

Thèse de Doctorat

Erika Patricia CLAVIJO RIVERA

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Sciences pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture

Discipline : Sciences pour l'ingénieur

Spécialité : Génie des Procédés

Unité de recherche : GEPEA, Génie des procédés – Environnement – Agroalimentaire – UMR CNRS 6144

Soutenue le 19 décembre 2017

Etude physicochimique du comportement d'une solution synthétique d'un broyat de microalgues et de la séparation par procédés membranaires des lipides qu'il contient

JURY

Président : Murielle RABILLER-BAUDRY, Professeur, Université de Rennes 1

Rapporteurs : Romain KAPEL, Maître de conférences, Université de Lorraine
Véronique VIE, Maître de conférences, Université de Rennes 1

Examineurs : Jack LEGRAND, Professeur, Université de Nantes
Alain RIAUBLANC, Chargé de Recherche INRA, Laboratoire BIA

Directeur de Thèse : Patrick BOURSEAU, Professeur, Université de Bretagne Sud
Co-directrice de Thèse : Cécile MONTEUX, Chargée de Recherche CNRS, ESPCI
Co-encadrante de Thèse : Estelle COUALLIER, Chargée de Recherche CNRS, GEPEA

A ma mère, à Cami et à mon ange !

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto...”

“Merci à la vie, qui m’a tant donné...”

Violeta Parra

Remerciements

Je voudrais initialement remercier la mission interdisciplinaire Energie du CNRS et l'INSIS qui ont financé cette thèse. A Jack Legrand et Pascal Jaouen, ancien et actuel directeur du laboratoire de Génie des procédés – environnement – agro-alimentaire (GEPEA) pour m'avoir accueillie au sein de leur institution.

Je remercie également les rapporteurs Romain Kapel, Véronique Vie ; ainsi que les examinateurs Murielle Rabiller-Baudry, Jack Legrand, Alain Riaubanc et tous les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. A Patrick Bourseau, directeur de thèse je le remercie pour ses conseils, son suivi pendant toute la durée de mon doctorat ainsi que pour tout le soin qu'il a apporté pour améliorer ce manuscrit. A Cécile Monteux un grand merci pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour ses apports et conseils très importants sur la partie expérimentale dédiée aux phénomènes d'interfaces.

Je tiens très spécialement à remercier mes encadrants Estelle Couallier et Matthieu Frappart pour la confiance qu'ils m'ont accordée, pour leur temps, leur disponibilité sans limite et pour tout leur soutien pendant ces trois ans. L'aboutissement de ce travail n'aurait été pas possible sans leur aide, leurs apprentissages et leur confiance. Un grand merci pour tout ce que vous m'avez appris sur le plan professionnel comme personnel, pour ne jamais cesser de croire en moi et surtout pour votre amitié !

A tous les membres de l'équipe BIA de l'INRA de Nantes, Marc Anton, Alain Riaubanc un grand merci pour me permettre de travailler avec vous et pour mettre à ma disposition leurs équipements pour la réalisation d'une grande partie de mon travail expérimental. A Alain Riaubanc, Claude Génot et Marie Hélène, je voudrais les remercier pour leurs conseils très importants qui ont aidé à l'orientation de ce projet dans des moments critiques. A Michèle, Elisabeth, Valérie et Anne, je les remercie énormément pour toute leur gentillesse, pour me faire toujours sentir faire partie des leurs, pour les moments partagés, leurs conseils professionnels et personnels, les cafés, pour m'aider tant de fois, pour leur disponibilité illimitée et leur bienveillance. Merci pour votre amitié sincère.

A tous les membres du GEPEA, chercheurs et techniciens et spécialement à Frank, Emmanuel, Candice et Delphine pour leur intervention directe dans les ordinateurs, les pilotes de filtration et les analyses de lipides. A Raphaëlle et à Laurence parce que leur gentillesse et leurs sourires ne les abandonnent jamais. A Caroline Gentric, Walid Bled, Nour-Edine Sabiri, Agnès Montillet, Catherine Dupré, Anthony Masse pour leur gentillesse, leur sourire permanents et pour être bienveillants envers moi. A tous les nombreux stagiaires, doctorants, post-doctorants et ATER que

j'ai rencontrés au GEPEA, Caroline, Meriem, Ayuni, Astrid, Antoine, Brieuc, Emilie, Arnaud, Rémy C., et Rémy N., Alexandra, Guillaume, Armel, Philipe, Eglantine, Aumaya, Mbalo, Valeria, Nicolas, Sita, Iman, Imma, Jeremy, Jordan, Maeva, Antoine, Marie, Florence, Camille, pour les bons moments partagés ensemble et pour faire du laboratoire un endroit de partage de connaissance et de soutien.

A mes amis du cœur Wenli, Jian et Tian, Meriem, Fernando, Sean, Momo, Kabayi, Adeline, Karine, Baharé, Vladimir et à mes ananas Dounia, Lisa, Lili, Myriam, Antoinette, Charlène, Rosita, Shuli qui ont construit les meilleurs souvenirs que je garderai de ces trois ans, je n'ai pas de mots pour les remercier pour leur amitié et pour leur dire à quel point leur soutien a été important pour moi. Les liens si forts que nous avons construits ensemble nous les garderons pour toujours ! A Celia, Matthy, Melissa et Khaoula qui n'ont jamais cessé de m'encourager.

A ma famille qui m'a toujours soutenu dans tous mes projets et mes envies. Toutes ces personnes qui depuis longtemps ont cru en moi et qui m'ont aidée à construire ce que je suis aujourd'hui. A Susana pour son amour et pour tout son soutien, pour nous montrer ce qu'est le courage et le sacrifice. A KT, Juani et Avril, Lili, Juanpi, Camilo D.P., Lau, Amparo, Sebas, Paolita, Jose, Emma, Andreita, Cata, Tony, Bella, Nata et à mon petit ange Carlitos, merci pour leur amour inconditionnel. A ma mère, à qui je dois tout, pour m'apprendre les choses importantes de la vie, pour faire tout ce qu'il fallait pour que je sois là aujourd'hui, pour tous ses conseils et son amour. A Camilo, pour tout son soutien, ses conseils scientifiques, pour son aide sans mesure pendant la période de rédaction et surtout pour remplir ma vie de joie et d'amour.

A vous tous un grand merci !

Production scientifique

Publications

E. Clavijo Rivera, V. Montalescot, M. Viau, D. Drouin, P. Bourseau, M. Frappart, C. Monteux, E. Couallier. Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: Impact on lipid fraction composition. *Bioresource Technology*. Volume 256, May 2018, Pages 77-85.

Communications orales

- Understanding microalgae lipids recovery by membrane processes: cross flow filtration of a representative synthetic mixture (o/w emulsion). 10th World Congress of Chemical Engineering WCCE. **E. Clavijo Rivera E.**, Villafaña Lopéz L., S. Liu, P. Bourseau, M. Frappart, C. Monteux, E. Couallier. 1-5 octobre 2017.
- Characterization of lipids produced by *Parachlorella kessleri*, cultured under nitrogen starving conditions. RRB-12: 12th international Conference on Renewable Resources and Biorefineries. Gand - Belgique. **E. Clavijo Rivera**, V. Montalescot, M. Viau, D. Kucma, P. Bourseau, M. Frappart, C. Monteux, E. Couallier. Communication orale. 30 may - 1 Juin 2016.
- Characterization of the lipid fraction of ground stressed *Parachlorella kessleri*. Formulation of a representative synthetic mixture. Conférence OCEANEXT. Nantes - France. **E. Clavijo Rivera**, V. Montalescot, M. Viau, D. Kucma, P. Bourseau, M. Frappart, C. Monteux, E. Couallier. Communication orale. 08-10 Juin 2016.
- Etude physicochimique du comportement d'une solution modèle d'un broyat de microalgues et de la séparation par procédés membranaires de ses lipides. Séminaire annuel laboratoire GEPEA. **E. Clavijo Rivera**, P. Bourseau, M. Frappart, C. Monteux, E. Couallier. (juin 2015)

Posters et Flash Posters

- Characterization of the fouling of an ultrafiltration polyethersulfone membrane fouled by an emulsion modelling lipids issued from Microalgae. 11th International Congress on Membranes and Membrane Processes Conference information (ICOM 2017). V. Drevet, S. Liu, E. Clavijo Rivera, L. Villafaña López, M. Frappart, E. Couallier, A. Szymczyk, M. Rabiller-Baudry. 29 juillet - 4 Août 2017. San Francisco - Etats Unis.

- Filtration d'une émulsion représentative d'un extrait de microalgues pour la concentration des lipides : choix de membrane et caractérisation du colmatage. **E. Clavijo Rivera**, L. Villafañá López, S. Liu, V. Drevet, P. Bourseau, A. Szymczyk, M. Rabiller Baudry, M. Frappart, E. Couallier. Poster and flash Poster. Congrès MEMPRO 6. Intégration des membranes dans les procédés. Saint Malo - France. 07-09 Juin 2017.
- Filtration d'une émulsion représentative d'un extrait de microalgues pour la concentration des lipides : Comparaison des filtrations dynamique et tangentielle. L. Villafañá-López, S. Liu, E. Clavijo Rivera, P. Bourseau, E. Couallier, M. Frappart. Congrès MEMPRO 6. Saint Malo - France. 07-09 Juin 2017.
- Fractionation of biomolecules from microalgae: characterisation of membranes fouled by lipids. International Conference on Membranes in Drinking and Industrial Water Production MDIW 2017. S. Liu, V. Drevet, E. Clavijo Rivera, L. Villafañá López, M. Frappart, M. Rabiller Baudry, E. Couallier, A. Szymczyk. 6-8 Février, 2017.
- Caractérisation physicochimique d'une solution synthétique représentative d'un broyat de microalgues riches en lipides et étude de son fractionnement par procédés membranaires. CFM- Club Français de Membranes. Journée de doctorants. **E. Clavijo Rivera**, V. Montalescot, M. Viau, D. Kuckma, P. Bourseau, C. Monteux, M. Frappart, E. Couallier. Poster et Flash Poster. Paris - France. 07 Avril 2016.

Table des matières

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
I.1. INTRODUCTION	6
I.2. LIPIDES DE MICROALGUES.....	6
I.2.1. <i>Lipides neutres des microalgues.....</i>	7
I.2.2. <i>Lipides polaires des microalgues.....</i>	9
I.2.3. <i>Lipides destinés à la formulation de mélanges synthétiques</i>	10
I.2.3.1. Lipides neutres des huiles végétales.....	10
I.2.3.2. Lipides polaires et tensioactifs	11
I.3. PHENOMENES D'INTERFACE	16
I.3.1. <i>Généralités sur les phénomènes d'interface</i>	16
I.3.1.1. La tension interfaciale.....	16
I.3.1.2. Les tensioactifs	17
I.3.1.3. Isothermes d'adsorption	19
I.3.1.4. Films de Langmuir et isothermes de compression	22
I.3.2. <i>Lipides aux interfaces liquide-gaz (L-G) et liquide-liquide (L-L)</i>	26
I.3.2.1. Lipides aux interfaces liquide-gaz (L-G).....	26
I.3.2.1. Lipides aux interfaces liquide-liquide (L-L).....	27
I.3.3. <i>Méthodes de mesure de la tension interfaciale</i>	29
I.3.3.1. Goutte Pendante	32
I.3.3.2. Balance de Langmuir	35
I.3.4. <i>Emulsions.....</i>	37
I.3.4.1. Stabilité et mécanismes de déstabilisation des émulsions	37
I.3.4.2. Procédé d'émulsification.....	39
I.4. FILTRATION MEMBRANAIRE.....	42
I.4.1. <i>Introduction</i>	42
I.4.2. <i>Définition des paramètres importants.....</i>	43
I.4.2.1. Types de procédés membranaires	44
I.4.2.2. Facteurs influençant le flux de perméat	45
I.4.2.3. Mode de filtration discontinue (batch)	51
I.4.2.4. Matériaux membranaires	54
I.4.2.5. Géométrie des membranes et des modules membranaires	55
I.4.3. <i>La filtration membranaire dans le bioraffinage de microalgues.....</i>	57
I.4.4. <i>Application de la filtration membranaire à la séparation huile/eau</i>	60

1.4.5. Sélection des membranes pour cette étude	64
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES.....	67
II.1. INTRODUCTION	68
II.2. OBTENTION DE LA SOLUTION SYNTHETIQUE (EMULSION)	69
II.2.1. Caractérisation des échantillons de cultures de <i>Parachlorella kessleri</i>	69
II.2.1.1. Caractérisation des échantillons de <i>Parachlorella kessleri</i> , granulométrie et analyse des lipides	70
II.2.1.2. pH et Conductivité	70
II.2.2. Formulation de l'émulsion et produits utilisés.....	71
II.2.3. Obtention de l'émulsion	72
II.2.4. Granulométrie de l'émulsion	74
II.3. ANALYSE DES INTERFACES	75
II.3.1. Analyse de l'interface huile/eau par la méthode de la goutte pendante.....	76
II.3.1.1. Systèmes étudiés	76
II.3.1.2. Purification des huiles végétales	77
II.3.1.3. Préparation des phases.....	77
II.3.1.4. Mesure de la masse volumique.....	77
II.3.1.5. Dynamique d'adsorption et tension interfaciale à l'équilibre	78
II.3.2. Analyse de l'interface air/eau par balance de Langmuir	78
II.3.2.1. Détermination des isothermes de compression en balance de Langmuir	78
II.3.2.2. Prélèvements des films de tensioactifs sur lame de mica pour l'analyse en Microscopie à Force Atomique (AFM)	80
II.3.2.3. Analyse des films des tensioactifs en AFM	80
II.4. FILTRATION MEMBRANAIRE DE L'EMULSION	81
II.4.1. Solution d'alimentation	81
II.4.2. Membranes utilisées et expériences réalisées.....	81
II.4.3. Pilote de filtration tangentielle.....	82
II.4.4. Mesure du flux de perméat.....	84
II.4.5. Conditionnement de la membrane	85
II.4.6. Détermination de la perméabilité à l'eau.....	86
II.4.7. Variation du flux en fonction de la pression transmembranaire PTM. Définition de la pression de travail P_w	87
II.4.8. Concentration de l'émulsion	88
II.4.9. Calcul de la réduction relative de flux RFR.....	88
II.4.10. Nettoyage des membranes	89

II.4.11. Calcul de résistances.....	90
II.4.12. Bilan de matière. Calcul de la quantité d'huile restant dans le système et sur la membrane.....	91
II.4.13. Suivi des caractéristiques de l'émulsion pendant la filtration.....	93
II.4.13.1. Granulométrie de l'émulsion	93
II.4.13.2. pH et Conductivité	93
II.4.13.3. Matière sèche	93

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LA CARACTERISATION DES BROYATS DES MICROALGUES. DEFINITION D'UNE SOLUTION SYNTHETIQUE REPRESENTATIVE..... 95

III.1. INTRODUCTION	96
III.2. MECHANICAL CELL DISRUPTION OF <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> MICROALGAE: IMPACT ON LIPID FRACTION COMPOSITION.....	97
III.2.1. Introduction	97
III.2.1.1. Microalgal lipids and cell disruption methods.....	98
III.2.1.2. Lipid profiles from microalgae	99
III.2.2. Materials and methods.....	102
III.2.2.1. Microalgae strain and culture	102
III.2.2.2. Cell disruption and centrifugation	103
III.2.2.3. Analyzed samples.....	104
III.2.2.4. Granulometry.....	104
III.2.2.5. Chemical analyses	104
III.2.2.6. Lipid classes analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) ...	107
III.2.2.7. Lipid classes analysis by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) 109	
III.2.3. Results and Discussion.....	110
III.2.3.1. General characteristics of cultures: total lipid content (TL)	110
III.2.3.2. Particle size distribution	112
III.2.3.3. Fatty acids (FA) profile of the total lipids extract.....	114
III.2.3.4. SPE separation of lipids in TAG, ONL, GL and PL classes.....	117
III.2.3.5. Fatty acid composition of lipid classes.....	119
III.2.3.6. Neutral lipids analysis by HPLC	120
III.2.3.7. Polar lipids analysis by HPTLC	121
III.2.4. Conclusion	123
III.3. DEFINITION DE LA SOLUTION SYNTHETIQUE	124
III.3.1. Sélection de la composition de la phase lipidique	124

III.3.1.1. Sélection des huiles végétales	124
III.3.1.2. Sélection des tensioactifs	128
III.3.2. Caractéristiques de l'émulsion et formulation	129
III.3.3. Conclusions sur la caractérisation des broyats de microalgues et la définition d'une solution synthétique représentative.....	130

CHAPITRE IV.RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LA CARACTERISATION DES INTERFACES

133

IV.1. INTRODUCTION	134
IV.2. ANALYSE DE L'INTERFACE HUILE/EAU PAR LA METHODE DE LA GOUTTE PENDANTE.....	135
IV.2.1. Influence de la pureté des huiles végétales.....	135
IV.2.2. Etude du comportement de la phosphatidylcholine PC-90G à l'interface huile/eau.....	136
IV.2.3. Etude du comportement du MTNL à l'interface huile/eau	138
IV.2.4. Etude du comportement des mélanges PC90G et MTNL à l'interface huile/eau	140
IV.3. ANALYSE DE L'INTERFACE AIR/EAU PAR BALANCE DE LANGMUIR.....	143
IV.3.1. Etude du comportement de la PC-90G à l'interface air/eau	144
IV.3.2. Etude du comportement du MTN à l'interface air/eau	148
IV.3.3. Etude du comportement des mélanges PC90G et MTNL à l'interface air/eau.....	152
IV.3.3.1. Isothermes de compression des mélanges de PC90G et MTNL	152
IV.3.3.2. Comparaison des isothermes de compression des mélanges et des produits purs	155
IV.3.3.3. Evolution de l'aire moyenne par molécule dans les films des mélanges	156
IV.3.3.4. Analyse de miscibilité : interactions entre MTNL et PC90G	157
IV.3.3.5. Collapse des films pendant la compression	160
IV.3.3.6. Compressibilité des films interfaciaux.....	160
IV.3.4. Comparaison des résultats de goutte pendante et de balance de Langmuir.....	162
IV.4. CONCLUSIONS SUR LA CARACTERISATION DES INTERFACES.....	165

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSIONS SUR LA FILTRATION MEMBRANAIRE167

V.1. INTRODUCTION	168
V.2. COMPACTAGE ET PERMEABILITE A L'EAU $L_{P_{EAU}}$	168
V.3. SELECTION DES CONDITIONS OPERATOIRES	170
V.4. CONCENTRATION DE L'EMULSION	176
V.4.1. Granulométrie initiale de l'émulsion	176
V.4.2. Analyse des flux et du colmatage.....	178
V.4.3. Concentration de l'huile et taux de rétention.....	182
V.4.4. Effet de la filtration sur la distribution de taille des gouttelettes d'huile.....	185

V.4.5. Bilan matière. Détermination de la quantité d'huile restant dans le système et dans la membrane	192
V.5. ÉVALUATION DE L'EFFICACITE DU NETTOYAGE.....	194
V.6. ÉVALUATION DES RESISTANCES DUES AU COLMATAGE.....	196
V.7. SELECTION D'UNE MEMBRANE POUR LA SEPARATION DES LIPIDES DE L'EMULSION	199
V.8. CONCLUSIONS SUR LA FILTRATION MEMBRANAIRE	201
V.9. LIEN ENTRE PROCEDE DE FILTRATION ET INTERFACES	203
CONCLUSIONS GENERALES	209
PERSPECTIVES.....	212
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	213
ANNEXE I. CARACTERISATION DE L'EMULSION PAR GRANULOMETRIE LASER	225
ANNEXE II. DISTRIBUTION DE TAILLE DE PARTICULES.....	226
ANNEXE III. VARIATION DU FLUX DE PERMEAT (J) ET DU FLUX NORMALISE (J/JEAU) AVEC LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE (PTM) POUR PLUSIEURS ESSAIS DE FILTRATION DE L'EMULSION.....	227
ANNEXE IV. FLUX DE PERMEAT DE FILTRATION DE L'EMULSION COMPARE AU FLUX A L'EAU.....	229
ANNEXE V. FILTRATION DE L'EMULSION: J ET J/JEAU EN FONCTION DU TEMPS.....	232
ANNEXE VI. FILTRATION DE L'EMULSION: J EN FONCTION DU FRV.....	234
ANNEXE VII. SUIVI DU PH ET DE LA CONDUCTIVITE PENDANT LA FILTRATION	235
ANNEXE VIII. ANALYSE DE LA FRACTION TAG DE L'ECHANTILLON HPD85 (B3)	236

Liste des figures

Figure 1. Phénomènes probables présentés par les gouttelettes des lipides d'une émulsion lors de sa concentration par filtration membranaire.....	2
Figure 2. Exemples de lipides des différentes familles. R, R' = résidus d'acides gras	7
Figure 3. Profil des acides gras totaux de plusieurs souches de microalgues en phase stationnaire de croissance.....	8
Figure 4. Schéma d'un corps huileux entouré par une couche de phospholipides et de protéines.	9
Figure 5. Profil des acides gras totaux de quelques huiles végétales	11
Figure 6. Diagramme binaire de phases lécithine (œuf 1 et soja 2) - eau).....	13
Figure 7. Structure du octyl glucopyranoside.....	14
Figure 8. Distribution des forces au sein et à la surface d'un liquide en contact avec de l'air.....	17
Figure 9. Organisation de molécules de tensioactifs en micelles	19
Figure 10. Isotherme d'adsorption typique d'un tensioactif sur une interface.....	20
Figure 11. Identification des phases dans une isotherme de compression	22
Figure 12. Mécanismes de collapse des monocouches de lipides.....	25
Figure 13. Organisation probable des molécules dans une monocouche mixte.....	25
Figure 14. Formation de multicouches aux interfaces L-G et L-L.....	28
Figure 15. Goutte pendante d'eau dans l'huile	32
Figure 16. a) Système de coordonnées pour une goutte pendante. b) Rayons R_1 et R_2 sur un point S d'une surface convexe.....	33
Figure 17. Obtention d'une isotherme de compression avec la balance de Langmuir	36
Figure 18. Dépôt d'une monocouche par la méthode de Langmuir-Blodgett	37
Figure 19. Mécanismes de déstabilisation des émulsions.....	38
Figure 20. Schéma du principe de la filtration membranaire.....	43
Figure 21. Variation du flux de perméat (J) en fonction de la pression transmembranaire (PTM).....	48
Figure 22. Filtration membranaire en mode discontinue.....	51
Figure 23. Les membranes dans le bioraffinage de microalgues (Adaptée de Gerardo et al., 2014)	58
Figure 24. Stratégie expérimentale du travail de recherche	69
Figure 25. Formulation de la solution synthétique représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues	71
Figure 26. Protocole d'obtention d'une solution synthétique représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues.....	74
Figure 27. Module plan Rayflow	83
Figure 28. Montage de filtration membranaire utilisé pour l'étude	84
Figure 29. Filtration en (a) mode concentration (recyclage du rétentat) et en (b) mode recyclage total (recyclage du rétentat et du perméat).....	86

Figure 30. Diminution du flux de perméat pendant l'étape de compactage d'une membrane PVDF 0,4 μm à 30°C, 1 m.s^{-1} de vitesse tangentielle et à pression constante	86
Figure 31. Flux à l'eau initial à l'eau d'une membrane PAN 500 kDa mesurée à 30°C et à une vitesse tangentielle de 1 m.s^{-1}	87
Figure 32. Synthesis of the different characterization methods used for the determination of lipids profile from <i>Parachlorella kessleri</i> samples.....	110
Figure 33. Total lipids content of samples from different cultures of nitrogen starved <i>Parachlorella kessleri</i>	111
Figure 34. Volume particle size distribution of samples from cultures a) B1 and b) B3 of nitrogen starved <i>Parachlorella kessleri</i>	113
Figure 35. Major fatty acids composition of samples from different cultures of nitrogen starved <i>Parachlorella kessleri</i>	115
Figure 36. Comparison of lipids classes profile for samples B3	117
Figure 37. a) HPLC profiles of TAG fraction from samples of B3. b) Probable TAG molecules from sample HPD100 of batch B2 compared to vegetable oils.....	120
Figure 38. Polar lipids profile of B3 and B4 samples.....	122
Figure 39. Comparaison des profils des acides gras totaux majoritaires des huiles végétales présélectionnées et d'un surnageant d'un broyat de <i>Parachlorella kessleri</i> carencée	125
Figure 40. Profil des TAG de l'huile d'avocat.....	127
Figure 41. Profil des TAG de l'huile de cameline.....	127
Figure 42. Comparaison des profils de TAG du mélange des huiles 30% Avocat-70% Cameline aux échantillons du Batch 3.....	128
Figure 43. Cinétiques d'adsorption de la PC90G à différentes concentrations dans un système eau-huile et 20°C.....	137
Figure 44. Cinétiques d'adsorption du MTNL à différentes concentrations et 20°C	139
Figure 45. Variation de la tension interfaciale en fonction de la concentration de PC90G, de MTNL et de leur mélange 50/50 % w/w à 20°C	141
Figure 46. Comparaison des dynamiques d'adsorption des mélanges de PC90G+MTNL avec les produits seuls	142
Figure 47. Isothermes de compression du film de DPPC à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée de pH=7.4. a) DPPC pur. b) Comparaison de DPPC face à PC90G.....	145
Figure 48. Isothermes de compression de films de PC90G à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4 pour 5 essais (a) à (f) effectués dans des conditions identiques.....	146
Figure 49. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux de la PC90G formés à l'interface air-eau à différentes pressions d'interface.	148
Figure 50. Isothermes de compression de films de MTNL à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4 pour 4 essais (a) à (f) effectués dans des conditions identiques.....	149
Figure 51. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux du MTNL formés à l'interface air-eau à 25 mN.m^{-1}	151

Figure 52. Isothermes de compression de films des mélanges PC90G+MTNL à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4.....	153
Figure 53. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux du mélange PC90G/MTNL 50/50 %w formés à l'interface air-eau à 25 mN.m ⁻¹	154
Figure 54. Isothermes de compression de films de PC90G et MTNL et leurs mélanges à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4.....	155
Figure 55. Aire limite par molécule des différents systèmes étudiés A ₀ : début de l'augmentation de pression ; A _c : début de la phase de liquide condensé.	157
Figure 56. Diagrammes aire moléculaire – composition à 10, 15, 25 mN.m ⁻¹ , pour les monocouches de PC90G, MTNL et leurs mélanges à 20°C sur un tampon de pH=7,4.....	158
Figure 57. Comparaison de Cs (compressibilité) des monocouches des surfactants seuls et en mélange.....	161
Figure 58. Courbes de variation du flux de perméat avec la pression transmembranaire établies pour la détermination des conditions critiques pour la filtration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle pour différentes membranes.....	171
Figure 59. Comparaison du flux à l'eau (J _{eau}) et du flux de perméat (J) lors de la filtration de l'émulsion pour une membrane PAN 500 kDa à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	174
Figure 60. Flux de perméat normalisé (J/J _{eau}) de la filtration de l'émulsion pour les membranes testées à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	174
Figure 61. Distributions granulométriques initiales en volume de plusieurs émulsions avant filtration, obtenues par microscopie + analyse d'image.	176
Figure 62. Distribution granulométrique initiale en volume d'une émulsion typique avant filtration, obtenue par granulométrie laser.	178
Figure 63. Evolution dans le temps du flux de perméat pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	179
Figure 64. Évolution dans le temps du flux de perméat normalisé (J/J _{eau}) pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	179
Figure 65. Evolution du flux de perméat avec le facteur de réduction volumique FRV pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	182
Figure 66. Variation du logarithme du facteur de concentration d'huile en fonction du logarithme du facteur de réduction volumique.....	184
Figure 67. Observation microscopique des gouttelettes de lipides d'une émulsion avant filtration. Membrane PVDF 1,5 µm (5).	186
Figure 68. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PES 200 kDa (1).....	187
Figure 69. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PES 300 kDa (3).....	187
Figure 70. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PAN 500 kDa (5).....	188
Figure 71. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 0,4 µm (10).....	188

Figure 72. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 μm (13).....	189
Figure 73. Evolution des Dv50 normalisés des gouttelettes du rétentat avec le facteur de réduction volumique FRV lors de la concentration de l'émulsion.....	189
Figure 74. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du perméat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 μm (13).....	192
Figure 75. Résistances totale, réversible et irréversible de quelques membranes à FRV=2.....	197
Figure 76. Évolution de la résistance totale R_{tot} au cours de la concentration de l'émulsion.....	199
Figure 77. Représentation d'une gouttelette d'huile soumise à un cisaillement ou un écrasement aux abords de la membrane pendant la filtration.....	206
Figure 78. Variation du flux de perméat (J) (gauche) et du flux normalisé (J/Jeau) (droite) avec la pression transmembranaire (PTM) pour des essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PES 200 kDa, (c) (d) PES 300 kDa, (e) (f) PAN 500 kDa, (g) (h) PVDF 0,4 μm et (i) (j) PVDF 1,5 μm	228
Figure 79. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PES 200 kDa.....	229
Figure 80. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PES 300 kDa.....	229
Figure 81. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PAN 500 kDa.....	230
Figure 82. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PVDF 0,4 μm	231
Figure 83. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes en PVDF 1,5 μm	231
Figure 84. Flux de perméat et flux normalisé en fonction du temps pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PES 200 kDa, (c) (d) PES 300 kDa, (e) (f) PAN 500 kDa	232
Figure 85. Flux de perméat et flux normalisé en fonction du temps pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PVDF 0,4 μm , (c) (d) PVDF 1,5 μm	233
Figure 86. Flux de perméat en fonction du FRV pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) PES 200 kDa, (b) PES 300 kDa, (c) PAN 500 kDa, (d) PVDF 0,4 μm et (e) PVDF 1,5 μm	234
Figure 87. Probable TAG composition of HPD85 (B3) sample. Results from HPLC and Maldi TOF analysis..	237

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition de quelques huiles végétales.....	10
Tableau 2. Produits industriels à base de lipides polaires utilisés dans la formulation des émulsions.....	12
Tableau 3. Principales méthodes de caractérisation des interfaces L-L et L-G.....	30
Tableau 4. Comparaison de différents dispositifs d'émulsification.....	40
Tableau 5. Classification des procédés baromembranaires.....	44
Tableau 6. Caractéristiques des matériaux membranaires.....	54
Tableau 7. Caractéristiques principales des différents modules membranaires.....	56
Tableau 8. Exemples d'application de la filtration membranaire pour le traitement d'émulsions.....	61
Tableau 9. Matériaux et seuil de coupure des membranes sélectionnées pour l'étude.....	65
Tableau 10. Caractéristiques des produits tensioactifs utilisés dans la formulation de l'émulsion.....	72
Tableau 11. Caractéristiques des membranes testées.....	82
Table 12. Lipid classes composition for different microalgae.....	100
Table 13. Synthesis of analyzed samples from the different batches.....	104
Table 14. Peaks characterizing the size distributions of intact cells IC, grinded samples by HPD and BM and supernatants samples.....	113
Table 15. Total fatty acids composition of intact cells, grinded cells by BM or HPD and supernatant samples from nitrogen starved <i>Parachlorella kessleri</i>	116
Table 16. Lipid classes profile of nitrogen starved <i>Parachlorella kessleri</i> (% w/w of total lipids).....	117
Table 17. Mass of TAG, ONL and polar lipids from batch 3, according to the total lipid content and the relative mass.....	118
Table 18. Fatty acids profile of lipid classes for intact cells IC, grinded sample HPD85 and supernatant Sup.HPD85 from batch B3 (relative %).....	119
Tableau 19. Pourcentages relatifs des acides gras majoritaires d'un surnageant de broyat comparés à ceux des huiles d'avocat, de cameline et d'un mélange avocat/cameline 30/70 %w.....	126
Tableau 20. Caractéristiques souhaitées de l'émulsion.....	130
Tableau 21. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations de PC90G.....	136
Tableau 22. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations de MTNL.....	138
Tableau 23. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations des mélanges PC90G/MTNL (50/50 % w/w).....	140
Tableau 24. Expériences réalisées en balance de Langmuir.....	144
Tableau 25. Temps de compactage et perméabilités à l'eau L _{eau} après compactage, à 30 °C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	169
Tableau 26. Conditions de pression et de flux critiques (estimées) et maximales des membranes testées pour la filtration de l'émulsion à 30°C et 1 m.s ⁻¹ de vitesse tangentielle.....	172
Tableau 27. Granulométries de départ des émulsions concentrées pour plusieurs essais, déterminées par microscopie couplé à analyse d'image.....	177

<i>Tableau 28. Flux initiaux de perméat Ji lors de la concentration de l'émulsion et flux initiaux normalisés Ji/Jeau des membranes testés</i>	<i>179</i>
<i>Tableau 29. Variation du pourcentage de matière sèche M.S. et du pourcentage d'huile dans le rétentat avec le facteur de réduction volumique FRV.....</i>	<i>183</i>
<i>Tableau 30. Variation du pourcentage de matière sèche M.S. et du pourcentage d'huile dans le perméat avec le facteur de réduction volumique FRV.....</i>	<i>183</i>
<i>Tableau 31. Taux de rétention TR et pourcentage d'huile retenu dans le système après filtration</i>	<i>185</i>
<i>Tableau 32. Diamètres Dv10, Dv50 et Dv90 caractérisant les distributions en volume des gouttelettes des lipides dans le rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour une sélection de membranes.....</i>	<i>190</i>
<i>Tableau 33. Diamètres Dv10, Dv50 et Dv90 caractérisant les distributions en volume des gouttelettes de lipides dans le perméat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 µm</i>	<i>191</i>
<i>Tableau 34. Quantité d'huile perdue dans le système après concentration de l'émulsion à un FRV=2</i>	<i>193</i>
<i>Tableau 35. Perméabilités à l'eau avant et après nettoyage à 30 °C et 1 m⁻¹.s⁻¹ de vitesse tangentielle. Récupération de la perméabilité à l'eau après filtration de l'émulsion FRR</i>	<i>195</i>
<i>Tableau 36. Résistances totale Rtot, réversible Rrev, irréversible Rirr, et résistance du colmatage Rf de quelques membranes à FRV=2.....</i>	<i>197</i>
<i>Tableau 37. Tableau comparatif des performances des membranes testées pour la filtration de l'émulsion</i>	<i>200</i>
<i>Tableau 38. Évolution du pH et de la conductivité lors de la concentration de l'émulsion à 25°C.....</i>	<i>235</i>
<i>Tableau 39: Triacylglycerols identified in lipid extracts from nitrogen starved P.Kessleri (B3)</i>	<i>236</i>

Liste de symboles

Lettres romaines

A	Aire moléculaire	$\text{\AA}^2.\text{molecule}^{-1}$
c	Concentration au sein du fluide de la molécule adsorbée à l'interface	mol.L^{-1}
C_0	Concentration initiale de l'espèce à séparer	g.L^{-1}
C_P	Concentration de l'espèce à séparer dans le perméat	g.L^{-1}
C_R	Concentration de l'espèce à séparer dans le rétentat	g.L^{-1}
J	Flux volumique de perméat	$\text{m}^3.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ où $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$
J_{crit}	Flux critique	$\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$
J_{lim}	Flux limite	$\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$
FC	Facteur de concentration	-
FRR	Ratio de récupération de flux	-
FRV	Facteur de réduction volumique	-
k_B	Constante de Boltzmann	$\text{J.K}^{-1}.\text{molécule}^{-1}$
K	Constante d'équilibre d'adsorption	L.mol^{-1}
L_p	Perméabilité hydraulique de la membrane	$\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$
P_0	Pression d'alimentation	Pa ou bar
P_{crit}	Pression critique	bar
P_{max}	Pression maximale	bar
P_R	Pression du côté du rétentat	Pa ou bar
P_P	Pression du côté du perméat	Pa ou bar
P_w	Pression travail	Pa ou bar
PTM	Pression transmembranaire	Pa ou bar
ΔP_{eff}	Pression efficace	bar
Q_0	Débit du liquide circulant à l'entrée du module de filtration	$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$
Q_P	Débit volumique de perméat	$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$
R	Constante universelle des gaz parfaits	$\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
R_1, R_2	Rayons de courbure d'une goutte pendante	m
R_{ch}	Résistance due au colmatage réversible chimiquement	m^{-1}
R_{irr}	Résistance due au colmatage irréversible qui reste malgré le nettoyage	m^{-1}
R_f	Résistance globale de colmatage	m^{-1}

R_m	Résistance hydraulique de la membrane propre	m^{-1}
R_{pc}	Résistance due à la polarisation de concentration	m^{-1}
R_{ph}	Résistance due au colmatage réversible physiquement	m^{-1}
R_{rev}	Résistance due au colmatage réversible	m^{-1}
R_{tot}	Résistance totale à l'écoulement	m^{-1}
S	Surface de la membrane	m^2
S_{VL}	Section de la veine liquide	m^2
T	Température absolue	K
TR	Taux de rétention	-
V_0	Volume initial de la solution	mL
V_P	Volume du perméat	mL
V_R	Volume du rétentat	mL
V_{tan}	Vitesse tangentielle moyenne de circulation du fluide dans le module	$m.s^{-1}$

Lettres grecques

β	Paramètre de forme adimensionnelle caractéristique de la forme d'une goutte pendante	-
γ	Tension d'interface	$mN.m^{-1}$
γ_0	Tension d'interface d'un liquide pure (en absence du soluté)	$mN.m^{-1}$
Γ	Excès de surface	$mol.m^{-2}$
Γ_0	Nombre maximale de moles pouvant être adsorbées sur l'interface	$mol.m^{-2}$
$\Delta\rho$	Différence des masses volumiques des fluides	$g.cm^{-3}$
μ	Viscosité du perméat	Pa.s
Π	Pression interfaciale	$mN.m^{-1}$

Introduction

La culture et le bioraffinage de microalgues consistent à cultiver ces microorganismes et à récupérer et fractionner des composés de haute valeur ajoutée tels que les lipides (pour la production de biodiesel), les protéines, les polysaccharides et les antioxydants (chlorophylles, caroténoïdes) (Kleinegris et al., 2011). Dans le cas des lipides, certaines souches de microalgues pourraient produire jusqu'à 77 % w de la matière sèche (Chisti, 2008), parmi lesquels des lipides neutres comme les triglycérides (triacylglycerols, TAG) et les acides gras (fatty acids, FA) ou des lipides polaires comme les phospholipides et les glycolipides (composés principaux de la membrane cellulaire). L'extraction par voie «humide», c'est à dire sans passer par une étape énergivore de séchage de la biomasse avant l'extraction, est en plein essor (Jenck et al., 2011) et nécessite des procédés innovants, efficaces et non polluants. La filtration membranaire pour la concentration et la purification par voie humide des huiles produites par les microalgues est une voie d'avenir.

Au niveau technologique, des grandes avancées ont été faites sur l'étape de la culture cellulaire et sur la récolte, même si des approfondissements sont encore nécessaires. Mais la séparation et la purification des produits issus de ces microorganismes sont encore à l'état d'ébauche, raison pour laquelle des nombreuses questions continuent à se poser. Ce verrou demandera un très fort investissement dans les prochaines années, tant au niveau fondamental que du développement de procédés.

Le bioraffinage des microalgues nécessite le développement d'une cascade de procédés économes en énergie et suffisamment doux pour garantir l'intégrité des composés fragiles et la valorisation de toutes les fractions. La filtration membranaire est un procédé présentant de grands avantages pour la récupération de biomolécules après broyage. Ce sont des procédés de séparation qui ne nécessitent ni l'ajout de substances chimiques, ni de changements de phases énergivores (cristallisation ou évaporation). Il existe une ample gamme de matériaux, de seuils de coupure, de géométries et de modes d'opération qui donnent beaucoup de flexibilité à ce procédé et qui peuvent être adaptés aux particularités des solutions à traiter.

L'intégration des procédés membranaires dans cette cascade n'est pas triviale, étant donné la complexité des solutions à traiter qui peuvent contenir des fragments cellulaires, des particules et des gouttelettes de lipides, entre autres. Les deux verrous à la mise au point de procédés de filtration pour la séparation de l'huile d'une phase aqueuse issue d'un broyat de microalgues sont :
i) la compréhension de l'organisation des composés au sein du mélange complexe à fractionner et

ii) la compréhension des interactions entre le mélange complexe et le matériau membranaire, ainsi que leur impact sur les performances du procédé.

Dans ce contexte, le travail présenté ici concerne la filtration membranaire pour la récupération des lipides (triglycérides) dispersés dans un broyat de microalgues et la compréhension de l'organisation des composés au sein du mélange complexe à fractionner, plus particulièrement à l'interface huile/eau. Il a été soutenu par la mission interdisciplinaire Energie du CNRS dans le cadre du projet « Algues, Molécules, Territoires ».

Les interfaces entre l'eau, l'huile et la membrane jouent un rôle clé dans la séparation. Dans un broyat de microalgues ou un surnageant du broyat après centrifugation, les gouttelettes d'huile contenant principalement des triglycérides peuvent être stabilisées dans la phase aqueuse par des composés amphiphiles naturels tels que les acides gras libres, les phospholipides et glycolipides, les protéines etc., qui jouent le rôle de surfactants. Dans un tel mélange, les lipides se trouveraient dispersés dans l'eau comme dans une émulsion. Lors de la filtration membranaire de ce mélange complexe, les propriétés d'interface huile/eau et huile-eau-solide influencent le comportement des lipides au cours du procédé. Pendant la filtration, la phase huile dispersée sera concentrée et les gouttelettes pourront se déformer, coalescer ou réduire leur taille (Figure 1), ce à cause de la circulation du fluide à une vitesse importante dans le système de filtration et à cause des éventuels interactions entre les gouttelettes et la surface de la membrane. **La séparation de l'huile et la coalescence dépendent des propriétés de l'interface huile/eau.** Ces propriétés sont notamment la tension interfaciale statique (qui décrit l'énergie nécessaire à la création d'une surface plus grande) et de la tension interfaciale dynamique (qui permet de décrire les dynamiques d'adsorption et de désorption des tensioactifs à l'interface).

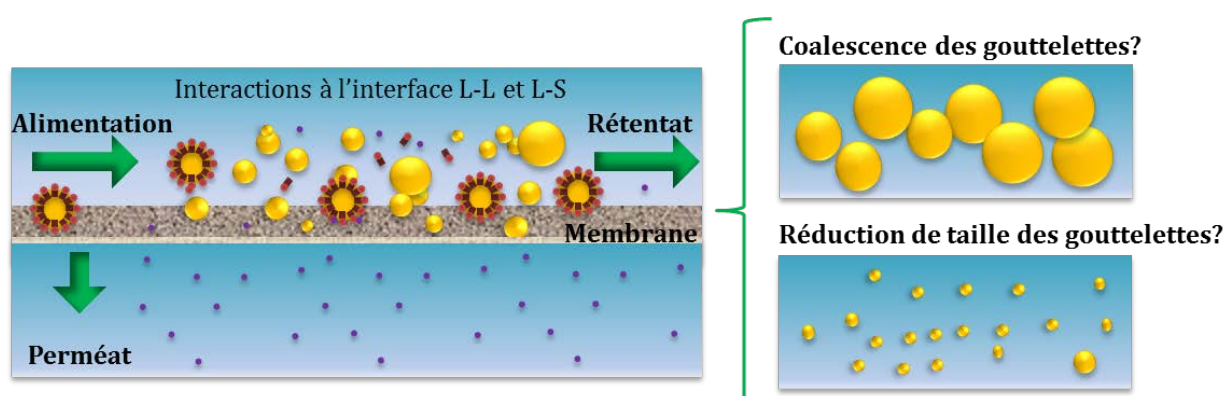


Figure 1. Phénomènes probables présentés par les gouttelettes des lipides d'une émulsion lors de sa concentration par filtration membranaire

En examinant les interactions à l'interface liquide-solide entre la solution filtrée et la membrane, quand une gouttelette d'huile rencontre la membrane, elle peut se coller ou être entraînée par la

phase continue. Les gouttelettes de lipides peuvent s'accumuler sur la membrane et former un gâteau ou un film suivant la stabilité de l'interface de la goutte et de son affinité avec la membrane. L'accumulation de matière sur la membrane (colmatage) crée une résistance à la perméation de la phase continue et donc influence l'efficacité du procédé membranaire (perméabilité, rétention, sélectivité, nettoyabilité). En plus, en fonction du mouillage de la membrane par l'huile et de la pression, les lipides peuvent pénétrer dans les pores de la membrane et se retrouver dans le perméat. Il apparaît clairement que les propriétés des interfaces liquide-liquide et liquide-solide impactent directement la filtration.

La mise en place d'une approche physicochimique d'étude des performances de la filtration membranaire pour la récupération des lipides issus des microalgues et la comparaison de différentes conditions de filtration nécessitent de travailler avec des mélanges de composition stable et maîtrisée, afin de pouvoir analyser les propriétés interfaciales. La culture de microalgues et leur broyage dans des conditions adaptées à la production de lipides est possible au GEPEA. Cependant, la production de fractions réelles issues de cultures fraîches, de composition stable et maîtrisée, reste difficile. Il est tout aussi difficile de caractériser dans ces mélanges réels les interfaces eau-huile. C'est pourquoi dans ce travail il a été choisi de formuler un mélange synthétique représentatif d'un extrait de microalgues, basé sur la caractérisation de produits réels.

Cette étude constitue la première étape d'un projet à long terme, visant à mettre en place une approche multi-échelle du fractionnement d'un broyat de microalgues dans le cadre d'une bioraffinerie de microalgues. Dans ce contexte, l'objectif principal du travail de recherche ici présenté est d'étudier la séparation membranaire de lipides produits par des microalgues à partir d'un mélange synthétique, ainsi que de comprendre les phénomènes physicochimiques qui peuvent intervenir à l'interface huile/eau lors de la séparation. L'étude comprend 3 parties: i) la caractérisation des lipides issus de cultures de microalgues et la définition du mélange synthétique, qui est une émulsion de lipides neutres et polaires dans l'eau ii) la caractérisation physicochimique de l'interface liquide-liquide (huile/eau) présente dans l'émulsion et iii) l'étude de la filtration membranaire de l'émulsion et du rôle des phénomènes interfaciaux sur ce procédé.

L'objectif de la première partie est de caractériser la fraction lipidique issue de la culture et du broyage de microalgues cultivées en condition de carence en azote pour favoriser la production de lipides, et de définir la composition des solutions synthétiques. Pour simplifier cette première étude, il a été choisi de représenter un surnageant issu de la centrifugation d'un broyat de microalgues, débarrassé des débris cellulaires mais contenant encore 40 % des lipides totaux produits par la microalgue. Le mélange synthétique est donc une émulsion d'huile dans l'eau H/E.

Seule la fraction lipidique des microalgues a été considérée (lipides polaires et apolaires). Les autres molécules d'intérêt constituant les microalgues (protéines, sucres, antioxydants, etc.) ne sont pas considérées dans ce travail.

L'objectif de la deuxième partie est d'étudier l'interface huile/eau présente dans l'émulsion. Le comportement des molécules amphiphiles (lipides polaires) a été étudié à l'interface huile/eau par la méthode de la goutte pendante. La tension interfaciale à l'équilibre et la dynamique d'adsorption de ces molécules amphiphiles à l'interface L-L ont ainsi été déterminées. Les propriétés interfaciales de ces composés amphiphiles en termes de pression interfaciale et de compressibilité ont été aussi étudiées à l'interface air/eau par la méthode de la balance de Langmuir. Cette analyse permet d'étudier l'organisation possible du film interfacial et sa stabilité à la compression (diminution de l'aire interfaciale) et pourrait donc fournir des informations importantes sur la réponse de l'interface huile/eau à ce type des perturbations pendant la filtration.

Finalement, la troisième partie du projet a pour objectif l'étude de la séparation des lipides de l'émulsion par des procédés membranaires. Les performances de plusieurs membranes hydrophobes et hydrophiles (polyéthersulfone PES, polyfluorure de vinylidène PVDF, polyacrylonitrile PAN) de micro et ultrafiltration ont été testées pour la concentration des lipides dans le rétentat. L'évolution de la taille de gouttelettes de lipides et l'apparition du phénomène de coalescence et de colmatage au cours de la filtration ont été analysés.

Ce document est divisé en 5 chapitres. Le **Chapitre I** est une synthèse bibliographique sur les trois parties au cœur de ce travail : la composition des microalgues, la caractérisation des interfaces huile/eau et la filtration membranaire appliquée à la récupération de lipides. Dans le **Chapitre II** les matériels et méthodes utilisés pour l'étude sont décrits. Le **Chapitre III** présente les résultats de la caractérisation d'un broyat de microalgues et la formulation d'une émulsion basée sur ces résultats. Le **Chapitre IV** concerne les résultats de l'étude du comportement des produits tensioactifs de l'émulsion aux interfaces huile/eau et air/eau. Le **Chapitre V** présente les résultats de la filtration membranaire de l'émulsion ainsi qu'un premier approche vers le lien entre les phénomènes d'interface et le procédé de filtration membranaire.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I.1. Introduction

Cette synthèse bibliographique est divisée en trois parties. Dans la première partie, les lipides produits par les microalgues sont présentés. Des huiles végétales et des produits commerciaux à base de lipides polaires, qui peuvent être utilisés dans la formulation de solutions synthétiques représentatives d'un surnageant du broyat de microalgues, seront aussi présentés. La deuxième partie de la bibliographie concerne les concepts de base sur les interfaces liquide-liquide (L-L) et liquide-gaz (L-G) et les principales techniques de caractérisation de ces interfaces seront présentées. Cette partie sera complétée par la présentation de concepts généraux sur les émulsions et sur les procédés d'émulsification. La troisième et dernière partie concerne les concepts fondamentaux de la filtration membranaire et l'application de ce procédé à la filtration des émulsions d'huile dans l'eau.

I.2. Lipides de microalgues

Grace à leur capacité de production et d'accumulation de lipides (principalement des triglycérides TAG), les microalgues ont été considérées depuis les années 1970 comme une source alternative pour la production de biodiesel (Sheehan et al., 1998). De nombreuses recherches ont été effectuées dans ce domaine, depuis la sélection des souches pour la production de lipides (Taleb, 2015), jusqu'à la désintégration cellulaire pour l'extraction de ces composés (Montalescot, 2015; Montalescot et al., 2015). Les industries alimentaires s'y intéressent également puisque ces huiles sont riches en acides gras essentiels à des niveaux comparables aux à ceux des huiles de poisson (Ryckebosch et al., 2014).

Certaines souches de microalgues ont une productivité d'huile très élevée, par exemple *Botryococcus braunii*, *Schizochytrium sp.*, *Nannochloropsis sp.* et *Parachlorella kessleri* peuvent contenir 25-75 %, 50-77 %, 31-68 %, 41-65 % w/w de lipides rapportés à leur matière sèche respectivement (Bigogno et al., 2002; Chisti, 2008; Montalescot, 2015; A. Taleb et al., 2015). La quantité de triglycérides (TAG) augmente si la culture est faite dans des conditions de stress. Par exemple, la souche *Parachlorella kessleri* peut augmenter sa productivité en triglycérides de 7 fois lorsqu'elle est cultivée en carence d'azote (Taleb et al., 2016).

Les microalgues produisent une grande variété de lipides ayant différentes fonctionnalités : composés structuraux des membranes, de réserve d'énergie et des métabolites. La caractérisation de ces lipides est largement reportée dans la littérature mais le profil lipidique varie avec la

souche, la phase de croissance et les conditions de culture. Ces lipides peuvent se regrouper en 2 grandes familles : i) les lipides neutres (LN) comprenant les triacylglycérides (TAG), les monoacylglycérides (MAG), les diacylglycérides (DAG) et les acides gras libres (AGL) et ii) les lipides polaires dont les glycolipides et les phospholipides font partie. La **Figure 2** présente des exemples de composés de ces familles.

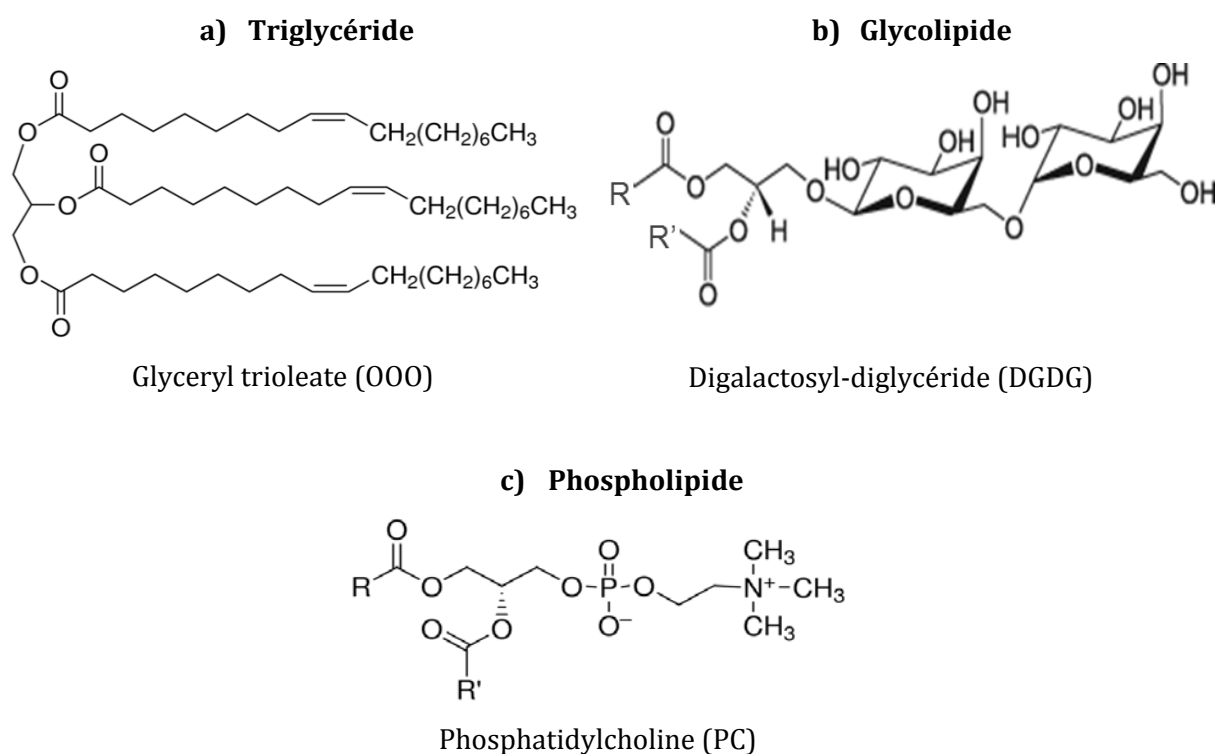


Figure 2. Exemples de lipides des différentes familles. R, R' = résidus d'acides gras. (Sigma-Aldrich ; Avanti Polar Lipids)

I.2.1. Lipides neutres des microalgues

Parmi les lipides neutres, les TAG sont le groupe de molécules produites en plus grande quantité par les microalgues (jusqu'à 80% de la fraction lipidique)(Becker, 1993). Par exemple, Chen et al., 2007, ont déterminé que dans la phase stationnaire de croissance, la souche *Nitzschia laevis*, produit 69.1% de TAG, ~8% de MAG et de ~2% de DAG. Le **Table 12** de l'article inclus dans le **Chapitre III**, présente plus d'exemples à ce propos. En général, les lipides produits par les microalgues sont constitués d'acides gras de chaînes carbonées contenant 12 à 22 atomes de carbone, avec des insaturations qui peuvent atteindre jusqu'à six doubles liaisons(Becker, 1993; Cohen, 1999).

Les acides gras sont souvent représentés par le nombre d'atomes de carbone et de doubles liaisons. Par exemple l'acide linoléique contenant 18 carbones et 2 doubles liaisons peut être écrit C18:2.

La nature des acides gras est très variable suivant les souches de microalgues. Ceci peut être observé dans la **Figure 3**. Dans les cas présentés les acides gras myristique C14:0, palmitique C16:0, palmitoléique C16:1n-7 et l'oléique C18:1n-9 se trouvent dans des quantités importantes. D'autres acides gras portant des polyinsaturations sont également produits dans des quantités importantes mais pas systématiquement par toutes les souches.

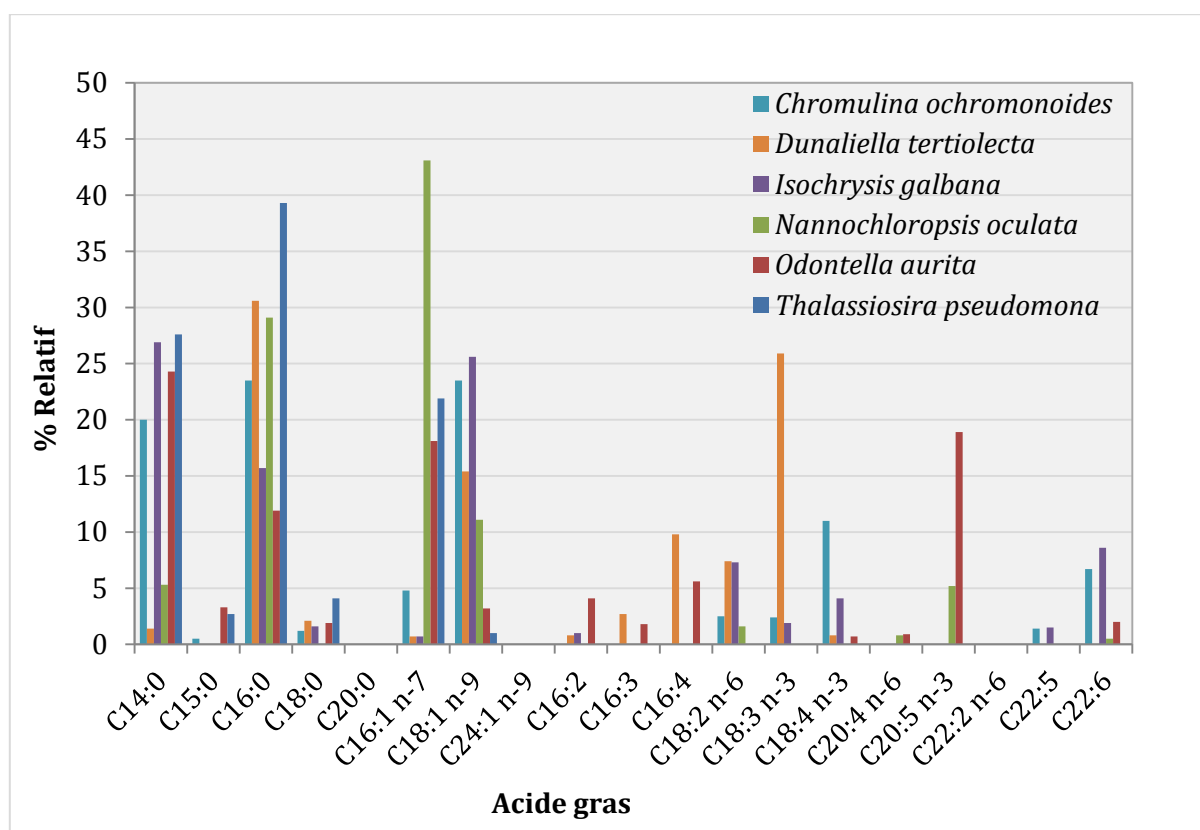


Figure 3. Profil des acides gras totaux de plusieurs souches de microalgues en phase stationnaire de croissance (Roleda et al., 2013)

Les lipides de réserve sont accumulés et stockés dans le cytoplasme de la cellule sous la forme de globules huileux constitués d'un cœur de lipides neutres entourés d'une monocouche de phospholipides. Cette dernière est stabilisée par des protéines structurales telles que les oléosines (**Figure 4**) et des molécules phytochimiques comme que les tocophérols (Jayasinghe et Gray, 2014). Ghislain et al., 2007, ont isolé des corps lipidiques de *Schizochytrium* de tailles entre 4,4 μm et 9,5 μm (diamètre moyen pour une distribution en surface).

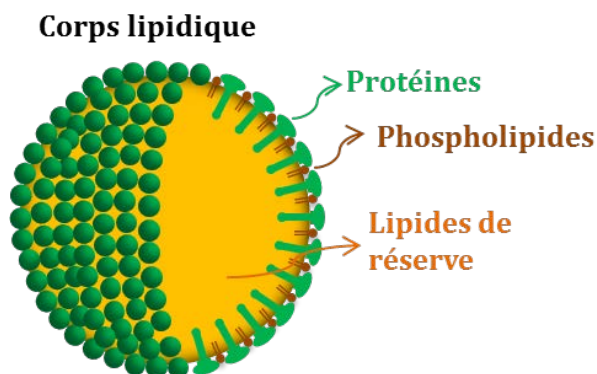


Figure 4. Schéma d'un corps huileux entouré par une couche de phospholipides et de protéines. Adapté de Qu et al., 2013.

I.2.2. Lipides polaires des microalgues

Parmi les glycolipides, les monogalactosyl-diglycérides MGDG, les digalactosyl-diglycérides DGDG sont présents en plus grandes quantités, puis les sulfoquinovosyl-diglycérides SQDG dans des quantités moins importantes (Alonso et al., 1998; Bigogno et al., 2002; Chen et al., 2007; Wang et Wang, 2012).

Parmi les phospholipides, la phosphatidylcholine PC, la phosphatidylethanolamine PE, le phosphatidyl-glycerol PG, le phosphatidylinositol PI (avec des chaînes d'acides gras riches en insaturations) (Siegenthaler et Murata, 2006) sont les substances les plus communes dans le cas de plusieurs souches de microalgues (Chen et al., 2007; Cohen, 1999). D'autres composés tels que le diphosphatidyl-glycerol DPG, la diacylglycériltriméthylhomosérine DGTS (un lipide à bétaine) et l'acide phosphatidique PA, peuvent se trouver dans cette fraction de lipides polaires (Bigogno et al., 2002; Chen et al., 2007).

La proportion des lipides polaires peut varier drastiquement avec les conditions de culture. Siaut et al., 2011 ont constaté pour la souche *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'une culture en carence en azote la diminution de la proportion de MGDG, DGDG et SQDG à plus de 80%. Par ailleurs, la présence dans des quantités importantes des AGL, de DAG, de PA et de lysophospholipides dans un échantillon de microalgue est un indice de la dégradation de ses lipides (Christie, 2009).

I.2.3. Lipides destinés à la formulation de mélanges synthétiques

I.2.3.1. Lipides neutres des huiles végétales

La composition des acides gras produits par des microalgues est dans certains cas proche de ceux de celle quelques huiles végétales (Becker, 1993). C'est pourquoi ces produits, ont été considérés dans ce travail pour la formulation de l'émulsion représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues.

Les huiles végétales sont principalement composées de lipides neutres, majoritairement des triglycérides, mais elles contiennent aussi naturellement des lipides polaires tels que les glycolipides et les phospholipides dans de faibles quantités (**Tableau 1**). Les lipides polaires de l'huile de soja par exemple sont de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidylethanolamine (PE) et du phosphatidylinositol (PI) et des traces d'autres lipides comme des sphingolipides, des céramides et des cérébrosides. Il est possible de trouver dans les huiles végétales de faibles quantités de matière insaponifiable (tocophérols, stérols et hydrocarbures) qui diminuent sa qualité. Ces composés sont normalement enlevés dans le procédé de raffinage mais des traces peuvent se trouver dans le produit final (Gunstone, 2002).

Tableau 1. Composition de quelques huiles végétales (adapté de Gunstone, 2002)

	Soja (raffiné)	Canola	Raisin
TAG (%)	>99	94,4-99,1	91,8-99,0
AGL (%)	<0,05	0,4-1,2	0,5-1,8
GL (%)			0,9
PL (%)	0,003-0,045	<0,6	<0,8
Matière insaponifiable (%)	0,3	0,5-1,2	0,5-1,2
Chlorophylle (ppm)		5-50	5-55

TAG : triglycérides ; AGL : acides gras libres ; GL : glycolipides ; PL : phospholipides

La **Figure 5** présente le profil des acides gras totaux de quelques huiles végétales. En général, il est observé que les acides gras majoritaires sont les acides oléique C18:1n-9 et linoléique C18:2n-6 suivis en des quantités plus faibles par les acides palmitique C16:0 et stéarique C18:0.

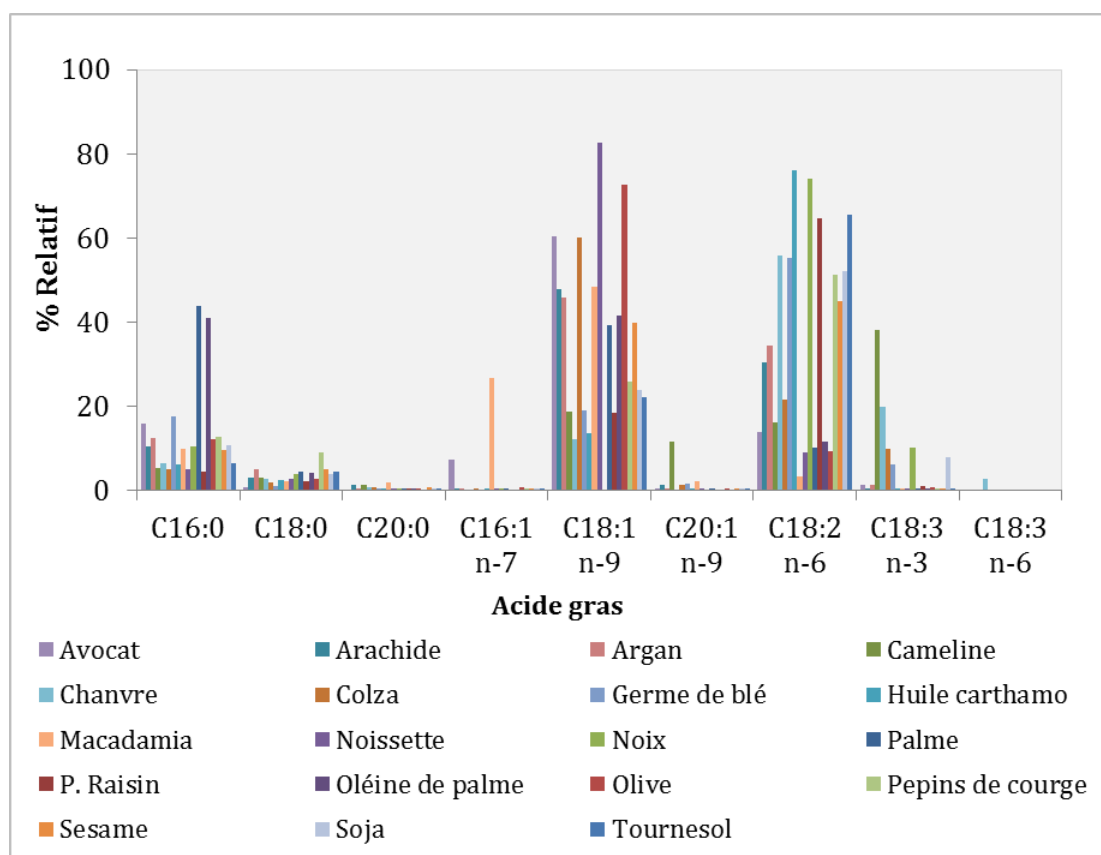


Figure 5. Profil des acides gras totaux de quelques huiles végétales (Dubois et al., 2007)

I.2.3.2. Lipides polaires et tensioactifs

Les lipides polaires sont des composés utilisés dans l'industrie en tant que tensioactifs pour l'obtention des émulsions. Leur propriété amphiphile leur donne la capacité de s'adsorber à l'interface huile/eau et de la stabiliser. Pour cette raison, dans la formulation de la solution synthétique, des produits tensioactifs à base de lipides polaires ont été considérés. Le **Tableau 2** montre quelques produits potentiels à base de lipides polaires disponibles sur le marché et utilisés dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires pour la formulation des émulsions.

Pour la formulation de l'émulsion il a été choisi de travailler avec un mélange de lipides polaires comportant des phospholipides et des glycolipides puisque l'utilisation de plusieurs tensioactifs peut avoir un effet synergique sur la stabilité de l'émulsions (O'Brien, 2008). Deux produits parmi ceux du **Tableau 2** semblent intéressants pour la formulation de l'émulsion dans ce travail : le Phospholipon 90G composé principalement par de la phosphatidylcholine (PC) pour représenter la famille des phospholipides et le Montanov-L contenant des alkyl glucosides pour la famille des

glycolipides. Du fait de l'intérêt particulier de la phosphatidylcholine et des alkylpolyglucosides pour ce travail les prochains paragraphes sont dédiés à leur description.

Tableau 2. Produits industriels à base de lipides polaires utilisés dans la formulation des émulsions

Produit commercial	Composition
Lécithine	PC (24 %), PE (20 %), PI (14 %), PA (7 %), autres phospholipides (8 %), glycolipides (15 %), triglycerides (3 %) (ALC, 2009)
Phospholipon 90G	Phosphatidylcholine PC >940 %, LPC max. 4,0 % , tocopherol max. 0,3 % (ALC, 2007)
Phospholipon 90H	Phospholipides totaux = 97 %, PC hydrogéné (95 %), LPC (max. 2-3 %), tocophérol (max. 0,3 %), PE < 0,1 %), PA < 0,1%), PI < 0,1 % (ALC, 2007)
Montanov L	C14-22 Alcools gras + C12-20 Alkyl glucosides (Seppic, 2016b)
Montanov 68	Cetearyl Alcool + APG (Seppic, 2016a)
Ceramosides HP	Phytoceramides > 50% riches en omega 3, 6 et 9; DGDG > 40% (Seppic, 2017).

PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PA : acide phosphatidique

I.2.3.2.1 La phosphatidylcholine PC

La phosphatidylcholine PC (**Figure 2 c**) est un composé tensioactif zwitterionique, c'est-à-dire que la molécule n'a pas de charge nette, caractéristique qui est invariable avec le pH, mais qui présente une charge positive sur l'azote et une charge négative sur le phosphate. C'est un composant des membranes cellulaires et des membranes des organelles d'êtres vivants représentant jusqu'à 50-60 %w de la fraction de phospholipides. A l'interface, une molécule de PC peut occuper de 0,6 à 1 nm² selon les acides gras qu'elle contient (Somasundaran, 2006) suivant les caractéristiques de la solution tampon comme le pH et la force ionique. La concentration micellaire critique (CMC) des tensioactifs lipidiques dépend de la longueur des chaînes des acides gras : plus les chaînes sont longues, moins importante est la CMC. Dans le cas de la phosphatidylcholine, la CMC est de 90 mM pour C5:0 PC ; 0,011 mM pour 14:0 PC et 0,46 nM pour C16:0 PC (Avanti Polar Lipids, 2016).

La phosphatidylcholine est souvent trouvée industriellement sous le nom de lécithine. La lécithine est un produit largement utilisé dans l'industrie alimentaire (Xu et al., 2011) obtenu comme un sous-produit du raffinage des huiles végétales, de soja particulièrement et des œufs. En plus de la phosphatidylcholine, la lécithine contient aussi d'autres phospholipides comme la

phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylglycérol et le phosphatidylinositol ainsi que des composés tels que des TAG, des glucides et des acides gras libres. Ce produit est souvent utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour l'obtention des émulsions (Somasundaran, 2006).

La **Figure 6** montre le diagramme de phases lécithine-eau. La phase L_α est caractérisée par la formation de cristaux liquides lamellaires : un arrangement de molécules formant une bicouche lipidique comme celle présente dans les membranes cellulaires. Cette phase est la forme prévalente de la lécithine dans les solutions aqueuses au-dessous de 35 % d'eau à température ambiante. Au-dessus de cette proportion d'eau, la phase aqueuse coexiste avec la phase L_α de la lécithine. Cette bicouche peut avoir une épaisseur entre 4-6 nm. La PC peut stabiliser l'interface eau-huile et diminue la coalescence des gouttelettes de la phase dispersée (Shchipunov, 1997).

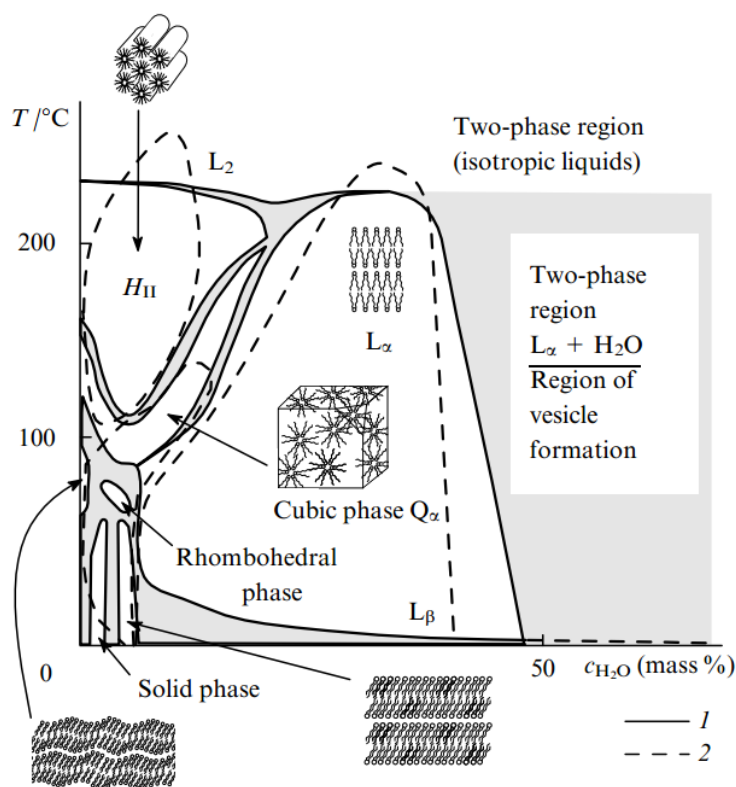


Figure 6. Diagramme binaire de phases lécithine (œuf 1 et soja 2) - eau (Shchipunov, 1997)

1.2.3.2.2 Les alkyl polyglucosides (APG)

Les alkylpolyglucosides APG sont des éthers de glucose d'origine végétale, formés par un alkyle gras saturé ou insaturé (partie hydrophobe) associé à un ou plusieurs saccharides (partie hydrophile). Ce sont des molécules non ioniques ayant des propriétés tensioactives pouvant être

utilisés avec d'autres surfactants pour améliorer la stabilité des émulsions. leurs propriétés ne sont en général dépendantes ni de la salinité ni de la température (Pantelic, 2014).

Les APG sont stables à pH élevés mais à des pH faibles ils peuvent s'hydrolyser en sucres et en alcools gras. Comme pour la phosphatidylcholine, la concentration micellaire critique CMC des APG varie selon la longueur des chaines hydrocarbonées. Par exemple $CMC_{C_{14}APG} = 2,659 \cdot 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ et $CMC_{C_{12}APG} = 2,973 \cdot 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$ (Pantelic, 2014).

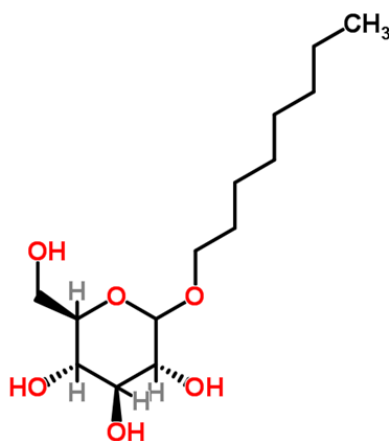


Figure 7. Structure du octyl glucopyranoside (ChemSpider, 2017)

En général, l'utilisation d'un mélange de surfactants permet de stabiliser les émulsions. Lors de la recherche bibliographique réalisée pour la pré-sélection des émulsifiants potentiels pour les solutions modèles, il a été observé qu'un grand nombre de surfactants commercialisés sont déjà des mélanges de composés contenant un surfactant et un co-surfactant. C'est le cas des quelques APG commercialisés par Seppic, comme les Montanov-L et Montanov-68, qui en plus des glycolipides, contiennent aussi des alcools gras de chaîne courte et moyenne qui jouent un rôle stabilisant : leurs molécules se placent à l'interface entre les molécules des autres tensioactif et donnent de la flexibilité à l'interface, facilite la courbure, et donc la formation de gouttes de la phase dispersée au moment de l'émulsification.

Conclusion de la partie bibliographique sur les lipides de microalgues

Les microalgues sont des microorganismes capables de produire une large diversité de lipides, variables selon la souche, la phase de croissance et les conditions de culture. Ces lipides sont généralement composés par des acides gras de chaînes carbonées ayant entre 12 et 22 carbones. Lorsqu'elles sont cultivées en conditions de stress, les microalgues augmentent la proportion de lipides neutres produits.

Dans le profil des acides gras totaux, les acides myristique C14:0, palmitique C16:0, palmitoléique C16:1n-7 et l'oléique C18:1n-9 sont couramment identifiés dans des quantités importantes. La fraction de lipides neutres est principalement composée par des triglycérides et la fraction des lipides polaires par un mélange de phospholipides et de glycolipides.

Certaines huiles végétales peuvent avoir une composition proche de celle des lipides produits par des microalgues, raison pour laquelle une présélection a été faite pour composer la fraction de lipides neutres de la solution synthétique. Cette solution étant une émulsion, des lipides polaires ayant des propriétés tensioactives pourront être utilisés dans sa formulation. Des produits industriels, à base de lipides polaires, ont été identifiés pour apporter à la formulation de l'émulsion un glycolipide et un phospholipide afin de mieux représenter la composition des huiles des microalgues.

I.3. Phénomènes d'interface

Cette synthèse bibliographique sur l'étude des interfaces liquide-gaz (L-G) et liquide-liquide (L-L) a pour objectif de présenter les bases nécessaires pour la compréhension des phénomènes physicochimiques des interfaces huile/eau en présence d'un mélange de tensioactifs. La première partie concerne les concepts généraux des phénomènes d'interface et de tension interfaciale ; la deuxième partie décrit le comportement des lipides aux interfaces liquide-gaz et liquide-liquide, et est suivi par une brève explication des paramètres qui influencent la caractérisation des interfaces. Ensuite, les bases des techniques expérimentales utilisées pour la caractérisation des ces interfaces sont présentées et enfin dans la troisième partie une brève présentation est faite des émulsions et des procédés utilisés pour leur obtention.

I.3.1. Généralités sur les phénomènes d'interface

L'étude des phénomènes de surface ou d'interface concerne l'analyse des phénomènes physiques produits par le contact d'un fluide avec une autre phase gazeuse, liquide ou solide. Les propriétés de ces interfaces peuvent être modifiées par des changements chimiques ou physiques dans l'une des phases, comme des variations de température ou de pH, la présence de molécules tensioactives ou de particules même à de faibles concentrations (Briant, 1989).

I.3.1.1. La tension interfaciale

Au sein d'un liquide, les molécules sont soumises à des forces cohésives symétriques provenant des molécules qui les entourent. Par contre, pour les molécules qui se placent à la surface, ces forces sont différemment distribuées (**Figure 8**) puisqu'elles n'ont que la moitié des forces cohésives vis à vis des molécules au sein du liquide. Ainsi, les molécules à la surface se trouvent dans un état énergétique dit « défavorable » (Gennes et al., 2005). En conséquence, les molécules à la surface cherchent à exposer le moins de surface possible, afin d'atteindre l'état le plus « favorable » du point de vue énergétique. La propriété qui caractérise ce phénomène est la **tension de surface**. Ainsi, l'énergie qui devra être fournie au système pour augmenter la surface est proportionnelle au changement d'aire ΔA et à la tension de surface. Le terme **tension**

interfaciale est utilisé lorsque le phénomène concerne deux fluides non miscibles comme l'huile et l'eau.

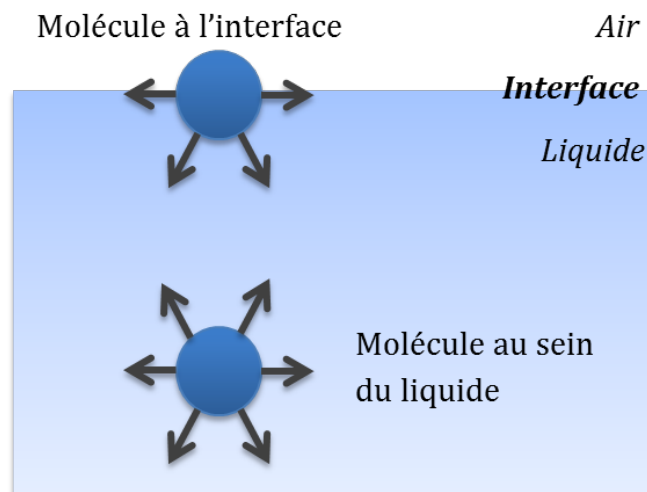


Figure 8. Distribution des forces au sein et à la surface d'un liquide en contact avec de l'air (Adaptée de Gennes et al., 2005)

Les liquides dont les molécules présentent des interactions fortes telles que les liaisons hydrogène dans l'eau, ont une tension de surface plus grande que les liquides dont les interactions moléculaires sont plus faibles (du type van der Waals) telles que les huiles ($\gamma_{eau\ 25^{\circ}C} = 72\ mN.m^{-1}$; $\gamma_{huile\ 25^{\circ}C} \approx 20\ mN.m^{-1}$) (De Gennes et al., 2005).

I.3.1.2. Les tensioactifs

Les tensioactifs, aussi connus comme surfactants, sont des molécules amphiphiles capables de modifier les propriétés physicochimiques d'une interface. Ces molécules portent une partie hydrophobe (non polaire, généralement une chaîne hydrocarbonée) et une partie hydrophile (polaire, ionique ou non ionique) qui leur donne le caractère amphiphile. Et c'est justement grâce à cette propriété que ces molécules peuvent s'accumuler aux interfaces. En effet, lorsqu'elles sont mises en contact avec deux phases immiscibles (liquide, solide ou gaz), ces molécules migrent vers l'interface et s'y accumulent jusqu'à atteindre l'équilibre. L'adsorption de molécules amphiphiles aux interfaces est impliquée dans les phénomènes de mouillage (L-S) et de dispersion (obtention des émulsions, des suspensions et des mousses). Cette adsorption est à l'origine de l'abaissement de la tension interfaciale (stabilisation de l'interface), c'est à dire de l'énergie nécessaire pour augmenter l'aire interfaciale entre deux phases comment referncié par Larpent, 1995.

Aux interfaces, les tensioactifs orientent leurs parties hydrophobe et hydrophile selon l'affinité avec chacune des phases liquide (organique ou aqueuse), solide ou gaz. La valeur de la tension interfaciale dépendra de la concentration en tensioactif et de l'aire interfaciale occupée par les molécules du surfactant (Larpent, 1995).

Une des applications des tensioactifs est la préparation des émulsions, car ils permettent de stabiliser l'interface huile/eau et donc évitent la séparation des phases dans le temps. Lors de l'émulsification, les molécules de tensioactifs se positionnent à l'interface et forment des liaisons hydrogènes et ioniques avec la phase hydrophile (tête polaire) et des interactions du type van der Waals avec la phase organique (partie non polaire du tensioactif). L'abaissement de l'énergie d'interface permet donc de disperser une des phases dans l'autre et de former des gouttelettes qui augmentent l'aire interfaciale du mélange (Doumeix, 2011).

A partir d'une certaine concentration dans un liquide, les molécules de tensioactif s'organisent et forment des agrégats. Ces groupements appelés « micelles » peuvent avoir des formes différentes (cylindriques, sphériques, etc., selon la nature et la concentration du tensioactif) et présenter deux conformations selon le type de liquide qui les contient : si la phase liquide est aqueuse les molécules s'organisent en plaçant leur partie polaire vers l'extérieur (micelle directe), mais si cette phase est organique la partie polaire se place à l'intérieur de la micelle (micelle inverse) (**Figure 9**).

La concentration de tensioactif à laquelle les micelles se forment est connue comme la «Concentration Micellaire Critique » ou CMC. La valeur de la CMC dépend de la nature du tensioactif, de la température et de la concentration en électrolytes (pour les tensioactifs ioniques, la présence de sels fait diminuer la CMC) (Brochete, 2013; Cabane et Hénon, 2003; Larpent, 1995).

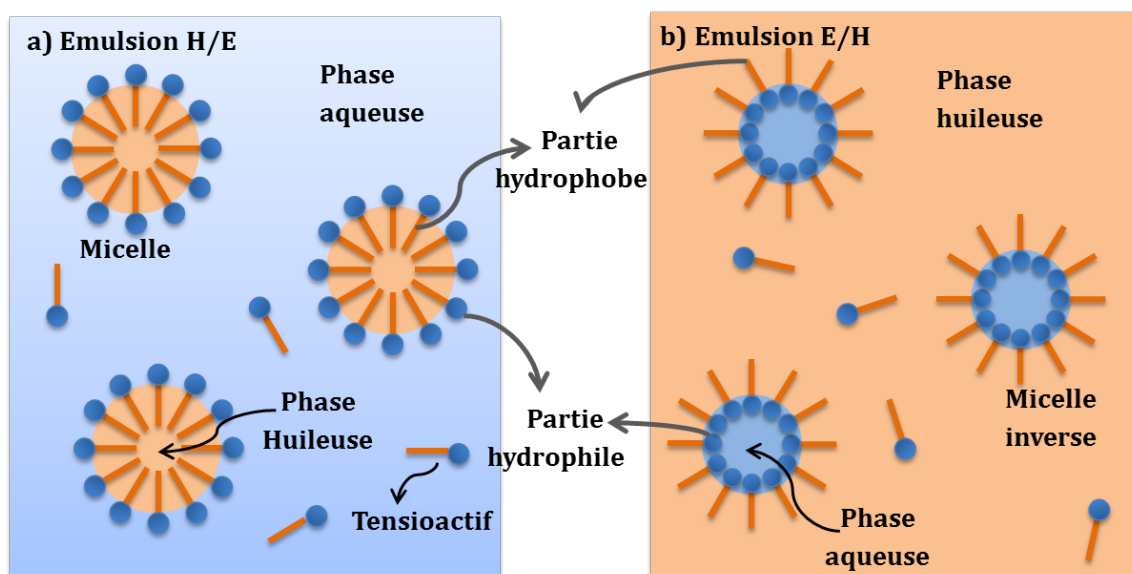


Figure 9. Organisation de molécules de tensioactifs en micelles a) directe et b) inverses dans des émulsions H/E et E/H

Les micelles permettent de mettre en solution des composés tels que les graisses dans l'eau, en plaçant les molécules de la phase organique au centre des structures, comme il est montré dans la **Figure 9 a**. Si plusieurs tensioactifs sont en solution, de micelles mixtes peuvent se former (Doumeix, 2011).

I.3.1.3. Isothermes d'adsorption

L'adsorption de tensioactifs à l'interface implique une étape préalable de diffusion de ces molécules de la phase qui les contient vers l'interface, une étape d'adsorption qui fait diminuer la tension interfaciale (γ) et qui est suivie parfois d'une étape de réarrangement des molécules pouvant faire diminuer γ davantage. Ce phénomène est étudié par des « isothermes d'adsorption » construites à partir de la mesure de la tension interfaciale (γ) à l'équilibre à plusieurs concentrations et à une température constante. Ces isothermes fournissent des informations sur l'organisation probable des composés dans la phase qui les contient à une certaine concentration. Elles comportent typiquement 4 zones définies comme le montre la **Figure 10** : en solution à de faibles concentrations (Zone I) le surfactant reste en solution et s'adsorbe partiellement à l'interface mais cela modifie peu les propriétés de l'interface. Lorsque la concentration augmente le surfactant s'organise à l'interface (Zone II), et à partir de ce point une petite augmentation de la concentration aura un grand effet sur la tension interfaciale (Zone III) jusqu'à la concentration micellaire critique CMC (Zone IV). A partir de cette concentration l'interface est saturée et les tensioactifs en excès se regroupent en solution, des micelles commencent à se former dans la

solution et donc la hausse de la concentration n'a plus d'effet sur l'abaissement de la tension interfaciale γ (Cote, 1998).

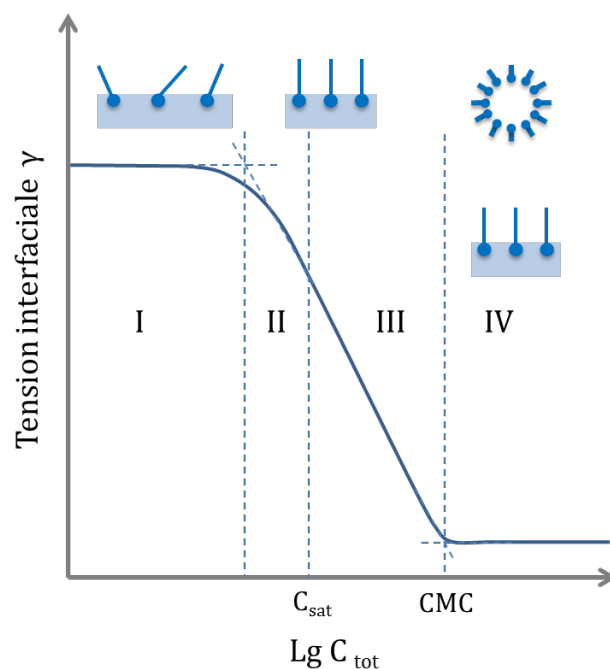


Figure 10. Isotherme d'adsorption typique d'un tensioactif sur une interface (adapté de Cote, 1998)

Plusieurs modèles mathématiques ont été proposés pour ces isothermes, dont les plus communs sont l'isotherme de Langmuir et l'isotherme d'adsorption de Gibbs. D'autres modèles, se rapprochant plus des observations expérimentales, ont été aussi proposés comme ceux de de Franklin (Bahtz et al., 2009), de Ward et Tordai (Reis et al., 2008), et de Szyszkowski (Dukhin et al., 1995).

1.3.1.3.1 Isotherme de Langmuir

Le modèle de Langmuir est basé sur l'hypothèse de la formation d'une monocouche adsorbée à l'interface, où les interactions se produisent uniquement entre les molécules du soluté et la phase sur laquelle il s'adsorbe (interactions perpendiculaires à l'interface), mais pas entre les molécules du même type placées côte à côte (interactions parallèles à l'interface). Egalement, il est supposé que les molécules qui interagissent (soluté-solvant) ont la même taille et la même aire de contact lors des interactions.

Le modèle de l'isotherme de Langmuir comme référencié par Prosser et Franses, 2001, est donné par l'équation suivante :

$$\Gamma = \Gamma_0 \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad \text{Eq. 1}$$

Avec :

Γ Excès de surface (concentration à l'interface de l'espèce adsorbée à l'équilibre (mol.m⁻²))

Γ_0 Concentration maximale (à saturation) de l'espèce adsorbée à l'interface (mol.m⁻²)

K Constante d'équilibre d'adsorption (L.mol⁻¹)

c Concentration au sein du fluide de l'espèce adsorbée à l'interface (mol. L⁻¹)

Cette équation exprime la variation de la concentration de l'espèce adsorbée à l'interface en fonction de la concentration de cette même espèce au sein du fluide. L'isotherme de Langmuir peut être utilisée comme un outil de comparaison du comportement des molécules tensioactives aux interfaces, mais elle est applicable seulement à des solutions de faible concentration.

1.3.1.3.2 Isotherme de Gibbs

Outre les interactions entre les molécules placées perpendiculairement à l'interface prises en compte par l'isotherme de Langmuir, les molécules adsorbées établissent aussi des interactions latérales avec d'autres molécules du soluté. L'équation d'adsorption de Gibbs (**Equation 2**), aussi connue comme « équation fondamentale des effets de surface » tient compte de ces deux types d'interactions. Ce modèle exprime l'excès de surface Γ en fonction du taux de variation de la tension de surface avec la concentration de l'espèce en solution (Briant, 1989) :

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \left(\frac{d\gamma}{d \ln c} \right) = -\frac{c}{RT} \cdot \left(\frac{d\gamma}{dc} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

Avec

Γ Excès de surface (concentration à l'interface de l'espèce adsorbée à l'équilibre (mol.m⁻²))

γ Tension interfaciale (N.m⁻¹)

R Constante universelle des gaz parfaits (J mol⁻¹.K⁻¹)

T Température absolue (K)

c Concentration en solution de la molécule adsorbée (mol.L⁻¹)

De l'équation de Gibbs il est déduit que si la tension interfaciale diminue quand la concentration d'une substance en solution augmente, le terme $\left(\frac{d\gamma}{d \ln c} \right)$ est négatif et Γ prend une valeur positive

indiquant que la substance s'adsorbe à l'interface. La mesure de la tension interfaciale en fonction de la concentration permet de déduire l'excès de surface à partir de l'équation de Gibbs.

I.3.1.4. Films de Langmuir et isothermes de compression

Lorsqu'un film interfacial est formé par des molécules tensioactives insolubles dans l'eau, sa structure peut être étudiée à l'interface air/eau. Cette interface portant une phase hydrophobe (l'air) et une phase hydrophile (l'eau) est souvent utilisée comme modèle pour l'étude des interfaces liquide-liquide (dans le cas présent huile-eau) (Berton, 2011; Pichot et al., 2013) puisque elle présente l'avantage de pouvoir travailler à une concentration connue de tensioactif à l'interface et parce que la technique est facile à mettre en œuvre.

Les lipides, en tant que molécules insolubles dans l'eau, peuvent former des monocouches ou des films de Langmuir aux interfaces air/eau. A l'interface, ces molécules orientent leurs parties polaires et non-polaires vers l'eau et vers l'air respectivement. Une monocouche peut exister avec différentes structures pouvant être assimilées à des phases gaz, liquide et solide selon l'arrangement plus ou moins organisé de ses molécules. La **Figure 11** (bas) montre les différents arrangements possibles dans des phases identifiées comme gaz (G), liquide expansé (LE), liquide condensé (LC) et solide (S).

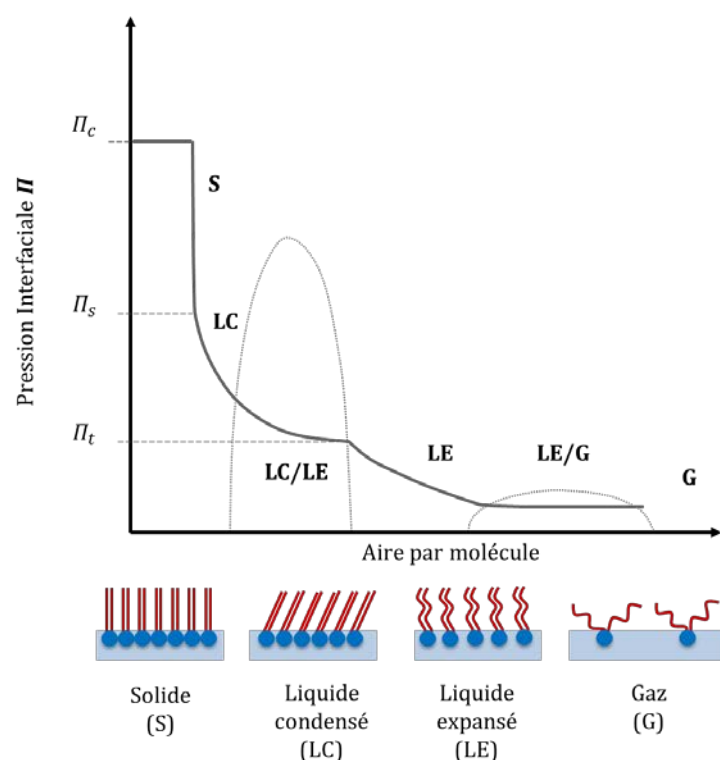


Figure 11. Identification des phases dans une isotherme de compression (exemple d'un composé pur) (Adapté de Adamson et Gast, 1997)

Dans la phase gaz, l'état des molécules d'une monocouche peut s'assimiler à celui d'un gaz en deux dimensions (2D), ce qui peut être décrit par l'équation d'un gaz idéal en 2D qui suppose que la pression de surface (ou pression interfaciale) Π est fonction de l'énergie cinétique totale du système donnée par $k_B T$ (Gaines, 1966) :

$$\Pi A = k_B T \quad \text{Eq. 3}$$

Avec

Π Pression interfaciale (N.m⁻¹)

A Aire moléculaire (Å².molecule⁻¹)

k_B Constante de Boltzmann (1,3806·10⁻²³ J.K⁻¹.molécule⁻¹)

T Température absolue (K)

La pression interfaciale est définie comme la différence entre la tension d'interface en l'absence (γ_0) et en présence du tensioactif (γ). Ce concept sera repris dans la section **§1.3.3.2**.

En phase de liquide expansé (LE,) les têtes polaires des molécules d'une monocouche sont fortement hydratées. Puis, en étant plus proches les unes des autres que dans la phase gaz (G), elles subissent des interactions intermoléculaires. Concernant les queues hydrophobes, orientées vers l'air, des longueurs de chaînes plus importantes favorisent les interactions attractives entre les molécules et aident à l'organisation du film vers une phase plus condensée. Dans la phase de liquide condensé (LC), les têtes polaires sont faiblement hydratées et les queues hydrophobes s'organisent de façon à avoir un angle d'inclinaison vers l'interface air-eau, formant une structure très organisée et homogène. Dans la phase solide (S) les molécules sont très proches entre elles et ont une mobilité minimale des chaînes carbonées, orientées verticalement vers l'air (Myers, 2006).

Les monocouches à l'interface liquide-gaz peuvent être étudiées et caractérisées par des isothermes de compression **Figure 11** (haut). Ces isothermes permettent de déterminer l'aire occupée par molécule à une pression interfaciale (Π) donnée ainsi que les structures probables du film aux différentes pressions. Un exemple d'une isotherme de compression Π - A typique des composés lipidiques est présenté dans la **Figure 11**. Les points d'inflexion de ces isothermes témoignent des changements de phases subis par les monocouches au fur et à mesure que la pression interfaciale augmente. De droite à gauche, le début de la courbe correspond à un mélange LE/G jusqu'au premier point d'inflexion qui indique le changement à la phase LE. Ensuite, un nouveau changement de courbure (parfois un plateau) qui démarre à Π_t (pression de transition

LE/LC) indique la coexistence des phases LC/LE, jusqu'à la transformation du film en une monocouche plus homogène caractéristique de la phase LC. Dans ce cas la corrélation Π vs A est presque linéaire et la pente de la courbe tracée est assez prononcée. En d'autres termes, une faible réduction de l'aire interfaciale se traduit par une augmentation importante de la pression de l'interface. Si la pression augmente encore, le film passe de la phase liquide condensé (LC) à la phase solide (S).

Les isothermes de compression fournissent aussi une information importante concernant l'aire occupée par une molécule hydratée ou sans hydratation. Ces aires peuvent être déterminées par l'extrapolation jusqu'à une pression de zéro des zones linéaires correspondantes aux phases de liquide condensé (LC) et solide (S) respectivement (Erbil, 2006).

Collapse d'une monocouche

Lorsqu'une monocouche atteint le maximum de compressibilité, une augmentation additionnelle de la pression interfaciale entraîne l'effondrement de la monocouche. Ce phénomène est aussi connu comme **collapse** (Adamson et Gast, 1997). La pression maximale des isothermes de compression qui caractérise le début de ce changement dans la structure d'une monocouche correspond à la pression de collapse Π_c . En théorie, la pression de collapse Π_c dépend de la longueur des chaînes hydrocarbonées : plus la chaîne est longue, plus la pression de collapse est élevée (Miyoshi et Kato, 2015). Dans une isotherme de compression ce phénomène est caractérisé par l'apparition d'un pic sur la courbe de l'isotherme (**Figure 11**).

Pendant le collapse la monocouche devient instable et se transforme en une structure tridimensionnelle organisée ou pas, comme par exemple des agrégats ou des multicouches. Cela produit une diminution de la densité moléculaire à l'interface et une augmentation de la tension d'interface. Le mécanisme de collapse des monocouches dépend de la nature de ses composés et de la température. Dans le cas des lipides, les molécules peuvent former des structures diverses (**Figure 12**) telles que des plis de bicouches, des vésicules et des micelles qui entraînent une perte irréversible du composé de l'interface. Le collapse de monocouches de mélanges de DPPC/POPG a été modélisé par Baoukina et al., 2008. Ces auteurs ont pu déterminer que des bicouches sont initialement formées et puis que celles-ci adaptent une forme elliptique qui évolue soit en structures circulaires planes, soit en vésicules qui se détachent de l'interface.

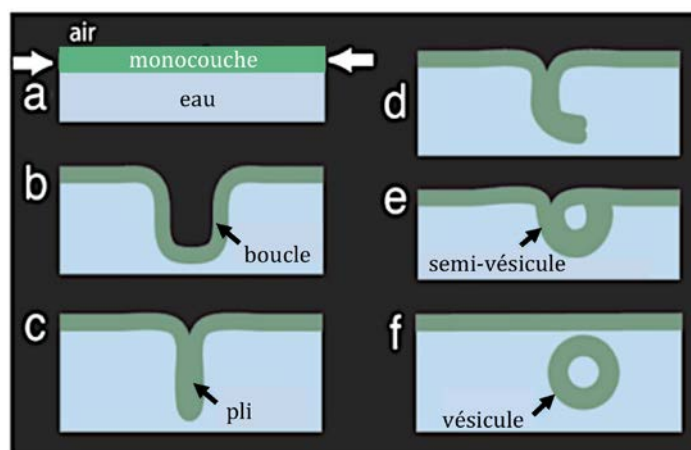


Figure 12. Illustration des mécanismes de collapse des monocouches de lipides (exemple de modélisation) (Baoukina et al., 2008)

Les films de Langmuir peuvent aussi être utiles pour des études à l'interface L-L à l'aide d'un double capillaire coaxial (Adamson et Gast, 1997) comme dans les travaux de (Wege et al., 1999), qui ont utilisé cette technique pour étudier le comportement d'un phospholipide déposé d'abord sur une goutte d'eau et ensuite mis en contact avec de l'huile.

Mélanges dans des films interfaciaux

La structure d'une monocouche peut se modifier avec la présence d'autres molécules amphiphiles, même en de faibles concentrations, ce qui est à l'origine de la formation de films mixtes. Dans ce cas, des interactions entre les différents composés peuvent avoir lieu et générer un comportement complexe à cause des différences de miscibilité. Cela pouvant entraîner la formation de plusieurs phases et domaines coexistant dans ces monocouches (**Figure 13**).

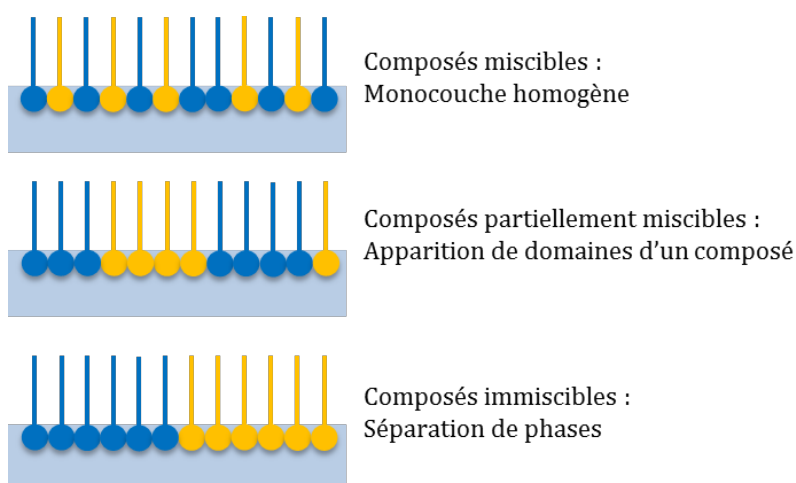


Figure 13. Organisation probable des molécules dans une monocouche mixte (Adapté de : Gaines, 1966)

Dans ces films mixtes, les interactions entre les molécules peuvent dans certains cas former des synergies et augmenter la stabilité du film interfacial. Les types d'interactions entre les molécules peuvent être déterminés à l'aide des isothermes de compression qui servent de base pour la construction des courbes de l'aire moléculaire occupée par le tensioactif à une pression donnée en fonction de la composition. Cette courbe permet de comparer le comportement des mélanges avec celui d'une solution idéale où il n'y a pas d'interactions. Les écarts positifs de la courbe idéale correspondent à des interactions de type attractives et les écarts négatifs à des interactions répulsives entre les différents types de molécules présentés dans la monocouche.

I.3.2. Lipides aux interfaces liquide-gaz (L-G) et liquide-liquide (L-L)

Les interfaces L-G et L-L, peuvent être assimilées à des films minces très sensibles aux changements chimiques ou physiques des phases qui les constituent. L'étude de ces interfaces donne une information fondamentale sur l'organisation des molécules que s'y trouvent et sur leur réponse aux éventuelles perturbations et aux changements du système. Par exemple, dans le cas d'une émulsion, les propriétés physicochimiques des structures formées à l'interface liquide-liquide déterminent sa stabilité.

I.3.2.1. Lipides aux interfaces liquide-gaz (L-G)

Le comportement des molécules amphiphiles à l'interface air-eau est comparable au comportement que ces molécules auraient à l'interface huile-eau du fait de la présence dans les deux systèmes d'une phase hydrophobe (air ou huile) et d'une phase hydrophile (eau). D'où l'intérêt de la caractérisation de cette interface pour ce travail.

Des nombreuses études existent sur le comportement des lipides à l'interface L-G. La famille des phosphatidylcholines est particulièrement intéressante pour la communauté scientifique en raison de sa présence dans des nombreux systèmes biologiques (membranes cellulaires) et a fait pour cela l'objet de nombreux études (Dynarowicz-Łatka et Hac-Wydro, 2004; Lawrie et al., 2000; H. M. Mansour et Zograf, 2007; Villalonga, 1968). Lawrie et al., 2000, ont obtenu l'isotherme de compression de la DPPC à plusieurs températures avec une sous-phase d'eau ultra pure. Ils ont constaté la formation des différentes phases lors de la compression à l'aide d'un microscope à angle de Brewster.

Mélanges de lipides à l'interface L-G

Plusieurs auteurs ont étudié le mélange de la DPPC avec d'autres lipides. Par exemple, Wagner et Brezesinski, 2007, ont observé que l'ajout de n-hexadécanol ($C_{16}OH$) et de dipalmitoylglycérol (DPG) dans des monocouches de phosphatidylcholine conduisait à la formation de structures homogènes en phase LC où les composés se mélangeaient complètement, et à la réduction de l'aire moyenne occupée par molécule de $44 \text{ \AA}^2$ (DPPC pur) à $37 \text{ \AA}^2$ pour le mélange DPPC/ $C_{16}OH$ et jusqu'à $39,5 \text{ \AA}^2$ pour le mélange DPPC/DPG à 40 mN.m^{-1} . Lawrie et al., 2000, ont étudié aussi le mélange DPPC/ $C_{16}OH$ mais à plusieurs concentrations et ils ont observé qu'une transition de phase LE/LC pouvait être encore observée à de faibles quantités d'alcool mais que, si la proportion de $C_{16}OH$ augmentait, le plateau typique du changement de phase disparaissait complètement de l'isotherme, comme si aucune transition de phase n'avait lieu. La transition de phase serait masquée par la diminution de la concentration en DPPC.

I.3.2.1. Lipides aux interfaces liquide-liquide (L-L)

Les lipides polaires, les acides gras à longue chaîne et les mono et diacylglycérides entre autres, sont des substances portant une partie hydrophile et une partie hydrophobe qui leur donnent la propriété de s'adsorber aux interfaces L-L et de modifier ainsi leurs caractéristiques physicochimiques. Leur effet sur la tension interfaciale (γ) dépend des longueurs des chaînes carbonées, du pH de la solution et de leur affinité avec les phases qui constituent l'interface.

Les lipides polaires comme les phospholipides peuvent former des monocouches aux interfaces liquide-liquide (L-L) (Li et al., 1996). Les phospholipides peuvent également former des multicouches (Friberg et al., 1976), caractéristique aussi présentée par les alkylpolyglucosides (Seppic, 2016b) aux interfaces L-L. Ces structures plus complexes que les monocouches donnent plus de viscosité et de rigidité à l'interface (Baudonnet et al., 2004). Cela pourrait se traduire dans le cas d'une émulsion par une meilleure stabilisation de l'interface huile/eau et par la diminution de la coalescence des gouttelettes (Myers, 2006). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la formation de multicouches aux interfaces :

- i) La déposition successive de molécules après la saturation de l'interface : initialement des molécules s'adsorbent à l'interface jusqu'à la saturation et forment une première monocouche. Ensuite d'autres molécules amphiphiles s'adsorbent et forment une deuxième monocouche sur la première.

- ii) L'accroissement de la pression interfaciale : comme il a été expliqué dans la section dédiée au collapse d'une monocouche, si la pression interfaciale augmente au-delà de la pression de collapse des multicouches peuvent se former.
- iii) L'addition directe à l'interface de bicouches préalablement formées en solution : certains composés comme les phospholipides forment des structures de bicouches en solution. Ces structures pourraient s'adsorber directement à l'interface après la formation d'une première monocouche (**Figure 14**)

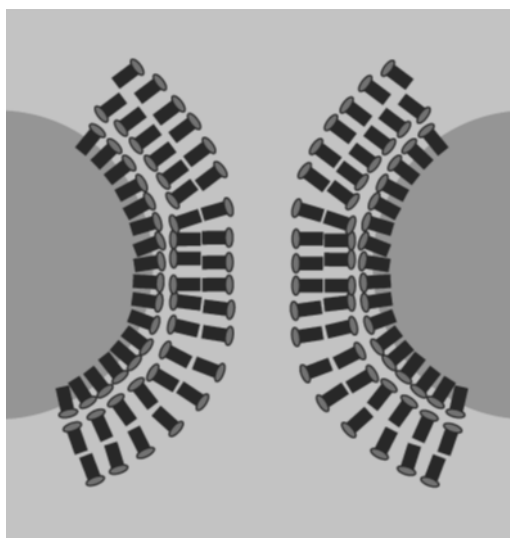


Figure 14. Formation de multicouches aux interfaces L-G et L-L (Source : (Myers, 2006))

Mélanges de lipides à l'interface L-L

Lorsque plusieurs tensioactifs se trouvent en même temps dans un système diphasique, deux situations peuvent se présenter : i) un des tensioactifs s'adsorbe préférentiellement sur l'interface et les autres restent dans la phase avec laquelle ils ont le plus d'affinité ou bien ii) plusieurs composés s'adsorbent en même temps, formant un film mixte à l'interface. (Reis et al., 2008), ont évalué le caractère amphiphile de quelques acides gras (C8, C16 et C22 :6), de monoglycérides, de diglycérides et de leurs mélanges dans une interface huile/eau. Ils ont établi que les monoglycérides ont une activité à l'interface plus importante que les acides gras et que les diglycérides et qu'en conséquence, l'interface des mélanges est dominée par ces molécules. La cause de ce comportement est la polarité des composés : les diglycérides sont plus solubles dans la phase huileuse, les acides gras dans la phase aqueuse et les monoglycérides le sont dans les deux phases. Ces résultats, parmi d'autres, démontrent que le comportement d'un composé à l'interface ne dépend pas seulement de ses propres caractéristiques, mais aussi des propriétés d'autres espèces présentes dans le système.

I.3.3. Méthodes de mesure de la tension interfaciale

Différentes techniques ont été développées pour étudier les caractéristiques des interfaces L-G et L-L. Ce sont des méthodes cherchant à mesurer la tension d'interface d'un système donné. Elles peuvent être regroupées selon la nature de la mesure en : méthodes de capillarité, de détachement, de pression et d'analyse d'image. Le **Tableau 3**, présente un résumé des techniques disponibles, avec leurs avantages et leurs inconvénients. Le choix de la méthode pour une application spécifique dépend de la nature de l'interface, de la rapidité du phénomène à étudier (variation de γ avec le temps), de la précision souhaitée et de la quantité disponible d'échantillon pour la mesure.

Tableau 3. Principales méthodes de caractérisation des interfaces L-L et L-G

Méthode	Application	Description de la méthode	Avantages	Inconvénients
Méthode de capillarité				
Capillaire	Interface L-G Analyse statique	Analyse de l'ascension du liquide dans un capillaire fin en verre positionné verticalement sur un lit de liquide (Adamson et Gast, 1997). Basée sur la loi de Jurin.	Méthode simple. Haut contrôle expérimental des variables. Faible incertitude et grande précision.	Le liquide doit mouiller complètement le matériel du capillaire donc l'angle de contact=0.
Méthodes de détachement / force				
Lame de Wilhelmy et Anneau du Nouÿ	Interface L-G et L-L Analyse statique	Une lame ou un anneau métallique est mis en contact avec le liquide à analyser, ensuite la force nécessaire pour séparer la lame/anneau du liquide est mesurée (Adamson et Gast, 1997; Denis et Hipeaux, 1997; Gennes et al., 2005).	Méthode précise et rapide. Plusieurs géométries des solides disponibles pour la mesure. La méthode de l'anneau est normalisée ASTM D 971.	Lorsque le liquide ne mouille pas complètement la surface du solide, des corrections sont à appliquer. Analyse des interfaces L-L possible mais moins précise et plus difficile dû aux problèmes de mouillabilité.
Balance de Langmuir	Interface L-G (étude de monocouches)	Adaptation de la méthode de lame de Wilhelmy. Un tensioactif dissout dans un solvant volatil est déposé goutte à goutte sur une surface d'eau pour former une monocouche. L'aire interfaciale air-eau est réduite à l'aide d'une barrière. La pression interfaciale au cours de la réduction d'aire est mesurée avec un capteur de force (Gaines, 1966).	Méthode permettant de travailler avec une quantité de tensioactif constante. Les monocouches peuvent être récupérées pour analyse microscopique avec la méthode de Langmuir-Blodgett.	Très haute sensibilité à la contamination même au niveau de traces.
Volume ou poids de goutte	Interface L-G et L-L Analyse dynamique	Des gouttes sont formées à l'aide d'un capillaire jusqu'à son détachement et récupérées dans un contenant. Leur poids ou leur volume par goutte est ainsi déterminé (Adamson et Gast, 1997; Denis et Hipeaux, 1997; Miller et Fainerman, 1998).	Méthode rapide mais semi-quantitative donc manque de précision. Utile pour détecter composantes indésirables dans le liquide. Méthode normalisée ASTM D 2285.	Un facteur de correction est nécessaire puisque la goutte ne tombe pas complètement, une partie reste attachée au capillaire.

Méthode	Application	Description de la méthode	Avantages	Inconvénients
Méthodes de mesure de pression				
Pression maximale d'une bulle dans un liquide	Interfaces L-G. Analyse dynamique	Une bulle d'air est formée dans un liquide à l'aide d'un capillaire. La pression au-dessus du capillaire est mesurée en fonction du temps et la pression critique à laquelle la bulle éclate est déterminé. Ainsi un rayon de bulle critique est établi et la tension de surface est déterminée (Adamson et Gast, 1997; Denis et Hipeaux, 1997; Dukhin et al., 1995).	Méthode précise, ne dépend pas de l'angle de contact. Adaptée pour liquides tels que les métaux fondus.	Problèmes de précision pour des bulles de petit volume.
Méthodes basées sur l'analyse de forme de gouttes				
Goutte tournante	Interfaces L-L Analyse statique	Un tube transparent contenant une liquide plus dense tourne autour de son axe. Une goutte du liquide moins dense est introduite et sa forme est analysée. Ainsi, la tension interfaciale est ainsi déduite (Adamson et Gast, 1997; Denis et Hipeaux, 1997).	Adapté pour des mesures de tension interfaciale très basses.	Méthode remplacée par la méthode de goutte pendante car plus facile
Goutte Pendante ou Inversée	Interfaces L-G et L-L Analyse statique et dynamique	<i>Goutte pendante :</i> Une goutte du liquide à analyser est formée à l'aide d'un capillaire. Sa forme juste avant qu'elle tombe est analysée par un logiciel de traitement d'image et la tension superficielle est calculée par ajustement de l'équation de Young-Laplace au profil réel de la goutte (Adamson et Gast, 1997). <i>Goutte inversée (L-L):</i> Même principe que la goutte pendante avec la différence qu'un capillaire courbé est utilisé pour former une goutte ascendante d'un liquide dans un autre liquide moins dense.	<i>Goutte pendante :</i> Besoin d'une faible quantité du liquide à analyser. Mesure rapide et relativement précise. Pas de problème de mouillabilité des surfaces. <i>Goutte inversée :</i> Il n'y a pas de contamination externe comme de la poussière qui affecteraient les résultats	<i>Goutte pendante :</i> L'évaporation du liquide pendant la mesure peut entraîner des résultats faussés. Méthode très sensible aux contaminations externes. <i>Goutte inversée :</i> Quantité nécessaire d'un des liquides plus importante.

Dans le cadre de ce travail les méthodes de la goutte pendante et de la balance de Langmuir ont été choisies pour les analyses de l'interface L-L et L-G respectivement. Ce sont des méthodes relativement faciles à mettre en œuvre qui permettront d'étudier le comportement des tensioactifs utilisés dans cette étude à l'interface huile/eau comme dans l'émulsion formulée et à l'interface air/eau pour déterminer les arrangements probables des molécules dans le film interfacial présent dans l'émulsion. Pour cette raison, les prochains paragraphes sont dédiés à une description plus détaillée de ces deux méthodes.

I.3.3.1. Goutte Pendante

Les tensiomètres disponibles aujourd'hui permettent en plus de faire des mesures en statique, d'analyser les changements de la tension de surface avec le temps et donc d'étudier le phénomène de relaxation de la couche d'adsorption d'une interface L-L. Avec la technique de la goutte pendante, la tension d'interface entre deux fluides est déterminée en analysant (par analyse d'image) la forme d'une goutte d'un fluide A dans un fluide B formée à l'aide d'un capillaire (**Figure 15**). La forme de la goutte est le résultat de la tension interfaciale (qui tends à donner une forme sphérique à la goutte) et de l'accélération de la pesanteur (qui tend à allonger la goutte), qui influencent son rayon de courbure, donnant comme résultat une goutte avec une forme de poire. Les dimensions réelles de la goutte sont mesurées par analyse d'image et le profil réel est ajusté selon l'équation de Young-Laplace qui décrit le profil du contour de la goutte et qui est introduite ci-dessous.

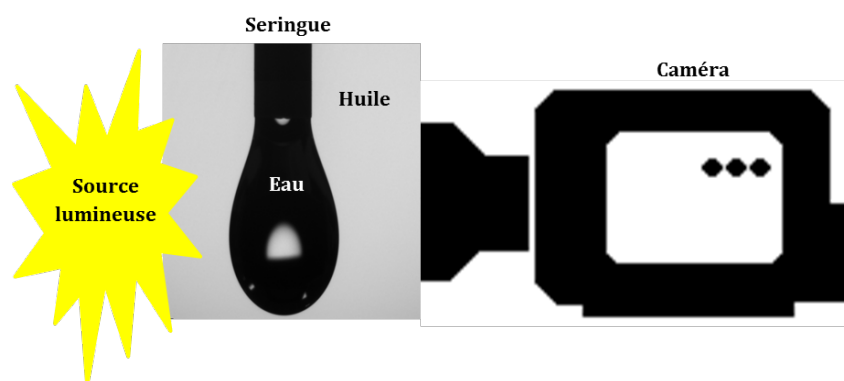


Figure 15. Goutte pendante d'eau dans l'huile

Equation de Young-Laplace

Une goutte sphérique d'un liquide, de rayon r , formée dans un autre liquide, expérimente une différence de pression Δp (pression de Laplace) à travers sa surface. Si les effets gravitationnels

sont négligés, un changement de volume nécessitera d'effectuer un travail $\Delta p dV$ sur la goutte, qui sera équilibré par une réduction de l'énergie de sa surface, donnée par γdA (Briant, 1989b).

$$dW = \Delta p dV = \gamma dA \quad \text{Eq. 4}$$

Cette dernière équation peut s'exprimer en termes du rayon pour une goutte sphérique:

$$\Delta p d\left(\frac{4}{3}\pi r^3\right) = \gamma d(4\pi r^2) \quad \text{Eq. 5}$$

Donc, la différence de pression à travers la surface d'une goutte sphérique est liée à la fois à la tension de surface et à son rayon par l'**Equation 6**:

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Eq. 6}$$

Lorsque la surface n'est pas sphérique, comme celle d'une goutte pendante (**Figure 16**), la courbure de la surface en un point peut être décrite à partir de deux rayons R_1 et R_2 (rayons des cercles tangents à la surface au point considéré). Une analyse similaire à celle faite précédemment sur une surface courbe, permet de déduire l'Equation de Young-Laplace (**Equation 7**). Cette équation, associe le profil d'une goutte pendante à ses rayons de courbure et à sa tension interfaciale.

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

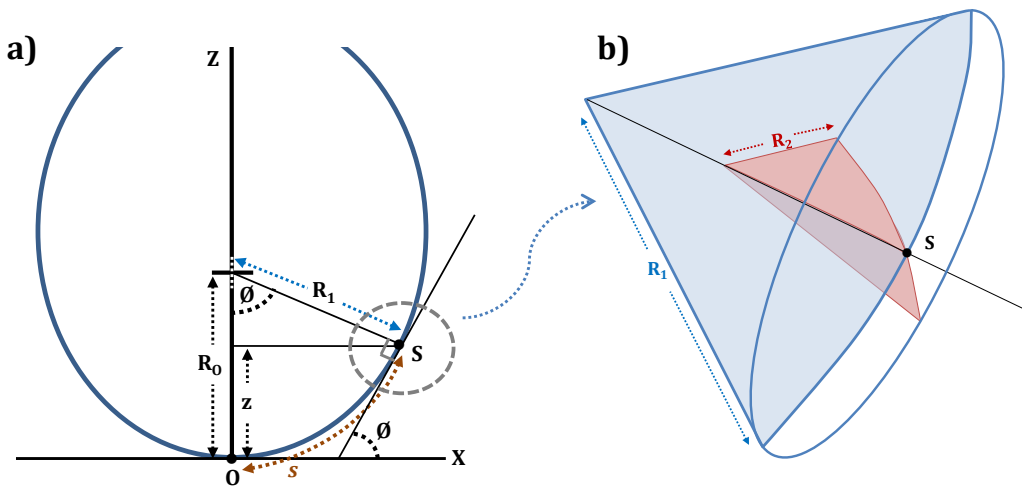


Figure 16. a) Système de coordonnées pour une goutte pendante. b) Rayons R_1 et R_2 sur un point S d'une surface convexe. Adapté de Rotenberg et al., 1983.

Au point S, la différence de pression Δp_s entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte sera égale à la différence des pressions au point O (origine du système de coordonnées (x, z)), augmenté de la

variation des pressions hydrostatiques due à la gravité entre le point O et le point z (Briant, 1989b) :

$$\Delta p_s = \Delta p_o + \Delta \rho g z \quad \text{Eq. 8}$$

Avec

$\Delta \rho$ = différence des masses volumiques des fluides à l'intérieur et à l'extérieur de la goutte

Etant donné qu'au point O, les rayons de courbure sont égaux $R_1 = R_2 = R_o$, l'équation de Young-Laplace se réécrit:

$$\Delta p_o = \frac{2\gamma}{R_o} \quad \text{Eq. 9}$$

Avec

R_o Rayon de courbure à l'origine du système de coordonnées (x, z) .

Selon la **Figure 16** :

$$R_1 = \frac{x}{\sin \phi} \quad \text{Eq. 10}$$

Donc :

$$\Delta p_s = \gamma \left(\frac{\sin \phi}{x} + \frac{1}{R_2} \right) \quad \text{Eq. 11}$$

Et combinant les équations **8**, **9** et **11**, il en résulte :

$$\frac{1}{R_2} + \frac{\sin \phi}{x} = \frac{2}{R_o} + \frac{\Delta \rho g z}{\gamma} \quad \text{Eq. 12}$$

Cette équation peut être écrite de forme adimensionnelle :

$$\frac{R_o}{R_2} + \frac{R_o \cdot \sin \phi}{x} = 2 + \frac{\Delta \rho g z \cdot R_o}{\gamma} \quad \text{Eq. 13}$$

$$\frac{R_o}{R_2} + \frac{R_o \cdot \sin \phi}{x} = 2 + \frac{\beta \cdot z}{R_o} \quad \text{Eq. 14}$$

Avec

$$\beta = \frac{\Delta \rho g R_o^2}{\gamma} \quad \text{Eq. 15}$$

β appelé le paramètre de forme, est une grandeur adimensionnelle caractéristique de la forme de la goutte.

Le profil de la goutte peut être décrit selon les coordonnées x et z en fonction de la longueur de l'arc (s) formé entre le point analysé S et l'origine des coordonnées O , et l'angle $\varnothing$. Il est possible de faire une paramétrisation en utilisant l'arc s de la goutte, ce qui permet d'obtenir les équations différentielles suivantes (Rotenberg et al., 1983; Song et Springer, 1996; Touhami et al., 1996) :

$$\frac{dx}{ds} = \cos \varnothing \quad \text{Eq. 16}$$

$$\frac{dz}{ds} = \sin \varnothing \quad \text{Eq. 17}$$

$$\frac{d\varnothing}{ds} = -\frac{\sin \varnothing}{x} + 2 + \beta z \quad \text{Eq. 18}$$

Au point O de la goutte (**Figure 16**), les conditions limites suivantes sont valides :

$$x(0) = z(0) = \varnothing(0) = 0 \quad \text{Eq. 19}$$

Le profil de la goutte est obtenu à partir de l'intégration des **Equations 16, 17 et 18**, avec les conditions aux limites données dans l'**Equation 19** pour un rayon R_o obtenu par l'analyse d'image. En faisant varier β , le profil de la goutte est ajusté à l'équation de Young-Laplace. Une fois cette valeur ajustée, il est possible de déterminer γ à partir de l'**Equation 15**.

I.3.3.2. Balance de Langmuir

Cette méthode d'analyse d'interfaces est utilisée pour étudier le comportement de molécules amphiphiles insolubles dans l'eau capables de former une monocouche à l'interface eau-air. L'organisation probable des molécules et la nature des interactions entre les différents composés dans le cas de films mixtes peuvent aussi être déterminées par cette technique. L'analyse consiste en la déposition goutte à goutte d'une quantité connue (de l'ordre de quelques microlitres) de surfactant solubilisé dans un solvant organique fortement volatil, sur une surface aqueuse (sous-phase) contenue dans une cuve en Téflon® (**Figure 17**).

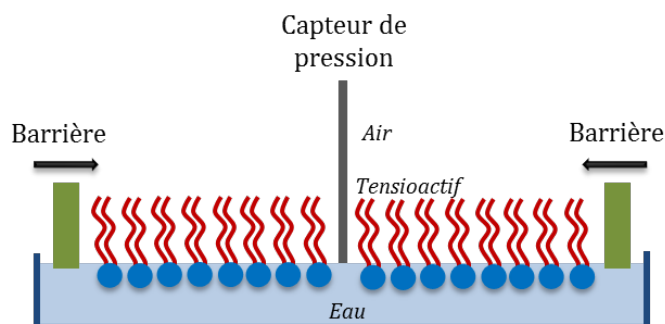


Figure 17. Obtention d'une isotherme de compression avec la balance de Langmuir

La partie hydrophile des molécules tensioactives s'oriente vers l'eau alors que la partie hydrophobe s'oriente vers l'air. Après l'évaporation du solvant, la surface est comprimée à l'aide d'une ou deux barrières en téflon qui se ferment à vitesse constante, ce qui fait varier la densité des molécules à l'interface et fait augmenter la pression interfaciale Π . La pression interfaciale (**Équation 20**) est définie comme la différence entre la tension d'interface en l'absence (γ_0) et en présence du surfactant (γ). La mesure de la pression interfaciale en fonction du changement d'aire de la surface permet donc d'obtenir une isotherme de compression.

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Eq. 20}$$

Les informations fournies par les isothermes de compression obtenues avec la Balance de Langmuir peuvent être complétées par des observations microscopiques des monocouches à différentes pressions interfaciales. Ceci est possible avec la méthode de Langmuir-Blodgett (**Figure 18**) qui permet de déposer les monocouches sur un support solide pour son analyse ultérieure. Les films de lipides purs ou en mélange ont été largement étudiés par cette technique et observés ensuite par microscopie à force atomique (AFM) (Birdi et al., 1994; Vié et al., 1998), microscopie à fluorescence (Chen et al., 2007), angle de Brewster (Lawrie et al., 2000) et microscopie électronique (Neuman et Fereshtekhou, 1988). La déposition d'une monocouche par cette méthode est schématisée dans la (**Figure 18**).

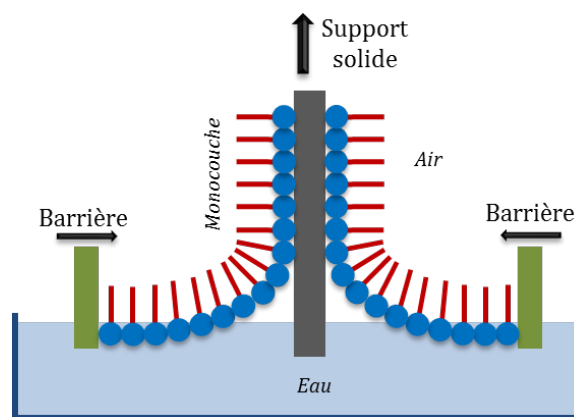


Figure 18. Dépôt d'une monocouche par la méthode de Langmuir-Blodgett

I.3.4. Emulsions

Une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'un liquide (phase dispersée) dans un autre liquide (phase continue) dans lequel il est immiscible. L'une des phases est hydrophobe et l'autre est hydrophile. Les émulsions peuvent se préparer en dispersant de l'huile dans l'eau (H/E) ou au contraire en formant de gouttelettes d'eau dans l'huile (E/H). Ces derniers mélanges sont aussi connus comme des émulsions inverses (Doumeix, 2011). Selon la taille des gouttelettes de la phase dispersée, les émulsions se classifient en macroémulsion si la taille est entre 1 et 50 μm , et de microémulsions si la taille est entre 10 et 100 nm (Vandamme et al., 2007).

Outre les composants de base de chaque phase, huile et eau par exemple, un ou plusieurs tensioactifs sont nécessaires pour que l'émulsion soit stable dans le temps. Ces molécules se placent à l'interface huile/eau formant une couche interfaciale qui réduit l'énergie interfaciale, diminue la coalescence des gouttelettes et augmente le temps de déphasage de l'émulsion (Vandamme et al., 2007 ; Doumeix, 2011).

I.3.4.1. Stabilité et mécanismes de déstabilisation des émulsions

En absence d'un tensioactif, les gouttelettes dans une émulsion tendent à se rapprocher pour réduire l'aire de l'interface et en conséquence l'énergie totale du système. Même en présence d'un tensioactif, les émulsions sont des systèmes instables et le déphasage ne peut être que retardé que par l'ajout d'un surfactant. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le déphasage d'une émulsion comme il est présenté dans la **Figure 19**. Ces mécanismes sont le crémage, la

sédimentation et la floculation, phénomènes anticipant l'apparition de la coalescence. Ce dernier phénomène et le mûrissement d'Ostwald sont les étapes préalables au déphasage de l'émulsion. Si la phase dispersée est moins dense que la phase continue et qu'il y a une agglomération de gouttelettes dans la partie supérieure de l'émulsion, le phénomène est appelé crémage ; le cas contraire est celui de la sédimentation. Ces deux phénomènes peuvent être diminués par la réduction de la taille des gouttelettes, par l'augmentation de la viscosité de la phase continue ou en utilisant des phases avec une différence de masse volumique moins importante (Legrand, 2013).

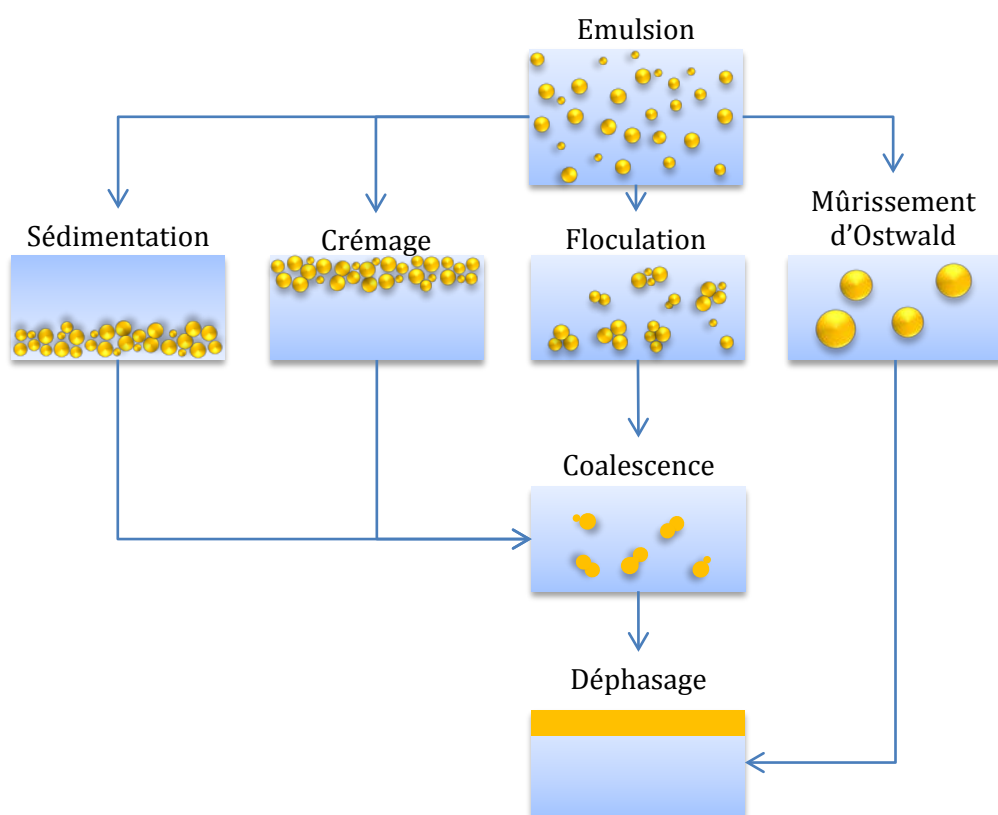


Figure 19. Mécanismes de déstabilisation des émulsions (Adapté de Doumeix, 2011)

Le mûrissement d'Ostwald, peut avoir lieu si les composants de la phase dispersée sont partiellement solubles dans la phase continue. Ces molécules diffusent à travers la phase continue faisant disparaître peu à peu les gouttelettes les plus petites et agrandissant de la même façon les plus grosses. La floculation (phénomène réversible) est le résultat de l'approche des gouttelettes à cause de l'agitation thermique (mouvement Brownien) et des forces de van der Waals. Des floes peuvent se former si la tension interfaciale est suffisamment faible et si l'interface est assez stable

pour que le film interfacial reste intact lors des collisions des gouttelettes. Au contraire, si l'interface est instable, les gouttelettes coalescent (Doumeix, 2011; Legrand, 2013).

La coalescence est un phénomène irréversible dont la dernière étape est le déphasage total du système. La coalescence de deux gouttelettes est causée par l'amincissement du film interfacial qui les sépare, ce qui est provoqué par les forces d'attraction de van der Waals devenant importantes lors d'un rapprochement de deux gouttes (Tadros, 2013).

Pour ralentir l'apparition de ces phénomènes les tensioactifs font partie incontournable des formulations des émulsions car ils permettent de stabiliser l'interface et peuvent augmenter les forces de répulsion entre deux gouttelettes. Leur adsorption à l'interface favorisent la stabilisation stérique (par la barrière qui forment à l'interface) et/ou électrostatique (par la charge portée dans le cas de certaines molécules) si le surfactant est ionique (Destribats, 2011; Doumeix, 2011).

I.3.4.2. Procédé d'émulsification

L'émulsification est un procédé qui demande l'apport d'une grande quantité d'énergie, ce qui peut être fait par différents dispositifs comme par exemple le roto-stator, les homogénéisateurs à haute pression et les ultrasons (Dalmazzone, 2000). La déformation/fragmentation des gouttes peut s'atteindre par différents méthodes : le cisaillement, la turbulence et la cavitation (formation et implosion de bulles de vapeur générées par les gradients de pression au sein du liquide). Deux types de forces sont impliquées : i) les forces visqueuses, prépondérantes dans des régimes laminaires, qui entraînent du cisaillement à l'interface entre la goutte et la phase continue et ii) les forces inertielles, qui donnent en régime turbulent et qui sont à l'origine de gradients de pression (Canselier et Poux, 2004; Legrand, 2013).

Le **Tableau 4** compare les différents dispositifs utilisés pour l'obtention des émulsions et donne une idée des granulométries qui peuvent être obtenues avec chaque technique.

Tableau 4. Comparaison de différents dispositifs d'émulsification (Adapté de Dalmazzone, 2000 ; Doumeix, 2011 ; McClements, 2004; Brochette, 2013)

Technique	Ø moyen (µm)	Mode	Mécanisme (Dalmaz., 2000)	Description
Cuve agitée	30-300	Batch/ Continu	turbulence et forces visqueuses	L'apport d'énergie se fait par agitation mécanique du système dans une cuve avec un mobile d'agitation (turbines, hélices, ancre etc). Capacité de préparation de quelques litres à de grosses quantités industrielles.
Mélangeur statique	5-100	Continu	Turbulence et forces visqueuses	Les deux phases circulent à travers d'un système rigide, non mobile qui contient des éléments fixes qui changent la direction de circulation du flux, entraînant le mélange des phases et la formation de l'émulsion lors du passage. Une deuxième étape d'homogénéisation avec un autre système en continu est en général nécessaire.
Roto-stator	0,5-5	Batch/ Continu	Turbulence et forces visqueuses	Méthode très répandue pour préparer des émulsions. Les phases à émulsifier sont soumises à un fort cisaillement lors de son passage à travers d'un espace étroit ou entrefer (<1mm) compris entre une partie fixe (stator) et une partie mobile (rotor) du mélangeur. Ce système proportionne une turbulence importante qui assure le mélange des phases
Moulin colloïdal	0,5-5	Continu	Forces visqueuses	Même principe du roto-stator mais utilisé en continu dans l'industrie alimentaire avec de liquides plutôt visqueux. Plus efficace si le liquide d'alimentation du système est une pré-émulsion. La vitesse du rotor varie entre 1000 - 20000 rpm et l'espace de l'entrefer peut être entre 50 - 1000 µm selon le modèle (McClements, 2004).
Homogénéisateur à haute pression (jet)	<<1	Continu	Turbulence, cavitation et forces visqueuses	Méthode très utilisée dans l'industrie alimentaire. Le fluide (pré-émulsifié) est projeté à contre une paroi ou contre un autre jet du fluide grâce à l'utilisation d'une pompe de haute pression. L'obtention d'une granulométrie très fine est le résultat de la collision et le passage du liquide à travers un espace étroit du dispositif. Plusieurs passages dans la chambre permettent d'atteindre de tailles plus fines.
Ultrasons ou sonication	≈1	Batch/ Continu	Turbulence et cavitation	L'utilisation d'ondes ultrasonores produit de variations de pressions et de cisaillement dans le mélange, ce qui génère la formation de fines gouttelettes de la phase à disperser. La formation d'ondes ultrasonores (de 16kHz à 1MHz de fréquence) peut se faire par transducteurs piezoélectriques ou par de jet de liquides
Procédés membranaires	0,3	Batch/ Continu	-	La phase dispersée est forcée à passer à travers une membrane vers la phase continue. Les pores de la membrane déterminent la taille de gouttelettes de l'émulsion. Technique pas encore très utilisé à l'échelle industrielle.
Microfluidization	<0,1	Continu	Turbulence, cavitation et forces visqueuses	Deux courants à haute pression des phases à homogénéiser sont dirigés vers une chambre de réaction à travers de microcanaux. Lors de leur entrée dans la chambre, les courants collisionnent à 180°, ce qui fait réduire la taille de gouttes de la phase dispersé formant de très fines gouttelettes (Paquin et Giasson, 1989).

Conclusion de la partie bibliographique sur les phénomènes d'interface

Dans ce travail de recherche le système étudié est une émulsion huile/eau. La phase huile est constituée de triglycérides et de deux lipides polaires qui jouent le rôle de tensioactifs naturels. Pour comprendre comment l'interface huile/eau se comporte au cours de la filtration membranaire permettant la concentration de la phase huile, il est nécessaire d'étudier ses caractéristiques physicochimiques, ce qui peut être réalisé par la mesure de la tension interfaciale. L'étude de l'adsorption de surfactants lipidiques aux interfaces L-G et L-L a été largement étudiée dans la littérature, mais le système étudié contient un mélange particulier de tensioactifs. Il est donc nécessaire d'étudier le comportement de ce système mixte.

Dans le cadre de ce travail, les méthodes de la goutte pendante et de la Balance de Langmuir ont été choisies. La première permet de déterminer le comportement des tensioactifs à l'interface huile/eau (comme dans l'émulsion) et la deuxième permet d'analyser l'organisation de ces molécules de tensioactifs dans le film interfacial par l'étude des monocouches formées à l'interface air/eau. Ces informations seront utiles pour mieux comprendre la façon dont l'interface pourrait réagir aux déformations probables survenant pendant la filtration et comment ces phénomènes physicochimiques pourraient influencer la séparation de la phase huile de l'émulsion par des procédés membranaires.

I.4. Filtration membranaire

I.4.1. Introduction

Les procédés membranaires sont particulièrement intéressants pour la séparation des composés à haute valeur ajoutée issus du bioraffinage de microalgues, où des mélanges complexes contenant des protéines, des polysaccharides, des lipides, etc., doivent être fractionnés. Dans le bioraffinage, les technologies propres telles que les techniques membranaires, qui limitent l'ajout de solvants organiques et préservent l'intégrité des molécules présentes dans le mélange, sont souhaitées. Cependant, le fractionnement de ces mélanges complexes est fortement influencé par les propriétés physicochimiques des espèces présentes qui peuvent s'associer selon leur affinité, et former des agrégats difficiles à séparer. En conséquence, pour que ces technologies puissent être intégrées dans le bioraffinage de microalgues, un développement de connaissances spécifiques sur les particularités des mélanges et de leur comportement lors du fractionnement, est nécessaire.

Les procédés membranaires sont très souvent utilisés pour la séparation de mélanges complexes dans des industries diverses telles que l'agroalimentaire, la pétrochimie, la métallurgie, le traitement de l'eau, etc. Dans ces industries, des volumes importants d'effluents contenant des huiles émulsifiées mélangées avec d'autres substances chimiques, sont traités par filtration membranaire. L'efficacité de cette technique est connue pour cette application, où des membranes organiques sont utilisées couramment pour la séparation des phases huile/eau. Les avantages des membranes organiques par rapport aux membranes inorganiques sont leur coût réduit et la gamme plus large de seuils de coupure disponibles sur le marché. Pour la concentration de l'huile des émulsions, les matériaux hydrophiles sont préférés car ils permettent un flux de perméat plus élevé et un colmatage par des lipides moins important.

Cette partie de la bibliographie présente dans un premier temps les concepts fondamentaux de la filtration membranaire, puis l'application de la technologie dans le bioraffinage des microalgues et une dernière partie est dédiée à l'application de cette technologie au traitement des émulsions.

I.4.2. Définition des paramètres importants

L'objectif de la filtration membranaire est de concentrer ou de séparer des particules ou des substances qui se trouvent solubilisées ou dispersées dans une solution en utilisant une membrane sélective. Le matériau et la taille des pores des membranes sont choisis en fonction des caractéristiques des composés à séparer (taille et nature chimique). Ainsi, la sélectivité de la membrane dépendra de la taille des espèces, de leur charge et de leur affinité chimique avec la membrane (Aimar et al., 2010a; Aptel et al., 2002).

Le principe de la filtration membranaire consiste à faire passer une partie de solution à traiter (du solvant et certains solutés) à travers la membrane avec comme force motrice un gradient de pression (**Figure 20**).

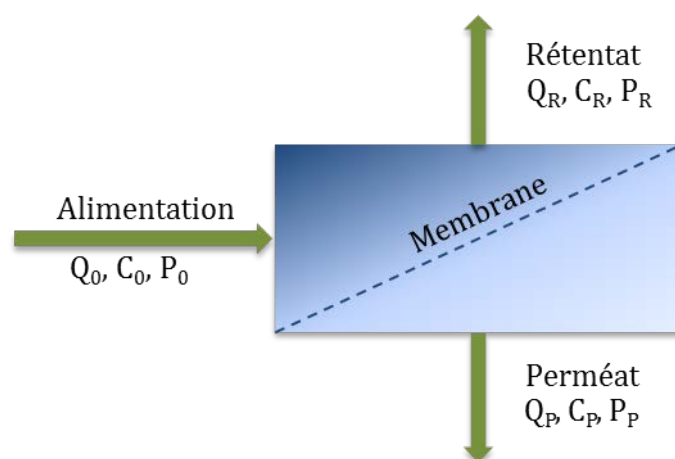


Figure 20. Schéma du principe de la filtration membranaire (Q_0 , Q_R , Q_P = débit de alimentation, de rétentat et de perméat ; C_0 , C_R , C_P = concentration du soluté dans l'alimentation, le rétentat et le perméat ; P_0 , P_R , P_P = pression d'alimentation, du côté rétentat et du côté perméat)

L'alimentation est divisée en deux parties : une partie qui traverse la membrane et qui contient les composés de petite taille ou de faible masse molaire (perméat) et une partie qui est retenue par la membrane et qui contient les espèces de plus grande taille ou avec les masses molaires les plus importantes (rétentat). Les composés qui seront retenus seront ceux dont la taille est supérieure au seuil de coupure de la membrane, qui définit les molécules qui seront retenues à plus de 95 %.

I.4.2.1. Types de procédés membranaires

Les procédés membranaires dont la force motrice est un gradient de pression sont la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration, et l'osmose inverse. Les caractéristiques principales de ces procédés sont résumées dans le **Tableau 5**. D'autres techniques telles que la dialyse et l'électrodialyse utilisent comme force motrice un gradient de concentration et de potentiel électrique respectivement.

Tableau 5. Classification des procédés baromembranaires
(Adapté de : Aptel et al., 2002; Maurel, 2017)

Type de procédé	Diamètre de pore	Pression opératoire (bar)	Pression efficace* (bar)	Perméabilité à l'eau $L_{p_{eau}}$ ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1}$)	Flux J ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	Exemples d'application
Microfiltration	0,1-10 μm	0,5 – 1	0,5-1	300 à 1500	150-1500	Bactéries, colloïdes, émulsions
Ultrafiltration	1-100 nm	1 – 5	1-5	50-100	50-500	Polymères, protéines, colloïdes
Nanofiltration	≤ 1 nm	10 – 40	20	2,5-5	50-100	Molécules organiques (pesticides, herbicides, etc). Ions multivalents
Osmose inverse	Membrane dense	30 - 80	20-40	0,5-1,5	10-60	Petites molécules et sels

*Pression efficace = $PTM - \Delta \Pi$; avec PTM =pression transmembranaire et $\Delta \Pi$ =pression osmotique

L'écoulement du fluide à travers la membrane peut être perpendiculaire (filtration frontale) ou parallèle à la surface de la membrane (filtration tangentielle). L'avantage de la filtration tangentielle est la réduction de l'accumulation de matière au voisinage immédiat (polarisation de concentration) ou sur la surface de la membrane (colmatage), ce qui permet de maintenir un flux du perméat plus élevé pendant la filtration. Les techniques utilisées dans cette étude pour la filtration de l'émulsion comprennent la micro et l'ultrafiltration en mode de filtration tangentielle.

I.4.2.2. Facteurs influençant le flux de perméat

En absence d'espèces à filtrer, le flux à travers la membrane dépend de la pression, de la viscosité du fluide (le solvant) et de la résistance de la membrane au passage du fluide. Ce flux du perméat est alors exprimé par la loi de Darcy (**Equation 21**) :

$$J = \frac{Q_p}{S} = \frac{PTM}{\mu \cdot R_m} = L_p \cdot PTM \quad \text{Eq. 21}$$

Avec :

J Flux volumique de perméat ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)

Q_p Débit volumique de perméat ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)

S Surface de la membrane (m^2)

PTM Pression transmembranaire (Pa)

μ Viscosité du perméat (Pa.s)

R_m Résistance hydraulique de la membrane au passage du liquide (m^{-1})

L_p Perméabilité hydraulique de la membrane ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ou $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$)

La perméabilité hydraulique de la membrane L_p exprime la quantité de liquide qui peut traverser la membrane par unités de temps, de surface et de pression transmembranaire. La perméabilité à l'eau caractérise l'état de la membrane propre avant la filtration de la solution réelle. Sa détermination après la filtration et après le nettoyage permet de d'établir les résistances du colmatage. La résistance hydraulique R_m est aussi une caractéristique propre à la membrane qui dépend de son épaisseur, des caractéristiques des pores et de leur nombre par unité de surface.

Lors de la filtration d'une solution réelle à une concentration de soluté donnée, le flux de perméat dépend de la concentration du soluté, de la membrane et des conditions opératoires. Dans le cadre de ce travail, les conditions de pression, température et vitesse tangentielle sont choisies et fixées afin de pouvoir comparer plusieurs types de membranes.

I.4.2.2.1 Conditions opératoires

Les conditions opératoires d'une filtration membranaire doivent être choisies en fonction du fluide à traiter et des objectifs souhaités de façon à favoriser un flux du perméat important et constant tout au long de la filtration. Les principaux paramètres sont les suivants :

La pression transmembranaire PTM

La pression transmembranaire *PTM* est la différence de pression de part et d'autre de la membrane. Elle est calculée selon l'**Equation 22**.

$$PTM = \frac{P_0 + P_R}{2} - P_P \quad \text{Eq. 22}$$

Avec :

P_0 Pression d'alimentation (Pa ou bar)

P_R Pression du côté du rétentat (Pa ou bar)

P_P Pression du côté du perméat (Pa ou bar)

La vitesse tangentielle

La vitesse tangentielle, donnée par l'**Equation 23**, est la vitesse du rétentat qui circule parallèlement à la membrane et qui conditionne l'hydrodynamique du module de filtration pour une installation, un fluide et une température de filtration donnée. Cette vitesse joue un rôle important car elle limite l'épaisseur de la couche de polarisation et diminue le colmatage de la membrane dû au dépôt de matière sur la surface de la membrane (concepts qui seront abordés au paragraphe **§I.4.2.2.2**). Cependant, l'augmentation de la vitesse tangentielle n'entraîne pas forcément une amélioration du flux lors de la filtration d'une émulsion, où d'autres facteurs tels que la granulométrie de la phase dispersée entrent en jeu : une vitesse tangentielle élevée pourrait provoquer une perte de pression importante et pourrait diminuer l'efficacité de la séparation (Hu et al., 2003).

La vitesse tangentielle doit donc être suffisamment élevée pour limiter le colmatage et mais être aussi choisie de façon à limiter les pertes de charges qui limitent le fonctionnement, en fonction du coût énergétique et de la fragilité possible des molécules (certains composés peuvent être dégradés par des taux de cisaillement forts).

$$V_{tan} = \frac{Q_0}{S_{VL}} \quad \text{Eq. 23}$$

Avec :

V_{tan}	Vitesse tangentielle moyenne de circulation du fluide dans le module ($m.s^{-1}$)
Q_0	Débit volumique du liquide circulant à l'entrée du module ($m^3.s^{-1}$)
S_{VL}	Section de la veine liquide (m^2)

La température

Comme il apparaît dans l'expression de la loi de Darcy (**Equation 21**), le flux de perméat est lié à sa viscosité. En augmentant la température de travail, il est possible de diminuer cette viscosité et donc d'augmenter le flux, à condition de respecter la sensibilité des produits filtrés. La température influence aussi le transport à travers la membrane. Dans le cas de la filtration d'une émulsion, une augmentation de température aiderait aussi à la séparation des phases car cela favorise la déstabilisation du film interfaciale (Hlavacek, 1995).

1.4.2.2.2 Polarisation de concentration et colmatage

La perméabilité hydraulique de la membrane L_p (pente de la droite « Solvant pur » de la **Figure 21**) donne la variation du flux du perméat en fonction de la pression transmembranaire lors de la filtration du solvant pur. Mais lorsque une solution contenant des particules ou des molécules retenues par la membrane est filtrée, le flux de perméat est plus faible à cause d'une accumulation de matière aux abords de la membrane (phénomène de polarisation de concentration) et ne sera en outre pas proportionnel à la pression sur toute sa plage de variation (courbe « Solution » de la **Figure 21**) : initialement une relation linéaire entre J et PTM existe mais quand le dépôt devient important (début du colmatage), à partir du point critique (P_{crit} , J_{crit}) de la **Figure 21**, la perméabilité $L_p = J/PTM$ commence à diminuer jusqu'à un moment où la hausse de pression n'a plus d'effet sur le flux de perméat (aux points P_{max} , J_{lim}).

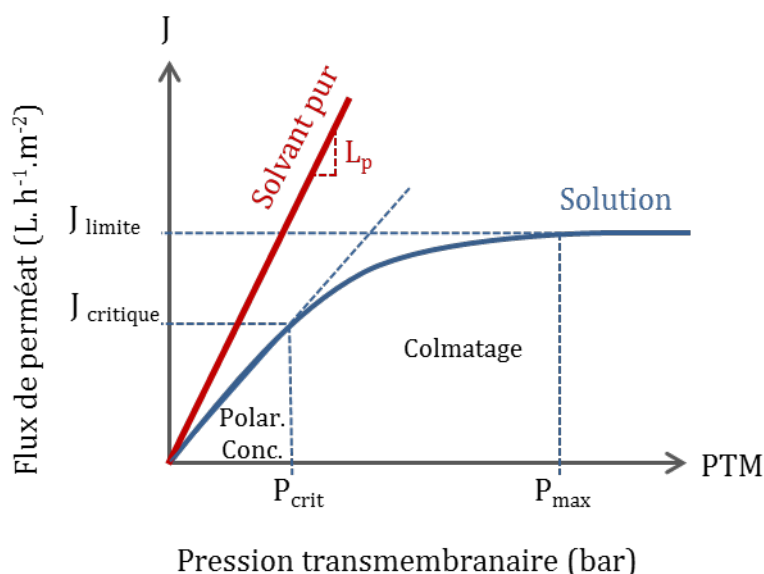


Figure 21. Variation du flux de perméat (J) en fonction de la pression transmembranaire (PTM) (Adapté de (Aimar et al., 2010b))

Le développement du colmatage dépend des phénomènes de la convection (qui emporte de la matière vers la membrane et qui est fonction du flux de perméat) et de la diffusion de matière dans le sens contraire de la filtration (qui dépend entre autres de la turbulence et du gradient de concentration) (Hu et al., 2003). Le phénomène de polarisation de concentration se différencie du phénomène de colmatage par deux caractéristiques : i) la matière accumulée à l'interface solide-liquide est dans le même état que celui dans la solution (dispersée ou solubilisée) ; ii) et le phénomène est réversible. En revanche, le colmatage est constitué d'un dépôt de matière à la surface de la membrane ou à l'intérieur des pores (formation d'un gâteau, blocage des pores ou réduction de la taille des pores). Il engendre une baisse importante du flux de perméat et modifie la sélectivité de la membrane (Rabiller-Baudry, 2016). Une partie de ce dépôt de colmatage reste toujours réversible et peut être éliminé par l'utilisation d'une vitesse tangentielle élevée et par nettoyage de la membrane (Aimar et al., 2010b).

Pendant la filtration de l'émulsion, de la matière lipidique peut s'accumuler sur la surface de la membrane au fur et à mesure qu'avance la concentration. Le rapprochement des gouttelettes de lipides dans le dépôt, favorise les collisions entre elles ce qui pourraient favoriser la formation d'agrégats qui par la suite pourraient former des structures de gel (Hu et al., 2003).

Il existe plusieurs façons de lutter contre la couche de polarisation de concentration et le colmatage. Cela passe initialement par la sélection adéquate du matériau membranaire, ensuite il est possible d'agir sur le taux de cisaillement (hydrodynamique) par exemple avec l'augmentation

de la vitesse tangentielle, l'utilisation de promoteurs de turbulence ou bien par utilisation de la filtration dynamique. D'autres actions sont aussi possibles comme la réduction de la pression, la pratique périodique de rétrolavages et l'utilisation des ultrasons.

I.4.2.2.3 Résistances

Lors de la filtration d'une solution réelle, une diminution de la perméabilité de la membrane est observée au cours du temps à cause de l'apparition de la polarisation de concentration et du colmatage. L'apparition de ces phénomènes a comme conséquence le développement de nouvelles résistances en plus de la résistance R_m de la membrane propre. Ces résistances s'opposent au passage du fluide à travers la membrane et font diminuer le flux du perméat au cours de la filtration. Des modèles de résistances en série ont été proposés pour expliquer ce comportement, dans lequel la résistance hydraulique totale R_{tot} est la somme de toutes les résistances impliquées : la résistance de la membrane propre R_m , la résistance due au colmatage R_f et la résistance due à la polarisation de concentration R_{pc} (**Equation 24**).

$$R_{tot} = R_m + R_f + R_{pc} \quad \text{Eq. 24}$$

Avec

$$R_f = R_{rev} + R_{irr} \quad \text{Eq. 25}$$

$$R_{rev} = R_{ch} + R_{ph} \quad \text{Eq. 26}$$

$$R_n = R_m + R_{irr} \quad \text{Eq. 27}$$

Avec :

R_{tot}	Résistance totale au transfert (m^{-1})
R_m	Résistance hydraulique de la membrane propre (m^{-1})
R_f	Résistance globale de colmatage (m^{-1})
R_{rev}	Résistance due au colmatage réversible (m^{-1})
R_{pc}	Résistance due au colmatage de la polarisation de concentration (m^{-1})
R_{ch}	Résistance due au colmatage réversible chimiquement (m^{-1})

R_{ph}	Résistance due au colmatage réversible physiquement (m^{-1})
R_{irr}	Résistance due au colmatage irréversible qui reste malgré le nettoyage (m^{-1})
R_n	Résistance après nettoyage (m^{-1})

La résistance due au colmatage R_f comprend :

- i) Une partie qui peut être éliminée et dite réversible R_{rev} et qui est due probablement à l'obstruction de pores ou à la formation d'un gâteau sur la membrane. A son tour, cette résistance comprend une partie qui est physiquement réversible R_{ph} (qui peut être éliminé par exemple par un lavage tangentielle ou par retrolavage) et une autre qui est chimiquement réversible R_{ch} (qui peut être éliminée par un nettoyage utilisant des produits chimiques tels que des solutions acides ou basiques).
- ii) Une partie dite irréversible R_{irr} (qui peut être due aussi à la formation d'un gâteau ou à la formation d'un gel)(Bacchin et al., 2006).

La résistance due au phénomène de la polarisation de concentration fait aussi partie de la résistance totale. Ce phénomène reste réversible par la diminution de la pression transmembranaire et donc du flux (Bacchin et al., 2006).

Ces résistances peuvent être déterminées à partir des perméabilités à l'eau et à la solution filtrante avant, pendant et après la filtration et le nettoyage. La méthodologie de ce calcul sera expliquée dans la partie correspondante du chapitre Matériel et méthodes de la filtration (§II.4.11). Les résistances peuvent être incluses dans la loi de Darcy comme suit :

$$J = \frac{PTM}{\mu \cdot R_{tot}} = \frac{PTM}{\mu \cdot (R_m + R_f + R_{pc})} \quad \text{Eq. 28}$$

1.4.2.2.4 Nettoyage

La nettoyabilité des membranes est une caractéristique très importante pour la sélection de la membrane pour une application spécifique. Le but de l'étape de nettoyage de la membrane après utilisation est de diminuer les résistances dues au colmatage, développées au cours de la filtration. Cette étape doit être conçue pour récupérer la perméabilité à l'eau au-delà de 90 % de sa valeur initiale. Les protocoles de nettoyage comme les produits disponibles sont très variés et doivent être choisis en fonction du matériau de la membrane et de la nature des dépôts. Parmi les procédés possibles se trouvent les traitements chimiques avec des acides, des bases, des détergents, etc., et les traitements enzymatiques ou physiques comme le rétrolavage et les ultrasons.

Au moment de la sélection du produit de nettoyage il faut tenir compte des effets qu'ils peuvent avoir sur le matériau membranaire. Certains produits peuvent endommager la structure polymérique irréversiblement. Pour ce qui concerne les membranes polymériques, elles sont moins résistantes aux solvants que les membranes céramiques. Par exemple, les membranes en polyamide sont incompatibles avec des agents de nettoyage chlorés car ceux-ci attaquent le matériau de manière irréversible (Mulder, 1996). D'autres peuvent faire gonfler les pores des matériaux polymériques et en conséquence changer le taux de rétention et augmenter la perméabilité (Winston Ho et Sirkar, 2012).

Concernant le nettoyage de dépôts huileux sur les membranes, les produits tensioactifs tels que le dodécylsulfate de sodium SDS, sont efficaces. D'autres produits commerciaux sont aussi disponibles, comme ceux de la gamme Ultrasil (société Ecolab), contenant des mélanges basiques, acides ou neutres de détergents, d'enzymes ou/et d'agents complexants comme l'EDTA. Certains auteurs ont utilisé des microémulsions pour nettoyer des membranes colmatées par des lipides (Hu et al., 2003).

I.4.2.3. Mode de filtration discontinue (batch)

La filtration discontinue est le mode de filtration utilisé dans ce travail de recherche pour concentrer l'émulsion. Ce mode consiste à filtrer un volume donné d'une solution en recyclant le rétentat dans la cuve d'alimentation et en soutirant le perméat (**Figure 22**).

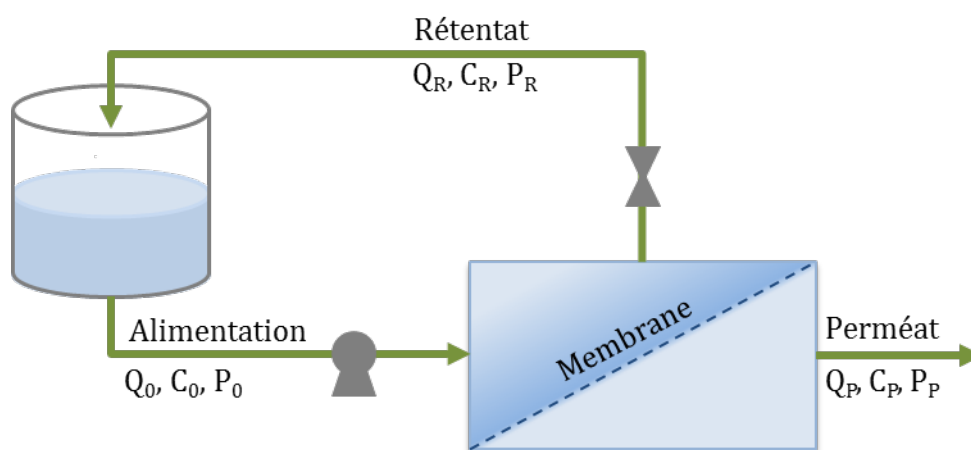


Figure 22. Filtration membranaire en mode discontinue

Les paramètres qui décrivent ce procédé sont mentionnés ci-dessous :

Le facteur de réduction volumique FRV de la solution

En filtration discontinue, le facteur de réduction volumique FRV est le ratio entre le volume initial de la solution à traiter et le volume du rétentat. Dans la pratique, la quantité de perméat soutiré est mesurée et le FRV calculé comme suit (**Equation 29**).

$$FRV = \frac{V_0}{V_R} = \frac{V_0}{V_0 - V_P} \quad \text{Eq. 29}$$

Avec

V_0 Volume initial de la solution (L)

V_R Volume du rétentat (L)

V_P Volume du perméat (L)

Le Facteur de Concentration FC d'un soluté

Le facteur de concentration FC indique combien de fois le soluté a été concentré lors de la filtration. Il est calculé à partir de l'**Equation 30**

$$FC = \frac{C_R}{C_0} \quad \text{Eq. 30}$$

Avec

C_R Concentration du soluté dans le rétentat (g.L⁻¹)

C_0 Concentration de soluté dans la solution d'alimentation (g.L⁻¹)

Le taux de rétention TR

Ce paramètre indique la proportion de soluté qui est retenue par la membrane (**Equation 31**). Il indique la sélectivité de la membrane : $TR=1$ pour une rétention totale et $TR=0$ si le composé n'est absolument pas retenu. Sa détermination est réalisée à partir des données expérimentales des concentrations de rétentat et de perméat prélevés à un instant donné de la filtration. Ce paramètre est dépendant de la membrane, de la nature de la solution à traiter et des conditions expérimentales.

$$TR = \frac{C_R - C_P}{C_0} \cdot 100 = 1 - \frac{C_P}{C_R} \cdot 100 \quad \text{Eq. 31}$$

Avec :

TR	Taux de rétention (%)
C_P	Concentration du perméat (g.L ⁻¹)
C_R	Concentration du rétentat (g.L ⁻¹)

Le bilan de matière sur l'opération

Le bilan de matière sur le procédé de filtration membranaire en mode discontinu peut être réalisé en supposant une température constante ainsi qu'une masse volumique de la solution invariable avec la composition. Ainsi, le volume total de la solution est exprimé par l'**Equation 32** ; sa variation dans le rétentat et le perméat est exprimée par l'**Equation 33**. De façon similaire, la masse totale du soluté peut être exprimée par l'**Equation 34**, avec $\overline{C_P}$ = concentration moyenne du perméat à un instant donné ; sa variation dans le rétentat et dans le perméat pendant la filtration est donnée par l'**Equation 35**.

$$\text{Bilan matière global :} \quad V_0 = V_R + V_P \quad \text{Eq. 32}$$

$$-dV_R = dV_P \quad \text{Eq. 33}$$

$$\text{Bilan matière en huile :} \quad V_0 \cdot C_0 = V_R \cdot C_R + V_P \cdot \overline{C_P} \quad \text{Eq. 34}$$

$$C_P \cdot dV_P = -d(C_R \cdot V_R) \quad \text{Eq. 35}$$

Expression du facteur de concentration FC en fonction du Facteur de Réduction Volumique

L'intégration de l'**Equation 35**, entre l'instant initial ($V_R = V_0$, $C_R = C_0$) et un instant quelconque (V_R , C_R) permet d'exprimer le facteur de concentration FC en fonction du facteur de réduction volumique FRV comme suit :

$$C_P \cdot dV_P = -C_R \cdot dV_R - V_R \cdot dC_R \quad \text{Eq. 36}$$

En remplaçant dV_P par l'**Equation 33** :

$$-C_P \cdot dV_R = -C_R \cdot dV_R - V_R \cdot dC_R \quad \text{Eq. 37}$$

En regroupant les termes et compte tenu de l'**Equation 31**:

$$\int_{V_0}^{V_R} \frac{1}{V_R} \cdot dV_R = \int_{C_0}^{C_R} -\frac{1}{TRC_R} \cdot dC_R \quad \text{Eq. 38}$$

En supposant que le taux de rétention TR est constant tout au long de l'opération :

$$\ln \frac{V_R}{V_0} = \frac{1}{TR} \ln \frac{C_0}{C_R} \quad \text{Eq. 39}$$

d'où

$$FC = \frac{C_R}{C_0} = FRV^{TR} \quad \text{Eq. 40}$$

$$\text{Si } TR = 1 \quad \therefore \quad FC = FRV$$

L'**Equation 40** est utile pour la détermination de la concentration du soluté dans le rétentat à partir de la concentration initiale, du taux de rétention et du facteur de réduction volumique FRV.

I.4.2.4. Matériaux membranaires

Les membranes sont des matériaux semi-perméables qui grâce à leur haute sélectivité, permettent la séparation d'une ou plusieurs substances contenues dans un mélange. Ce sont souvent des matériaux ayant une structure asymétrique et constitués d'un support macroporeux (qui assure la tenue mécanique) sur lequel est déposée une couche d'un matériau (nommée couche active ou sélective) donnant les propriétés de sélectivité à la membrane. Il existe selon la nature du matériau deux grandes familles de membranes : les minérales et les organiques. Le **Tableau 6** présente les caractéristiques principales de ces deux groupes de membranes.

Tableau 6. Caractéristiques des matériaux membranaires (Adapté de Remigy et Desclaux, 2007)

	Membranes céramiques	Membranes organiques
Résistance au pH	0-14	3-8
Résistance à T	> 300°C - stérilisables	Max. de 30 à 40 °C
Résistance aux solvants	Très bonne résistance	Faible résistance. Membranes chlorées PTFE, PVDF plus résistantes
Seuil de coupure*	MF, UF	MF, UF, NF, OI
Géométries	Plane, tubulaire, multicanaux	Plane, tubulaire, spiralée, fibres creuses
Coût	> 10 fois le coût des membranes organiques	Bon marché

*cf. Tableau 5, diamètre de pore.

Les membranes minérales sont caractérisées par une haute résistance au pH et à la température et supportent de pressions élevées (10-100 bar). Leur structure est souvent de type composite : une couche active d'un oxyde minéral comme l'oxyde de zirconium ZrO_2 , de titane TiO_2 , de cérium CeO_2 , d'alumine Al_2O_3 déposée sur un support céramique comme le carbone graphite ou l'alumine Al_2O_3 . Ce sont de membranes plus coûteuses (jusqu'à 10 fois les membranes organiques) et plus encombrantes que les membranes organiques. La rigidité des matériaux utilisés fait que la taille de pores disponible est limitée à la micro et l'ultrafiltration et également que les géométries sont restreintes aux formes planes, tubulaires ou multicanaux (Remigy et Desclaux, 2007).

Les membranes organiques sont constituées des matériaux polymériques, moins résistants au pH, à la température ($< 50^\circ C$) et aux solvants que les membranes céramiques. Ce sont des membranes moins chères et plus faciles à mettre en œuvre, disponibles en une large gamme de taille de pores (MF, UF, NF, OI) et de géométries (plane, spirale, tubulaire, fibres creuses). Parmi les polymères fréquemment utilisés se trouvent l'acétate de cellulose, le polyamide (PA), le polysulfone (PS), le polyéthersulfone (PES), le polyacrylonitrile (PAN) et le polyfluorure de vinyle (PVDF).

I.4.2.5. Géométrie des membranes et des modules membranaires

Les membranes sont fabriquées en formes planes ou cylindriques. Pour optimiser l'espace occupé dans les installations industrielles, des modules membranaires ayant des géométries différentes sont fabriqués. Ces modules permettent ainsi de réduire au maximum l'encombrement et offrent une surface de filtration importante. Leur géométrie peut être plane, spiralée, tubulaire, multicanal ou en fibres creuses. Le **Tableau 7** présente les caractéristiques principales des différents modules.

Tableau 7. Caractéristiques principales des différents modules membranaires (Charcosset, 2012; N. N. Li et al., 2008; Novelect, 1993; Remigy et Desclaux, 2007)

	Plans	Spirale	Tubulaire		Fibres creuses
			Monocanaux	Multicanaux	
Description	Membranes planes	Membranes planes roulées en spirale	Membranes sous forme de tube avec $\varnothing < 25$ mm)	Barreau percé de plusieurs canaux (3 à 30)	Membranes sous forme de capillaire (tube de 1 à 2 mm de diamètre).
Matériaux	Organique et minéral (rare)	Organique	Organique et minéral (rare)	Minéral	Organique
Compacité	Faible	Élevé	Faible	Meilleure compacité que les monocanaux	Élevée
Nettoyage	Rétrolavage déconseillé	Difficultés possibles	Nettoyage simple. Rétrolavage déconseillé		Rétrolavage possible
Applications	Applications ne nécessitant pas de P trop élevées. Séparation de produits biologiques	Réserve aux produits peu concentrés et au traitement d'eau	Peut traiter tous types de produits (fluides visqueux, chargés), supporte 80 bars. Souvent utilisées en agroalimentaire et traitement de l'eau.		Traitement de l'eau. Fortes PTM applicables pour des fibres de faible diamètre.
Observations	Système souple et plus modulable. Visualisation du perméat produit par chaque élément	Capacité de filtration élevée. Sensibilité au colmatage (pré-traitement nécessaire). Faible coût.	Technologie simple. Le fluide à traiter circule à l'intérieur des tubes (<i>inside-out</i>). Coûts d'installation relativement importants.		Fragile. Alimentation <i>inside-out</i> ou <i>outside-in</i> . Sensibilité au colmatage.

Les membranes planes sont constituées d'un support mécanique sur lequel se déposent une ou plusieurs couches d'un même ou de plusieurs matériaux. Cette configuration de la membrane ne permet pas de faire de rétrolavage car la pression dans le sens envers de la filtration abîmerait la couche sélective. Très couramment ce sont des membranes organiques mais des membranes céramiques peuvent être aussi trouvées dans cette géométrie (Remigy et Desclaux, 2007). Les modules spiralés sont fabriqués à partir de membranes planes organiques en les enroulant autour d'un support poreux. Cette configuration permet d'augmenter la surface de filtration disponible des membranes planes.

Les modules tubulaires monocanaux sont fabriqués avec des matériaux organiques et ont des diamètres des tubes entre 10 et 25 mm (Li et al., 2008), même si de membranes capillaires céramiques, ayant de diamètres entre 3 et 10 mm existent (Remigy et Desclaux, 2007). Elles présentent l'avantage de pouvoir être nettoyées mécaniquement. Ce sont des membranes utilisées souvent dans les industries agroalimentaires et de traitement des eaux industrielles. Sur le même

principe existent les membranes tubulaires en multicanaux, fabriquées en céramique et ayant entre 3 et 30 canaux. Elles sont plus compactes que les monocanaux et supportent des pressions jusqu'à 80 bars.

Les membranes en fibres creuses sont disponibles uniquement en matériaux organiques et normalement sont fabriquées à partir d'un seul polymère. Les fibres ont en général des diamètres entre 1 et 2 mm. Un seul module peut grouper un nombre très important de fibres, pouvant aller jusqu'à quelques milliers. Deux configuration existent : *inside-out* et *outside-in* selon que l'alimentation se fait par l'extérieur de la fibre ou par l'intérieur. Ces membranes peuvent être rétrolavées, raison pour laquelle elles sont très utilisées dans le traitement des eaux (Li et al., 2008).

I.4.3. La filtration membranaire dans le bioraffinage de microalgues

Le bioraffinage consiste à fractionner une ressource d'origine végétale dans son ensemble pour obtenir un maximum de produits valorisables avec un minimum de déchets. Les procédés propres permettant la production, séparation et purification de chaque espèce tout en gardant l'intégrité de tous les produits d'intérêt sont privilégiés (Jiang et Zhu, 2013). Dans le cas des microalgues, les composés sont de natures diverses, parmi lesquels se trouvent les lipides, les protéines, les carbohydrates et les pigments avec des applications dans les industries pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, de l'énergie, de la chimie verte, entre autres (Greenwell et al., 2010).

L'utilisation des procédés membranaires dans le bioraffinage de microalgues a suscité l'intérêt de nombreux auteurs (Bilad et al., 2014; Gerardo et al., 2014; Giorno et al., 2013; J. Kim et al., 2013) qui ont proposé son utilisation à plusieurs niveaux du procédé. La **Figure 23** illustre les étapes du bioraffinage de microalgues dans lesquelles les procédés membranaires pourraient être intégrés. Dans un premier temps, dans l'étape de culture cellulaire pour la récupération et le recyclage du milieu de culture, ensuite dans l'étape de la récolte pour séparer les cellules du milieu et les concentrer (Frappart et al., 2011) et finalement dans les étapes de séparation et purification des composés d'intérêt (Bilad et al., 2014). Les avantages de l'utilisation des procédés membranaires pour la séparation des mélanges complexes sont connus dans les industries agroalimentaires, d'énergie, de traitement des eaux usées etc. Ces avantages sont principalement liés à la haute sélectivité de la séparation, à la limitation de l'utilisation de solvants organiques, ainsi qu'aux

coûts réduits d'opération et d'entretien, d'où l'intérêt pour l'intégration de cette technologie dans le bioraffinage de microalgues.

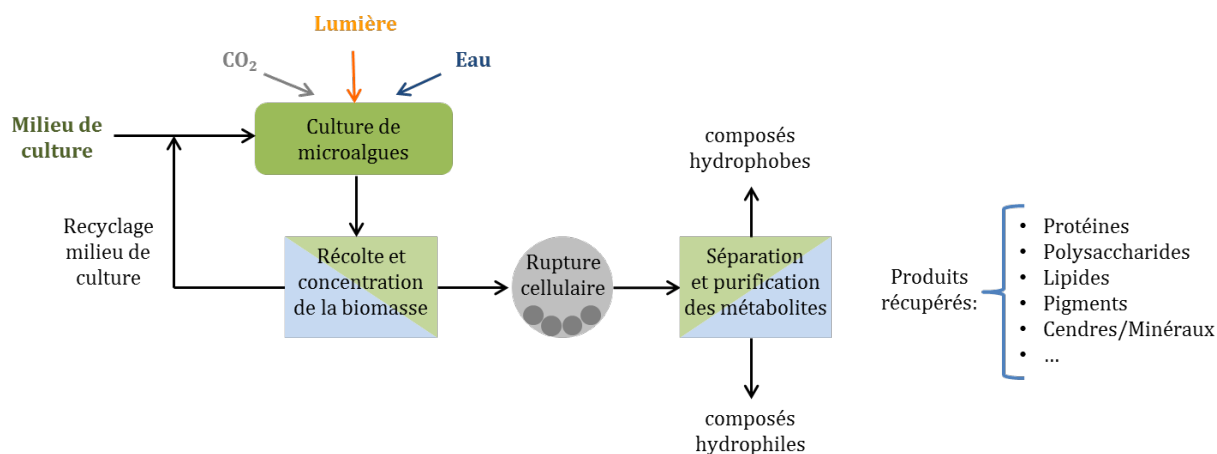


Figure 23. Les membranes dans le bioraffinage de microalgues (Adaptée de Gerardo et al., 2014)

Cependant, pour que les procédés membranaires puissent être intégrés avec succès dans le bioraffinage de microalgues, des travaux de recherche approfondis sont nécessaires sur chacune des étapes afin de les optimiser. Dans l'étape initiale de récolte et de concentration, Frappart et al., 2011 évoquent la nécessité d'étudier l'effet de l'hydrodynamique de la filtration sur les cellules afin de garder leur intégrité lors d'un couplage avec un photobioréacteur. D'autres auteurs considèrent aussi nécessaire l'étude du colmatage en considérant les caractéristiques de la suspension de microalgues, le type de membranes et les paramètres opératoires (Bilad et al., 2014).

Dans l'étape de fractionnement, plus particulièrement pour la récupération des huiles, les travaux scientifiques se sont plutôt concentrés sur l'extraction par solvant ou par CO₂ supercritique en voie sèche (Bjornsson et al., 2012; Gerardo et al., 2014; Halim et al., 2012). L'utilisation de procédés membranaires pour traiter de la biomasse humide déconstruite reste très peu développée. Dans ce cas des moyens mécaniques (à la place des solvants organiques) sont utilisés pour l'extraction des espèces de l'intérieur de la cellule, le milieu résultant de la déconstruction cellulaire pouvant être fractionné par filtration membranaire. Giorno et al., 2013, ont étudié la séparation de triglycérides à partir de biomasse humide traitée par sonication. Ils ont utilisé des membranes d'ultrafiltration en cellulose régénérée avec des seuils de coupure de 30 kDa et 100 kDa et ont obtenu des flux de perméat entre 22 et 27 L.h⁻¹.m⁻². Une meilleure séparation des triglycérides TAG (retrouvés dans le perméat avec les sucres) a été observée avec la membrane de 30 kDa. Cette membrane a été plus efficace pour la rétention de pigments et de protéines

comparée à la membrane de 100 kDa qui n'a pas retenu les protéines. Ces auteurs interpellent sur le fait que l'efficacité de séparation obtenue pour la membrane de 30 kDa est peut être liée au mélange traité et à la méthode de désintégration cellulaire utilisée.

Montalescot, 2015, a également étudié le fractionnement d'une biomasse humide de microalgues mais en partant de cellules broyées dans un broyeur à billes et dans un homogénéisateur à haute pression. Dans ce dernier travail plusieurs membranes monocanales céramiques ont été utilisées avec des seuils de coupure entre 50 nm et 1,4 μm . Au contraire de Giorno et al., 2013, cet auteur a constaté une séparation inefficace de l'huile avec une transmission inférieure à 4 % pour une biomasse broyée et riche en lipides. Les protéines et les sucres étaient aussi retenus par les différentes membranes testées. L'auteur suggère un colmatage important dès le début de la séparation qui entraînerait une modification de la sélectivité de la membrane, ceci malgré les flux importants obtenus, entre 90 et 180 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ à 90 min de filtration. Ce même auteur a travaillé sur la récupération de lipides mais partant d'une solution débarrassée de débris cellulaires : le surnageant d'un broyat centrifugé a été utilisé comme solution d'alimentation pour la filtration. Dans ce cas, des membranes céramiques avec de seuils de coupure de 20 et 50 nm ont été utilisées. La réduction des débris cellulaires dans la solution d'alimentation lui a permis d'améliorer la séparation des sucres qui ont été transmis dans le perméat à des taux de transmission compris entre 20 et 30 %. Pourtant, aucune transmission importante d'huile ou de protéines n'a été observée.

Ces auteurs ont été confrontés à la complexité des milieux résultant de la déconstruction cellulaire ainsi qu'à des forts colmatages. En plus, la variabilité de la composition entre différentes cultures et la dépendance des résultats à la composition des mélanges filtrés fait que l'extrapolation à d'autres souches n'est pas évidente. Pour toutes ces raisons, il est difficile de conclure quant aux conditions optimales du procédé de filtration pour la séparation des lipides à partir de ces mélanges issus de microalgues et sur les caractéristiques des membranes à utiliser.

Il existe donc un fort besoin d'étudier la séparation de ces mélanges complexes mais en partant de solutions ayant une composition maîtrisée. L'approche proposée dans ce travail est d'étudier la séparation de la fraction lipidique d'une solution reconstituée d'un surnageant d'un broyat de microalgues contenant des lipides typiques produits par ces microorganismes dispersés dans l'eau (émulsion huile dans l'eau H/E). La séparation de la phase huile des émulsions par des procédés membranaires étant connue dans d'autres domaines, ces connaissances pourront être d'une grande utilité pour cette étude.

I.4.4. Application de la filtration membranaire à la séparation huile/eau

La filtration membranaire est déjà employée pour la séparation de lipides émulsifiés dans de nombreuses applications des industries alimentaire, du pétrole, des métaux, etc., dans lesquelles des quantités importantes d'eau résiduaire contenant de l'huile émulsifiée sont produites et doivent être traitées (Cheryan et Rajagopalan, 1998; Dickhout et al., 2017; Duroudier, 1999). Dans ces effluents industriels, les lipides sont fréquemment accompagnés d'autres composés tels que des anticorrosifs, des amines, des bactéricides, etc., (Kajitvichyanukul et al., 2011) qui rendent plus difficile la séparation car ils ont souvent des propriétés tensioactives.

Les techniques membranaires les plus couramment utilisées pour la séparation de ces huiles émulsifiées sont la microfiltration MF et l'ultrafiltration UF. Cette séparation implique d'une part la **concentration** de l'huile par l'élimination de la phase aqueuse et d'une autre part la déstabilisation de l'interface L-L qui favorise l'apparition du phénomène de **coalescence**. Le **Tableau 8** montre quelques expériences de traitement des émulsions par filtration membranaire.

Concentration de l'huile et matériaux utilisés

Lors de la filtration d'une émulsion huile dans l'eau H/E en mode concentration, l'huile est récupérée dans le rétentat par élimination de la phase aqueuse dans le perméat. Dans le rétentat, les gouttelettes de lipides se rapprochent de plus en plus au cours de la filtration. Mais cela n'assure pas la coalescence si l'interface est stable. Même si des facteurs de concentration très élevés sont atteints, l'émulsion peut rester stable sans être démixée (Hlavacek, 1995). Dans ce cas, des conditions opératoires favorisant la déstabilisation de l'interface seront nécessaires pour atteindre une coalescence des gouttelettes. Par exemple une température plus élevée qui aiderait à la déstabilisation de l'interface.

Tableau 8. Exemples d'application de la filtration membranaire pour le traitement d'émulsions

Référence	Emulsion	Membrane	Seuil de coupure	J (L.h ⁻¹ m ⁻²)
(Abadi et al., 2011)	H/E Huile de raffineries (26 mg/L) Øgoutt. = 3-4 µm	Céramique tubulaire	0,2 µm	250 - 300
(Koltuniewicz et al., 1995)	H/E Dodecane (1000 ppm) Øgoutt. = 0,75 µm	PVDF (hphil) PS (hphil) Céramique (hphil)	PVDF (0,45 µm) PS (0,1 µm) Céramique (0,1 µm)	40 - 400
(Moulai-Mostefa et al., 2007)	H/E Huile de coupe (4 % w)	PES	50 kDa	Disq. rot. : 100 -VSEP : 250
(Daiminger et al., 1995)	H/E Dodecane 25g/L DEPA (surfactant) Øgoutt. = 5 µm	PTFE (hphob) PVDF Nitrate de cellulose	PTFE (5 et 1 µm). PVDF (0,22 µm). Nitrate de cellulose (3 µm)	-
(Hlavacek, 1995)	H/E Huile de l'industrie d'alum. (2,8-3,2 % w) Øgoutt. = 1,7 ± 0,5 µm	-Acétate de nitrocellulose (hphil) -PVDF (hphil et hphob) -PTFE (hphob) -Esters de cellulose (hphil) -Polycarbonate (hyphil) -PP (hphob)	-Acétate de nitrocellulose (0,2 µm) -PVDF (0,2µm-0,45µm) -PTFE (0,2µm) -Esters de cellulose (0,8µm) -Polycarbonate (0,2-0,12-0,1µm) -PP (0,2µm)	20(à 20°C) 35 (à 30°C)
(Hu et al., 2003)	H/E Huile de moteur (5 % vol)	PES PVDF	PES (20 et 100 kDa) PVDF (60 kDa)	102 - 108
(Zhu et al., 2014)	H/E micro and nano émulsion	PVDF superhydrophobe	-	1750 - 2100
(Susan et al., 2017)	H/E Huile de l'industrie du pétrole Øgoutt. = 0,3 µm	PVDF avec plusieurs caractéristiques hphiles	23 - 100 nm	73 - 252

Les membranes les plus adaptées pour concentrer l'huile des émulsions aqueuses sont les membranes hydrophiles puisque le colmatage par des matières organiques est moins important lorsque les membranes ont plus d'affinité pour l'eau. Mais il faut souligner que certains composés amphiphiles présentent des groupements hydrophiles qui peuvent néanmoins interagir avec les matériaux hydrophiles et qu'un colmatage reste donc possible. La caractéristique d'hydrophilicité permet d'avoir un flux de perméat plus important tout au long de la filtration (Zhu et al., 2014). Hu et al., 2003, ont obtenu des flux de perméat similaires pour 3 membranes hydrophiles en PES (20 et 100 kDa) et PVDF (60 kDa), lors de la filtration d'une émulsion issue de l'industrie pétrochimique à 5 % d'huile vol (entre 102 et 108 L.h⁻¹.m⁻² à 0,3 bar et 30 °C). Certains groupes de recherche ont concentré leurs travaux sur l'obtention de membranes superhydrophiles pour rendre plus favorable la formation de la couche d'hydratation pendant la filtration, qui limite le contact entre la phase lipidique et la surface membranaire (Peng et al., 2017). Même si certains auteurs s'intéressent aussi aux membranes céramiques (Koltuniewicz et al., 1995) pour la filtration des émulsions, ce type de matériau n'est intéressant que dans certains cas, par exemple lors de la séparation de molécules à très haute valeur ajoutée (applications en pharmacie par exemple), quand la solution contient des matières corrosives, lorsque la température de travail est importante ou quand la nature du colmatage mérite l'utilisation de produits chimiques agressifs, ce qui n'est pas le cas dans cette application (Faibish et Cohen, 2001). Pour cette raison, les membranes organiques ont été privilégiées pour cette étude.

Coalescence par déstabilisation de l'interface huile/eau. Matériaux utilisés

Pour favoriser la coalescence des gouttelettes de lipides des émulsions d'huile dans l'eau H/E, plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des membranes hydrophobes de plusieurs matériaux (PVDF, PTFE, PP, etc.) (Daiminger et al., 1995; Hlavacek, 1995; Hong et al., 2003). Ils ont observé une coalescence des gouttelettes des lipides en faisant passer l'émulsion à travers les pores des membranes hydrophobes, facilitant par la suite la séparation de la phase huile. Le mécanisme proposé par Hlavacek, 1995 pour expliquer ce phénomène est le suivant : l'interface huile/eau est perturbé par le passage de l'émulsion à travers les pores de la membrane où des gradients de vitesses et donc le cisaillement sont importants au niveau des parois. Les interactions entre les surfactants et le matériau membranaire provoqueraient la désorption du surfactant de l'interface huile/eau et favoriserait la coalescence des gouttelettes d'huile, tant à l'intérieur des pores qu'à la sortie de la membrane. D'autres auteurs ont obtenu le même effet pour des émulsions d'eau dans l'huile avec de membranes minérales hydrophiles (Sun et al., 1998). Comme dans le cas des matériaux hydrophiles, des nouveaux matériaux avec de propriétés hydrophobes améliorées sont développées (Zhu et al., 2014).

Type de filtration et conditions opératoires

Les systèmes de filtration utilisés dans la communauté scientifique pour l'étude de la séparation des huiles des émulsions par techniques membranaires sont divers. Koltuniewicz et al., 1995, ont comparé la filtration frontale et tangentielle lors de la filtration d'une émulsion d'huile dans l'eau H/E (phase organique dodécane à 1000ppm) avec un diamètre moyen de gouttelettes de 0,75 μm . Ils ont testé trois membranes hydrophiles en PVDF (0,45 μm), PS (0,1 μm) et céramique (0,1 μm) et ont observé des chutes très importantes de flux dans les premières 50 min de la filtration pour les membranes organiques (de $\approx 60\%$ pour la PVDF et de $\approx 50\%$ pour la PS pour une filtration à 12 bar) et une diminution moins importante pour la membrane céramique (20 %). Ces réductions de flux étaient plus importantes avec la hausse de la pression transmembranaire. Ils ont vérifié également l'effet positif de l'augmentation de la vitesse tangentielle sur le flux de perméat. Mais d'autres auteurs ont observé qu'à des vitesses tangentielles plus importantes, l'effet sur le flux est plus limité et l'efficacité de la séparation huile/eau peut être réduite (Hu et al., 2003). Moulai-Mostefa et al., 2007, ont étudié les effets de l'hydrodynamique sur le flux de perméat avec deux systèmes de filtration dynamique (disque rotatif et membrane vibrante) pour la filtration d'une émulsion contenant de l'huile de coupe. Ils ont observé des flux plus importants pour le système à disque rotatif, qui permet de limiter le colmatage par les hauts taux de cisaillement que ce système permet d'atteindre.

Problèmes liés à la filtration membranaire des émulsions et axes de recherche identifiés

Les principaux problèmes liés à la filtration membranaire des émulsions, identifiés par de nombreux chercheurs (Hu et al., 2003; Lipp et al., 1988; Zhu et al., 2014) concernent la diminution du flux de perméat dû aux phénomènes de polarisation de concentration et de colmatage, causés par l'accumulation d'huile aux abords de la membrane et dans les pores de celle-ci. Sans oublier que les molécules de tensioactifs peuvent également participer à ce colmatage en s'adsorbant à la surface et dans les pores.

Comme il a été montré dans les paragraphes précédents, les travaux de recherche sur l'application de la filtration membranaire pour la séparation des émulsions huile/eau ont été consacrés à l'étude de l'influence de divers paramètres sur la performance de la filtration, à l'amélioration des performances des membranes (flux de perméat, sélectivité et résistance au colmatage) par le développement et l'utilisation de nouveaux matériaux ou par l'optimisation des conditions opératoires. Malgré l'importance des surfactants dans la filtration membranaire, moins d'attention a été portée au rôle de ces molécules sur les performances du procédé. Les interactions avec la membrane sont aussi importantes car les molécules de surfactants peuvent interagir avec sa surface, ce qui favoriserait leur désorption de l'interface huile/eau.

I.4.5. Sélection des membranes pour cette étude

Pour ce travail, une présélection des matériaux a été faite sur la base d'une recherche bibliographique ciblant les membranes utilisées pour des applications similaires, tant à l'échelle du laboratoire qu'industrielle. Ces applications concernent les industries agroalimentaires, de traitements des eaux résiduaires issues des industries du pétrole et métallurgiques etc. L'objectif est d'identifier différentes membranes (différents matériaux et seuils de coupure). Ces membranes seront ensuite comparées au cours de la filtration d'un mélange synthétique représentatif d'un extrait de microalgues contenant des lipides concentrés (une émulsion).

Seuils de coupure

Des membranes avec des seuils de coupure de la gamme de microfiltration MF et d'ultrafiltration UF ont été sélectionnées car ce sont les types de filtration les plus couramment utilisés pour le traitement des émulsions dans l'industrie et étudiés par la communauté scientifique pour des applications similaires.

Matériaux

Pour cette étude, des membranes organiques ont été privilégiées. Elles sont peu chères et présentent une gamme très large de seuils de coupure disponible sur le marché. Les matériaux organiques ont été utilisés efficacement pour le traitement des eaux industrielles dans plusieurs secteurs et ont été intégrées aux procédés facilement. La performance de ces membranes organiques dans le bioraffinage de microalgues sera évaluée.

Trois matériaux différents, entre hydrophiles et hydrophobes, avec des seuils de coupure MF et UF ont été sélectionnés. Ils sont présentés dans le **Tableau 9**. Des flux de perméat plus faibles sont attendus avec les membranes hydrophobes puisque les interactions de la surface avec l'huile pourraient avoir comme conséquence un colmatage plus prononcé que pour les membranes hydrophiles. Dans l'industrie, des membranes hydrophiles comme les PES et PAN sont préférées lorsque un flux important et un colmatage organique faibles sont recherchés ; mais si une longue durabilité est souhaitée, les membranes privilégiées sont plutôt en polymères moins hydrophiles mais plus résistants comme le PVDF (durabilité entre 3-5 ans pour des applications conventionnelles) (Li et al., 2008).

Tableau 9. Matériaux et seuil de coupure des membranes sélectionnées pour l'étude

Matériau	Seuil de coupure
PES	200 kDa
PES	300 kDa
PAN	500 kDa
PVDF	0,4 μm
PVDF	1,5 μm

Le polyéthersulphone PES est le matériau le plus couramment utilisé dans l'industrie laitière (Diagne, 2013). En principe le PES est un matériau plutôt hydrophile. Il est connu pour être résistant au chlore mais à long terme l'intégrité du matériau peut être engagée (Rabiller-Baudry, 2016). Ce polymère est rigide et a de bonnes propriétés mécaniques (bonne résistance à la traction et à la compression ainsi qu'à des stress thermiques), raison pour laquelle ces membranes peuvent être stérilisées (Li et al., 2008; Zhao et al., 2013). Deux membranes en PES avec une hydrophilicité équivalente (voir angles de contact dans le **Tableau 11**) et avec 2 seuils de coupure différents ont été sélectionnées pour l'étude afin de comparer l'effet de la variation du seuil de coupure sur les performances de la filtration.

Les membranes en polyacrylonitrile PAN sont des membranes utilisées dans des applications de traitement d'émulsions huile/eau (Scharnagl et Buschatz, 2001) reconnues pour avoir une perméabilité à l'eau importante (Li et al., 2008) ; elles présentent des flux importants lors de la séparation des émulsions (Peng et al., 2017). Ce type de matériau devrait permettre de concentrer l'huile avec un colmatage moins important. Elles présentent aussi une bonne stabilité chimique et une facilité de nettoyage : des agents de nettoyage courants tels que l'acide citrique, l'hypochlorite de sodium ($\text{NaOCl} < 15 \text{ ppm}$) et des solutions diluées de NaOH ($< 0,1 \text{ \% w/w}$) sont efficaces pour récupérer sa perméabilité à l'eau au-delà de 90 % (Scharnagl et Buschatz, 2001).

Les membranes en polyfluorure de vinilidène PVDF sont des membranes caractérisées par leur grande résistance et durabilité (Li et al., 2008). Ce matériau a été proposé par plusieurs auteurs pour la concentration et déstabilisation des émulsions (Daiminger et al., 1995; Hlavacek, 1995; Hu et al., 2003; Koltuniewicz et al., 1995; Zhu et al., 2014). Il est possible de trouver des membranes en PVDF hydrophiles ou hydrophobes, l'hydrophilie de la membrane étant modifiée par les fabricants par l'apport d'un autre composé à la matrice polymérique. Pour ce travail deux membranes en PVDF seront testées, avec des seuils de coupure et des mouillabilités à l'eau différentes.

Géométrie

La géométrie plane a été privilégiée pour cette étude afin de faciliter la caractérisation du colmatage de la membrane après la filtration. Cette caractérisation ne fait pas partie des objectifs

de cette thèse, mais d'un projet mené en parallèle, en collaboration avec l'Institut de Sciences Chimiques de Rennes. Plusieurs des membranes colmatées après la filtration de l'émulsion ont été fournies à cet institut pour leur étude. Actuellement les techniques de FTIR-ATR et de potentiel d'écoulement sont mises en place pour la caractérisation du colmatage des membranes utilisées dans cette étude.

Conclusion de la partie bibliographique sur la filtration membranaire

Les procédés membranaires ont un grand potentiel pour être intégrés dans le bioraffinage de microalgues, grâce à la flexibilité de la technologie à s'adapter aux particularités du fluide à traiter. Il existe à ce moment peu de références sur l'utilisation de ces procédés pour le traitement en voie humide de biomasse microalgale déconstruite. La connaissance du produit et les conditions de filtration pour le traitement de ce type de biomasse restent encore des défis à relever. Pour que la concentration et la purification des huiles de cette biomasse puissent être envisagées, il est nécessaire de faire une sélection adéquate du matériau et des conditions opératoires du procédé. Travailler avec des solutions de composition moins complexes et maîtrisées contenant des produits issus des microalgues, comme l'émulsion proposée dans ce travail, permettra de surmonter les difficultés liées à la complexité des solutions réelles et aidera à la compréhension de la séparation.

Cette révision bibliographique a permis aussi de faire une présélection de membranes à tester (matériaux et seuils de coupure). Ceci basé sur l'utilisation de la filtration membranaire dans d'autres secteurs industriels pour la séparation des lipides des émulsions pour lesquels son efficacité a été démontrée. Dans ce travail, cinq membranes de 3 matériaux polymériques différents, avec de seuils de coupure variés et plus ou moins hydrophiles ou hydrophobes, seront testées et leurs performances comparées. Ce, avec la perspective, une fois la méthodologie développée et les membranes les plus performantes sélectionnées, de pouvoir tester plusieurs compositions de lipides dans l'émulsion et d'évaluer l'impact de cette concentration sur l'efficacité de la filtration.

Chapitre II. Matériels et Méthodes

II.1. Introduction

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'étudier la séparation membranaire de lipides produits par des microalgues à partir d'un mélange synthétique constitué d'une émulsion d'huile dans l'eau ainsi que de comprendre les phénomènes physicochimiques qui peuvent avoir lieu à l'interface huile/eau lors de la séparation.

La stratégie expérimentale (**Figure 24**) suivie a consisté en la définition et l'obtention d'une solution synthétique (émulsion) d'un broyat de microalgues et à étudier son interface et la séparation de ses phases par filtration membranaire. Dans un premier temps des échantillons de différentes cultures de la microalgue *Parachlorella kessleri* cultivée en carence d'azote ainsi que des broyats (obtenus par broyeur à haute pression et broyeur à billes) et de leurs surnageants (obtenus par centrifugation des broyats) ont été caractérisés. Les résultats de cette première partie ont été ensuite utilisés pour formuler une émulsion d'huile dans l'eau avec un pH, une conductivité, une granulométrie et une composition lipidique définie. Un mélange d'huiles végétales (avocat et cameline) et de deux produits tensioactifs (des lipides polaires de la famille des phospholipides et un mélange d'alcools gras et de glycolipides) a été sélectionné pour la phase lipidique. Un procédé d'émulsification adapté à la formulation de l'émulsion a été défini de façon à obtenir une émulsion stable ayant les caractéristiques granulométriques souhaitées. Par la suite, des analyses des interfaces huile/eau et air/eau en présence des tensioactifs employés dans la formulation de l'émulsion ont été réalisées par les méthodes de la goutte pendante et de la balance de Langmuir. Finalement des essais de filtration membranaire de l'émulsion formulée, avec plusieurs types de matériaux membranaires et différents seuils de coupure ont été exécutés.

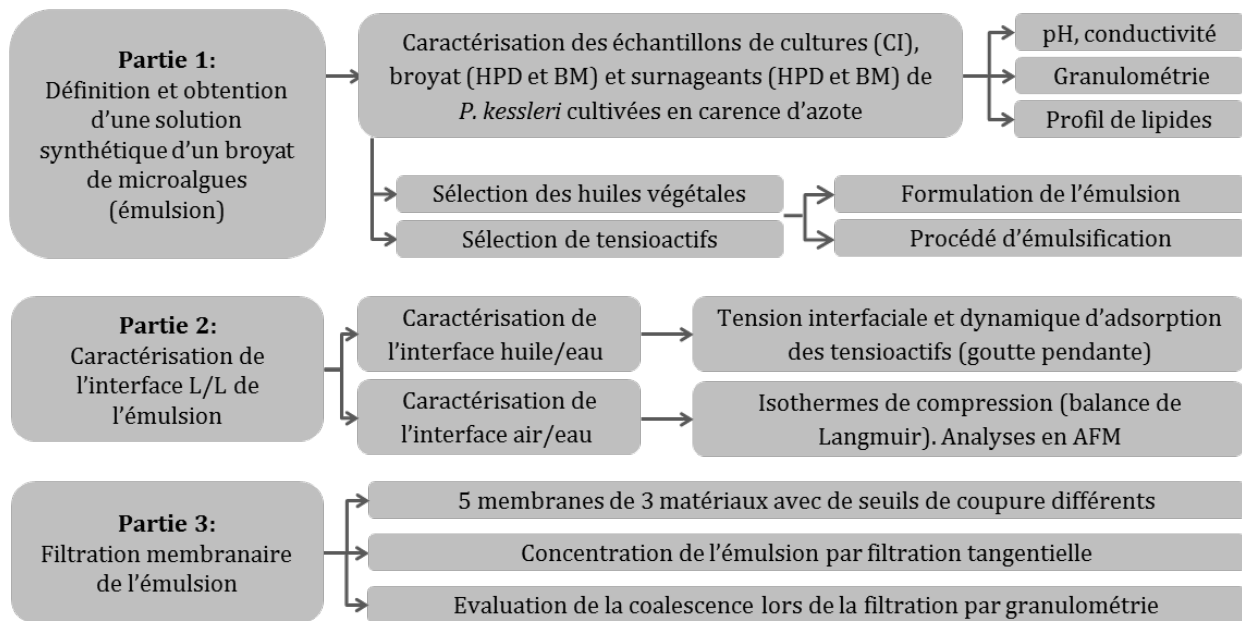


Figure 24. Stratégie expérimentale du travail de recherche

II.2. Obtention de la solution synthétique (émulsion)

II.2.1. Caractérisation des échantillons de cultures de *Parachlorella kessleri*

Dans la première étape du projet, l'objectif était la définition de la composition d'une émulsion d'huile dans l'eau H/E formulée sur la base de la caractérisation d'un extrait de microalgues, cultivées en condition de carence en azote. Cette étape comporte donc i) la caractérisation d'un broyat réel de microalgues ii) la formulation de l'émulsion et la définition d'un protocole d'émulsification.

II.2.1.1. Caractérisation des échantillons de *Parachlorella kessleri*, granulométrie et analyse des lipides

La méthodologie utilisée pour la caractérisation des lipides et la granulométrie des échantillons de *Parachlorella kessleri* sera détaillée dans l'article présenté dans le 0. Un résumé de cette méthodologie est présenté dans les prochaines lignes.

Les échantillons analysés ont été fournis par V. Montalescot du laboratoire GEPEA et étaient issues du broyage des cultures de *Parachlorella kessleri* cultivée en carence d'azote. Ces échantillons comprenaient i) des cellules intactes (non broyées) dans leur milieu de culture, ii) des broyats et iii) des surnageants des broyats (obtenus après centrifugation). Des échantillons de 4 batch différents, ayant une quantité total d'huile différente ont été analysés. Deux méthodes de broyage ont été utilisées pour l'obtention de ces échantillons : un broyeur à haute pression (HPD pour le sigle en anglais) et un broyeur à billes (BM pour le sigle en anglais). Les échantillons ont été obtenus à deux taux de destruction cellulaire : 85 % et 100 %. La granulométrie de ces échantillons a été déterminée à l'aide d'un granulomètre laser au laboratoire de l'équipe BIA de l'INRA de Nantes. La caractérisation du profil lipidique des échantillons a été réalisée en plusieurs étapes :

- i) Extraction par solvants des huiles contenus dans les échantillons ;
- ii) Transméthylation des lipides de l'extrait et détermination du profil des acides gras totaux par chromatographie en phase gazeuse (GC) ;
- iii) Séparation des lipides de l'extrait en classes ou *familles* triglycérides (TAG), autres lipides neutres (ONL pour ses sigles en anglais), glycolipides (GL), phospholipides (PL) ;
- iv) Transméthylation des différentes *familles* pour l'obtention de leurs profils des acides gras totaux par chromatographie en phase gazeuse (GC) ;
- v) Analyse des différentes familles des lipides par HPLC ;
- vi) Analyse de l'extrait de lipides par HPTLC pour l'identification et quantification des principaux lipides polaires.

II.2.1.2. pH et Conductivité

Pour la détermination du pH, un pHmètre FiveGo de Mettler Toledo pourvu d'une sonde LE409-DIN a été étalonné et utilisé. Pour la détermination de la conductivité, un conductimètre FiveGo étalonné avec une solution étalon de 1413 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ à 20 °C a été utilisé.

II.2.2. Formulation de l'émulsion et produits utilisés

Les caractéristiques de l'émulsion en termes de granulométrie et de composition ont été définies sur la base des résultats des analyses des broyats et des surnageants de la microalgue *Parachlorella kessleri*. Ces caractéristiques seront détaillées et leur choix justifiés dans le **Chapitre III**, section §III.3.1 et §III.3.2. Cependant la formulation résultante est ici présentée afin de bien décrire le protocole d'obtention de l'émulsion.

L'émulsion utilisée dans cette étude est une émulsion d'huile dans l'eau (H/E) dont la fraction d'huile est de 2 % w. Une solution tampon phosphate à pH 7,4 constitue la phase aqueuse. La fraction d'huile est composée par des lipides neutres et des lipides polaires comme montrée dans la **Figure 25**. Les lipides neutres sont apportés par un mélange d'huiles d'avocat et de cameline et les lipides polaires par un mélange de phospholipides (de la famille de phosphatidylcholines PC), d'alcools gras et de glycolipides (de la famille des alkylpolyglucosides APG).

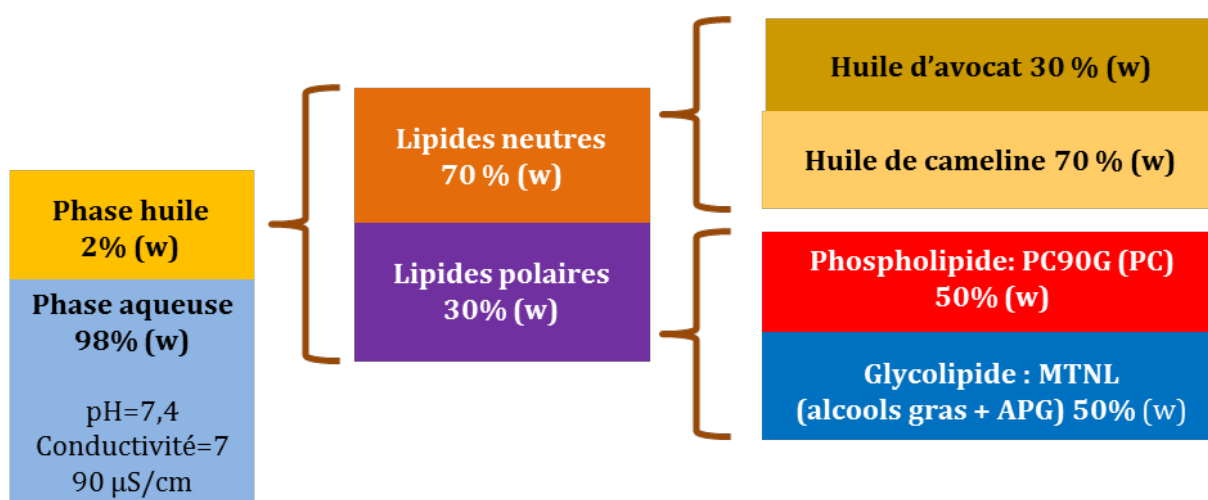


Figure 25. Formulation de la solution synthétique représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues (émulsion d'huile dans l'eau H/E). PC90G : produit tensioactif de phosphatidylcholine (PC). MTNL : produit tensioactif composé d'alcools gras et d'alkylpolyglucosides (APG).

Le choix du mélange d'huiles végétales a été réalisé à partir de la caractérisation des cinq produits (huile d'avocat, de cameline, de macadamia, de pépins de raisin et d'olive) sélectionnées initialement par leurs profils des acides gras totaux trouvés dans la littérature (**Figure 5**). Les critères de sélection ont été principalement la disponibilité, l'état liquide du produit à

température ambiante pour faciliter les manipulations tout en conservant une teneur importante en acides gras saturés et moindre en lipides insaturés. Ceci se justifie par la composition des microalgues donnée dans la littérature pour différentes souches en phase stationnaire de croissance (**Figure 3**).

La comparaison des profils des acides gras totaux des échantillons de microalgues avec ceux de ces huiles végétales (principalement constituées de triglycérides) (résultats montrés en **section §III.3.1** a permis de sélectionner les huiles d'avocat et de cameline pour composer la phase huileuse (TAG) de l'émulsion (avocat/cameline 30/70 %w). Des huiles de l'enseigne Ensemble ont été utilisées.

Des glycolipides et des alcools gras et de phospholipides ont été ajoutés dans la phase lipidique pour permettre la stabilité des émulsions. Les principales caractéristiques des produits tensioactifs utilisés sont présentées dans le **Tableau 10**. Ceux sont des produits utilisés notamment dans les industries pharmaceutique et cosmétique.

Tableau 10. Caractéristiques des produits tensioactifs utilisés dans la formulation de l'émulsion

Produit		Caractéristiques
Phospholipon 90G (PC90G)	Type	Zwitterionique
	Composition	PC > 96,2 %w, LPC max. 4,0 % w, tocopherol max. 0,3 % w. Acides gras totaux*: C16:0 (12,6 %w), C18:0 (3,5 %w), C18:1n-9 (6,7 %w), C18:1n-7 (1,6 %w), C18:2n-6 (66,5 %w), C18:3 (8,4 %w). Autres < 0,5 %w: C20:0, C20:1, C22:0, C22:1.
	Fournisseur	Lipoid
Montanov-L (MTNL)	Type	Non ionique, promoteur de cristaux liquides et de phase lamellaire
	Composition	75 – 85 %w alcools gras (chaines hydrocarbonées de C14 à C22), 15 – 25 %w alkyl glucosides (chaines hydrocarbonées de C12 à 20)
	Fournisseur	Seppic

*Résultats expérimentaux

II.2.3. Obtention de l'émulsion

La technique choisie pour l'émulsification a été l'homogénéisation avec un rotor-stator. Cet outil a été sélectionné pour la simplicité de son utilisation et parce que c'est une technologie permettant

d'atteindre une granulométrie entre 0,5-5mm, qui est dans la gamme de taille des particules trouvées dans les broyats et les surnageant de microalgues (voir 0, section §III.2.3.2.). L'appareil utilisé a été un rotor-stator Ultraturrax T-25 avec une tige de 13 mm de diamètre.

Les conditions du procédé d'émulsification ont été choisies de façon à obtenir une émulsion d'huile dans l'eau (fraction d'huile de 2 % w) stable dans le temps avec les caractéristiques granulométriques souhaitées. Une phase pré-expérimentale a permis de définir ces conditions. Les paramètres pris en compte ont été : le mode de préparation des phases aqueuse et huileuse, la température de préparation des phases, la vitesse de rotation du roto-stator, le temps d'homogénéisation et le refroidissement. Le protocole choisi est montré dans la **Figure 26**.

La phase aqueuse est une solution tampon phosphate à pH = 7,4 préparée à partir de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4 . Initialement 1L d'une solution mère est préparée avec 11,2 mL d'une solution 1 M KH_2PO_4 et 38,8 mL d'une solution 1 M de K_2HPO_4 ; le volume est complété jusqu'à 1 L avec de l'eau MilliQ. La solution finale à utiliser dans l'émulsion est préparée à partir de 192,8 mL de la solution mère dilués jusqu'à 2 L avec de l'eau MilliQ. La conductivité de cette solution est vérifiée et en cas de besoin ajusté par l'ajout d'eau MilliQ jusqu'à obtenir une conductivité de $790 \mu\text{S.cm}^{-1}$.

Les phases aqueuses et huileuse (mélange d'huiles végétales avocat/cameline 30/70 %w) sont initialement pré-homogénéisées avec un surfactant dans chaque phase : PC90G dans la phase aqueuse et MTNL dans la phase huile. Chaque phase est chauffée à 85 °C et mélangée jusqu'à l'obtention de deux phases homogènes. Ensuite la phase huile est ajoutée à la phase aqueuse et les deux phases sont mélangées à 85 °C pendant 30 min. L'émulsification avec le rotor-stator est réalisée à 23800 tpm pendant 30 min avec un bécher à chicanes qui empêche la formation de vortex et favorise l'homogénéisation. L'émulsion est ensuite refroidie avec une agitation douce et laissée en agitation pendant 20h jusqu'à la séparation par filtration membranaire.

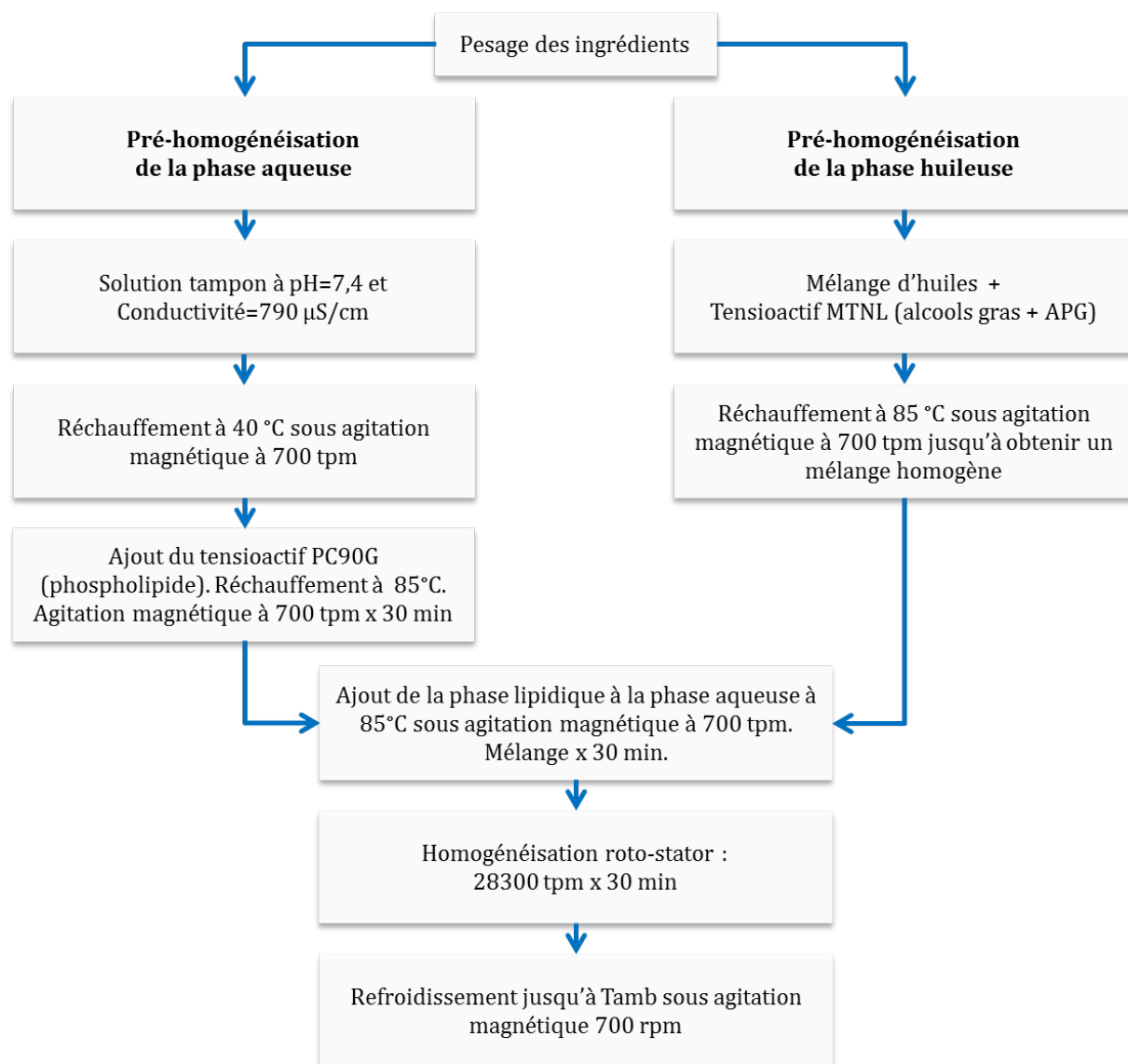


Figure 26. Protocole d'obtention d'une solution synthétique représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues (émulsion d'huile dans l'eau H/E)

II.2.4. Granulométrie de l'émulsion

Un microscope droit Axio Scope A1, Carl Zeiss a été utilisé pour l'observation microscopique des échantillons des émulsions préparées. Un échantillon de 100 µL d'émulsion était dilué 10 fois dans la solution tampon utilisée pour la préparation de l'émulsion. Ceci afin de faciliter le traitement d'image par le logiciel *open source* Image J développé par les National Institutes of Health. Cette dilution entraînant des changements dans la phase continue pouvant avoir des conséquences sur la stabilité de l'interface, l'observation au microscope était faite rapidement après la dilution. Pour

ces observations un volume d'échantillon de 80 μL est déposé sur le puits d'une lame à cavité et observé avec un grossissement de 100 X. Entre 30 et 50 images ont été prises pour chaque échantillon afin d'avoir un nombre de gouttelettes supérieur à 5000, établi comme le minimum nécessaire pour avoir une taille moyenne de gouttelettes des lipides invariable. Ces images ont été analysées avec le logiciel Image J et la **distribution de taille en volume** a été déterminée. Pour les distributions monomodales (un pic unique), les diamètres Dv_{10} , Dv_{50} et Dv_{90} ont été relevés. Ces trois paramètres indiquent les diamètres en-dessous desquels se trouvent 10 %, 50 % et 90 % en volume des gouttelettes analysées. Il est important de signaler que la limite de détection du microscope utilisé est de 0,5 μm , en conséquence, toutes les particules de taille inférieure ne sont pas détectées et les résultats de ces analyses ne seront valides que pour les gouttelettes de taille supérieure.

II.3. Analyse des Interfaces

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la séparation membranaire de lipides produits par des microalgues à partir d'un mélange synthétique et de comprendre les phénomènes physicochimiques qui peuvent avoir lieu à l'interface huile/eau lors de la séparation. Pour atteindre cet objectif il est nécessaire d'étudier l'interface huile/eau présente dans l'émulsion. L'objectif de cette partie expérimentale vise à déterminer les propriétés physicochimiques de cette interface constituée de deux produits tensioactifs de différentes familles de lipides polaires, en termes de tension interfaciale et de structure formée à l'interface.

L'approche utilisée a été d'analyser initialement le comportement individuel de chaque produit tensioactif à des différentes concentrations aux interfaces huile/eau et air-eau. Ensuite ces systèmes d'un seul surfactant ont été comparés aux systèmes portant un mélange de deux tensioactifs comme dans l'émulsion.

Pour l'analyse de l'interface huile/eau la méthode de la goutte pendante a été utilisée afin de mesurer la tension interfaciale des différents systèmes à plusieurs concentrations. Les mesures ont été faites au laboratoire de Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM) de l'ESPCI à Paris et au laboratoire de l'unité de Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) de l'INRA à Nantes.

Dans le cas de l'analyse de l'interface air-eau la méthode de la balance de Langmuir a été utilisée pour déterminer les isothermes de compression permettant d'analyser la structure et les

interactions des molécules dans les monocouches formées. Dans ce cas, les mesures ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de l'unité BIA de l'INRA de Nantes.

II.3.1. Analyse de l'interface huile/eau par la méthode de la goutte pendante

II.3.1.1. Systèmes étudiés

La phase lipidique utilisée correspond à la phase de l'émulsion constituée par un mélange d'huiles d'avocat et de cameline et 1 ou 2 surfactants : PC90G (phosphatidylcholine) et MTNL (mélange des alcools gras et APG). La phase aqueuse correspond à la solution tampon à pH=7,4 utilisée pour la préparation de l'émulsion.

Afin de reproduire l'interface huile/eau de l'émulsion formulée, les systèmes suivants ont été envisagés :

- a) Système à 1 surfactant : (PC dans l'eau), (PC dans l'huile), (MTN dans l'huile)
- b) Système à 2 surfactants dans la phase lipidique (PC+MTN dans l'huile)
- c) Système à 2 surfactants, 1 dans chaque phase : (PC dans l'eau) et (MTN dans l'huile)

La tension interfaciale à l'équilibre de ces systèmes a été évaluée lors d'essais préliminaires. Les systèmes portant la PC dans l'huile et le système portant la PC dans l'eau ont présenté des tensions interfaciales équivalentes. En conséquence, afin d'atteindre une meilleure homogénéisation des surfactants dans la phase qui les contient, les systèmes portant un ou deux tensioactifs dans l'huile ont été choisis pour continuer cette étude.

De même, lors des essais préliminaires, la concentration totale en surfactants a variée entre 0,5 et 30% w/w de la phase lipidique. Pour des concentrations supérieures à 5% w/w, ces essais ont permis d'observer des inconvénients concernant la solidification de la phase lipidique. En effet, pour des telles concentrations, il était nécessaire de maintenir la température de l'émulsion au-delà de 55°C pour garder la phase lipidique à l'état liquide. Par ailleurs, la méthode de la goutte pendante est adaptée à la mesure de tensions d'interface supérieures à 0,1 mN.m⁻¹, ce qui limite la concentration en surfactants à une valeur inférieure à 0,5% w/w.

En conséquence, le système retenu pour l'étude de l'interface huile/eau (H/E) contient des surfactants dans la phase lipidique concentrés à $\leq 0,5$ % w/w, ce qui est une concentration

inférieure à la concentration réelle dans l'émulsion formulée (30 % w/w de surfactant dans la phase lipidique). Les mesures ont été réalisées à 20°C.

II.3.1.2. Purification des huiles végétales

Les huiles végétales contiennent naturellement des molécules amphiphiles comme les monoacylglycerides et les lipides polaires capables de s'adsorber à l'interface et de diminuer la tension interfaciale. Afin que ces molécules n'entrent pas en compétition avec les tensioactifs utilisés dans cette étude lors des mesures de tension interfaciale, les huiles d'avocat et de cameline ont été purifiées selon la méthodologie suivante : un mélange d'huile/silicate de magnésium (Florasil - Acros Organics maille 60-100) 70/30 % w/w a été mis en agitation pendant 15 jours dans un récipient hermétiquement fermé sous azote dans une salle climatisée à une température de 20 ± 2 °C. Le mélange a été centrifugé 20 min à 6000 tpm et 20°C, le surnageant filtré sous vide avec un filtre en laine de verre de 0,7 μm . L'huile purifiée a été stockée à 4°C jusqu'aux analyses.

II.3.1.3. Préparation des phases

La phase aqueuse a été préparée suivant le protocole décrit en §II.2.3 pour la solution tampon de l'émulsion. Pour la préparation de la phase lipidique, un mélange d'huile composé de 30 % w/w d'huile d'Avocat et 70% w/w d'huile de Cameline a été préparé à partir des huiles purifiées selon le protocole décrit en §II.3.1.2. Un ou deux surfactants à la concentration souhaitée ont été incorporés au mélange d'huiles à 85 °C pendant 30 minutes avec agitation magnétique sur une plaque chauffante avec contrôle de température. Le mélange huiles-surfactant a été gardé sous agitation jusqu'à atteindre la température ambiante.

Les concentrations totales de surfactant testées étaient : 0,5 ; 0,1 ; 0,01 ; 0,001, et 0,0001 % w/w de tensioactif dans la phase lipidique. La proportion PC90G/MTNL dans les mélanges a été gardée constante à 50:50 % w/w.

II.3.1.4. Mesure de la masse volumique

La mesure de la tension interfaciale étant très sensible à la masse volumique des phases, cette propriété a été mesurée pour chaque mélange avec un densimètre DMA 4500 à une température de 20 °C. La précision de l'appareil pour la masse volumique est de 0,00005 g.cm⁻³ et de 0,03 °C pour la température.

II.3.1.5. Dynamique d'adsorption et tension interfaciale à l'équilibre

Un tensiomètre Tracker IT Concept de TECLIS avec une plage de mesure de $0,1 \text{ mN.m}^{-1}$ à 100 mN.m^{-1} a été utilisé pour les mesures de tension interfaciale. La température du système analysée a été régulée par un thermostat connecté à la cuve contenant une des phases. L'incertitude maximale sur la valeur calculée de la tension interfaciale a été estimée à $0,1 \text{ mN.m}^{-1}$ (Shchipunov et Kolpakov, 1991).

Des gouttes entre 1 et $10 \mu\text{L}$ de la phase aqueuse ont été formées à l'intérieur d'une cuve tempérée à 20°C contenant la phase lipidique à l'aide des aiguilles de diamètres variant entre 0,5 et 1 mm. La tension interfaciale a été déterminée par l'analyse du profil de la goutte en utilisant des images acquises par une caméra connectée à un ordinateur. La méthode de calcul sur laquelle se base la détermination de la tension interfaciale a été expliquée au §I.3.3.1. La tension interfaciale a été enregistrée dès la fin de la formation de la goutte et jusqu'à l'équilibre du système. Le temps de stabilisation étant différent pour chaque composition étudiée, la détermination du point d'équilibre est faite en observant la courbe γ vs $\log t$.

II.3.2. Analyse de l'interface air/eau par balance de Langmuir

L'appareil utilisé pour la détermination des isothermes de compression est une balance de Langmuir marque Kibron, pilotée par le logiciel Filmware 3.6.2. L'appareil comporte une cuve en acier inoxydable de 150 mL de capacité, dont les bords sont entourés par du Téflon®. Un puit au centre de la cuve permet d'immerger une lame de mica pour transférer le film monomoléculaire. La plage de mesures de l'appareil est de 0 à 130 mN.m^{-1} , avec une précision supérieure à 0,1 % et une résolution de $10 \mu\text{N.m}^{-1}$. Les expériences se sont déroulées dans une salle à température contrôlée à 20°C .

II.3.2.1. Détermination des isothermes de compression en balance de Langmuir

II.3.2.1.1 Vérification de la propreté de la solution tampon

La méthode de la balance de Langmuir étant très sensible à toute contamination, une routine spécifique de nettoyage de la cuve ainsi qu'une vérification systématique de la propreté du

tampon avant chaque expérience étaient nécessaires. La cuve était rincée abondamment avant chaque expérience avec de l'eau chaude du robinet et ensuite avec de l'eau distillée. Dans toutes les expériences, une cuve portant un puit au centre pour l'insertion de la lame de mica a été utilisée même si aucun prélèvement n'était fait, ceci pour garder les mêmes conditions dans les expériences sans et avec prélèvement du film. Dans toutes les expériences, 150 mL de solution tampon ont été utilisés pour le remplissage de la cuve. La vérification de la propreté de cette solution a été faite en fermant les barrières à 40 mm.min⁻¹ et en mesurant la pression interfaciale jusqu'à la fermeture maximale possible. Du moment que la pression interfaciale restait constante et proche de zéro pendant toute la compression, la solution tampon pouvait être considérée comme propre.

II.3.2.1.2 Obtention de l'isotherme de compression

Des solutions de chaque surfactant ou de leur mélange (50%/50% w/w) ont été préparées dans du chloroforme (CHCl₃) à une concentration totale de tensioactif de 1 mg.mL⁻¹. Des essais préliminaires ont été faits avec la PC90G pour déterminer la quantité optimale de surfactant à déposer, qui correspondait à une quantité suffisante pour couvrir toute la surface de l'eau (215 cm²) sans que pour autant celle-ci fasse augmenter la pression interfaciale avec les barrières 100 % ouvertes. Des quantités entre 12 et 20 µL ont été testées. Ainsi, une quantité de 15 µL a été déterminée comme adéquate pour la réalisation des expériences.

Ensuite 15 µL d'échantillon ont été déposés goutte à goutte sur toute la surface du tampon à l'aide d'une microseringue de 25 µL. Le système a été laissé en repos pendant 10 min pour équilibrage de la couche interfaciale et pour l'évaporation du solvant. Ensuite, les barrières ont été fermées à une vitesse de 10 mm.min⁻¹ et la pression interfaciale a été mesurée pour l'obtention de l'isotherme de compression (variation de la pression interfaciale en fonction de l'aire occupée par molécule à l'interface).

L'aire occupée par molécule est calculée à partir de l'estimation du nombre de molécules déposées à l'interface divisée par l'aire totale interfaciale de la balance de Langmuir à un moment donné de l'expérience. L'estimation du nombre de molécules est effectuée à partir des masses molaires moyennes de chaque produit, dans le cas de la PC90G une masse de 776,25 g.mol⁻¹. La masse molaire moyenne du MTNL est une donnée confidentielle du fournisseur et ne peut pas être présentée ici.

II.3.2.2. Prélèvements des films de tensioactifs sur lame de mica pour l'analyse en Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les prélèvements des films en lame de mica ont été faits à des pressions d'interface (Π) constantes de 10, 15 et 25 mN.m⁻¹ dans le cas de la PC90G, et de 25 mN.m⁻¹ dans le cas du MTNL et du mélange PC90G/MTNL 50%/50% w/w. Pour ce faire, la propreté du tampon a été vérifiée comme décrit en II.3.2.1.1. Ensuite, une lame de mica (suspendue par un crochet accessoire de la balance de Langmuir) a été immergée de 1 cm dans le puit de la cuve et 5 μ L d'échantillon ont été déposés sur la surface. L'équilibrage du film et la compression de la surface ont été réalisés comme décrit en II.3.2.1.2. Une fois atteinte la pression de surface souhaitée, la lame de mica a été sortie de l'eau à une vitesse constante de 2,5 mm.min⁻¹, en emportant sur sa surface le film monomoléculaire de tensioactifs formé sur l'eau. Pendant le prélèvement, la pression (Π) a été gardée constante en contrôlant l'ouverture des barrières afin que toute la structure de la monocouche prélevée ait la pression de consigne. Les lames avec leur dépôt ont été ensuite exposées à l'air ambiant pour séchage et dans des boîtes de Pétri pour stockage à température ambiante jusqu'aux observations microscopiques.

II.3.2.3. Analyse des films des tensioactifs en AFM

Les observations en microscopie AFM ont été réalisées par la plate-forme 2CBioMIF (ScanMAT, UMS 2001 CNRS - University of Rennes 1). Les structures des 5 films de tensioactifs seuls ou en mélange, prélevés à pression constante par la technique de Langmuir-Blodgett sur lame de mica ont été observées afin de pouvoir déterminer la structure des films. Des images de 5 μ m x 5 μ m et de 20 μ m x 20 μ m ont été prises et analysées. Ces analyses permettent de faire des observations des films en se déplaçant dans le plan de l'échantillon (x,y) et aussi perpendiculairement à ce plan dans la direction z . De cette façon il est possible d'observer la topographie de la surface de l'échantillon. L'échelle de couleur correspond à la variation de hauteur dans la surface du film.

II.4. Filtration membranaire de l'émulsion

La troisième et dernière étape expérimentale de ce travail a consisté à étudier la séparation membranaire de lipides produits par des microalgues à partir d'un mélange synthétique constitué d'une émulsion d'huile dans l'eau. En conséquence, l'émulsion formulée dans la première partie de ce travail, a été utilisée pour comparer les performances des différentes membranes. Les paramètres pris en compte pour cette étude ont été le matériau membranaire et le seuil de coupure. Afin de pouvoir comparer les membranes dans les mêmes conditions opératoires, la température (30 °C) et la vitesse tangentielle (1 m.s⁻¹) ont été gardées constantes. La pression transmembranaire a été choisie pour chaque membrane en fonction de son comportement face à la filtration de l'émulsion. Un protocole de nettoyage a été développé et ensuite appliqué à toutes les membranes après la filtration de l'émulsion pour comparer les perméabilités après nettoyage.

II.4.1. Solution d'alimentation

La solution d'alimentation du procédé de filtration correspond à l'émulsion formulée à partir de la caractérisation des échantillons du broyat et des surnageants de *Parachlorella kessleri*, et obtenue comme décrit en §II.2.3.

II.4.2. Membranes utilisées et expériences réalisées

Des membranes organiques planes d'ultra et microfiltration (fournisseur Orelis), de trois différents matériaux (PAN : polyacrylonitrile, PES: polyethersulfone, PVDF : polyfluorure de vinylidène) ont été utilisées pour l'étude. Leurs caractéristiques ainsi que les expériences de filtration réalisées sont présentées dans le **Tableau 11**. Les données d'angle de contact ont été obtenues au laboratoire GEPEA par L. Villafaña. Les angles de contact permettent de voir l'hydrophilicité du matériau. Un matériau est considéré hydrophile si $\theta < 90^\circ$ et hydrophobe si $\theta > 90^\circ$. Vu que les membranes sont de matériaux poreux ces valeurs donnent une idée sur la mouillabilité du matériau par l'eau puisque pour celles ayant une taille de pore importante

(comme la PVDF 1,5 μm) l'angle de contact peut être influencé par la pénétration rapide de l'eau dans les pores.

Tableau 11. Caractéristiques des membranes testées

Matériau	Seuil de coupure	θ (Angle de contact à l'eau)* (Villafañá, 2017)	Lp eau à 30°C (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	Fournisseur	Nombre d'expériences
PES	200 kDa	79,4±0,5	297-360	Orelis	2
PES	300 kDa	89,0±0,9	685 - 852	Orelis	2
PAN	500 kDa	75,0±2,4	416-970	Orelis	5
PVDF	0,4 μm	95,1±1,2	16213 -19816	Orelis	3
PVDF	1,5 μm	82,3±0,7	14895-18867	Orelis	2

PAN : polyacrylonitrile, PES: polyethersulfone, PVDF : polyfluorure de vinylidène.

*Matériau hydrophile si $\theta < 90^\circ$. Matériau hydrophobe si $\theta > 90^\circ$

II.4.3. Pilote de filtration tangentielle

Le module utilisé est un système de filtration tangentielle Rayflow de Rhodia Orelis pour des membranes planes d'une surface membranaire utile de 130 cm² (**Figure 27**). Il se compose de 2 plaques de contention séparées par une plaque support de la membrane et collecteur de perméat qui peut porter un coupon de membrane de chaque côté pour la réalisation des expériences en parallèle ou en série. Un joint d'épaisseur de 0,5 mm sépare les plaques de contention et la membrane et définit l'épaisseur de la veine liquide.

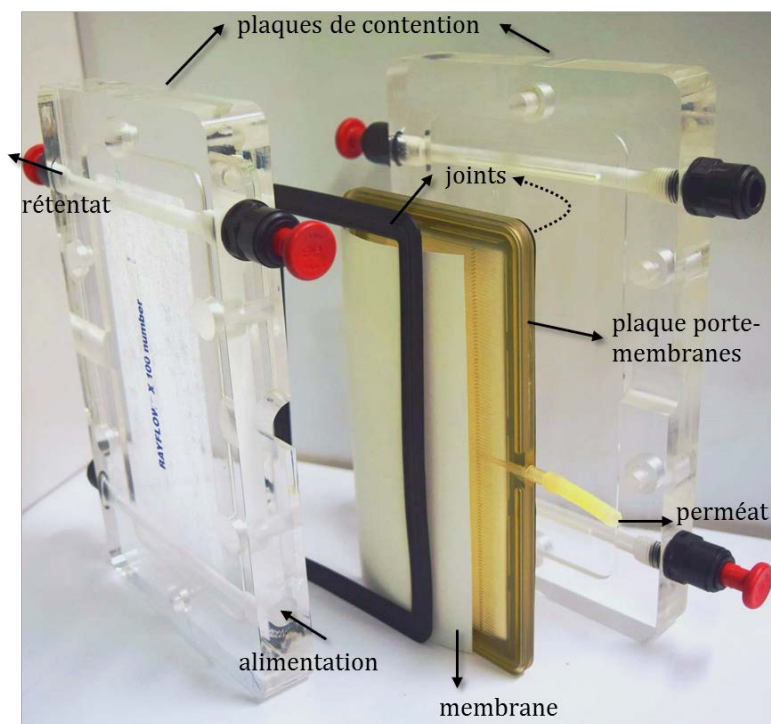


Figure 27. Module plan Rayflow (Orelis)

Le pilote de filtration (**Figure 28**) est équipé de deux capteurs de température, (un à la sortie du rétentat et un à la sortie du perméat), deux capteurs de pression électroniques 0-6 bars (Schneider Electric XMLP) et deux manomètres analogiques 0-4 bars (à l'entrée du pilote et à la sortie du rétentat), une vanne (à la sortie du rétentat) permettant de régler la pression transmembranaire PTM et d'une pompe péristaltique Masterflex I/P 77600-62 pour l'alimentation du circuit. La solution d'alimentation est gardée à température constante (30 °C) avec une plaque chauffante avec contrôle de la température. La mesure du débit de perméat est faite à l'aide d'une balance électronique (Radwag WLC 6/A2) connectée à un ordinateur. Une application créée au laboratoire GEPEA sous le logiciel Labview permet de faire le suivi en temps réel des températures, des pressions et du débit du perméat.

Un coupon neuf de dimensions 8,5 x 17,9 cm a été découpé et utilisé pour chaque expérience. Toutes les expériences ont été réalisées à une température constante de 30°C et à une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹.

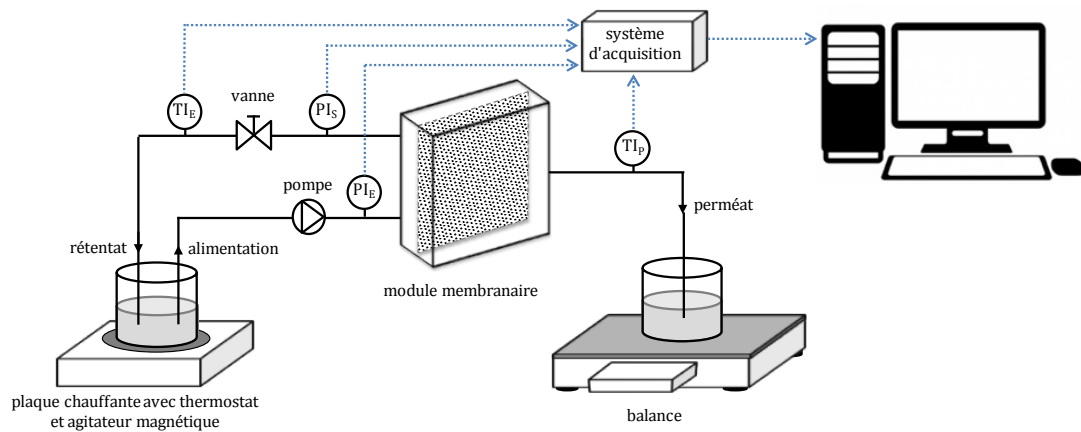


Figure 28. Montage de filtration membranaire utilisé pour l'étude

II.4.4. Mesure du flux de perméat

Les fluctuations de la température ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) et son influence sur le flux de perméat ont été corrigées en rapportant tous les flux à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour cela l'**Equation 41** a été utilisée.

$$J_{30^{\circ}\text{C}} = J_T \times \frac{\mu_T}{\mu_{30^{\circ}\text{C}}} \quad \text{Eq. 41}$$

Avec

$J_{30^{\circ}\text{C}}$ Flux de perméat corrigé à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

J_T Flux de perméat à la température T ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)

μ_T Viscosité de l'eau à la température T (Pa.s)

$\mu_{30^{\circ}\text{C}}$ Viscosité de l'eau à 30°C (Pa.s)

La viscosité de l'eau à une température donnée a été calculée à partir de l'**Equation 42** (Kestin et al., 1978).

$$\log \left\{ \frac{\mu_T}{\mu_{20^{\circ}\text{C}}} \right\} = \frac{20 - T}{T + 96} \{ 1,2364 - 1,37 \times 10^{-3}(20 - T) + 5,7 \times 10^{-6}(20 - T)^2 \} \quad \text{Eq. 42}$$

II.4.5. Conditionnement de la membrane

Le conditionnement de la membrane consiste à éliminer le produit de conservation (en général du glycérol), ainsi qu'à stabiliser le flux de perméat par le compactage du matériau. Cette procédure est faite afin d'assurer une structure de la membrane et un flux de perméat stables.

Pour l'élimination du produit de conservation, des essais avec de l'éthanol (30 °C, 30 min), de la soude NaOH 0,01 M (30 °C, 30 min) et de l'eau osmosée chaude (40 °C, 30 min) ont été réalisés en circuit fermé sur une membrane de PAN 500 kDa et les perméabilités à l'eau après ces rinçages déterminées (comme décrit en II.4.6). Ces résultats préliminaires ont permis d'établir un protocole de conditionnement initial de la membrane, comme indiqué ci-dessous :

- i) **Rinçage initial** avant le placement de la membrane dans le pilote : la membrane est laissée à tremper dans de l'eau osmosée pendant une nuit, étape suivie d'un rinçage léger à l'éthanol (96 %, pissette) et d'un lavage abondant avec de l'eau osmosée. La membrane est ensuite trempée encore dans de l'eau osmosée pendant 30 min avec un renouvellement d'eau chaque 10 min.
- ii) **Rinçage à l'eau à la pression minimale du système** : une fois la membrane placée dans le pilote, de l'eau circule en mode concentration (recyclage du rétentat et soutirage du perméat) (**Figure 29 a**) à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle, à la pression minimale du système (vanne de régulation 100 % ouverte) jusqu'à l'obtention de 1 L de perméat ou pendant un temps maximal de 30 min selon la membrane.
- iii) **Rinçage à l'eau avec pression** : circulation d'eau osmosée en mode concentration (recyclage du rétentat et soutirage du perméat) (**Figure 29 a**) à une pression telle que le flux du perméat se trouve entre 10-15 mL.min⁻¹.
- iv) **Compactage de la membrane** : de l'eau osmosée circule dans le système en circuit fermé, mode recyclage total (**Figure 29 b**). La pression transmembranaire est augmentée de 0,25 bar chaque 15 min et jusqu'à 1 bar. Le système est laissé dans ces dernières conditions jusqu'à atteindre un flux de perméat stable dans le temps pendant un minimum de 4h ou plus si nécessaire. Pendant cette étape, le flux du perméat diminue au fur et à mesure que le milieu poreux est compacté jusqu'à atteindre une valeur stable. Un exemple de l'évolution du flux du perméat au cours de la compaction est présenté dans la **Figure 30** pour une membrane de PVDF 0,4 µm.

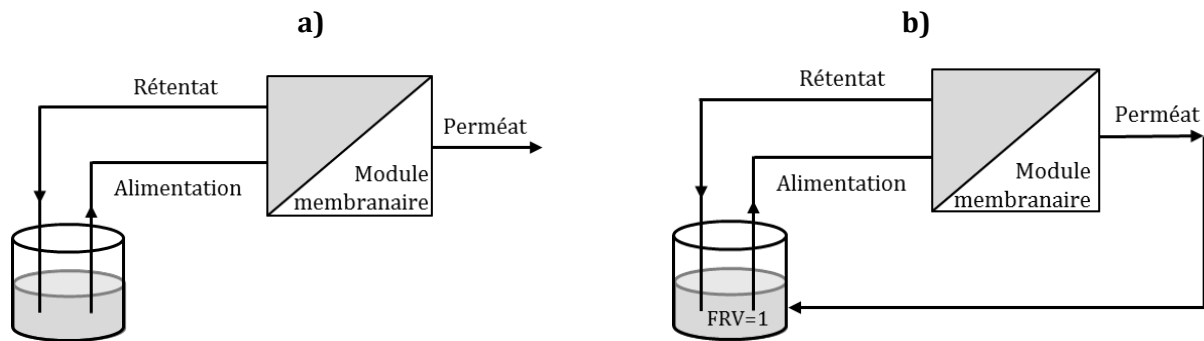


Figure 29. Filtration en (a) mode concentration (recyclage du rétentat) et en (b) mode recyclage total (recyclage du rétentat et du perméat). (Adapté de El Kabbaze, 2008).

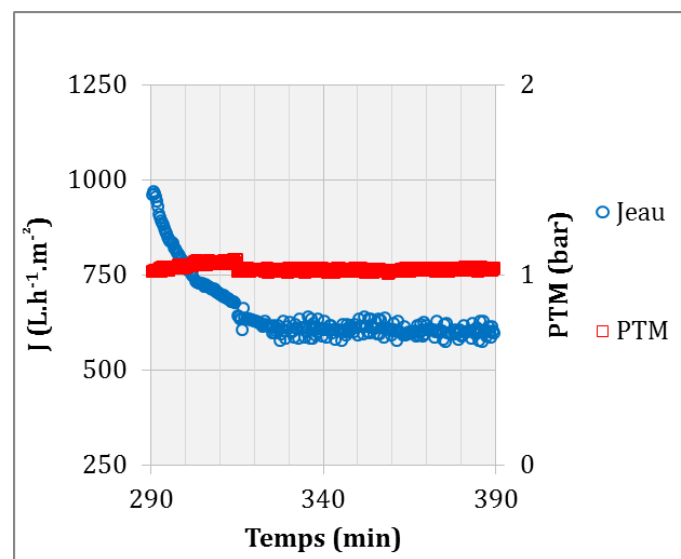


Figure 30. Diminution du flux de perméat pendant l'étape de compactage d'une membrane PVDF 0,4 μm à 30°C, 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle et à pression constante

II.4.6. Détermination de la perméabilité à l'eau

Le flux à l'eau de la membrane est mesuré après l'étape de conditionnement pour obtenir la perméabilité initiale de la membrane L_{p_i} , et également après le nettoyage qui suit la filtration de l'émulsion pour obtenir la perméabilité finale L_{p_f} . Pour cela de l'eau osmosée est filtrée à une température de 30 °C et une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹. Le flux du perméat est déterminé au cours du temps et le système gardé en mode de recyclage total (**Figure 29 b**). La pression transmembranaire PTM est augmentée de 0,25 bar et jusqu'à 1 bar en laissant le flux du perméat se stabiliser avant de changer à la pression suivante (**Figure 31 a**). Ce protocole a été répété entre 2 et 3 fois en diminuant et en augmentant la pression jusqu'à l'obtention d'une valeur de perméabilité reproductible (pente de la courbe $J=f(\text{PTM})$) (**Figure 31 b**).

La perméabilité initiale de la membrane permet d'obtenir la résistance hydraulique de la membrane neuve R_m . Les résistances dues à la polarisation de concentration, au colmatage total, au colmatage réversible, et irréversible peuvent être aussi calculées à partir des perméabilités déterminées après chaque étape de nettoyage comme décrit plus tard en §II.4.11.

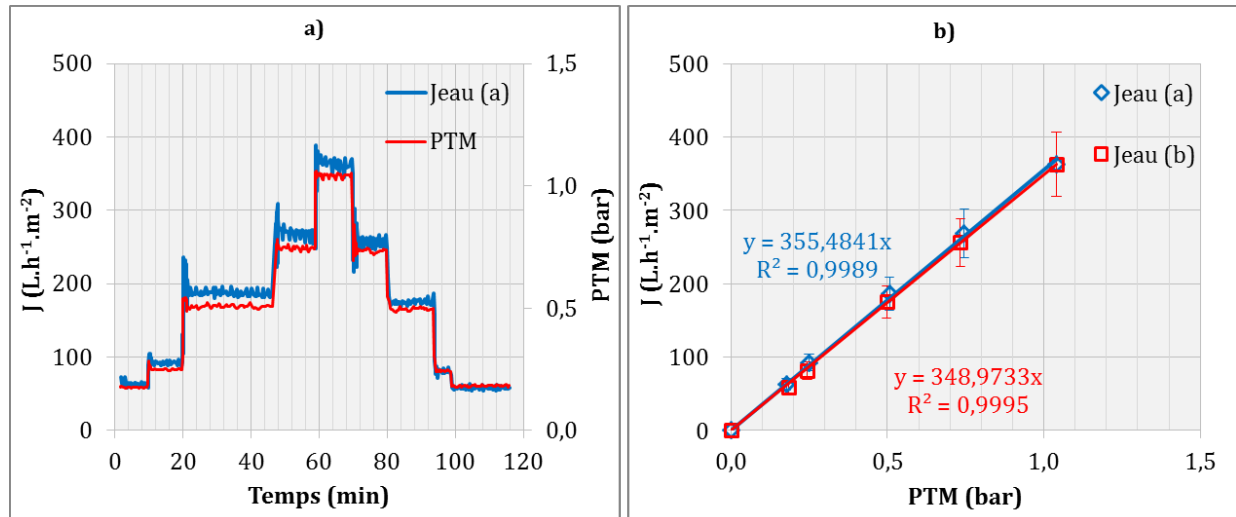


Figure 31. Flux à l'eau initial à l'eau d'une membrane PAN 500 kDa mesurée à 30°C et à une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹. (a) Stabilisation du flux du perméat avec le changement de la pression. (b) Variation du flux du perméat en fonction de la pression – Détermination de la perméabilité hydraulique de la membrane.

II.4.7. Variation du flux en fonction de la pression transmembranaire PTM.

Définition de la pression de travail P_w

Deux litres d'émulsion à 2 %w de phase huile (préparée la veille de l'expérience et laissée pendant 20h en agitation douce comme indiqué en §II.2.3) sont introduits dans le pilote. La filtration est réalisée à 30 °C et une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹, en mode de recyclage total comme montré dans la (Figure 29 b). L'émulsion circule quelques minutes dans le pilote sans pression et un échantillon initial de 15 mL d'émulsion est prélevé pour déterminer ses caractéristiques initiales.

La pression transmembranaire est augmentée jusqu'à 0,2 bar et le flux du perméat suivi jusqu'à sa stabilisation. La pression est augmentée jusqu'à la pression maximale P_{max} par palier de 0,1 bar en laissant le flux se stabiliser pour chaque point de pression. P_{max} est déterminée avec la courbe $J = f(PTM)$ qui est construite au fur et à mesure de l'expérience.

La pression de travail P_w choisie pour la filtration de l'émulsion en mode concentration (**Figure 29 a**) est déterminée à l'aide de la courbe $J = f(PTM)$ (**Figure 21**) et sera inférieure à la pression critique P_{crit} pour limiter le colmatage pendant la filtration. La valeur choisie de P_w doit permettre d'avoir un flux suffisant du perméat mais sans avoir un colmatage important. En général la P_w est telle que le flux du perméat obtenu est aux alentours de 80 % du flux maximal ou limite (J_{max}). Dans certains cas, la pression maximale était atteinte très rapidement (premiers point de pression évalués), ce qui restreignait la P_w à la pression donnée uniquement par le fluide avec la vanne de régulation 100 % ouverte.

II.4.8. Concentration de l'émulsion

Deux litres d'émulsion (préparée la veille de l'expérience et laissé pendant 20h en agitation douce comme indiqué en §II.2.3) à 30°C sont introduits dans le pilote de filtration tangentielle Rayflow. La filtration est réalisée à une vitesse tangentielle de 1 m.s⁻¹ en mode concentration comme indiqué en (**Figure 29 a**) en recyclant le rétentat dans le b cher d'alimentation et en soutirant le perméat jusqu'à atteindre la concentration souhaitée d'huile dans le rétentat. Les facteurs de réduction volumique FRV finaux ont varié entre 1,5 et 4 selon l'expérience. La pression de travail P_w utilisée correspond à celle trouvée avec l'expérience décrite en II.4.7 de $J = f(PTM)$. La température et la pression sont maintenues constantes tout au long de la filtration. Des échantillons de rétentat (15 mL) et de perméat (25 mL) ont été prélevés à différents facteurs de réduction volumique FRV et ont été caractérisés en termes de pH, conductivité, matière sèche et granulométrie. Le taux de rétention TR moyen de la membrane au cours de la filtration est déterminé selon l'**Equation 40**, et équivaut à la pente des courbes $Ln(FC)=f(FRV)$ construites à partir des concentrations dans le rétentat.

II.4.9. Calcul de la réduction relative de flux

RFR

L'analyse du colmatage sera appuyée sur le paramètre « réduction relative de flux », (reduction flux ratio, RFR) qui permet d'évaluer les propriétés colmatantes des membranes. Si RFR est petit cela veut dire que la membrane a moins de tendance à être colmatée. Il est calculé comme suit :

$$RFR = \left(1 - \frac{J_{FRV} n}{J_{eau}}\right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 43}$$

II.4.10. Nettoyage des membranes

Un protocole de nettoyage a été mis en place afin de retrouver au minimum 80 % de la perméabilité initiale de la membrane après la filtration de l'émulsion. Plusieurs agents de nettoyage ont été testés : la soude NaOH, l'acide nitrique HNO₃, l'éthanol EtOH, l'eau chaude à 40°C et le dodécylsulfate de sodium SDS, et les meilleurs résultats ont été obtenus avec SDS et EtOH. Le protocole choisi (toujours à 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle) suit les étapes suivantes :

- i) Rinçage à l'eau : élimination de la couche de polarisation de la concentration par rinçage avec de l'eau osmosée à 30 °C à 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle pendant 30 min en circuit ouvert, c'est-à-dire, sans recirculation ni de rétentat ni de perméat.
- ii) Élimination du dépôt avec une solution de dodécylsulfate de sodium SDS : cette étape consiste en un lavage avec une solution 8 mM de SDS (correspondant à la concentration micellaire critique CMC) à 40°C, à la pression maximale déterminée pour chaque membrane, pendant 30 min en mode de recyclage total.
- iii) Rinçage du SDS avec de l'eau osmosée : de l'eau à température ambiante et à la pression minimale du système (vanne de régulation 100 % ouverte) est introduite dans le pilote en circuit ouvert jusqu'à obtenir 1 L de perméat ou pendant 30 min maximum.
- iv) Rinçage à l'eau osmosée avec pression : le rinçage à l'eau est continué en mode concentration à la pression maximale P_{max} pendant 3 h, en renouvelant l'eau d'alimentation chaque 20 min.
- v) Élimination du SDS : les traces de SDS sont éliminées en faisant circuler une solution d'EtOH à 25 % w en circuit fermé pendant 1 h, sans pression et à température ambiante.
- vi) Élimination de l'EtOH avec de l'eau osmosée : les étapes ii) et iii) décrites précédemment pour rincer le SDS se répètent cette fois-ci pour éliminer l'EtOH restant sur la membrane.

Ce protocole a été testé sur une membrane colmatée de PAN 500 kDa et s'est avéré efficace, mais il devra être adapté et optimisé dans le cas d'une étude approfondie sur des membranes autres que PAN.

Une fois la membrane nettoyée et la perméabilité après nettoyage déterminée, la membrane est stockée dans une solution de métabisulfite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ à 0,5 % w (5 g bisulfite.L⁻¹) à une température de 4 °C.

La nettoyabilité de la membrane, c'est-à-dire, la facilité pour enlever le colmatage peut être évaluée à partir du calcul du ratio de récupération de flux ou FRR (pour Flux Recovery Ratio). Il est déterminé à partir de l'**Equation 44**.

$$FRR = \frac{Lp_{\text{après nett.}}}{Lp_{\text{eau}}} \quad \text{Eq. 44}$$

II.4.11. Calcul de résistances

Le calcul des résistances est fait à partir de la perméabilité initiale à l'eau de la membrane propre et de la membrane nettoyé après filtration de l'émulsion et du flux de perméat de pendant la filtration de l'émulsion à un FRV donné. La procédure est la suivante :

R_m est déterminée à partir de la perméabilité de la membrane propre :

$$R_m = \frac{1}{\mu \cdot Lp_{\text{eau}}} \quad \text{Eq. 45}$$

R_{tot} est déterminée à partir de la loi de Darcy avec le flux de perméat de la solution traitée à la fin de la filtration. Puisque les expériences de filtration de ce travail n'ont pas toutes été jusqu'au même facteur de concentration FRV, cette résistance a été calculée pour un FRV=2 afin de pouvoir les comparer entre elles. Ainsi :

$$R_{tot \text{ à } FRV=2} = \frac{PTM}{\mu \cdot J_{FRV=2}} \quad \text{Eq. 46}$$

La somme des résistances dues au colmatage et à la couche de polarisation ($R_f + R_{pc}$) est déterminée comme la différence entre $R_{tot} - R_m$ selon l'**Equation 24**.

La résistance hydraulique après nettoyage R_n est déterminée avec la perméabilité à l'eau évaluée après nettoyage :

$$R_n = \frac{1}{\mu \cdot Lp_{après\ nett.}} \quad \text{Eq. 47}$$

La résistance irréversible restant après le nettoyage chimique R_{irr} est déterminée comme la différence entre $R_n - R_m$

Enfin, la résistance réversible physiquement ou chimiquement R_{rev} est déterminée comme la différence $(R_f + R_{pc}) - R_{irr}$

II.4.12. Bilan de matière. Calcul de la quantité d'huile restant dans le système et sur la membrane

Le bilan matière a consisté à comparer la masse d'huile présente dans l'émulsion filtrée et la somme des masses d'huile récupérées après filtration dans le rétentat, le perméat et les différents échantillons récoltés. L'écart entre les deux termes a été interprété comme étant la masse d'huile retenue dans le système et sur la membrane. Le calcul ne conduit qu'à une estimation de la masse retenue puisqu'une partie de l'écart résulte des erreurs expérimentales.

Ce bilan matière en huile sur l'opération de filtration est déterminé à partir des pourcentages d'huile obtenus pour chaque échantillon de rétentat et de perméat. Ces pourcentages sont trouvés en enlevant à la matière sèche la quantité de sels ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$) contenue dans la solution tampon utilisée pour la préparation de l'émulsion. Les sels n'étant pas retenus par les membranes leur concentration est considérée identique dans les deux échantillons rétentat et perméat.

Cette estimation est faite comme suit :

$$\text{À FRV}=1 : \quad m_{tot\ huile} = X_{i\ huile\ ém.} \cdot m_{i\ ém.} \quad \text{Eq. 48}$$

$$\begin{aligned} \text{A FRV}=n : \quad m_{tot\ huile} = & m_{huile\ Ret\ FRVn} + m_{huile\ Perm.FRVn} \\ & + \sum_{1}^n m_{huile\ éch.Ret} + \sum_{1}^n m_{huile\ éch.Perm.} \\ & + m_{huile\ pilote\ FRVn} + m_{huile\ membrane\ FRVn} \end{aligned} \quad \text{Eq. 49}$$

Avec :

$$m_{\text{huile Ret FRVn}} = X_{\text{huile Ret.FRVn}} \cdot m_{\text{Ret FRVn}} \quad \text{Eq. 50}$$

$$m_{\text{huile Perm.FRVn}} = X_{\text{huile Perm.FRVn}} \cdot m_{\text{Perm.FRVn}} \quad \text{Eq. 51}$$

$$m_{\text{huile éch.Ret FRVn}} = X_{\text{huile Ret.FRVn}} \cdot m_{\text{éch.Ret FRVn}} \quad \text{Eq. 52}$$

$$m_{\text{huile éch.Perm FRVn}} = X_{\text{huile Perm.FRVn}} \cdot m_{\text{éch.Perm FRVn}} \quad \text{Eq. 53}$$

Avec :

$m_{\text{tot huile}}$	Masse totale d'huile dans l'émulsion initiale (g)
$X_{i \text{ huile ém.}}$	Fraction massique initiale en huile dans l'émulsion (g huile/g émulsion)
$m_{i \text{ ém.}}$	Masse initiale d'émulsion (g)
$m_{\text{huile Ret FRVn}} ; m_{\text{huile Perm.FRVn}}$	Masse d'huile dans le rétentat ou perméat à FRV=n (g)
$m_{\text{huile éch.Ret}} ; m_{\text{huile éch.Perm.}}$	Masse d'huile dans l'échantillon de rétentat ou perméat à FRV=n (g)
$X_{\text{huile Ret.FRVn}} ; X_{\text{huile Perm.FRVn}}$	Fraction massique en huile dans le rétentat ou perméat à FRV=n (g huile/g Rét. ou g huile/g Perm.)
$m_{\text{Ret FRVn}} ; m_{\text{Perm.FRVn}}$	Masse de rétentat ou perméat à FRV=n (g)
$m_{\text{éch.Ret FRVn}} ; m_{\text{éch.Perm FRVn}}$	Masse d'échantillon du rétentat ou perméat à FRV=n (g)
$m_{\text{huile pilote FRVn}} ; m_{\text{huile membrane FRVn}}$	Masse d'huile restant dans le pilote et dans la membrane à FRV=n

La détermination des $m_{\text{huile pilote FRVn}}$ et $m_{\text{huile membrane FRVn}}$ sera présentée en §V.4.5.

II.4.13. Suivi des caractéristiques de l'émulsion pendant la filtration

Tout au long de la filtration de l'émulsion, des échantillons de rétentat et de perméat ont été prélevés afin d'évaluer l'évolution des caractéristiques de l'émulsion pendant le procédé. Les analyses effectuées sont décrites dans les points suivants.

II.4.13.1. Granulométrie de l'émulsion

Les analyses granulométriques permettent principalement d'établir si la distribution de taille des gouttelettes de lipides change avec la filtration et permettent de déterminer si le phénomène de coalescence est favorisé par la filtration membranaire ou si au contraire ce procédé a un effet de réduction de taille des globules gras. Les distributions de taille des gouttelettes d'huile du rétentat et du perméat ont été déterminées par microscopie optique et analyse d'image comme décrit en §II.2.4. Lorsqu'il s'agissait d'un échantillon de rétentat, une dilution était nécessaire afin de faciliter le traitement d'image par le logiciel *open source* Image J développé par la National Institutes of Health. Au contraire, les observations des échantillons de perméat ne nécessitaient pas de dilution. Comme il a été signalé précédemment, la limite de détection du microscope ne permet pas l'observation des particules fines d'un diamètre inférieur à 0,5 μm . Pour déterminer la taille des gouttelettes de lipides au-dessous de cette valeur dans le cas des émulsions de départ, des analyses complémentaires de taille ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer 3000 de Malvern acquis par le laboratoire GEPEA en janvier 2017. La méthodologie employée est décrite en **Annexe I**.

II.4.13.2. pH et Conductivité

Le pH et la conductivité ont été suivis dans le perméat au cours de la filtration avec l'objectif de déterminer si les produits utilisés pour la solution tampon passaient à travers la membrane. Le pH-mètre et le conductimètre utilisés ont été décrits en §II.2.1.2. Les résultats sont présentés en **Annexe VII**.

II.4.13.3. Matière sèche

Cette analyse est faite avec l'objectif de déterminer l'évolution de la concentration d'huile dans le rétentat et dans le perméat tout au long du procédé membranaire. Pour cela un analyseur

d'humidité IR-30 de Denver Instrument avec une précision de pesée de 1 mg et une précision de lecture de 0,01 % a été utilisé. 5 g d'échantillon de rétentat ou 20 g d'échantillon de perméat ont été déposés sur une coupelle en aluminium préalablement séchée à 105 °C pendant 5 min. L'échantillon est séché à 105 °C jusqu'à masse constante. Il a été vérifié préalablement qu'aucune dégradation de l'huile donc aucune perte en masse due à une combustion n'a lieu pendant le séchage. La matière sèche comprend l'huile contenue dans l'émulsion ainsi que les sels. Les sels représentent 0,08 % w/w dans l'émulsion initiale.

Conclusion du chapitre Matériels et Méthodes

Ce chapitre expose initialement, le travail de formulation développé pour obtenir un mélange synthétique, sur la base de la caractérisation granulométrique et du profil lipidique d'un broyat de microalgues. Le protocole décrivant la caractérisation des lipides de ce broyat est présenté dans le chapitre suivant dans le contenu de l'article « Impact of mechanical grinding on the lipids classes composition of microalgae oil ». Egalement sont présentées les méthodes de la goutte pendante et de la balance de Langmuir employées pour caractériser respectivement les interfaces huile/eau (de l'émulsion formulée) et air/eau. Enfin, la méthodologie suivie pour réaliser les essais de filtration membranaire de l'émulsion synthétique est décrite. Dans les chapitres suivants, les résultats des expériences réalisées seront présentés.

Chapitre III. Résultats et discussions sur la caractérisation des broyats des microalgues. Définition d'une solution synthétique représentative

III.1. Introduction

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la séparation membranaire de lipides produits par des microalgues à partir d'un mélange synthétique constitué d'une émulsion d'huile dans l'eau ainsi que de comprendre les phénomènes physicochimiques qui peuvent avoir lieu à l'interface huile/eau lors de la séparation.

Pour atteindre cet objectif la première partie de ce travail a consisté en la définition des caractéristiques du mélange synthétique (émulsion) et en son obtention. Des cultures de la microalgue *Parachlorella kessleri*, des broyats et des surnageants ont été caractérisés en termes de granulométrie et de profil lipidique. Ces résultats sont présentés dans l'article intitulé « *Impact of mechanical grinding on the lipids classes composition of microalgae oil* » qui constitue la première partie de ce chapitre. Il comprend une introduction sur les huiles produites par les microalgues et sur les techniques de broyage de microalgues en complément de la revue bibliographique présentée en §1.2.I et §1.2.II. Ensuite l'article présente les matériels et méthodes utilisés pour la culture de la microalgue et son broyage (réalisés par V. Montalescot) et ceux employés pour la caractérisation granulométrique et lipidique (réalisés en collaboration avec le laboratoire BIA de l'INRA de Nantes). La partie résultats montre le profil des acides gras totaux (tot FA) de l'huile produite par la microalgue ainsi que les acides gras totaux de chacune des familles des lipides qui le constituent (triglycérides TAG, autres lipides neutres ONL, phospholipides PL et glycolipides GL). Les fractions de TAG, de PL et de GL ont été aussi analysées et les principaux composants déterminés. Ces résultats ont permis de mieux connaître la composition lipidique d'un broyat de microalgues. Cette étude a aussi permis de démontrer que le procédé de broyage a non seulement un impact sur l'organisation des lipides dans le broyat mais aussi sur la nature des composés.

Suite aux résultats de la caractérisation des lipides présentés dans l'article, la composition de la phase huile de l'émulsion a été définie : une fraction de lipides neutres apportées par des huiles végétales et une fraction de lipides polaires apportés par un mélange des produits émulsifiants industriels. La sélection des huiles et des tensioactifs ainsi que la définition de la formulation de l'émulsion et son procédé d'obtention sont présentées dans la deuxième partie de ce chapitre.

III.2. Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: Impact on lipid fraction composition

E. Clavijo Rivera^a, V. Montalescot^a, M. Viau^c, D. Drouin^a, P. Bourseau^a, M. Frappart^a, C. Monteux^b, E. Couallier^a

a : GEPEA UMR CNRS 6144, Saint Nazaire, France. b : SIMM UMR CNRS 7615, ESPCI, Paris, France. c : BIA UR INRA 1268, Nantes, France

Abstract

Samples of nitrogen-starved *Parachlorella kessleri* containing intact cells (IC), cells ground by bead milling (BM), and cells subjected to high-pressure cell disruption (HPD), together with their supernatants after centrifugation, were compared for granulometry and lipid profiles. The effects of disruption on the lipid profile and organisation were evaluated. The quantity of lipids available for extraction increased with disruption, and up to 81% could be recovered in supernatants after centrifugation, but a marked reorganization occurred. The proportion of amphiphilic free fatty acids and lysophosphatidylcholine increased during disruption due to their release or owing to lipid degradation by enzymes or physical conditions. This effect was more marked in HPD than in BM. Lipids contained in the aqueous phase, after disruption and centrifugation, were enriched in unsaturated fatty acids, BM leading to larger droplets than HPD. The larger liquid lipid droplet would be easier to recover in the following downstream processing.

III.2.1. Introduction

Microalgae oil is of interest for animal feed and human food industries because of its high content in essential fatty acids (omega-3 and omega-6), comparable to levels in fish oils (Ryckebosch et al., 2014). More recently, a new application has emerged: these microorganisms can produce and accumulate large quantities of triglycerides (TAGs) that can be transformed into biodiesel. However, the recovery of the valuable fractions produced by the microalgae through a low-cost wet pathway necessitates the development of new combined processes integrating culture, harvesting, and several biorefining steps, among which cell disruption, centrifugation and molecular separation through membrane processes or solvent extraction.

Among the numerous microalgae strains studied, some are remarkable for their high oil productivity. For instance, *Botryococcus braunii*, *Schizochytrium* sp., *Nannochloropsis* sp. and *Parachlorella kessleri* have been reported to produce lipids in quantities in the ranges 25–75%, 50–77%, 31–68%, and 41–65% w/w of dry weight respectively (Bigogno et al., 2002; Chisti, 2008; Taleb et al., 2015). Extensive research has demonstrated that TAGs accumulate significantly when microalgae are cultured under stressing conditions (nitrogen starvation, light intensity). This is observed for *P. kessleri* and *Chlamydomonas reinhardtii*, which increased their TAG production up to 7-fold and 15-fold respectively in response to nitrogen deprivation (Siaut et al., 2011; Taleb et al., 2016). *P. kessleri* also has characteristics of interest for photobioreactor cultivation and cellular pre-treatment for lipid extraction (high growth rate and low levels of biofilm and aggregate formation) (Fernandes et al., 2013; Taleb et al., 2016). This microalga was therefore selected in the present study to analyze the impact of disruption on lipid profile.

III.2.1.1. Microalgal lipids and cell disruption methods

The recovery of the lipids contained inside the cells through a low-cost wet pathway involves cell disruption, centrifugation and molecular separation in membrane processes or by solvent extraction. Cell disruption methods include chemical and enzymatic processes, subcritical water extraction, and physical methods such as freezing, osmotic shock, ultrasonication, microwave treatment, pulsed electric field treatment, bead milling (BM), and high pressure cell disruption (HPD) (Grimi et al., 2014; Halim et al., 2012; Lee et al., 2017). The mechanical methods such as BM and HPD do not involve the use or elimination of solvents, or expensive biomass drying stages, and have high cell disruption efficiencies (Günerken et al., 2015). They are consequently of particular interest for microalgae biorefineries designed for large-scale production. Although these two techniques are less selective than chemical or enzymatic methods, improvements can still be made by adapting operating conditions (Dong et al., 2016; Günerken et al., 2015; Shene et al., 2015).

The use of BM and HPD for cell disruption produces complex mixtures that are very different from the initial intracellular organisation: before disruption, neutral lipids are stored in the cytoplasm of the cell as droplets surrounded by a film of phospholipids, and stabilised by substances such as structural proteins and tocopherols (Jayasinghe and Gray, 2014). After disruption, cell wall fragments and non-soluble compounds (like lipids) remain suspended in the aqueous phase containing the soluble components (proteins, salts, nucleic acids, polysaccharides, etc). The characteristics of lipids in this mixture are not well known, but optimising the processes for oil recovery from these complex mixtures depends strongly on the composition and organisation of

the target substances. Disruption processes will affect the composition of the recoverable lipids: not only will TAGs be released from cells, but also polar lipids contained in cell membranes. In addition, during the disruption process, lipids may be transformed or degraded owing to local physical conditions (temperature, cavitation, shear rate), or by released enzymes (Balduyck et al., 2017). At the same time, the size of oil bodies contained initially in the cells may increase by coalescence, or may be reduced and dispersed (lipid droplets stabilised by polar components) in the aqueous phase by the shear forces. It is also possible for substances with high melting points, such as saturated fatty acids, to form solid particles and separate into a solid phase. Evaluating changes in lipid composition and organisation due to disruption is therefore essential in the development of biorefining processes.

III.2.1.2. Lipid profiles from microalgae

Microalgal lipids have been characterised mainly on undisrupted microalgae (Huang et al., 2013; Jones et al., 2012; Kobayashi et al., 2013; Mansour et al., 2005; Siaut et al., 2011).

Lipid composition depends on the microorganism, the growing phase and the culture conditions. These photosynthetic microorganisms produce both neutral lipids (free fatty acids, mono-, di- and triacylglycerols) and polar lipids (phospho- and glycolipids). Some examples of lipid composition reported in the literature for some strains of microalgae are shown in Table 12.

Table 12. Lipid classes composition for different microalgae

Microalgae	Growth Phase analysed	Lipid class															
		Neutral lipids NL (%)				Glycolipids GL (%)			Phospholipids PL (%)								Others (%)
		FFA	MAG	DAG	TAG	MGDG	DGDG	SQDG	LPC	PC	PE	PG	DPG	PI	DGTS	PA	
<i>Nitzschia laevis</i> (Chen et al., 2007)	early stationary		7.6	1.9	69.1	≈3.0	≈3.5	≈1.5	≈1.0	≈8.0	-	≈0.5	≈0.5	≈1.0		-	≈2.4
		Total NL = 78.6				Total GL ≈ 8.0			Total PL ≈ 11.0								
<i>Parietochloris incisa</i> (Bigogno et al., 2002)	stationary				77.1	4.9	6.8	2.8		0.7	0.6	0.2		0.5	4.6	1.4	0.4
		Total NL = 77.1				Total GL = 14.5			Total PL = 8.0								
<i>Isochrysis galbana</i> (Alonso et al., 1998)	stationary		6	12	25	18	13	6		9	2			4			5
		Total NL = 43				Total GL = 37			Total PL = 15								
<i>Porphyridium cruentum</i> (Alonso et al., 1998)	stationary		3	19	25	14	24	5		5				2			3
		Total NL = 47				Total GL = 43			Total PL = 7								
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Alonso et al., 1998)	stationary		4	7	40	21	12	2		6	4	2		1			1
		Total NL = 51				Total GL = 35			Total PL = 13								
<i>Nannochloropsis</i> * sp. (Wang, 2012)	non reported		9.3		41.1	0.8	10.5			6.7	1.4	2.2		6.2			21.8
		Total NL = 50.4				Total GL = 11.3			Total PL = 16.5								
<i>Schizochytrium limacinum</i> (Wang, 2012)*	non reported		12.6		69.0	1.4	0.1			5.0	6.9	0.1					5.0
		Total NL = 81.6				Total GL = 1.5			Total PL = 12.0								

FFA, free fatty acids; MAG, monoacylglycerides ; DAG, diacylglycerides ; TAG, triacylglycerides ; MGDG, monogalactosyl-diglyceride ; DGDG digalactosyl-diglyceride; SQDG, sulfoquinovosyl-diglyceride; LPC lysophosphatidyl-choline ; PC phosphatidyl-choline ; PE phosphatidyl-ethanolamine ; PG phosphatidyl-glycerol ; DPG diphosphatidyl-glycerol ; PI phosphatidyl-inositol; DGTS, diacylglyceryltrimeéthylhomoserine ; PA acide phosphatidique. * dry assisted grinding

Total lipid and total fatty acid profiles

In general, microalgae produce lipids containing fatty acids with chains ranging from 12 to 22 carbons and up to 6 unsaturations (Ahlgren et al., 1992; Becker, 1993; Cohen, 1999; Gunstone et al., 2007; Roleda et al., 2013; Vidyashankar et al., 2015). Growth period and nutrient depletion induce different proportions of total lipids, and also impact the ratio of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Angles et al., 2017; Becker, 1993; Jayasinghe and Gray, 2014). Intact cells of *P. kessleri*, produce mainly palmitic acid C16:0, oleic acid C18:1n-9c and linolenic acid C18:3n-3 during the exponential phase, but when deprived of nitrogen, the main FA synthesised was linoleic acid C18:2n-6c, and the amount of C16:0 was lower (internal research GEPEA). Kobayashi et al., 2013 with *P. kessleri* and Přibyl et al., 2012, for *Chlorella vulgaris* identified the same fatty acids, but in different proportions.

Neutral lipids

Neutral lipids are produced by microalgae as energy reserve substances. TAGs and free fatty acids (FFAs) compose this fraction. Other minor compounds may also be present, such as monoglycerides (MAGs) and diglycerides (DAGs). Neutral lipid contents have been reported for many microalga species along with their fatty acid profiles. They represent 30–90% w/w of total lipids (Bigogno et al., 2002; Chen et al., 2007; Huang et al., 2013; Siaut et al., 2011).

Polar lipids

Polar lipids are compounds found mainly in microalgae cell membranes. They are typically made up of glycerides with two fatty acids and a phosphate group (phospholipids) or a saccharide (glycolipids). The proportion of glyco- and phospholipids ranges widely across species (Alonso et al., 1998; Becker, 1993; Chen et al., 2007). Becker, 1993 reviewed the polar lipid contents of 8 microalgal species: their glyco- and phospholipid contents ranged from 6% to 59% and from 10% to 53% w/w of total lipids respectively. Řezanka and Podojil, 1989 found that glycolipids of *Parachlorella kessleri* (cultured under heterotrophic conditions) were mainly composed of monogalactosyldiglyceride (MGDG) with C16:3-C18:3 and C18:2-C18:3 as the main fatty acids; the main component of the phospholipid fraction was phosphatidylcholine (PC) with C16:0-C16:1 and C18:3-C18:3 fatty acids.

Disrupted microalgae

Research on disrupted microalgae has essentially focused on determining their total lipid content and total fatty acid profile, and on the influence of extraction methods or disruption conditions on

the yield of recovered lipids (Angles et al., 2017; Meullemiestre et al., 2016; Montalescot et al., 2015; Taleb et al., 2016; Viswanathan et al., 2012). (Balduyck et al., 2017), were the first to study the impact of cell disruption and wet storage on lipid composition for two strains (*Nannochloropsis oculata* and *T-Isochrysis lutea*). They highlighted lipid degradation by enzymes released after cell disruption. To our best knowledge, the composition and organisation of lipids after disruption of nitrogen-starved *P. kessleri* cultures and centrifuging have not yet been studied. These data are fundamental for optimising downstream processing, and for integrating BM or HPD as cell disruption methods in the whole process of microalgal lipid production.

In what follows, the granulometry and oil fraction composition of non-disrupted and disrupted cells and their supernatants after centrifugation are described for *P. kessleri*. Detailed composition of lipids in terms of total fatty acids (FAs), main compounds and fatty acids contained in the different lipid classes, namely TAGs, other neutral lipids (ONLs), glycolipids (GLs), and phospholipids (PLs) was determined in the different fractions. The effects of disruption on the organisation and composition of the resulting lipid fraction is analyzed.

III.2.2. Materials and methods

III.2.2.1. Microalgae strain and culture

Parachlorella kessleri (strain 2229 UTEX) used for this study was produced in batch mode in a flat panel airlift photobioreactor (PBR) (6 L) at 25 ± 0.5 °C. The culture was homogenized by sterile air injection at the bottom of the PBR. A pH/temperature probe (Mettler Toledo SG 3253 sensor) monitored by the acquisition software LabVIEW recorded pH and temperature. The pH was regulated at 7 with CO₂ bubbling, and constant light was provided by a LED array panel.

A progressive nitrogen starvation protocol was run: the 6 L PBR was inoculated with 300 mL of inoculum grown on a modified Bold's Basal culture medium (Pruvost et al., 2009). The PBR was then completed up to 1 L with the same culture medium, and the incident photon flux density PFD was set at $50 \mu\text{mole photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for 2 days to avoid stress due to high light intensity. The light intensity was then increased to $160 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for 3 days. At the end of the 5th day the PBR was completed up to 5.8 L with a free nitrogen modified Bold's Basal culture medium, and the incident PFD was set at $250 \mu\text{mole photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The aeration rate is fixed with the outlet vane to ensure a good culture suspension. Harvesting took place 12–14 days after the accumulation of lipids had reached a steady state. The harvested culture was then directly treated (disruption and centrifugation processes) and analysed.

III.2.2.2. Cell disruption and centrifugation

Two distinct mechanical methods of cell disruption were used: high-pressure disruption (HPD) and bead milling (BM) as described previously by Montalescot et al., (2015).

For HPD, a high-pressure cell disrupter (TS series 2.2kW from Constant Systems Limited, Daventry Northants, UK) was used. In this device, samples are forced through a small nozzle 180 µm in diameter (at pressures ranging from 50 to 270 MPa), forming a jet that hits a target on a thermoregulated exchange surface at 3 °C. For the present experiments, 85% of cell disruption was obtained with a single pass at 100 MPa (HPD85) and 100% of cell disruption with a pressure of 200 MPa (HPD100).

For bead milling (BM), a Dyno®-mill multi lab from Willy A Bachofen AG (Muttensz, Switzerland) was used. Experiments were run in pendulum mode (Kwade & Schwedes 2007). Samples were pumped from an agitated feed tank to a 600 mL grinding chamber containing the grinding medium (1.30 mm glass beads, filling ratio of grinding media fixed to 0.75) at a flow rate of 200 mL/min and a rotation speed of 8 m.s⁻¹. At the end of the first passage the suspension was recovered in a second tank and transferred to the first agitated tank to be repumped. For the present experiments, two disrupted biomasses were produced, one at 85% of cell disruption obtained after 3 passes through the grinding chamber (BM85), and a second one at 100% of cell disruption after 5 passes (BM100). Samples were then collected at the outlet when steady state was reached (which can be assumed after the flow of a volume of fluid equal to 3 times that of the grinding chamber for constant flow rate, temperature, pressure and concentrations) (Montalescot et al., 2015). Suspension outlet temperature was maintained at 20 °C with a cold glycerol fluid circulating in the cooling jacket of the grinding chamber.

To measure the extent of *P. kessleri* disruption (Middelberg, 1995; Spiden et al., 2013a, 2013b) cells (fixed with 20 µL of Lugol's iodine solution per mL of sample) were counted using a Malassez-type counting chamber. All the tests were performed in triplicate. The percentage of disintegrated cells Des (%) was calculated as described previously by (Montalescot et al., 2015), using Equation 1.

$$\text{Des (\%)} = \left(1 - \frac{N_x}{N_0}\right) \cdot 100 \quad \text{Eq. 1}$$

with N_x , the number of intact cells remaining after destruction at a given pressure on the HP disrupter or at the end of a given pass on the bead mill, and N_0 the number of intact cells before disruption.

To obtain a cell-free supernatant for lipid analysis, cell culture after disruption was centrifuged on a Sorvall RC 6 plus Thermo Electron Corporation centrifuge at 12,100g for 20 min at 20 °C.

III.2.2.3. Analyzed samples

Analysed samples were obtained from four different batches of *P. kessleri* (B1, B2, B3 and B4). Samples consisted of the whole mixture containing (i) intact cells before grinding (IC), (ii) culture disrupted by BM or HPD at 85% or 100% disintegrated cells, and (iii) supernatant of disrupted samples obtained by centrifugation (Sup.BM or Sup.HPD). **Table 13** summarises the type of samples analysed for each batch. Samples were stored at -20 °C before freeze-drying.

Table 13. Synthesis of analysed samples from the different batches

Batch	IC	BM85	HPD85	HPD100	Sup.BM85	Sup.HPD85	Sup.HPD100	Sup.BM100
B1	✓	✓	-	-	✓	-	-	-
B2	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
B3	✓	-	✓	-	-	✓	-	-
B4	-	✓	✓	-	✓	✓	-	-

IC: intact cells. BM: sample grinded by Bead Mill. HPD: sample grinded by High Pressure Disruption. Sup.: supernatant sample obtained by centrifugation. 85 and 100: percentage of cell disintegration.

III.2.2.4. Granulometry

Size distributions of particles contained in all microalgae suspensions, were determined by laser granulometry using a Horiba LA 960 instrument equipped with 2 light sources (a 650nm red Laser Diode and a 405nm blue LED) and a silicon photo diode detector with detection limits of 0.01µm and 5000µm. A refractive index (RI) of 1.45 (corresponding to the RI of microalgae cells) was used for non-grinded samples and 1.47 (corresponding to RI of colza oil) for disrupted samples and their supernatants.

III.2.2.5. Chemical analyses

III.2.2.5.1 Chemicals and standards used in lipids characterization

Solvents employed for lipids extractions and gas chromatography GC analysis were: n-hexane, 99+%, for analysis, chloroform, 99+%, stabilized with ethanol from Acros Organics, chloroform

for high-performance liquid chromatography HPLC-grade stabilized with 2-methyl-2-butene, acetone HPLC grade, methanol of analytical grade from VWR.

Analytical reagents such as dibutylhydroxytoluene BHT, boron trifluoride-methanol solution MeOH-BF₃ 14% w/w, glyceryl triheptadecanoate (TG17:0), fatty acids standards (Supelco 37 component fatty acid methyl esters FAME mix) as well as the silica gel pore size 60A 62-200 µm (70-230 mesh) high purity Fluka were obtained from Sigma-Aldrich. From Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) we purchased ammonia solution (30%), cyclohexane RS Plus Pesticide, and from Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands) methanol absolute (HPLC supra-gradient), chloroform (ethanol-stabilized, HPLC), acetonitrile (LC-MS).

The standard lipids used in HPLC, soy phosphatidylglycerol (PG) and sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) were obtained from Cogener, and phosphatidylcholine PC, lysophosphatidylcholine LPC, Phosphatidylethanolamine PE, phosphatidylserine PS, phosphatidylinositol PI from Sigma-Aldrich.

Triolein, diolein, monoolein, oleic acid, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), sphingomyelin (SPH) lyso-phosphatidylcholine (LPC) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Digalactosyl-diacylglycerol (DGDG), monogalactosyl- monoacylglycerol (MGMG) and monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) were purified from wheat flour at the laboratory as described previously (Bottier et al., 2007).

III.2.2.5.2 Total lipids extraction

Between 50 and 250mL of sample (depending on the sample concentration) were lyophilized for 2 to 3 days using a freeze dryer Alpha 1-2 LD Plus Christ. Dried residues were weighted and dry matter determined. Total lipids were extracted using a method based on Folch and Bligh and Dyer methods, mixing the dry matter of each sample (around 100 to 300 mg) with 12 mL of CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) and 20 µL of a solution of 20 µg/L of dibutylhydroxytoluene (BHT) used as antioxidant, during 6 h in a shaker plate. The solvent containing lipids was recovered and was evaporated with a gentle nitrogen flow. The residue (the total lipid extract) was diluted in 2 mL of the same solvent mixture before being stocked at -20°C.

III.2.2.5.3 Lipid classes separation by solid-phase extraction (SPE)

The separation of extracted lipids in neutral (TAG and other neutral lipids ONL) and polar compounds (glycolipids and phospholipids) was performed by solid-phase extraction (SPE). An aliquot of the total lipid extract containing up to 3 mg of lipids, previously dried and re-diluted in

500 μL CHCl_3 , was separated using a silica column of 7 cm activated with 6% w/w of distilled water and rinsed with CHCl_3 and MeOH. The first lipid fraction containing TAG, was eluted with 8 mL CHCl_3 (stabilized with amylene). The second fraction containing other neutral lipids (ONL) such as MAG, DAG and free fatty acids was obtained using 8 mL $\text{CHCl}_{3(\text{eth})}$ /MeOH 98:2 (v/v) and the third and the fourth containing glycolipids and phospholipids were obtained with 8 mL of acetone and 16 mL of MeOH respectively. Solvent was eliminated using nitrogen flow and the residue was either i) diluted in 1 mL of the same solvent and stocked at -20°C , or ii) transmethylated (as described in §III.2.2.5.4) for the determination of FA profile or analysed or iii) diluted in 1 mL CHCl_3 for HLPC analysis in regards to confirm the nature of the lipids group.

III.2.2.5.4 Fatty acids (FA) Transmethylation and Gas chromatography

Fatty acid composition of total, neutral (TAG, ONL) and polar lipids (GL, PL) were determined after transmethylation of about 0.5mg to 1mg of lipid with $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 14% in the presence of an internal standard (C17:0) according to (Morrison and Smith, 1964).

The objective of this procedure is the identification and the relative quantification of fatty acids present in lipid molecules. The analysis was performed on transmethylated samples coming from the total lipids fraction (to obtain the total fatty acids profile) and from the individual lipid classes separated (TAG, ONL, PL and GL). The transmethylation leads to fatty acids methyl ester FAMES that were analysed by gas chromatography.

For each sample, an aliquot (about 10-120 μL containing about 1mg) of lipid extract was dried with a nitrogen flow in a water bath at 40°C and then transmethylated using a mixture of 1.2 mL of MeOH- BF_3 (14% w/w) and 10 μg of TG 17:0 (internal standard). The boron trifluoride BF_3 catalyzes the transmethylation reaction. The reaction mixture was placed in a water bath at 90°C for 10 min to transform lipid molecules in FAME. After reaction, samples were cooled to room temperature. After addition of 1.5 mL of hexane, the organic phase containing FAME was washed three times with 2 mL of water. The organic phase containing lipids was then stocked at -20°C until GC analysis.

Transmethylated samples were analysed by gas chromatography (GC) using an Agilent 7820A System, provided with a flame ionisation detector (GC-FID) and equipped with a split/splitless injector (injected quantity: 2 μL , split set at 1/10 – 10mL/min). The separation column used was Trace TR-FAME 260M142P (30m x 0.25mm x 0.25 μm) containing a polar phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane. The carrier gas (hydrogen) flow rate was constant at 1 mL/min. The gas was produced using a hydrogen generator (WM-H2, FDG-Si, Evry, France). Temperature was

250°C for the injector and 280°C for the FID. The oven was at 80°C for 1 min, then temperature increased at 5°C/min to 145°C for 12 min, followed by a second rise of 1°C/min to 155°C for 5 min, then at 5°C/min to 200°C for 5 min and finally at 75°C/min to 250°C for 1 min. Individual fatty acids were identified by comparison of their retention times with those of standards (FAMEmix; Supelco, Sigma Saint Quentin Fallavier, France), while quantification was done using Chemstation, Openlab software and a comparison between the respective peak area and the one obtained for the internal standard TG 17:0 added during the transmethylation stage. Results were expressed as percentage of each fatty acid (FA) to the total fatty acids (TFA) (g/100 gTFA).

III.2.2.6. Lipid classes analysis by high performance liquid chromatography (HPLC)

III.2.2.6.1 Determination of classes of neutral lipids and phospholipids

Neutral and phospholipid fractions purified by SPE were further analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a modular UltiMate 3000 RS System (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) equipped with an Uptisphere Strategy column (150 mm× 4.6 mm, 2.2 µm, 100 Å; Interchim, Montluçon, France), and coupled to an evaporative light scattering detector (ELSD) Sedex 85 (Sedere S.A., Alfortville, France). Chromeleon® Chromatography Management Software (Dionex) was used for system control and data processing. Approximately 5 µg of each lipid fraction in 10 µL chloroform were eluted separately using a gradient from solvent A: chloroform to solvent B: methanol/ammonia (30% in water)/chloroform (92:7:1, v/v/v). The gradient started from 100% A to 20% B in 3 min and then increased to 100% B in 9 min. After a plateau at 100% B for 3 min programmed for PL analysis only, the column was equilibrated at 100% A for 3 min. The analysis was carried out at 30 °C with a flow rate of 1 mL/min. The ELSD temperature was set at 40 °C, the nebulizer gas pressure (dried and filtered air) was fixed at 3 bars and the photomultiplier sensitivity was set to gain 6. Lipid classes were identified by comparison of their retention times to those of lipid standards and their concentrations calculated by the use of calibration curves obtained with each standard.

The HPLC analysis, was done in order to identify the different groups or lipid families presented in each fraction obtained by SPE: i) triglycerides TAG ii) other neutral lipids ONL (such as monoacylglycerides MAG, diacylglycerides DAG and free fatty acids FFA), iii) glycolipids GL and iv) phospholipids PL. The system used was an HPLC Dionex RS-LS Ultimate 3000, equipped with an evaporative light scattering detector (Sedex 85, Sédéré).

The first part of the analysis was the identification of the neutral lipids groups by normal phase HPLC using a polar column of silice Uptispher UP5 25M Si ($\phi_{\text{particles}} = 5\mu\text{m}$; 250mm x 4mm). The initial mobile phase was CHCl_3 (phase A) for which the polarity was increased by adding progressively a mixture of $\text{MeOH} / \text{NH}_3$ 28% / CHCl_3 (92:7:1 v/v/v) (phase B). The addition was done with a linear gradient as follows: at a time 0 min, the mobile phase is composed only by phase A; at 3 min proportions are A/B 20/80 vol %; at 12 minutes mobile phase is only composed by Phase B. This last condition is maintained during 3 min. The solvent flow was 2 mL/min. The same column and solvents A and B were used for the separation of glycolipids and phospholipids fractions but using a solvent flow of 1.5 mL/min.

III.2.2.6.2 Separation and quantification by reverse-phase HPLC.

The TAG molecular species were separated by reverse-phase liquid chromatography UltiMate 3000 RS System (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) on two paired columns (Nucleoshell RP 18 HPLC column, 90A, 2.7 μm , 4.6 $\times$ 150 mm; Macherey-Nagel, Hoerd, France). Sample dissolved in chloroform/methanol (1:1; v/v) (10 mg/mL) was eluted using a gradient elution from solvent A: acetonitrile to solvent B: chloroform. The gradient went from 30% B to 47% B in 40 min. The mobile phase was brought back to initial conditions and the column was allowed to equilibrate for 3 min until the next injection. The mobile phase flow rate was 1 mL min⁻¹. The TAG were detected by an ELSD Sedex 85 (Sedere S.A., Alfortville, France). TAG were separated according to their equivalent carbon number (ECN) calculated as follows:

$$\text{ECN} = \text{number of carbons on the fatty chain} - 2 \times \text{number of double bonds}.$$

The content of each identified TAG was expressed as percentage of total TAG. Individual peaks were identified by comparing their retention times with those of pure TAG standard (triolein: 000, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and oils of known TAG compositions (olive, sunflower, rapeseed, macadamia and nut oils). They were quantified by comparison of their peak areas with a calibration curve plotted from the peak areas given by 5–80 μg triolein (0.25–4 mg/mL).

The second part concerned the analysis of the TAG and the ONL fraction, aiming to verify their correct separation during the SPE analysis. This analysis was done by reverse phase liquid chromatography RP-HPLC. Two different columns were tested: i) C18 with reference Acclaim 120 C18 ($\phi_{\text{particles}} = 3\mu\text{m}$; 250 mm x 3 mm) and ii) two columns in series of Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 ($\phi_{\text{particles}} = 1.8\mu\text{m}$; 250 mm x 3 mm). The initial mobile phase was a mixture of $\text{CH}_2\text{CHCN} / \text{CHCl}_3$ 70/30 vol %. During the analysis (30 min) CHCl_3 was added up to 50% vol of

composition in order to decrease the polarity of the solvent mixture for a flow rate of the mobile phase of 1 ml/min.

III.2.2.6.3 TAG analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF)

TAG fraction from batch B3 samples were analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF) as described by (Fogang Mba et al., 2017): five microliters of lipid fraction (2 mg/mL) were mixed with 45 μ L of a matrix (2.5 dihydroxybenzoic acid (DHB: 5 mg/mL) solubilized in methanol/water (90%, v/v)). 0.5 μ L of this mixture was applied to a stainless steel MALDI target and left to room temperature until crystallization. An Autoflex-Speed MALDI-TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a Smart beam laser (355 nm, 1000 Hz) and controlled with the Flex Control 3.4 software package, was operated with a positive polarity in the reflectron mode, and spectra were acquired in the m/z range 500–1000. The calibration of the mass spectrometer (time-of-flight) was done with polyethylene glycol (PEG) using m/z: 525.2887, 569.3149, 613.3411, 657.3673, 701.3936, 745.4198, 789.4460, 833.4722, 877.4984, 921.5246, 965.5509, 1009.5771, 1053.6033, 1097.6295, 1141.6557, and 1185.6819. TAG molecules were ionized as sodium adducts, for which m/z correspond to $[M+Na]^+$. (Lipid Maps, 2017), database was used to obtain the possible TAG molecules from the $[M+Na]^+$ obtained by MALDI TOF analysis.

III.2.2.7. Lipid classes analysis by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

This analysis was done by an external laboratory in order to identify and quantify specific molecules making part of polar lipids. Lipid classes were also analysed by high-performance thin layer chromatography (HPTLC) as described by (Moutel et al., 2016).

Figure 32 presents a synthesis of the different characterization methods used for the determination of lipid profiles from *Parachlorella kessleri* samples.

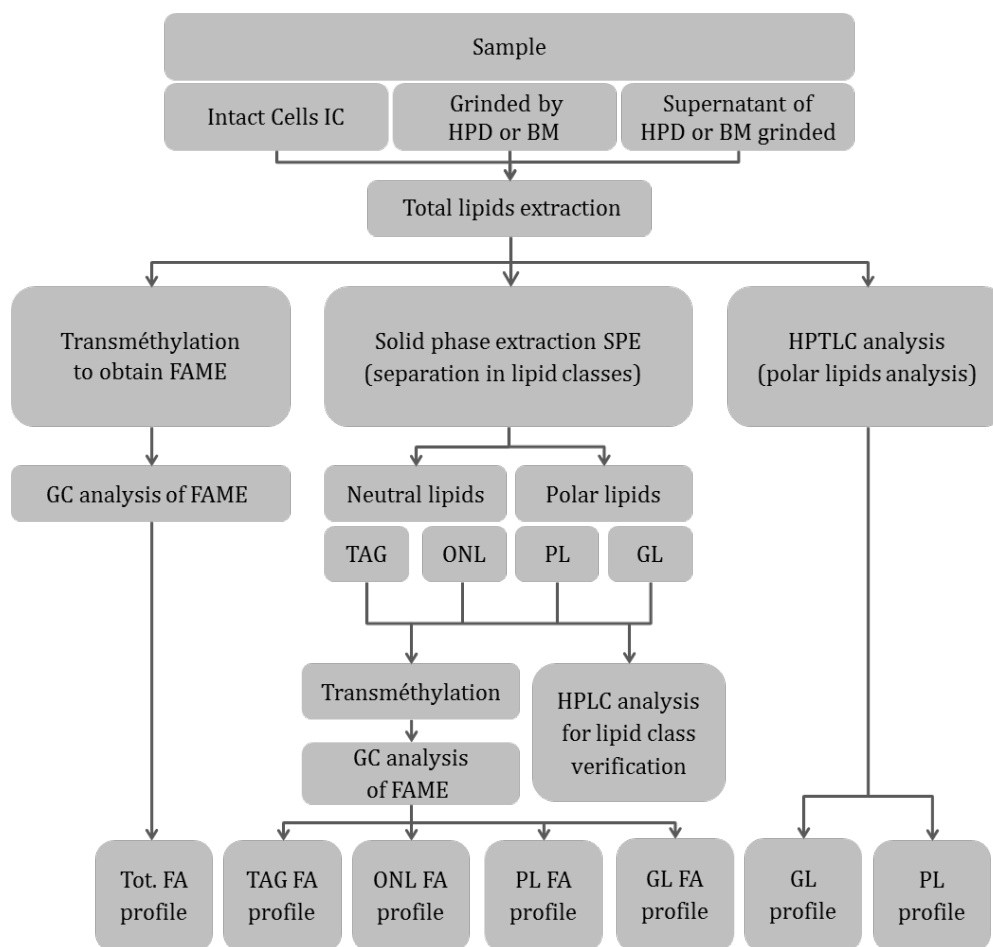


Figure 32. Synthesis of the different characterization methods used for the determination of lipids profile from *Parachlorella kessleri* samples

III.2.3. Results and Discussion

Samples containing intact cells (IC), cells disrupted by HPD or by BM and their supernatants from four different batches were characterised in terms of their granulometry and lipid profiles. The main results for each characterization method are presented in the following paragraphs, then a cross-analysis is proposed to highlight the main results on the lipid composition of the cultures in the different batches and the impact of disruption methods on the lipid composition.

III.2.3.1. General characteristics of cultures: total lipid content (TL)

Figure 33 shows the percentages of total lipids contained in all the samples analysed relative to dry matter. The highest lipid content in disrupted cells was obtained for batch B3 (1.31g/L),

followed by batch B2 (1.10g/L). Disrupted samples from batches B1 and B4 presented lower quantities, between 0.16 and 0.78 g/L. We see that significant variations were obtained between the different cultures. These differences are probably related to the physiological state of cells, which may cause variations in their response to nitrogen starvation. *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis* cultured in nitrogen-depleted media had a lipid production of between 30 to 36%dw (Huang et al., 2013), similar to the results obtained for IC(B3).

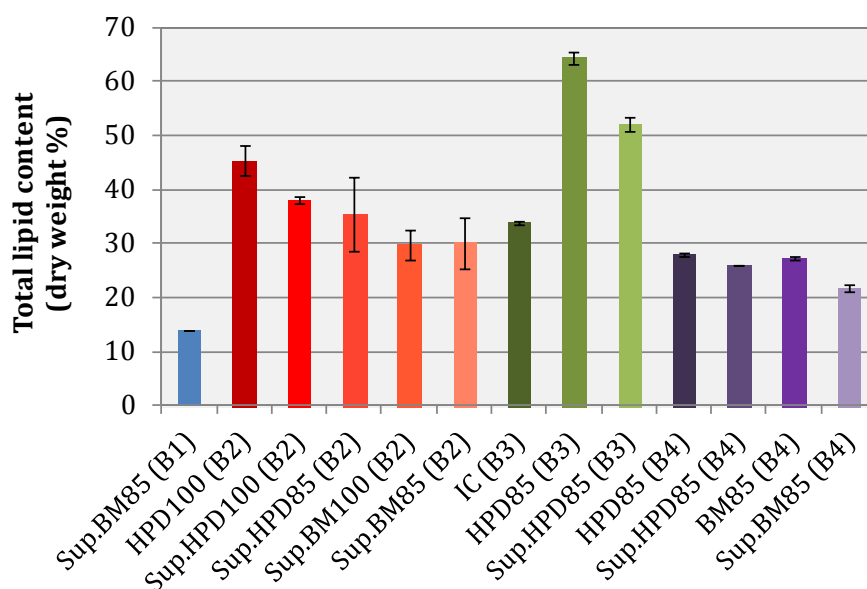


Figure 33. Total lipids content of samples from different cultures of nitrogen starved *Parachlorella kessleri*
 IC: intact cells. BM sample grinded by Bead Mill. HPD: sample grinded by High Pressure Disruption. Sup.: supernatant sample. 85 and 100: percentage of cell disintegration.

On comparing different types of samples from the same batch (IC, disrupted cells and supernatant), the results reveal that disruption increased the quantity of lipids available for extraction, and that a large proportion of lipids was recovered in supernatants by centrifugation. For instance, sample HPD85 from batch B3 yielded twice as much lipids as intact cells (IC). 81% of the lipids released by disruption was recovered in the supernatant after centrifugation; the remainder was trapped in the pellet. For all cases, the recovery ratio of lipids in supernatants was between 80–92% of those present in disrupted samples.

No significant differences were observed on comparing samples of cells disrupted by the same method at different percentages of disintegration (85% and 100%). For instance, from batch B2, samples Sup.BM85 and Sup.BM100 showed the same proportion of lipids, i.e. 30%dw of total lipids, and samples Sup.HPD85 and Sup.HPD100, 36–38%dw of total lipids. It would be expected

that 100% disintegration of the cells would yield to higher lipid liberation in the supernatant. The potential difference may be hidden by the analytical method uncertainty. Some of the intact cells may be partially damaged and liberate some lipids, or on the contrary a fraction of the lipids from the disrupted cells may not be fully accessible for analysis.

On comparing total lipid content of samples from batch B4, disrupted by different methods but at the same percentage of disintegration (BM85 and HPD85), no differences were observed. However, for all batches, slightly higher oil content was observed in supernatants of HPD samples.

III.2.3.2. Particle size distribution

The following results present the volume size distribution of analysed samples. Distributions are given by volume because this tells us which group of particles contributes most to total particle mass. As an example for comparison, **Figure 34** presents size distributions obtained for samples of batches B1 and B3.

Intact cells IC

IC Samples from B1 and B3 presented a monodisperse particle size distribution with an average size of $Dv50=6.2\mu\text{m}$ ($Dv10=4.2\mu\text{m}$ and $Dv90=9.7\mu\text{m}$). Taking into account these results and those obtained for total lipids content in grinded algae, it is possible to infer that intact cells having the same size, may present very different total lipids content.

Grinded samples

Considering grinded samples, BM85 from B1 (**Figure 34a**) showed a distribution very close to that of intact cells: the main peak (sum of the volume percentage of the corresponding particles equal to 99% of the volume in the analysed sample) was made up of particles with a volume diameter of $Dv50 = 4.74 \mu\text{m}$; while small particles, with $Dv50 = 0.2 \mu\text{m}$, formed less than 1% of the total volume. The same results were found for the batch B4 (B4-BM85, see appendix), but the small particles represented 13% of the total volume. By contrast, HPD85 in B3 (**Figure 34b**), showed a polydisperse size distribution with three peaks: the main one at $Dv50 = 4.8 \mu\text{m}$ (55% of total volume), and two others at $0.3 \mu\text{m}$ and $65.9 \mu\text{m}$, each with 22% of total volume. We note that some particles were bigger than ICs. This can be explained by the agglomeration of small particles after disruption: disrupted samples are mixtures in which water-soluble substances (polysaccharides, proteins, salts, etc.), and non-soluble compounds like lipids are mixed with cell fragments; some of these substances may be adsorbed at interfaces of particles, such as proteins on fat globules at water-oil interfaces (Lopez et al., 2010). After HPD of batch B3, the cells are

broken in smaller fragments that explain the presence of smaller particles. The external structure of the cells is strongly modified. The destabilization of the suspension and the aggregation seems more important in HPD. The BM particles may maintain for a moment their general structure and the repulsion between cells. The aggregation will obviously also occur because of the release of the molecules but may be later. HPD in the case of batch B4 don't show any aggregation. A deeper study would be needed to evaluate the impact of physiological state on the disruption method efficiency.

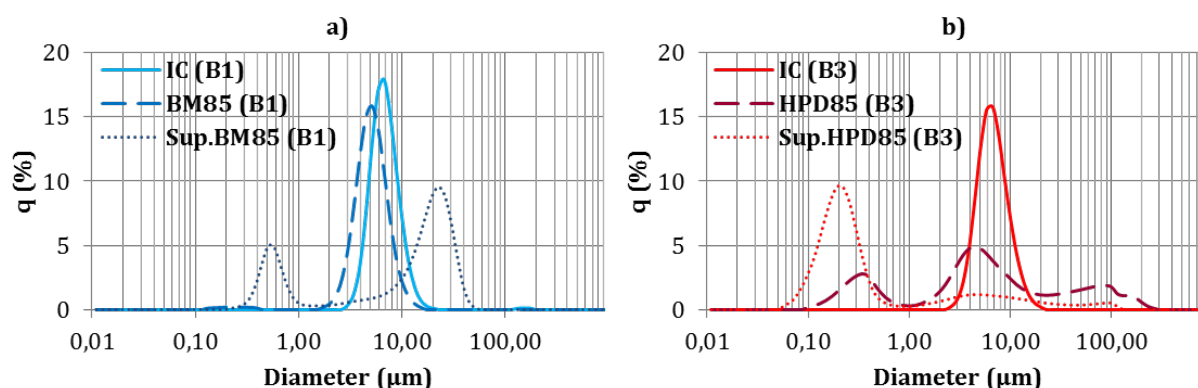


Figure 34. Volume particle size distribution of samples from cultures a) B1 and b) B3 of nitrogen starved *Parachlorella kessleri*.

IC: intact cells. BM sample grinded by Bead Mill. HPD: sample grinded by High Pressure Disruption. Sup.: supernatant sample. 85 and 100: percentage of cell disintegration. q(%): volume percentage of the corresponding particles reported to the total volume of measured particles.

Table 14. Peaks characterizing the size distributions of intact cells IC, grinded samples by HPD and BM and supernatants samples

Batch	Sample	Main Peak		Peak 2		Peak 3	
		Vol. %	Dv50 (μm)	Vol. %	Dv50 (μm)	Vol. %	Dv50 (μm)
B1	IC	99.7	6.3				
	BM85	98.5	4.7	1.5	0.2		
	Sup.BM85	75.4	18.3	24.6	0.5		
B2	Sup.BM85	70.9	46.6	29.1	0.4		
	Sup.BM100	67.8	33.9	32.2	0.4		
	Sup. HPD85	57.2	46.7	42.8	0.4		
	HPD100	44.6	0.4	31.7	111.1	23.7	13.3
	Sup. HPD100	57.8	0.2	42.2	41.6		
B3	CI	100.0	6.2				
	HPD85	55.4	4.8	22.4	0.3	22.2	65.9
	Sup. HPD85	76.3	0.2	20.9	5.7	2.9	73.3

	BM85	86.9	5.4	13.1	0.3
B4	Sup.BM85	66.1	25.6	33.9	0.3
	HPD85	81.6	4.9	18.4	0.3
	Sup.HPD85	92.1	0.2	7.9	4.4

Supernatant samples

The centrifugation process eliminates cell fragments, which are pelleted. In the case of sample Sup.BM85 from batch B1, two peaks were detected: one at $Dv50 = 18.3 \mu\text{m}$ (75% of total volume) and the other at $Dv50 = 0.5 \mu\text{m}$ (25% of total volume). This result contrasts with that for sample Sup.HPD85 from B3 (**Figure 34b**), for which most of the particles presented a mean diameter of $Dv50 = 0.02 \mu\text{m}$ (76% of total volume), although another peak appeared at $Dv50 = 5.7 \mu\text{m}$. Accordingly, particles found in supernatants should mainly be lipid droplets, with amphiphilic compounds that may be bound at the oil-water interface (proteins, etc.), or eventually non-centrifuged small fragments. But as we noticed in BM samples, most of disrupted cells have a size similar to intact cells and should leave in the pellet. These differences may be associated with the disruption process. Bead milling yields larger droplets than high-pressure disruption, which breaks up droplets. The centrifugation process may facilitate the coalescence of the larger lipid droplets, and result in an increased size of particles found in supernatant samples.

Data on the volume size distributions of all the other samples are presented in **Table 14**. They show that most of the supernatants after HPD contain smaller droplets than supernatants after BM. However, size of droplets in the supernatant may be a very important variable for lipid separation by membrane processes: bigger lipid droplets are desirable because this facilitates the separation from other components such as proteins and polysaccharides. Bead milling is therefore recommended.

III.2.3.3. Fatty acids (FA) profile of the total lipids extract

Table 15 shows the total fatty acid composition of intact cells (IC), cells disrupted by BM or HPD, and supernatant samples from nitrogen-starved *P. kessleri* cells. Carbon chains of fatty acids comprised 14 to 18 carbons, saturated, or with up to 3 unsaturations. Samples contained mainly oleic (C18:1n-9c), linoleic (C18:2n-6c), linolenic (C18:3n-3), palmitic (C16:0) and stearic acids (C18:0). These results are consistent with those found previously in our laboratory. Kobayashi et al., 2013, reported a similar profile for *P. kessleri* (same strain as used in this work,) but with C16:0 and C18:2n-6c as the main FAs.

These results also show that a part of the total FA profile depends on the response of cells to starvation. The most notable variation in the total FA profile was that supernatant samples from cultures with the lowest lipid content (B1 and B4) showed more linoleic acid and less oleic acid than those from cultures with the highest total lipid content (B2 and B3). Likewise, some differences were observed between different sample types from the same batch. For instance, as shown in **Figure 35**, disrupted samples presented more oleic acid and less palmitic acid than intact cells, suggesting that the extra C18:1n-9c comes from polar lipids present in cell membranes. They were not extracted during IC analysis, but released during disruption. On the contrary, on comparing the different methods of disruption and the different percentages of disintegration (85% or 100%), non-significant differences were observed (**Table 14**, B2 and B4), suggesting that neither the method nor the cell disruption yield tested (85% or 100%) influenced the total FA profile.

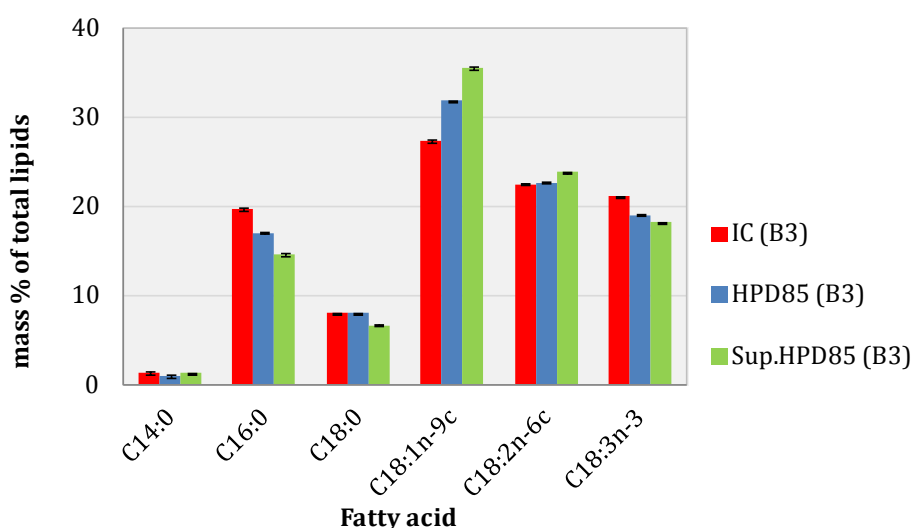


Figure 35. Major fatty acids composition of samples from different cultures of nitrogen starved *Parachlorella kessleri*

Table 15. Total fatty acids composition of intact cells, grinded cells by BM or HPD and supernatant samples from nitrogen starved *Parachlorella kessleri*

Batch	Sample		C14:0	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9c	C18:2n-6c	C18:3n-3	C20:0	Others
B1	Sup.BM85	rel. %	0.76	16.2	0.60	7.79	22.70	31.60	19.69	0	0.67
		SD	0.02	0.03	0.04	0.04	0.14	0.12	0.05	0	0.04
B2	Sup.BM85	rel. %	1.35	23.37	0.705	6.12	25.13	23.65	19.09	0	0.71
		SD	0.06	0.30	0.04	0.05	0.16	0.43	0.24	0	0.28
	Sup.BM100	rel. %	1.46	23.41	0.75	6.25	25.18	23.57	18.97	0	0.40
		SD	0.12	0.35	0.05	0.05	0.16	0.22	0.07	0	0.01
	Sup.HPD85	rel. %	1.38	22.37	0.69	5.89	25.46	23.91	19.54	0	0.74
		SD	0.06	0.34	0.03	0.16	0.10	0.05	0.11	0	0.323
	HPD100	rel. %	1.20	21.48	0.64	6.01	25.38	23.91	20.17	0.73	0.49
		SD	0.05	0.24	0.02	0.15	0.08	0.25	0.26	0.02	0.15
	Sup.HPD100	rel. %	1.28	20.41	0.64	5.56	25.78	24.61	21.18	0	0.53
		SD	0.16	0.29	0.01	0.04	0.06	0.07	0.11	0	0.17
B3	IC	rel. %	1.39	19.72	0	7.97	27.35	22.50	21.07	0	0
		SD	0.16	0.15	0	0.04	0.14	0.05	0.10	0	0
	HPD85	rel. %	0.97	17.05	0.46	7.97	31.85	22.68	19.03	0	0
		SD	0.13	0.05	0.01	0.04	0.08	0.02	0.10	0	0
	Sup.HPD85	rel. %	1.24	14.63	0	6.67	35.48	23.80	18.19	0	0
		SD	0.02	0.13	0	0.05	0.13	0.03	0.12	0	0
B4	BM85	rel. %	0.90	15.75	0.42	4.79	20.22	35.35	21.32	0.30	0.95
		SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.11	0.03	0.03	0.01	0.14
	Sup.BM85	rel. %	1.02	16.46	0.43	4.61	20.14	34.72	20.91	0.33	1.39
		SD	0.01	0.08	0.01	0.01	0.07	0.17	0.02	0.01	0.14
	HPD85	rel. %	0.89	15.41	0.41	4.71	20.01	34.99	22.04	0.29	1.24
		SD	0.01	0.13	0.01	0.05	0.07	0.06	0.01	0.01	0.28
	Sup.HPD85	rel. %	0.93	14.58	0.44	4.31	20.28	35.52	22.26	0.30	1.37
		SD	0.01	0.07	0.0	0.03	0.03	0.08	0.17	0.01	0.12

Results are mean values of 3 measurements. SD: standard deviation

III.2.3.4. SPE separation of lipids in TAG, ONL, GL and PL classes

Table 16 shows the distribution of main lipid fractions in the total lipids extracted from two batches. For a culture with a good lipid production (B3), *P. kessleri* produced mainly neutral lipids, up to 90% of total lipids, of which 83% were TAGs (IC sample). This high accumulation of neutral lipids was caused by the depletion of nutrients, which causes cells to produce more reserve lipids (TAGs and ONLs) than polar lipids. (Kobayashi et al., 2013), reported similar results for the same strain (also cultured under nitrogen depletion): TAG $\approx$ 80% of total lipids. These results are interesting compared with other strains (**Table 12.**).

Table 16. Lipid classes profile of nitrogen starved *Parachlorella kessleri* (% w/w of total lipids)

Batch	Sample	% TAG	% ONL	% GL	% PL
B3	IC	82.82 $\pm$ 1.27	5.85 $\pm$ 0.55	3.92 $\pm$ 0.22	6.57 $\pm$ 0.54
	HPD85	47.76 $\pm$ 1.14	42.11 $\pm$ 0.80	5.81 $\pm$ 0.23	4.32 $\pm$ 0.13
	Sup. HPD85	45.95 $\pm$ 1.10	43.75 $\pm$ 0.85	6.35 $\pm$ 0.36	3.94 $\pm$ 0.25
B4	BM85	36.31 $\pm$ 2.77	7.93 $\pm$ 7.79	36.38 $\pm$ 12.43	19.38 $\pm$ 2.16
	Sup. BM85	21.88 $\pm$ 0.92	9.79 $\pm$ 5.40	42.24 $\pm$ 5.05	26.09 $\pm$ 0.75
	HPD85	47.79 $\pm$ 1.47	32.27 $\pm$ 2.14	10.35 $\pm$ 1.89	9.59 $\pm$ 0.82
	Sup. HPD85	32.04 $\pm$ 8.51	18.48 $\pm$ 5.13	27.73 $\pm$ 3.86	21.75 $\pm$ 4.75

Results are mean values $\pm$ standard deviation.

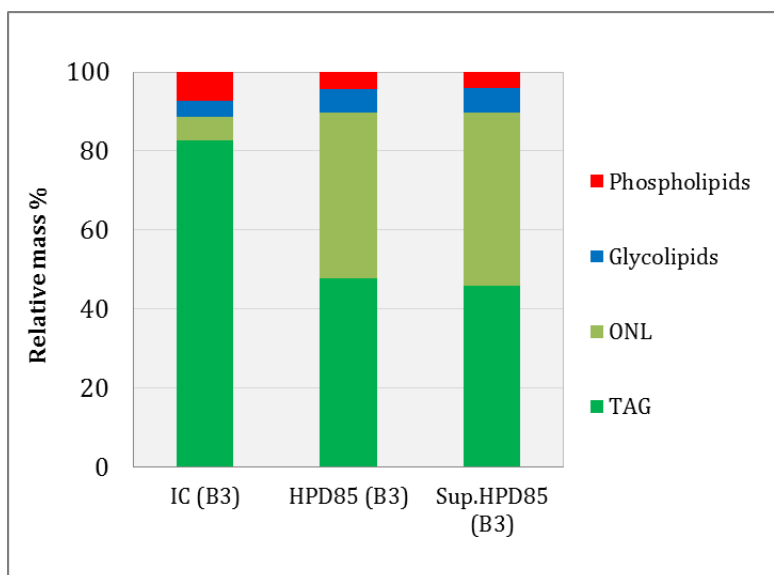


Figure 36. Comparison of lipids classes profile for samples B3

Table 17. Mass of TAG, ONL and polar lipids from batch 3, according to the total lipid content and the relative mass

Batch B3	IC	HPD85	Sup. HPD85
total lipid content (g) for 100g of dry matter	33	63	52
mass of TAG (g) for 100g of dry matter	27,39	30,24	23,92
mass of ONL (g) for 100g of dry matter	1,914	26,46	22,88
mass of Polar lipids (g) for 100g of dry matter	3,465	6,363	5,382

In the disrupted samples HPD85 from the B3 culture, the total lipids represented 63% of dry matter, whereas the lipids in HPD85 from the B4 culture represented only 27% of dry matter (see **Figure 33**). This is related to the different answer of the two cultures to the starving conditions. However, surprisingly, equal proportions of TAGs were obtained: 47.7% of the total lipids in the HPD85 for B3 and B4. The proportion of “other neutral lipids” (ONLs) in sample HPD85 was higher for batch B3 than for the batch B4, in contrast to the polar lipids.

On comparing IC, disrupted and supernatant samples from batch B3 (**Table 16**), the proportion of ONLs increased with disruption. This may be due to the release of ONLs during cell disruption. The mass of TAGs and polar lipids also slightly increased (**Table 17**). A part of these released compounds may also be degraded into FFAs. This degradation may be through hydrolysis due to enzymes released during cell disruption, or be a consequence of disruption conditions. (Balduyck et al., 2017, 2016)), also observed a rise in FFA concentration during storage of microalgae, depending on the strain, cell integrity and storage temperature. The effects of disruption can also be observed on comparing samples from the same batch B4 disrupted by different methods: despite the same total lipid content of the disrupted samples (**Figure 33**), HPD disruption led to a higher content of TAGs and ONLs and less polar lipids compared with sample BM85. The TAG and the polar lipid recovery may be higher in HPD and in BM respectively. The degradation of the TAGs and polar lipids may also be different in the two processes.

Cross-analysis of the composition of the microalgae – Results from part III.2.3.1, III.2.3.3, and III.2.3.4 – show that for a culture with a good lipid production, *P. kessleri* produced mainly neutral lipids, up to 90% of total lipids, of which 83% were TAGs (IC sample). According to total fatty acid profiles, samples contained mainly oleic, linoleic, linolenic, palmitic and stearic acids. A part of the total FA profile was dependent on the response of cells to starvation. Supernatant samples from cultures with high lipid content showed more oleic acid and less linoleic acid than those from cultures a low total lipid content.

III.2.3.5. Fatty acid composition of lipid classes

The different lipid classes (TAG, ONL, GL and PL) separated by SPE were transmethyated and analysed by GC to obtain their fatty acid profiles. The results of these analyses, for samples of batch B3, are presented in **Table 18**.

Table 18. Fatty acids profile of lipid classes for intact cells IC, grinded sample HPD85 and supernatant Sup. HPD85 from batch B3 (relative %)

FA	IC				HPD85				Sup. HPD85			
	TAG	ONL	GL	PL	TAG	ONL	GL	PL	TAG	ONL	GL	PL
C14:0	1.43	0	0	0.00	1.00	0.82	3.09	0	1.10	0.75	4.22	1.58
C16:0	17.78	15.61	42.39	38.34	14.31	20.66	27.53	34.15	14.51	13.44	21.58	42.35
C16:1n-7	0.45	0	0	0	0.41	0.39	0.00	0	0	0.41	0	0
C18:0	7.24	7.77	32.72	5.41	7.62	9.04	10.02	4.94	7.15	6.57	7.39	5.68
C18:1n-9c	29.79	24.56	0	7.83	33.06	31.39	23.84	10.56	36.23	37.07	28.36	13.23
C18:2n-6c	23.74	27.45	0	22.01	23.08	21.22	17.55	22.66	22.99	23.95	20.52	20.46
C18:3n-3	19.57	24.61	24.89	26.41	19.70	15.92	19.01	27.69	17.19	17.37	19.33	16.70
C20:0	0	0	0	0	0.82	0.82	0	0	0.82	0.44	0	0
Others	0.45	0	0	0	1.24	1.22	0	0	0.82	0.85	0	0
Total SFA	26.44	23.38	75.11	43.76	23.74	31.35	40.64	39.09	23.58	21.20	33.19	49.62
Total MUFA	30.25	24.56	0	7.83	33.48	31.79	23.84	10.56	36.23	37.49	28.36	13.23
Total PUFA	43.31	52.06	24.89	48.41	42.78	37.14	36.55	50.35	40.18	41.31	39.85	37.16

Results are mean values of 3 measurements. SFA: saturated fatty acids. MUFA: monounsaturated fatty acids. PUFA: polyunsaturated fatty acids

The results presented here are consistent with those presented previously for the total FA profile (**Table 15** and **Figure 35**) which showed the same major fatty acids found in all fractions of different lipid classes.

In general, different samples (IC, HPD85 and Sup. HPD85) presented a FA profile with similar trends for TAG, ONL and PL fractions. The major FAs were the same, with some differences in proportions. (Řezanka and Podojil, 1989), also identified C16:0, C18:1 C18:2 and C18:3 as the main FAs in the PL fraction for *Parachlorella kessleri*. One of the main differences between IC, HPD85 and Sup. HPD85 samples was observed in the GL fraction in IC, which presented large amounts of C16:0 and C18:0, which were significantly lower in the disrupted and the supernatant samples. Likewise, the C18:1n-9c content was much higher for the GL and PL fractions of disrupted and supernatant samples than for IC samples. As suggested above, the additional amount of C18:1n-9c may come from polar lipids of cell membrane released during disruption. The most abundant fatty acids found in TAG and ONL fractions for all sample types (IC, HPD85 and Sup. HPD85) were polyunsaturated FAs with 18 carbons.

In the case of intact cells, SFAs were found to be less abundant in neutral lipid fractions (TAG and ONL) than in polar ones (GL and PL): 23–26% w/w and 44–75% w/w of SFAs respectively. Martin et al. (2014) proposed for *Chlorella specie* a recycling of acyl groups from polar lipids to produce TAG, which decreases the rate of polar lipids in starving cells, while a part of this loss could be compensated by *de novo* fatty acid production with mid-long and more saturated chains. This phenomenon is not the same for *Nannochloropsis specie* (Martin et al., 2014). After disruption and centrifugation, Sup.HPD85 samples showed ONL fractions enriched with MUFAs and PUFAs compared with HPD85. SFAs are solid at room temperature (melting point above 60 °C for C16:0 and C18:0), while MUFAs and PUFAs are liquid (melting points 13.4 °C for C18:1, –5 °C for C18:2 and –11 °C for C18:3). These results suggest that after disruption and centrifugation, a part of the SFAs may have been trapped in the pellet, and the supernatant may have contained more lipids in the liquid state, dispersed in the aqueous phase as in an oil-in-water emulsion. GL and PL also contained more MUFAs and PUFAs after disruption.

III.2.3.6. Neutral lipids analysis by HPLC

Triglycerides TAG analysis

The TAG HPLC profiles (qualitative analysis) for samples from batch B3 (**Figure 37a**), intact and grinded cells, supernatants, were very close to each other, meaning that grinding and centrifugation after grinding have no visible effect in the TAG composition.

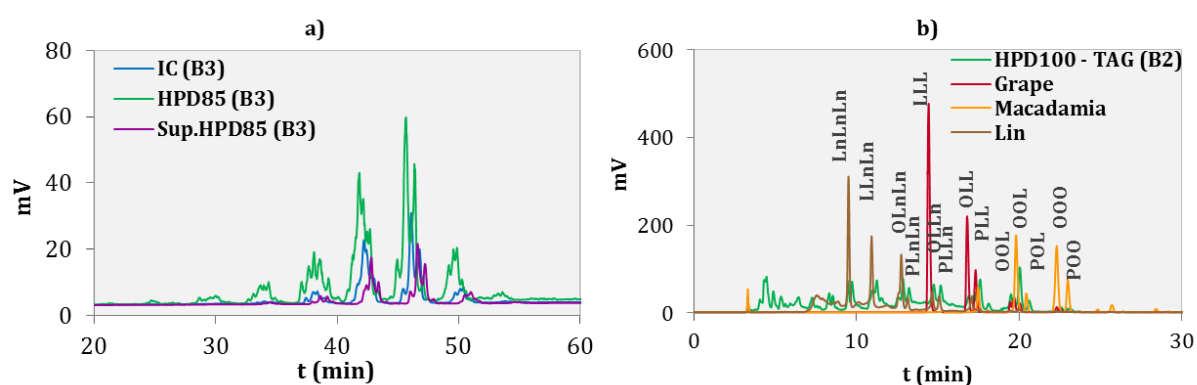


Figure 37. a) HPLC profiles of TAG fraction from samples of B3. b) Probable TAG molecules from sample HPD100 of batch B2 compared to vegetable oils. L: linoleic acid, Ln: linolenic acid, O: oleic acid, P: palmitic acid

Chromatograms were highly complex owing to the broad variety of TAGs. These compounds are eluted following their equivalent carbon number $ECN = \text{number of carbons} - 2(\text{number of double bonds})$. For compounds with the same ECN, the retention time decreases with the number of double bonds. This is illustrated by the retention order of the TAGs with ECN 44:

OLL < POLn < PPLn. However, TAGs with identical ECNs may not be completely separated during the HPLC analysis, with some co-elution, and overlapping of their peaks (Gunstone, 2002). To identify the probable TAGs produced by *P. kessleri*, a comparison with chromatograms from oils of known TAG compositions (grape, macadamia, linseed oils) (Holčapek et al., 2003; Lee et al., 2003) was made (**Figure 37b**). TAGs may be composed mainly of oleic (O), linoleic (L), linolenic (Ln) and palmitic acids (P). Complementary analysis by MALDI TOF was also carried out for the TAG fractions of batch 3. Neither technique, HPLC or MALDI TOF, tell us the position of fatty acids on the glycerol backbone. From the combination of the two techniques, 43 molecular species were identified as the most probable compounds present in TAG fractions (see **Appendix VIII**). These results show TAGs mainly containing 50–54 carbon atoms and 2–6 double bonds ($40 < \text{ECN} < 48$) as the most probable TAGs produced by starved *P. kessleri*. The suggested triglycerides are thus liquid at ambient temperature (melting points $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Gunstone et al., 2007).

Other neutral lipids ONL analysis

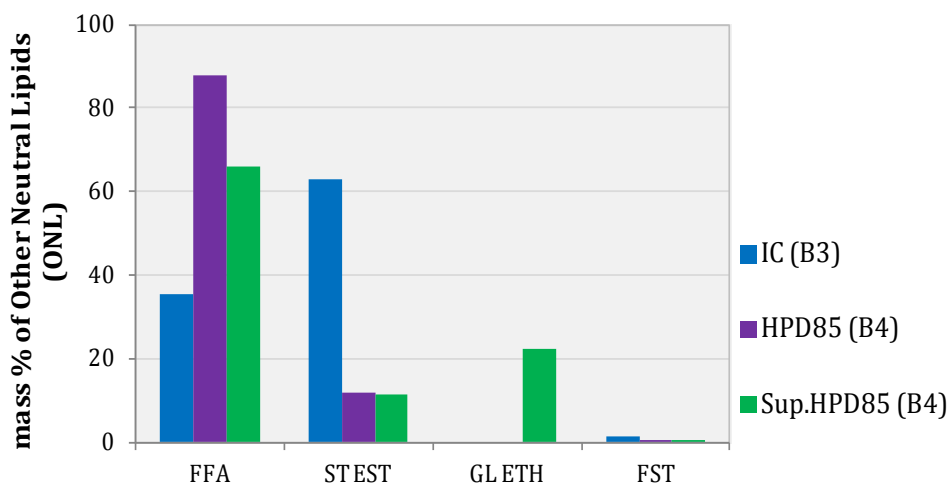
An ONL profile was also determined for some samples using HPTLC (**Figure 38a**). Results showed that before disruption this fraction contained only 35% (w/w of total ONL) of free fatty acids (sample B3), but in disrupted samples (B4) the proportion increased up to 88% (w/w of total ONLs). These data support the hypothesis that disruption causes release of FFAs or the degradation of TAGs or polar lipids into FFAs. Other components were also identified among the ONLs, namely free sterols, glyceride ethers and sterol esters (main component found in sample IC B3).

III.2.3.7. Polar lipids analysis by HPTLC

The composition of the polar lipids (phospholipids and glycolipids) of some samples was determined by HPTLC (**Figure 38b**). For the phospholipids, the data indicate that the most abundant component was phosphatidylcholine (PC) (24–31% w/w of polar lipids) followed by compounds also reported in the literature for other microalgal species (Alonso et al., 1998; Bigogno et al., 2002; Řezanka and Podojil, 1989; Wang and Wang, 2012) such as lysophosphatidylcholine LPC (1–11% w/w of polar lipids), phosphatidylinositol PI (7–13% w/w of polar lipids) et phosphatidylglycerol PG (2–6% w/w of polar lipids). Concerning the glycolipids, the sulfoquinovosyldiacylglycerol SQDG (20–23% w/w of polar lipids) was the most abundant, followed by digalactosyldiacylglycerol DGDG (9–17% w/w of polar lipids) and monogalactosyldiacylglycerol MGDG (4–11% w/w of polar lipids). Roughly the same proportions of these polar compounds were quantified in all the samples except for the LPC. The IC sample contained low quantities of LPC (1% w/w of polar lipids) compared with the disrupted and

supernatant samples (LPC: 10% w/w of the polar lipids). The high content of LPC in disrupted and supernatant samples may have been caused by the hydrolysis of PC (Mengesha and Bummer, 2010) by enzymes released during disruption.

a)



b)

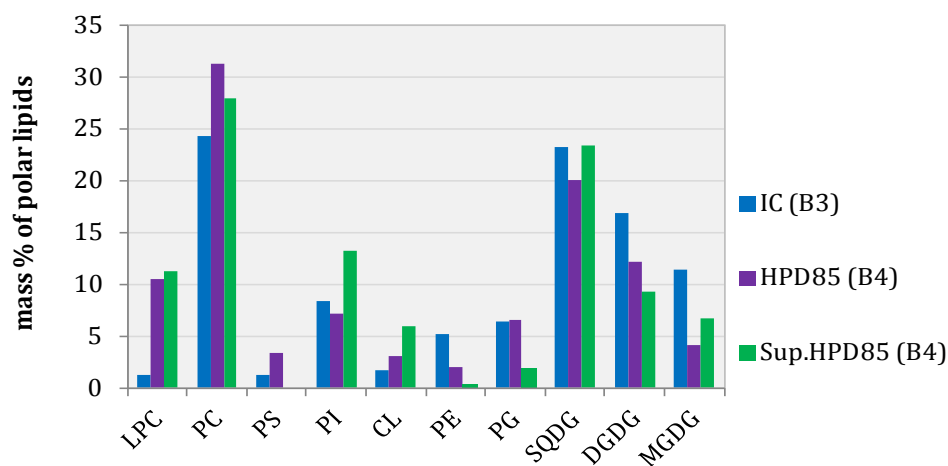


Figure 38. HPTLC results for other neutral lipids (a) and polar lipids (b) from B3 and B4 samples.

FFA: free fatty acid, ST EST: sterol ester, GL ETH: glyceride ether,
 LPC: lysophosphatidylcholine, PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylserine, PI: phosphatidylinositol,
 CL: cardiolipid, PE: phosphatidylethanolamine, PG: phosphatidylglycerol,
 SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol, MGDG: monogalactosyldiacylglycerol,
 DGDG: digalactosyldiacylglycerol

Cross-analysis of disruption methods - Results from part III.2.3.1 and III.2.3.2 show that disruption improved the quantity of lipids available for extraction and a large proportion of lipids was recovered in supernatants by centrifugation. Slightly higher oil content was observed in the supernatant of HPD samples, but bead milling yielded larger droplets, a very important criterion when considering lipid separation by membrane processes. Bead milling is therefore recommended. Agglomeration appears after disruption, causing an increase in particle size. Particles bigger than intact cells were also detected in supernatant samples, which could indicate the coalescence of lipid droplets. Results from part III.2.3.4, III.2.3.5, III.2.3.6 and III.2.3.7 show that The proportion of ONLs, and more specifically FFAs, increased with disruption. This was probably due to the degradation of TAGs or polar lipids by enzymes released during cell disruption, or a result of disruption conditions. HPD disruption led to a higher content of ONLs than BM. The degradation of phosphatidylcholine (PC) into lysophosphatidylcholine (LPC) was also noted and linked to a possible enzyme release. After disruption and centrifugation, the neutral lipid fractions (ONLs and TAGs) in supernatants were enriched in unsaturated fatty acids, which are liquids at ambient temperature, and therefore probably dispersed in the aqueous phase to form an oil-in-water emulsion.

III.2.4. Conclusion

The objective was to analyze the composition and organization of lipids, after disruption of nitrogen-starved *P. kessleri* cultures by bead milling and High-pressure disruption. This work demonstrates that disrupting cells by HPD or bead milling improves lipid recovery, but increases the release of amphiphilic substances like FFAs and LPCs, which will favor emulsification. The neutral lipid fractions in supernatants were enriched in unsaturated compounds compared to the disrupted samples. BM was recommended because larger droplet of lipids could be recovered in supernatants. These data will help integrating BM or HPD in the whole process of microalgal lipid production.

III.3. Définition de la solution synthétique

Les résultats obtenus lors de la caractérisation des échantillons des cultures de la microalgue *Parachlorella kessleri*, des broyats et des surnageants sont ici utilisés pour définir la composition de la solution synthétique. Cette section présente la sélection des produits, la formulation, la définition du procédé d'émulsification ainsi que les caractéristiques de l'émulsion obtenue.

III.3.1. Sélection de la composition de la phase lipidique

III.3.1.1. Sélection des huiles végétales

Acides gras totaux

Grace aux profils des acides gras totaux des huiles végétales reportés dans la littérature (voir §I.2.3.1 et à la recherche bibliographique initiale sur les lipides produits par des microalgues en phase stationnaire de croissance (**Figure 3**) cinq huiles végétales ont été présélectionnés pour être caractérisés. Il s'agit des huiles d'arachide, d'avocat, de cameline, de macadamia, de pépins de raisin et d'olive. Ces huiles ont été sélectionnées parce qu'elles sont liquides à température ambiante et qu'elles ont une teneur importante en acides gras saturés et monoinsaturés comme reporté dans la littérature par pour plusieurs microalgues (**Figure 3**). Les profils des acides gras totaux de ces huiles sont présentés sur la **Figure 39**.

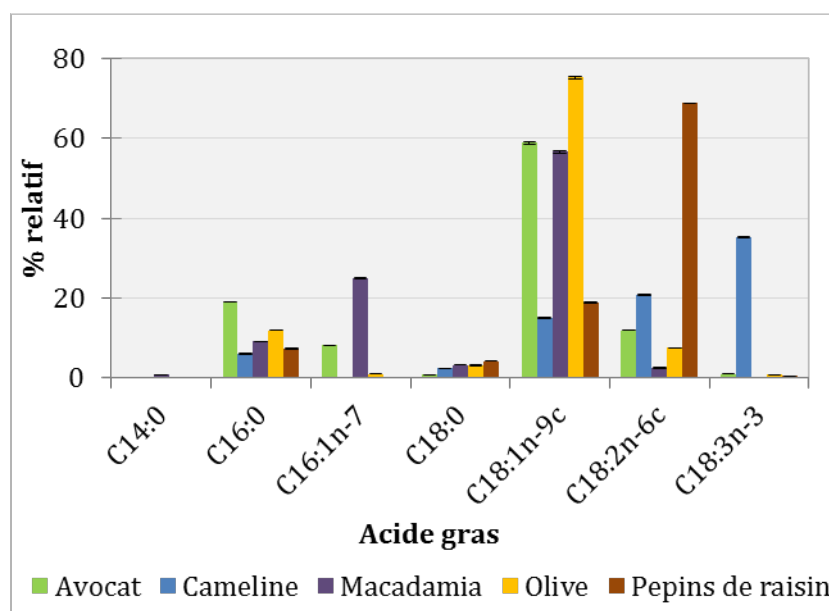


Figure 39. Comparaison des profils des acides gras totaux majoritaires des huiles végétales présélectionnées et d'un surnageant d'un broyat de *Parachlorella kessleri* carencée

Définition d'un mélange d'huiles pour l'émulsion

Les huiles d'avocat et de cameline ont été sélectionnées pour la constitution de la phase lipidique de l'émulsion. L'huile d'avocat a été choisie car elle est riche en acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1n-9c) et linoléique (C18:2n-6c) et l'huile de cameline car il est riche en acides oléique, linoléique et linolénique (C18:3n-3). A partir de la comparaison de la composition en acides gras majoritaires d'un surnageant d'un broyat de microalgue (Sup.HPD100) avec celles des deux huiles (**Tableau 19**) un mélange des huiles d'avocat (av)/cameline(cam) a été choisi pour constituer la phase huile de l'émulsion synthétique. Pour cela une estimation de la « proportion optimale av/cam » a été calculée avec les **Equations 54** et **55**. Dans les cas des acides gras palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) aucune mélange ne permet d'obtenir la composition du surnageant puisque leur composition dans les huiles d'avocat et cameline est inférieure de celle du surnageant. Comme il est observé dans le **Tableau 19** un mélange avocat/cameline 25/75 %w permettrait d'avoir la composition souhaitée des acides oléique (C18:1n-9c), et linoléique (C18:2n-6c) mais pour ne pas pénaliser la quantité d'acide palmitique (C16:0) un pourcentage plus important d'huile d'avocat a été sélectionné. En conséquence un mélange avocat/cameline de 30/70 %w a été choisi. La composition réelle des acides gras de ce mélange d'huiles pour les acides gras majoritaires du surnageant est aussi présentée dans le **Tableau 19**.

$$\%AG_{i \text{ sup.HPD100}} = \%AG_{i \text{ avocat}} \cdot X + \%AG_{i \text{ cameline}} \cdot Y \quad \text{Eq. 54}$$

$$X + Y = 1 \quad \text{Eq. 55}$$

Avec

$\%AG_{i \text{ sup.HPD100}}$	Pourcentage relatif de l'acide gras i dans le surnageant
$\%AG_{i \text{ avocat}}$	Pourcentage relatif de l'acide gras i dans l'huile d'avocat
$\%AG_{i \text{ cameline}}$	Pourcentage relatif de l'acide gras i dans l'huile de cameline
X	Proportion d'huile d'avocat dans le mélange
Y	Proportion d'huile de cameline dans le mélange

Tableau 19. Pourcentages relatifs des acides gras majoritaires d'un surnageant de broyat comparés à ceux des huiles d'avocat, de cameline et d'un mélange avocat/cameline 30/70 %w

Acide Gras	Sup. HPD100 (B2)	Huile d'avocat	Huile de cameline	Proportion optimale av/cam %w	Mélange av/cam 30/70 %w	
					Théorique*	Réel**
C16 :0	20,41	19,03	6,02	1 / 0	9,9	9,2
C18 :0	5,56	0,79	2,37	0 / 1	1,9	2,1
C18 :1n-9c	25,78	58,87	15,08	24,4 / 75,6	28,2	29,1
C18 :2n-6c	24,61	11,91	20,84	25,9 / 74,1	18,2	16,3
C18 :3n-3	21,18	1,06	35,24	13,9 / 86,1	25,0	26,74

*Théorique = calculée. **Réel = mesuré

Profil des triglycérides des huiles végétales sélectionnées

Ainsi que pour les échantillons des microalgues, des analyses des triglycérides contenus dans les huiles d'avocat et de cameline ont été réalisées par HPLC (cf. §III.2.3.6). Les chromatogrammes correspondants sont présentés dans la **Figure 40** et la **Figure 41**. Les triglycérides majoritaires de l'huile d'avocat sont le POO et le OOO, alors que ceux de l'huile de cameline sont le OLLn et le OOLn, ce qui correspond aux acides gras majoritaires trouvés par la détermination des acides gras totaux (**Tableau 19**).

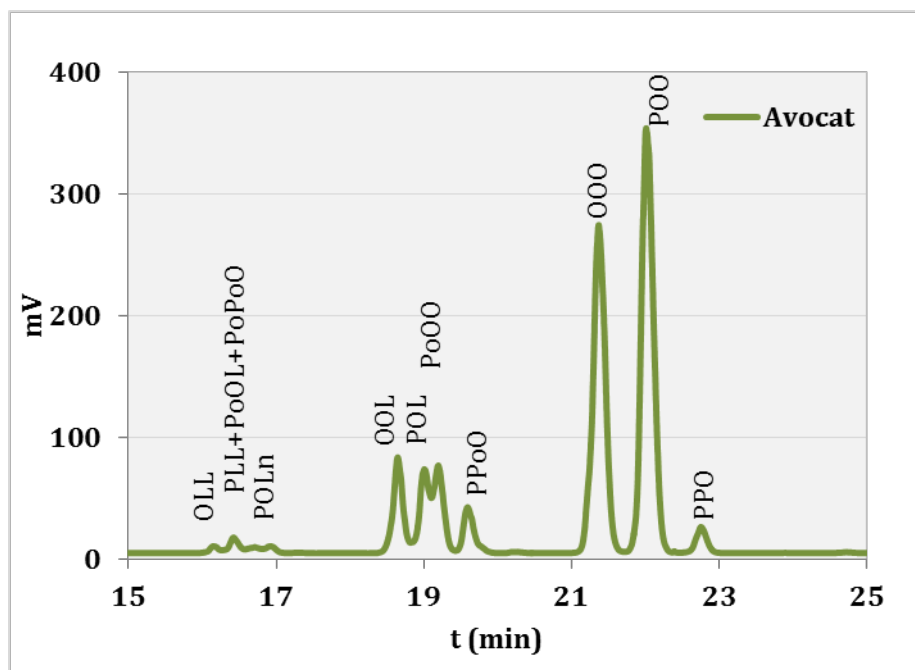


Figure 40. Profil des TAG de l'huile d'avocat. Les lettres représentent les 3 acides gras de chaque triglycéride : acides L = linoléique ; Ln = linolénique ; O = oléique ; P = palmitique ; Po = palmitoléique

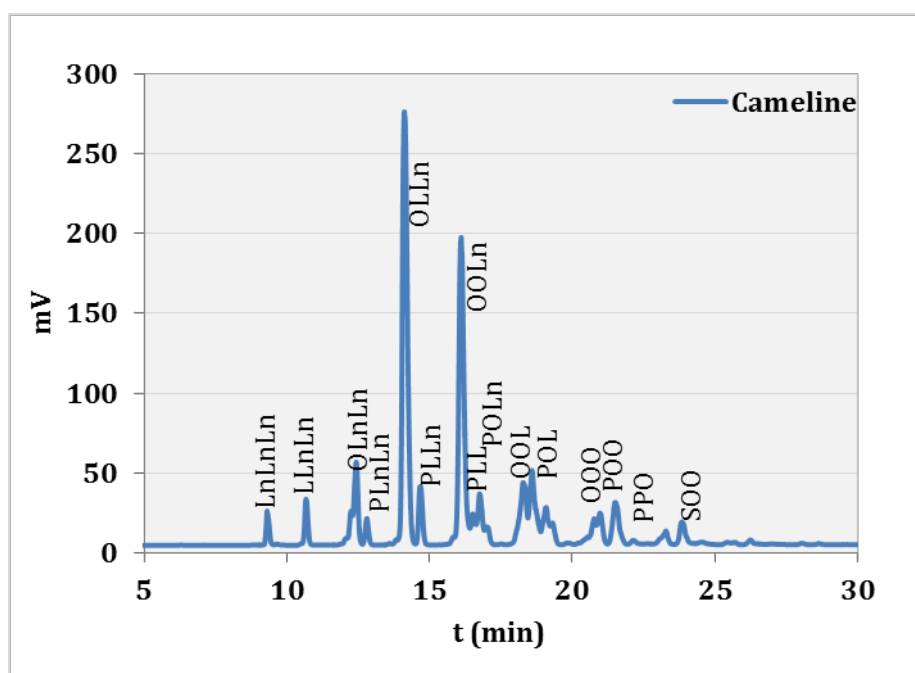


Figure 41. Profil des TAG de l'huile de cameline. Les lettres représentent les 3 acides gras de chaque triglycéride : acides L = linoléique ; Ln = linolénique ; O = oléique ; P = palmitique ; Po = palmitoléique ; S = stéarique

Le profil de triglycérides TAG du mélange d'huiles d'avocat/cameline 30/70 %w a de similitudes remarquables avec celui des échantillons de microalgue caractérisés. La **Figure 42** montre cette comparaison.

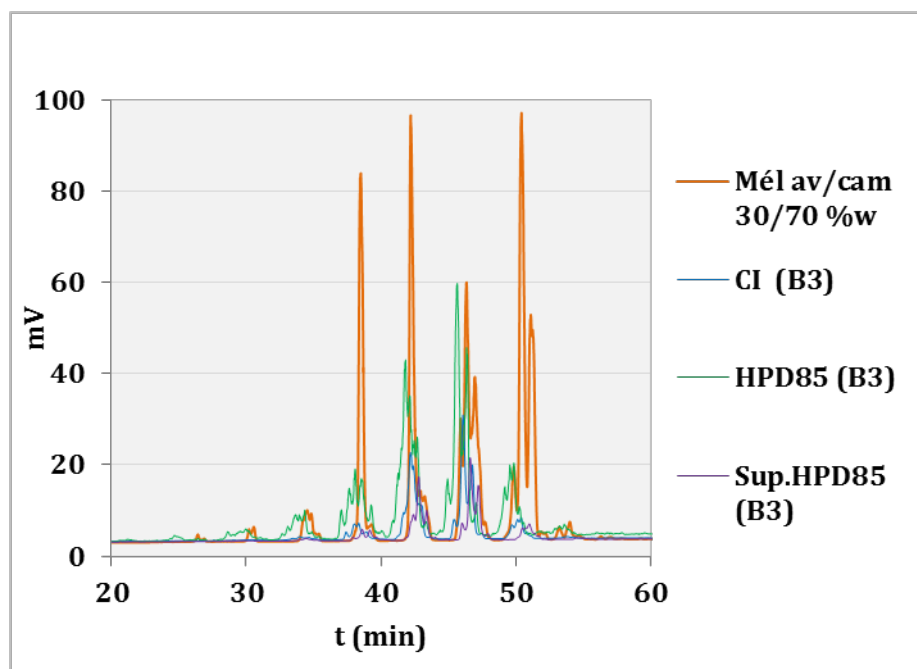


Figure 42. Comparaison des profils de TAG du mélange des huiles 30% Avocat-70% Cameline aux échantillons du Batch 3.

III.3.1.2. Sélection des tensioactifs

Une fois les lipides neutres choisis (mélange d'huiles végétales), des tensioactifs ont été sélectionnés pour donner la stabilité nécessaire à l'émulsion. Cette sélection a été basée sur les résultats de la caractérisation des échantillons de microalgue, qui a montré une proportion importante en lipides polaires. Il est important de rappeler que les lipides polaires sont des molécules amphiphiles pouvant s'adsorber aux interfaces, ce qui ouvre la possibilité de les utiliser comme les composés tensioactifs de l'émulsion. Pour mieux représenter la composition en lipides polaires des échantillons de microalgues, un phospholipide et un glycolipide ont été choisis pour être ajoutés à l'émulsion. Puisque des volumes importants d'émulsion étaient nécessaires pour les essais de filtration le choix des tensioactifs a été restreint à des produits industriels moins coûteux mais contenant plus d'impuretés.

Deux produits émulsifiants ont été choisis : le premier est un produit majoritairement composé par des phospholipides (du type phosphatidylcholine PC), ici nommé PC90G ; le deuxième est un produit composé par un mélange d'alcools gras et de glycolipides du type alkylglucosides APG,

nommé MTNL. Les caractéristiques de ces tensioactifs ont été présentées dans le **Tableau 10**. Le produit PC90G contient majoritairement de la PC composée des acides gras C18:2, C16:0, C18:3, C18:1 par ordre d'importance. Parmi les phospholipides issus de surnageants (**Table 18, Figure 38**), la PC est majoritaire et les mêmes acides gras sont retrouvés, mais dans des proportions différentes, les trois majoritaires restant le C16:0, C18:2 et C18:3. En raison du choix limité de produits commerciaux, le produit MTNL retenu est en revanche moins représentatif de la fraction des glycolipides présents dans un surnageant. Le produit retenu est un mélange contenant une fraction de composés tensioactifs (alkyl glucosides) portant une tête polaire de type « sucre », et des chaînes grasses de longueur similaires à celles des produits réels. Les alcools gras présents auront un impact non négligeable sur la structure des interfaces lipide-eau dans l'émulsion. La proportion phospholipides/glycolipides mesurée dans les échantillons de microalgue est variable entre différentes cultures (**Table 16**). Les glycolipides représentent entre 37 et 65 %w de la fraction des lipides polaires, et les phospholipides entre 63 % et 35 %w de cette même fraction. En conséquence, une proportion de PC90G/MTNL 50/50 %w a été choisie pour représenter la fraction des lipides polaires de microalgues dans la solution synthétique (émulsion).

III.3.2. Caractéristiques de l'émulsion et formulation

pH et conductivité de l'émulsion

Le pH et la conductivité de l'émulsion, ont été fixés grâce à la mesure de ces paramètres pour les échantillons des broyats et des surnageants. Dans l'émulsion ces caractéristiques seront données par l'eau utilisée lors de la préparation. Pour cela une solution tampon avec un pH de 7,4 et une conductivité de 790 $\mu\text{S}/\text{cm}$ seront utilisées.

Formulation de l'émulsion

Pour la formulation de la solution synthétique, une émulsion contenant une proportion de 30 %w de lipides polaires et 70 %w des lipides neutres a été sélectionnée pour la composition de la phase lipidique. Cette proportion représente la moyenne des compositions retrouvées dans les échantillons de la microalgue *Parachlorella kessleri* comme cela a été montré dans le **Table 16**. Comme défini précédemment, cette phase lipidique sera composé de lipides neutres apportés par un mélange d'huiles d'avocat/cameline 30/70 %w et par un mélange des produits tensioactifs PC90G/MTNL 50/50 %w.

Granulométrie de l'émulsion

Une taille moyenne de gouttelettes des lipides de 3 μm a été choisie sur la base i) des résultats de granulométrie obtenus pour des échantillons de broyats et des surnageants de ces broyats de *Parachlorella kessleri* (§III.2.3.2). Cette taille permet de suivre l'évolution des gouttelettes de lipides pendant la filtration par microscopie et de voir si les gouttelettes coalescent ou si au contraire leurs tailles se réduisent.

Le **Tableau 20** résume les caractéristiques souhaitées de l'émulsion qui constituera la solution synthétique représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues.

Tableau 20. Caractéristiques souhaitées de l'émulsion

Caractéristique	Consigne
Taille moyenne des goutt. des lipides (μm)	3
Proportion d'huile (% w)	2
Composition Phase huile	Lipides neutres/polaires 70/30 % w/w
Composition lipides neutres	Mélange d'huiles av/cam 30/70 % w/w
Composition Lipides polaires (Surfactants)	Mélange PC90G/MTNL 50/50 % w/w
pH	7,4
Conductivité ($\sigma_{20^\circ\text{C}}$) ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	790

III.3.3. Conclusions sur la caractérisation des broyats de microalgues et la définition d'une solution synthétique représentative

Dans cette partie expérimentale des échantillons de différentes cultures de la microalgue *Parachlorella kessleri* cultivée en carence d'azote, des broyats et des surnageants ont été caractérisés. La fraction lipidique était constituée de lipides neutres (jusqu'à 90 %w) et de lipides polaires. Les acides gras majoritaires ont été les acides oléique (C18:1n-9c), linoléique (C18:2n-6c), linolénique (C18:3n-3) et palmitique (C16:0). La phosphatidylcholine (PC) a été identifiée comme le phospholipide majoritaire. Parmi les glycolipides le sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) a été le principal constituant. Cette caractérisation a permis d'établir la formulation d'une solution synthétique représentative d'un surnageant de broyat qui sera formé d'une fraction

lipidique dispersée dans l'eau, c'est-à-dire d'une émulsion H/E. La phase lipidique de cette émulsion est composée par 70 w% de lipides neutres et 30 %w de lipides polaires. Les lipides neutres sont apportés par un mélange d'huiles d'avocat/cameline 30/70 %w et les lipides polaires par un mélange de produits émulsifiants industriels comprenant i) des phospholipides, ii) des alcools gras et des glycolipides PC90G/MTNL 50/50 %w. Cette étude a aussi permis de démontrer que le procédé de broyage a non seulement un impact sur l'organisation des lipides dans le broyat mais aussi sur la nature des composés.

Chapitre IV. Résultats et Discussions sur la caractérisation des Interfaces

IV.1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de caractériser l'interface huile/eau d'une émulsion représentative d'un surnageant d'un broyat de microalgues, dont l'obtention a été présentée dans le **Chapitre III**. Il s'agit de déterminer la structure de l'interface huile/eau (quels sont les composés présents à l'interface et comment sont-ils organisés ?) et l'impact que cela peut avoir sur ses propriétés, par exemple sur la tension interfaciale. La stabilité de l'émulsion, la coalescence ou la division des gouttelettes de lipides, mais aussi leur agrégation ou leur accumulation sur la membrane lors de la filtration dépendent directement des propriétés de l'interface huile/eau.

Un des paramètres qui caractérise l'interface est la tension interfaciale. Elle peut être mesurée par la méthode de la goutte pendante. Cette donnée intervient par exemple dans le calcul de la pression capillaire, pression qu'il faut appliquer pour qu'une phase huile pénètre dans un capillaire, assimilable aux pores d'une membrane.

Au cours de la filtration, une goutte peut être déformée, soit par le cisaillement dans la veine liquide, soit aux abords de la membrane, soit dans un pore de la membrane. Au cours de cette déformation, le film interfacial est étiré ou comprimé, ce qui peut modifier la structure même du film. La coalescence de gouttelettes, en diminuant l'aire interfaciale, peut aussi modifier la structure de l'interface (compression du film). La structure du film dans différentes conditions peut être caractérisée via une interface air/eau en utilisant une balance de Langmuir. L'interface air/eau est un modèle d'interface entre une phase hydrophobe (l'air ou l'huile) et une phase hydrophile (l'eau). Ce type d'expériences est couramment utilisé pour étudier les interfaces lipidiques (*cf.* §I.3.1.4). Les isothermes de compression permettent d'étudier l'organisation probable des différents composants à l'interface. Elles peuvent être couplées à des observations des films des tensioactifs par microscopie AFM, permettant de déterminer la structure des films.

Deux produits tensioactifs ont été utilisés pour cette étude. Ce sont des lipides polaires choisis sur la base du profil lipidique établi pour un broyat de microalgues. Un des produits est constitué des composés de la famille des phosphatidylcholines (nommée PC90G) ; l'autre est un mélange d'alcools gras et d'alkyl glucosides ou APG (nommé MTNL).

Une première partie de la caractérisation concerne l'étude de l'interface huile/eau en statique (avec la mesure de la tension interfaciale à l'équilibre) et en dynamique (avec le suivi de la tension interfaciale dans le temps) par la méthode de la goutte pendante. Ces résultats permettront de mieux comprendre l'état de l'interface avant et pendant l'équilibre. Il sera également possible

d'observer une éventuelle compétition entre les tensioactifs pour l'adsorption à l'interface. Une deuxième partie de la caractérisation consiste en l'étude de l'interface air/eau par la détermination des isothermes de compression des monocouches des tensioactifs seuls et en mélange avec la balance de Langmuir.

IV.2. Analyse de l'interface huile/eau par la méthode de la Goutte Pendante

Les paragraphes suivants présentent les résultats de la caractérisation de l'interface huile/eau à l'équilibre et les cinétiques d'adsorption des produits tensioactifs à cette interface par la mesure de la tension interfaciale par la méthode de la goutte pendante. Des gouttes de phase aqueuse ont été formées à l'intérieur d'une cuve contenant la phase lipidique constituée d'huiles végétales purifiées mélangées aux tensioactifs à différentes concentrations (*cf.* §II.3.1). L'adsorption des tensioactifs est contrôlée par les phénomènes de diffusion et d'adsorption/désorption des molécules, phénomènes qui dépendent de la nature des espèces tensioactives et des phases impliquées. Les cinétiques d'adsorption des produits seuls (la PC90G, et le MTNL) et de leur mélange (50:50 % w/w PC90G/MTNL) à l'interface huile/eau ont été déterminées.

IV.2.1. Influence de la pureté des huiles végétales

Le mélange d'huiles végétales utilisé pour l'étude des interfaces L-L a été traité avec un adsorbant, selon le protocole décrit en §II.3.1.2, afin d'enlever les contaminants susceptibles de s'adsorber à l'interface huile/eau. Le résultat de la tension interfaciale post purification est présenté dans la **Figure 43** (courbe a). Cette courbe montre la présence de composés amphiphiles résiduels après le traitement, mais avec un effet faible sur la tension interfaciale comparé à celui de la PC90G. En effet, la valeur observée de γ à l'équilibre pour ces huiles est de $21,9 \text{ mN.m}^{-1}$ à $t_{eq}=5,5 \text{ h}$. La valeur correspondante à $t=0,5 \text{ h}$ (1800 s) est de $28,1 \text{ mN.m}^{-1}$, ce qui est comparable aux valeurs reportées pour d'autres huiles purifiées au même temps d'adsorption, qui sont comprises entre 25 mN.m^{-1} (Bahtz et al., 2009) et 31 mN.m^{-1} . (Gaonkar, 1989).

Malgré la présence de contaminants résiduels dans le mélange d'huiles purifiées, la tension interfaciale obtenue à l'équilibre est très supérieure aux valeurs obtenues en présence des

surfactants étudiés (PC90G et MTNL) à toutes les concentrations testées (voir §IV.2.2, §IV.2.3). Pour cette raison, le mélange purifié est considéré comme étant adapté aux objectifs de la caractérisation de l'interface huile/eau.

IV.2.2. Etude du comportement de la phosphatidylcholine PC-90G à l'interface huile/eau

Tension interfaciale à l'équilibre de la PC90G

Le **Tableau 21** présente les tensions interfaciales à l'équilibre (γ_{eq}) obtenues à différentes concentrations de PC90G, ainsi que le temps mis pour atteindre cette valeur dès la formation de la goutte. Afin de pouvoir déterminer les tensions interfaciales à l'équilibre aux deux concentrations les plus importantes (0,5 et 0,1 % w/w), les volumes des gouttes ont été réduits pour qu'elles ne tombent pas avant d'atteindre la valeur de γ à l'équilibre. Ces résultats montrent qu'au-delà de 0,1 % w/w de PC90G l'interface est saturée en tensioactif et donc qu'une concentration plus importante n'aura plus d'effet sur l'abaissement de la tension interfaciale. Dans l'émulsion formulée au chapitre précédent, la concentration de la PC90G est de 15 %w/w par rapport à la phase huile. Bien qu'elle soit introduite dans la phase aqueuse lors de la formulation elle semble être en large excès et pourra éventuellement saturer l'interface huile/eau, en fonction de la compétition existant avec le MTNL. Une fraction pourra également rester sous forme dispersée ou d'agrégats dans la phase aqueuse.

Tableau 21. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations de PC90G

C PC90G (% w/w dans l'huile)	γ_{eq} (mN.m ⁻¹)	Ecart type	Incertitude (mN.m ⁻¹) k=2	Vol (μ L)	t _{eq} (s)	No. mesures
0,5	1,04	0,01	0,12	1,5	20	3
0,1	1,03	0,02	0,12	1,5	600	3
0,01	1,90	0,07	0,24	5,0	21000	2
0,001	3,31	-	0,38	5,0	78000	1
0,0001	7,42	-	0,86	5,0	50000	1
0	21,93	-	2,67	5,0	20000	1

k=facteur d'élargissement utilisé pour le calcul de l'incertitude. Vol= volume de la goutte. t_{eq}=temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

Aux plus faibles concentrations il n'y a pas de tendance nette dans le temps que les systèmes prennent pour atteindre l'équilibre. Ceci pourrait être dû aux impuretés de l'huile qui auraient un

effet plus important dans la diminution de la tension interfaciale lorsque le tensioactif se trouve à une faible concentration.

Dynamique d'adsorption de la PC90G

L'effet de la concentration de la PC90G sur la tension interfaciale dynamique du système huile/eau est présenté sur la **Figure 43**. La diminution de la tension interfaciale avec le temps met en évidence l'effet de l'adsorption des molécules de la PC90G à l'interface huile/eau.

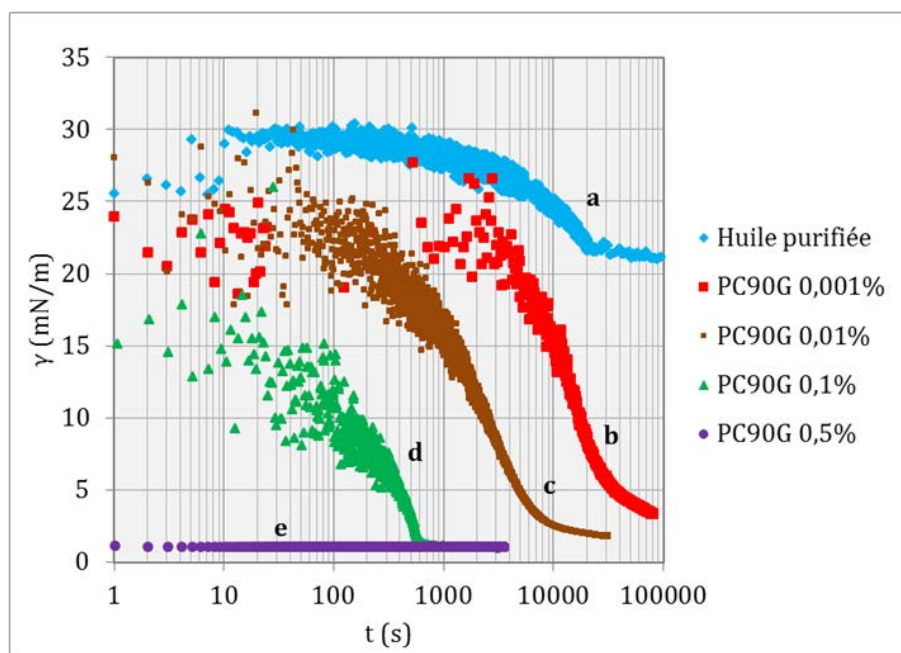


Figure 43. Cinétiques d'adsorption de la PC90G à différentes concentrations dans un système eau-huile et 20°C

La cinétique d'adsorption de la PC90G est d'autant plus rapide que la concentration en PC90G est élevée. La diffusion dans la phase liquide semblerait donc l'étape limitante..

A 0,1% w/w, la tension interfaciale diminue rapidement dans les premières minutes et atteint la valeur à l'équilibre au bout de 600 secondes (10 min) à la différence des concentrations plus faibles pour lesquelles le temps d'obtention de l'équilibre dépasse 6h. Ces longs intervalles sont comparables aux temps trouvés par (Y. A. Shchipunov et Kolpakov, 1991), pour l'adsorption de phosphatidylcholine, à des concentrations inférieures à 0,002mM à l'interface n-décane/eau et n-heptane/eau, soit 12 à 15h pour atteindre l'équilibre. A 0,5% w/w, l'interface est saturée très tôt.

IV.2.3. Etude du comportement du MTNL à l'interface huile/eau

Tension interfaciale à l'équilibre du MTNL

Le **Tableau 22** présente les tensions interfaciales à l'équilibre (γ_{eq}) obtenues pour les différentes concentrations de MTNL testées. Le temps mis pour atteindre cette valeur dès la formation de la goutte est également présenté. Dans ce cas la saturation de l'interface est attendue aux environs de 0,5% w/w de MTNL. Les valeurs obtenues de γ_{eq} pour ce système sont cohérentes avec celles reportées dans la littérature pour des systèmes similaires : Iglauer et al., 2009, ont étudié des produits commerciaux contenant des APGs (chaines de 8 à 16 carbones) mélangés avec des alcools (de 3-22 carbones) à l'interface n-octane/eau. Pour une concentration totale en surfactant variant de 0,5 à 2 % w/w, ils ont observé des valeurs de γ_{eq} comprises entre 0,01 - 1 mN.m⁻¹. Comme dans le cas de la PC90G, le MTNL, introduit dans la phase huile à 15%w/w est en large excès dans l'émulsion.

Tableau 22. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations de MTNL

C_{MTNL} (% w/w dans l'huile)	γ_{eq} (mN.m⁻¹)	Ecart Type	Incertitude (mN.m⁻¹) k=2	Vol (μL)	t_{eq} (s)	No. mesures
0,5	1,12	0,06	0,15	1,5	1000	2
0,1	3,75	-	0,43	5,0	60000	1
0,01	4,06	-	0,47	5,0	50000	1
0,001	13,42	-	1,55	5,0	200000	1
0,0001	18,74	-	2,16	10,0	40000	1

k=facteur d'élargissement utilisé pour le calcul de l'incertitude. Vol= volume de la goutte. t_{eq}=temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

Comme dans le cas de la PC90G, à de faibles concentrations de surfactant le temps pour atteindre l'équilibre ne suit pas la tendance observée pour le reste des concentrations. Il est possible de supposer qu'à de faibles concentrations de surfactant les impuretés de l'huile dominant l'adsorption à l'interface.

Dynamique d'adsorption du MTNL

Le produit MTNL est un mélange de molécules d'alcools gras et d'alkylpolyglucosides (APG) qui s'adsorbent à l'interface et diminuent la tension interfaciale comme le montre la **Figure 44**. Comme pour la PC90G, les cinétiques d'adsorption de ce mélange de tensioactifs montrent une diminution très rapide de la tension interfaciale à 0,5% w/w du MTNL dans la phase lipidique,

mais ici l'équilibre n'est pas très rapide, il est atteint vers 1000 secondes (17 min) environ. A 0,1% w/w, l'adsorption est plus lente qu'à 0,5% w/w et n'atteint l'équilibre qu'après 16h (**Tableau 22**). Il n'est pas possible à partir de ces résultats de dire laquelle des deux familles de molécules présentes dans le MTNL, alcools gras ou APGs, s'adsorbe en premier car pour cela il faudrait déterminer les cinétiques des composés seuls.

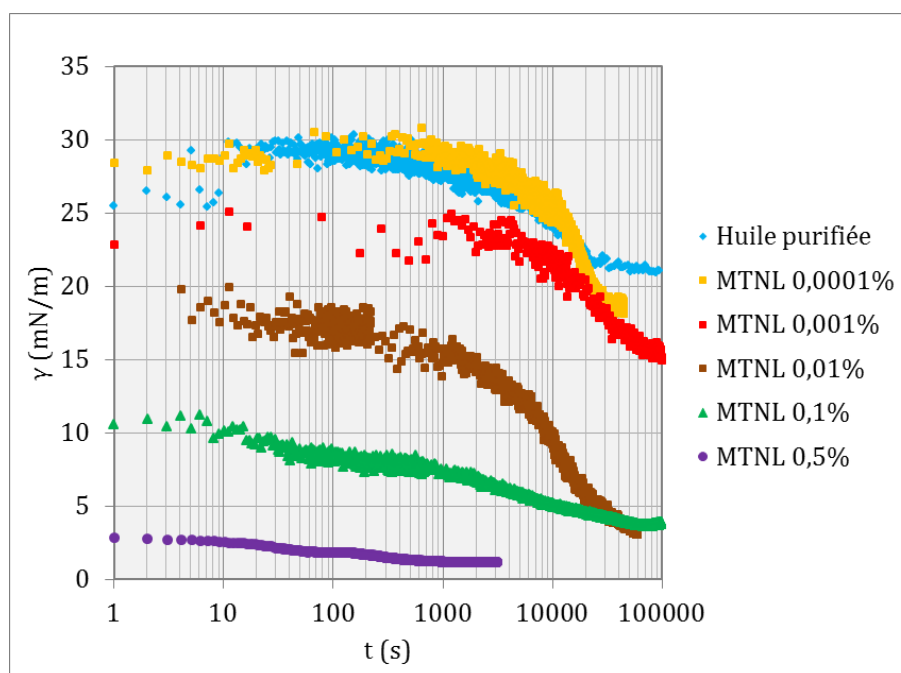


Figure 44. Cinétiques d'adsorption du MTNL à différentes concentrations et 20°C

Les courbes obtenues à des concentrations de 0,1 et 0,01% w/w affichent des cinétiques très différentes sur les premières 8h, mais la différence entre les valeurs à l'équilibre n'est pas significative compte tenu des incertitudes (**Tableau 22**). Les cinétiques d'adsorption très longues du MTNL pourraient être dues à la formation de structures lamellaires (cristaux liquides) autour de l'interface huile/eau qui prendraient plus de temps pour arriver à un état d'équilibre. La formation de ces structures typiques des APGs pourrait retarder la stabilisation de la tension interfaciale. Les effets d'un produit similaire au MTNL sur les propriétés d'une émulsion H/E, ont été étudiés par Baudonnet, Grossiord, et Rodriguez, 2004. Ils ont utilisé du Montanov 68, un émulsifiant qui contient des chaînes carbonées plus courtes (16 et 18 carbones) et ont observé, au microscope, la présence de stries à l'interface et les ont associées à la présence des cristaux liquides des APGs.

IV.2.4. Etude du comportement des mélanges PC90G et MTNL à l'interface huile/eau

Tension interfaciale à l'équilibre des mélanges PC90G et MTNL

Le **Tableau 23** présente les tensions interfaciales à l'équilibre (γ_{eq}) du mélange 50/50 % w/w PC90G/MTNL à différentes concentrations totales. Des valeurs équivalentes de la tension interfaciale à l'équilibre ont été obtenues pour 0,5 et 0,1% w/w de surfactant dans l'huile ce qui indique que l'interface se sature à partir de 0,1 % w/w de surfactant. Ce comportement est similaire à celui observé pour la PC90G. Les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre se rapprochent aussi plus de ceux de la PC90G que de ceux du MTNL aux mêmes concentrations.

Tableau 23. Tension interfaciale à l'équilibre à 20°C, à différentes concentrations des mélanges PC90G/MTNL (50/50 % w/w)

C PC90G +MTNL (% w/w dans l'huile)	γ_{eq} (mN/m)	Ecart type	Incertitude (mN/m) k=2	Vol (μ L)	t_{eq} (s)	No. mesures
0,5	1,06	0,01	0,12	1,0	20	3
0,1	1,05	0,06	0,15	1,5	1000	2
0,01	2,06	-	0,24	5,0	30000	1
0,001	9,77	-	1,13	5,0	50000	1
0,0001	14,27	-	1,65	10,0	50000	1

k=facteur d'élargissement utilisé pour le calcul de l'incertitude. Vol= volume de la goutte.
teq=temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

Comparaison des Isothermes d'adsorption γ -C des surfactants seuls et en mélange

Les isothermes d'adsorption des systèmes étudiés, (**Figure 45**) obtenues avec les tensions interfaciales à l'équilibre trouvées à chaque concentration, désignent la capacité de chaque surfactant et du mélange à abaisser la tension interfaciale du système huile/eau. Ces courbes montrent qu'à partir d'une concentration comprise entre 10^{-1} et $5 \cdot 10^{-1}$ %w dans la phase lipidique l'ajout de tensioactif au système n'a plus d'effet sur l'abaissement de la tension interfaciale.

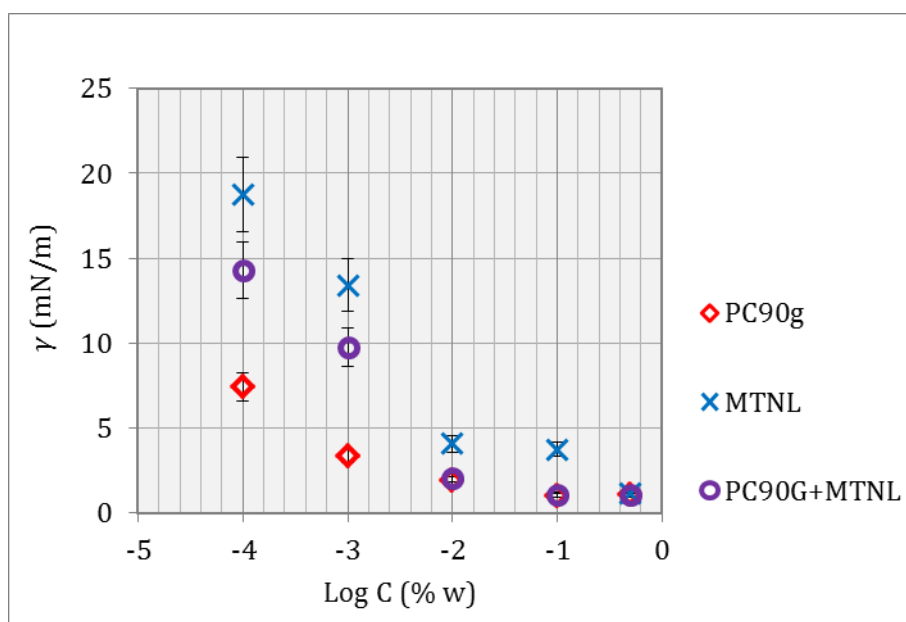


Figure 45. Variation de la tension interfaciale en fonction de la concentration de PC90G, de MTNL et de leur mélange 50/50 % w/w à 20°C

Ces isothermes indiquent que la PC90G est plus efficace que le MTNL pour diminuer la tension interfaciale aux concentrations considérées. Par contre la tension interfaciale est proche de 1 mN.m⁻¹ dans les trois cas lorsque les produits se trouvent à une concentration de 0,5 % w/w. Le mélange a des tensions interfaciales à l'équilibre plus proches de celles du MTNL aux faibles concentrations mais lorsque la concentration augmente, les valeurs sont équivalentes à celles de la PC90G. Aucune synergie entre les surfactants n'a été observée puisque la tension interfaciale du mélange n'est pas inférieure à la tension d'interface à l'équilibre (γ_{eq}) des deux surfactants seuls. Par contre, des interactions pourraient exister entre les molécules.

Dynamique d'adsorption des mélanges des surfactants

Comme il a été mentionné auparavant, les surfactants utilisés pour cette étude ne sont pas des produits purs mais des mélanges de composés. Lorsqu'ils sont dans l'eau, la phosphatidylcholine (PC) comme les alkylpoliglucosides (APG) peuvent former des vésicules avec des interfaces portant des structures multilamellaires (Mura et al., 2007). Si ces produits sont mélangés, comme dans l'émulsion formulée dans ce travail, des structures mixtes pourraient se former dans l'eau comme à l'interface, ce qui pourrait avoir un effet sur la dynamique d'adsorption et sur la structure de l'interface.

La **Figure 46** présente la comparaison entre les cinétiques d'adsorption des surfactants seuls et du mélange 50/50 % w/w PC90G/MTNL à différentes concentrations totales testées. Dans tous les cas l'équilibre pour le PC90G et le mélange est atteint avant celui pour le MTNL. Aux concentrations plus importantes, 0,5 et 0,1% w/w, le mélange présente un comportement plus

proche de celui de la PC90G que de celui du MTNL et atteint des valeurs de tension interfaciale γ à l'équilibre équivalentes à celles de la PC90G ($\approx 1 \text{ mN.m}^{-1}$). A 0,5% w/w, la PC90G a une vitesse d'adsorption quasi instantanée; le mélange prend seulement 20 secondes pour atteindre la stabilité, soit bien moins de temps que le MTNL qui prend 15 min. À des concentrations plus faibles (**Figure 46 c, d**), les courbes des mélanges se trouvent entre celles des deux surfactants seuls, ce qui évoque des interactions entre les molécules du produit mais ne faisant pas forcément diminuer davantage la tension interfaciale. A 0,01 %w, le MTNL semble dominer la dynamique d'adsorption à temps court mais à des temps plus longs la PC90G s'impose. Il est probable qu'une fois la PC90G adsorbée à l'interface, ses molécules y restent de manière irréversible tandis que le MTNL continuerait à faire des échanges dynamiques entre les phases liquides et l'interface. En conséquence, au terme d'un certain temps l'interface s'enrichirait en PC90G et le MTNL ne pourrait plus continuer à s'adsorber.

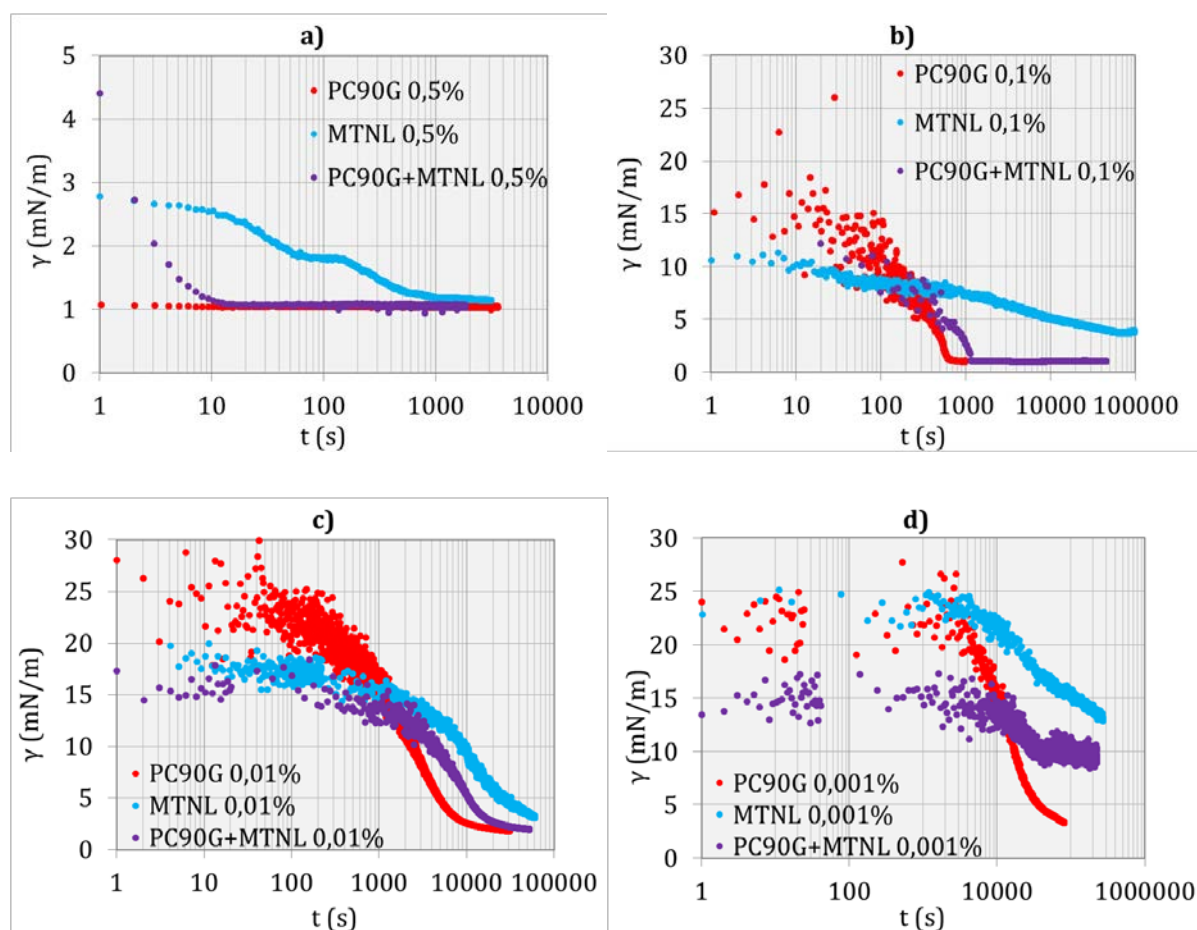


Figure 46. Comparaison des dynamiques d'adsorption des mélanges de PC90G+MTNL avec les produits seuls

En résumé, 0,5 %w de surfactant dans l'huile, l'interface huile/eau est saturée par les deux produits testés (PC90G et MTNL). Dans l'émulsion les deux produits PC90G et MTNL sont en large excès. Dans les deux cas, la diffusion des tensioactifs dans la phase liquide semble l'étape limitante pour la formation du film à l'interface. L'équilibre d'adsorption de la PC90G est atteint en environ 20 s à 0,5%w et 10 min à 0,1%w alors qu'il est atteint en 17 min à 0,5 %w et 17h à 0,1 %w pour le MTNL. La cinétique d'adsorption lente du MTNL peut être due à des structures lamellaires se formant près de l'interface huile/eau, déjà mise en évidence pour les alkylpolyglucosides dans la littérature. Aux concentrations les plus élevées de l'étude (0,1 et 0,5 %w), le mélange présente un comportement proche de la PC90G. En revanche, aux faibles concentrations le MTNL domine la dynamique d'adsorption à des temps courts puis la PC prend le dessus. Une compétition a été mise en évidence entre les deux produits, mais pas de synergie.

IV.3. Analyse de l'interface air/eau par balance de Langmuir

Les paragraphes suivants présentent les résultats de l'analyse des films de surfactants à l'interface air/eau. L'objectif de ces analyses est de comprendre comment les tensioactifs utilisés peuvent s'organiser à l'interface des gouttelettes. Est ce que les différents types de composés sont présents à l'interface ou est ce que l'un est éjecté en phase aqueuse ? Sont-ils répartis de façon homogène sur l'ensemble du film ou forment-ils des domaines constitués majoritairement de l'un ou de l'autre comme cela a été observé pour les globules gras du lait ou des vésicules de lipides (Lopez, 2011; Lopez et al., 2011)? Quelle surface est occupée par molécule ? De cette structure peut dépendre la fragilité des gouttelettes de lipides présentes dans l'émulsion.

La phase air comme la phase huile est apolaire et permet la mobilité des chaînes carbonées, il serait possible d'espérer que les lipides se comportent de façon similaire sur les deux interfaces air/eau et huile/eau même si la compression air/eau serait plus élevée que l'huile/eau.

Cependant le modèle air/eau utilisé pour comprendre la structure du film huile/eau présente des limites. Les phases en contact (air et eau) ne contiennent pas de surfactant en excès comme c'est le cas dans l'émulsion. Les tensioactifs ne peuvent pas se désorber dans la phase air hydrophobe.

Les expériences réalisées en balance de Langmuir avec la PC90G et le MTNL sont résumées dans le **Tableau 24**. En outre, une isotherme a été obtenue pour la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) pur, afin de la comparer avec le produit utilisé (PC90G).

Tableau 24. Expériences réalisées en balance de Langmuir

PC 90G % molaire	MTN L % molaire	μg déposés	Prélèvement x AFM Π (mN.m ⁻¹)
0	100	15	25
13	87	15	25
31	69	15	25
58	42	15	-
80	20	15	-
100	0	15	25, 15, 10

IV.3.1. Etude du comportement de la PC-90G à l'interface air/eau

La **Figure 47a** montre à gauche l'isotherme de compression obtenue expérimentalement pour la DPPC (produit pur) et à droite la comparaison avec l'isotherme de compression de la PC90G. Lors de l'expérience, la couche de tensioactif disposée à l'interface air/eau est comprimée. Au cours de cette compression, les molécules s'organisent (voir **Figure 11**). Les différentes phases formées pendant la compression sont les phases gaz (G), liquide expansé (LE), liquide condensé (LC). Elles sont identifiées à l'aide des changements de pente observés dans la courbe. Lorsque les tensioactifs s'organisent, la tension interfaciale entre l'air et l'eau diminue et la pression interfaciale Π augmente (**Equation 20**). Les valeurs des pressions de transition de phase Π_t entre le liquide expansé et le liquide condensé et de collapse Π_c ont été relevées sur les courbes : $\Pi_{t\text{DPPC}} \approx 5 \text{ mN.m}^{-1}$, $\Pi_{c\text{DPPC}} \approx 42 \text{ mN.m}^{-1}$ et $\Pi_{t\text{PC90G}} \approx 6 \text{ mN.m}^{-1}$, $\Pi_{c\text{PC90G}} \approx 40 \text{ mN.m}^{-1}$. L'aire occupée par molécule de DPPC au début de la phase de LC est d'environ $50 \text{ \AA}^2$ (détails de l'estimation en §IV.3.3.3) ce qui est proche de $44 \text{ \AA}^2$ reportée dans la littérature (Wagner et Brezesinski, 2007).

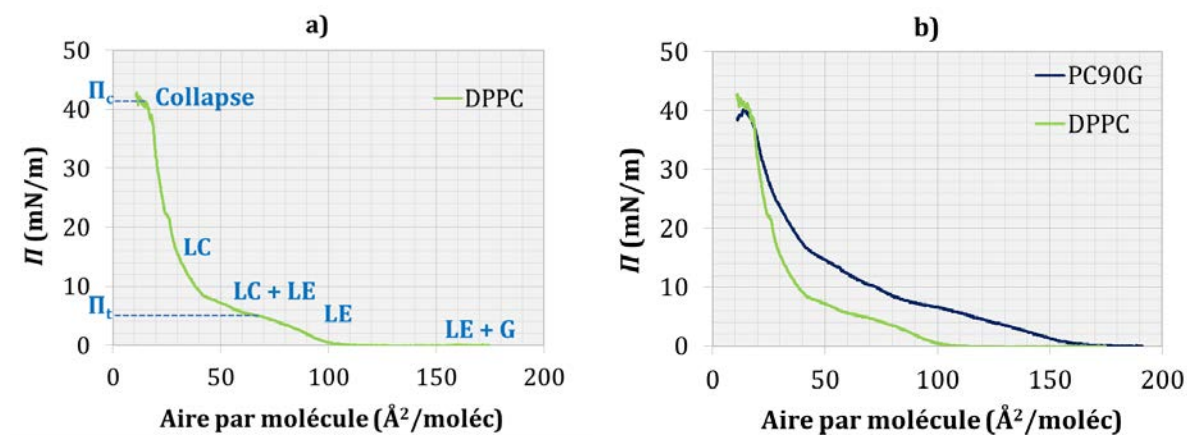


Figure 47. Isothermes de compression du film de DPPC à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée de pH=7.4. a) DPPC pur. b) Comparaison de DPPC face à PC90G. Phases : G : gaz, LE = liquide expansé, LC : liquide condensé, S : solide

L'augmentation de Π se fait lentement au début de la compression (observation des courbes de droite à gauche), ce qui est un indice que les molécules sont en phase gaz puis en phase liquide expansé (LE). Le point d'inflexion initial qui signale le début de la phase LE a lieu beaucoup plus tôt pour la PC90G (160 Å²/molécule) que pour la DPPC (110 Å²/molécule). Ceci pourrait être dû à la présence des acides gras avec de chaînes carbonées contenant des insaturations qui contraindraient l'arrangement des molécules dans le film, faisant augmenter l'aire moyenne occupée par molécule. Dans le film de DPPC les molécules seraient plus verticales à la surface en raison de la saturation des chaînes carbonées, comparé au film de PC90G (Figure 17b). Un état similaire de compaction est atteint à partir de 30 mN.m⁻¹.

Les monocouches de phosphatidylcholine ont été largement étudiées dans la littérature et des courbes comparables à celles de la **Figure 47** ont été présentées. Lawrie et al., 2000, ont caractérisé le film formé par la DPPC à 27°C sur une sous-phase d'eau ultra pure. Ces auteurs ont observé une zone plus étalée (un plateau) de coexistence des phases liquide expansé (LE) et liquide condensé (LC) que celle obtenue sur les courbes de la **Figure 47**, où aucun plateau n'a été observé mais plutôt un changement de courbure à partir de Π_c , avec possiblement une zone de coexistence des deux phases LE et LC. Cette différence pourrait être due aux vitesses de fermeture des barrières utilisées pour les expériences : des faibles vitesses permettent une observation plus claire des zones de coexistence des phases. Dans le cas de cette étude, une vitesse de 10 mm.min⁻¹ a été employée. Ces auteurs ont aussi fait des observations des monocouches au microscope à angle de Brewster et ils ont constaté l'apparition de domaines de phase condensée dans la zone de transition LE-LC, domaines qui se rapprochaient avec l'élévation de la pression jusqu'à la formation d'un film homogène de liquide condensé.

Le produit PC90G, qui à la différence de la DPPC n'est pas un produit pur mais au contraire un mélange de molécules de la famille des phosphatidylcholines (96,7% w/w) contenant divers acides gras (majoritairement C16 :0, C18 :0, C18 :1, C18 :2 et C18 :3), ainsi que d'autres composés comme la lysophosphatidylcholine (1% w/w), le tocophérol (0,17% w/w) entre autres, pourrait former de films plus désordonnés que ceux de la DPPC.

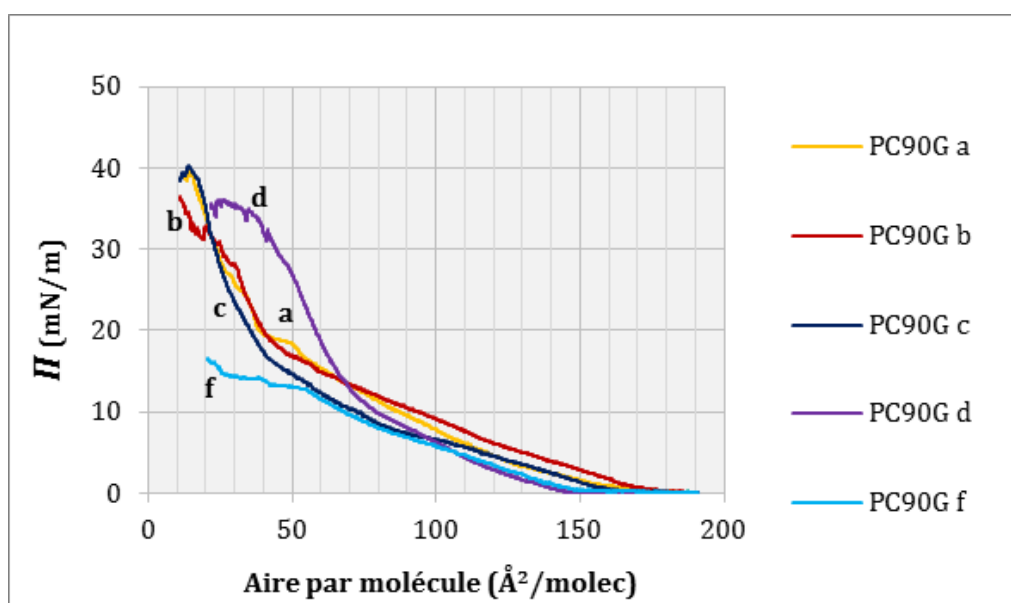


Figure 48. Isothermes de compression de films de PC90G à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4 pour 5 essais (a) à (f) effectués dans des conditions identiques

La reproductibilité des isothermes de la PC90G n'a pas été optimale. La **Figure 48**, témoigne de la complexité de la structure du film formé par ce produit : à partir de $\sim 15 \text{ mN.m}^{-1}$, certaines irrégularités apparaissent sur les courbes et suggèrent la formation de films plus hétérogènes avec des structures pas toujours stables pendant la compression : certaines courbes (**Figure 48**, courbe f) se stabilisent à une certaine pression comme s'il s'agissait d'une perte de produit de la monocouche. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce comportement : i) l'éjection d'un composé vers la phase aqueuse comme cela pourrait être le cas pour la lysophosphatidylcholine plus hydrophile ou bien ii) la formation de vésicules qui passeraient dans l'eau et entraîneraient l'élimination du produit de l'interface, comme proposé par Baoukina *et al.*, 2008 pour le mélange DPPC/POPG (voir **Figure 12**). Dans les deux cas, la perte des molécules de l'interface laisserait plus de surface disponible pour les molécules qui y restent et qui pourraient continuer à s'organiser sans pour autant faire augmenter la pression.

Analyse des films des tensioactifs en AFM

Des films interfaciaux de PC90G prélevés par la méthode de Langmuir Blodgett ont été observés par microscopie AFM. Vu l'irrégularité des isothermes de compression les prélèvements ont été faits à 3 pressions différentes pour vérifier des éventuels changements dans la structure. La **Figure 49** montre les images des films de PC90G prélevés à 10, 15 et 25 mN.m⁻¹. L'échelle de couleurs (en nanomètres) montrée à droite des images (**Figure 49 a, b, c**) représente la variation de hauteur dans la direction z (**Figure 49 d**) des éventuelles structures retrouvées dans un plan perpendiculaire au film, par exemple, la couleur blanc correspondrait à une structure ayant une hauteur de 10 nm. Des différences de hauteur peuvent représenter i) la présence de deux phases différentes (Vié et al., 1998; Yuan et Johnston, 2002) ou ii) la présence de tricouches (bicouches sur une première monocouche) (Rinia et al., 1999). Yuan et Johnston, 2002 ont observé une différence de hauteur entre les phases LE et LC de 0,7 nm pour une monocouche de DPPC à 95 %w. Vié et al., 1998 ont aussi observé une différence de hauteur de 0,9 nm entre différentes phases d'une monocouche mixte de DPPC/DOPC. Dans le cas des bicouches la hauteur serait plus importante, de l'ordre de 6 nm, comme observé par Rinia et al., 1999 pour des bicouches de DPPC.

Pour la PC90G, les films interfaciaux à 10 et 15 mN.m⁻¹ se sont montrées très homogènes et correspondraient à une structure majoritairement fluide en phase de liquide expansé (**Figure 49 a, b**) ce qui serait en accord avec les isothermes de compression. A ces deux pressions, il a été aussi observé la présence de certaines structures (points jaunes clairs), peu nombreuses et très dispersées.

A 25 mN.m⁻¹ les domaines jaunes clairs deviennent plus nombreux (**Figure 49c**). La **Figure 49d** représente le profil d'un plan perpendiculaire au film interfacial. La hauteur d'une des structures en jaune clair, donnée par les chaînes hydrocarbonées, correspond au pic de 5,8 nm. Ceci pourrait indiquer la présence d'une tricouche de lipides probablement formée par des molécules ayant des chaînes carbonées longues et plutôt saturées, qui sous la pression quittent le film initial mais ne peuvent se disperser dans la phase aqueuse. Par exemple de molécules ayant des acides gras C16 et C18 qui représentent 16 % w des acides gras totaux de la PC90G. Le diamètre moyen des points jaunes clairs de l'image de la **Figure 49c**, déterminé à l'aide du logiciel Image J en supposant des structures circulaires, est de 30 ± 14 nm. Ces observations montrent qu'à une haute pression, la phase de liquide expansé (LE) est encore bien présente. Cela peut être expliqué par un manque de cohésion entre les molécules, peut être dû aux différentes chaînes carbonées présentes dans le produit. En présence de chaînes lipidiques de même nature, les molécules pourraient s'organiser et former plus facilement une phase liquide condensée (LC).

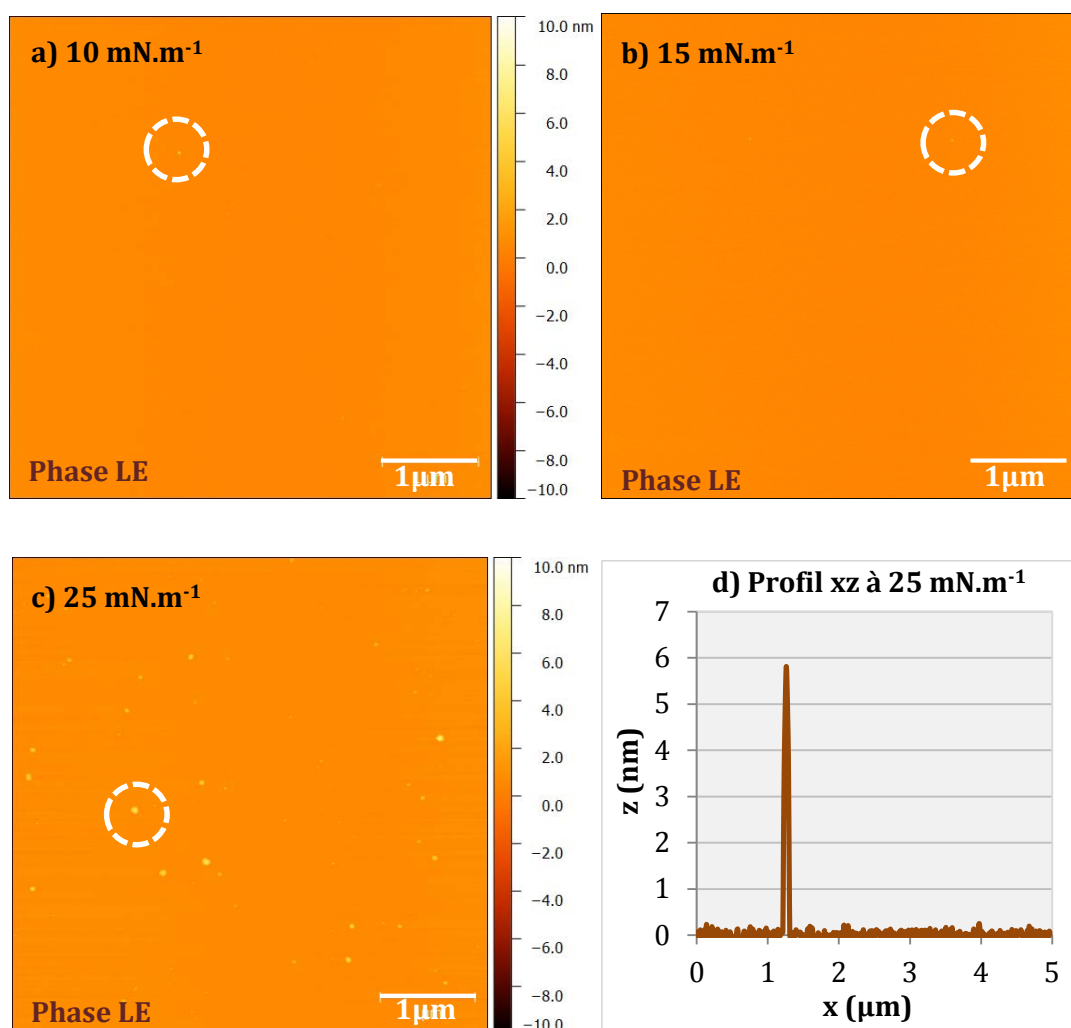


Figure 49. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux de la PC90G formés à l'interface air-eau à différentes pressions d'interface. Taille des images 5 μm x 5 μm. LE : phase de liquide expansé. LC : phase de liquide condensé. L'échelle de couleurs (en nanomètres) montrée à droite des images représente la hauteur dans la direction z des éventuelles structures retrouvées dans un plan perpendiculaire au film.

IV.3.2. Etude du comportement du MTN à l'interface air/eau

La **Figure 50** montre les isothermes de compression obtenues pour le MTNL à 20°C. Ces courbes ne présentent pas de zones indiquant une transition de phases. Ce sont des graphes typiques de monocouches où initialement les molécules se trouvent en phase LE et où, une fois que la pression commence à augmenter, la structure évolue progressivement vers la phase LC. Ensuite la pression augmente très rapidement indiquant que le film en état LC a une densité moléculaire importante

et devient très compact car un petit changement d'aire a beaucoup d'effet sur la pression interfaciale. La pression de collapse observée est $\Pi_{c\text{ MTNL}} = 40,24 \pm 0,81 \text{ mN.m}^{-1}$.

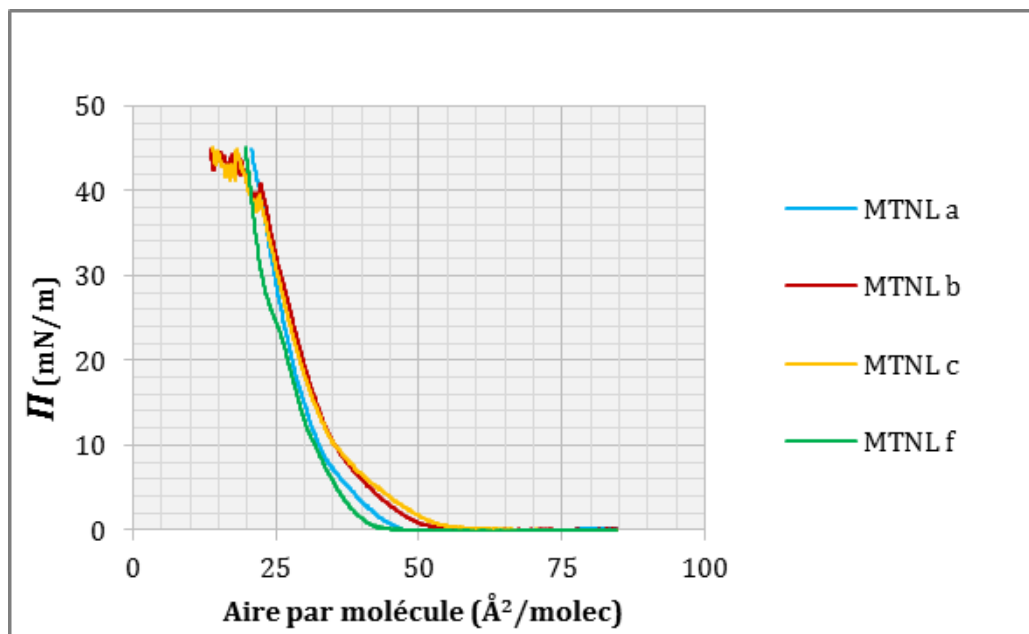


Figure 50. Isothermes de compression de films de MTNL à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4 pour 4 essais (a) à (f) effectués dans des conditions identiques

Comme la PC90G, le MTN est un mélange de produits. Il est composé d'alcools gras de chaînes de 14 à 22 carbones (80 % w/w) et d'alkylpolyglucosides (APG) de chaînes de 12 à 20 carbones (20 % w/w). Les alcools gras, en tant que co-surfactants et en raison de la petite taille de leur tête polaire, peuvent s'organiser en phase LE ou LC. Ils peuvent aussi s'intercaler entre deux molécules d'autres tensioactifs. Ainsi l'aire moyenne occupée par molécule peut être réduite. Les isothermes obtenues permettent d'avoir une valeur approximative de l'aire occupée par molécule au début de la phase condensée, qui est de $\approx 45 \text{ Å}^2$. Les valeurs reportées dans la littérature pour les APG vont de 47 à 70 Å^2 selon le nombre d'unités de glucose et la longueur de chaînes hydrocarbonées (Karsa, 1999).

Analyse des films des tensioactifs en AFM

Un film interfacial de MTNL prélevé à 25 mN.m^{-1} par la méthode de Langmuir Blodgett a été observé par microscopie AFM. La **Figure 51** montre les images correspondantes. Dans ce film, trois phases sont observées :

- i) Une première phase, représentée par des petits points jaune clair (comme ceux entourés par des cercles discontinus dans la **Figure 51**) dont la hauteur correspondraient aux pics de 1 à 2 nm observés dans la **Figure 51c**. Il est probable que cette phase soit du liquide condensé et qu'elle soit composée par les molécules ayant de chaînes longues et saturées du produit MTNL, qui se regrouperaient en domaines. Les APG sont la famille de composés minoritaire ($\approx 20\%$) dans le produit MTNL. Ce sont de molécules formés par des chaînes carbonées saturés de C12 à C22.
- ii) Une phase jaune majoritaire dans le film qui correspondrait au niveau représenté à $y=0$ nm dans la **Figure 51c**. Cette phase (probablement en liquide condensé) serait formée par un mélange d'alkylpolyglucosides (APG) et d'alcools gras du MTNL. Les alcools gras sont la famille de composés majoritaires dans le produit MTNL ($\approx 80\%$). Les APG ont une tête polaire plus grosse qui peut impliquer une hauteur plus importante. Les alcools peuvent se placer entre ces molécules et favoriser la formation d'un film plus organisé.
- iii) Une phase représentée par des domaines oranges de petite taille (**Figure 51a**) mais aussi des tailles importantes (**Figure 51b**), observé au niveau -2,5 nm de la **Figure 51c**. Cette phase serait en état de liquide expansé probablement composé par des alcools gras. La taille des petits domaines de la **Figure 51c**, a été aussi déterminée par analyse d'image. Le diamètre moyen est de 167 ± 41 nm.

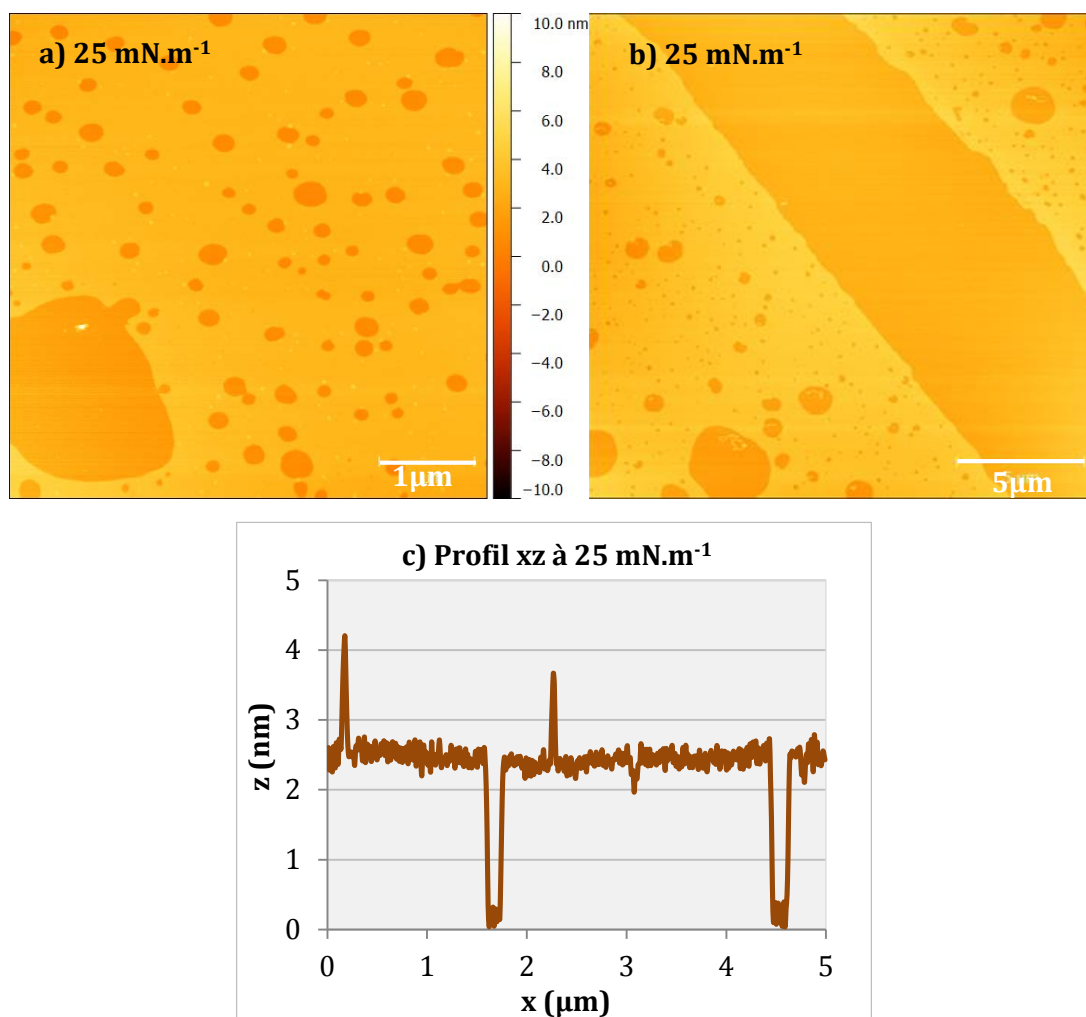


Figure 51. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux du MTNL formés à l'interface air-eau à 25 mN.m⁻¹. Taille de l'image a) 5 μm x 5 μm et b) 20 μm x 20 μm. LE : phase de liquide expansé. LC : phase de liquide condensé. L'échelle de couleurs (en nanomètres) montrée à droite des images représente la hauteur dans la direction z des éventuelles structures retrouvées dans un plan perpendiculaire au film.

Ces observations montrent donc qu'à 25 mN.m⁻¹ deux phases coexistent, l'une liquide expansé et l'autre liquide condensé contenant les différentes familles de composés présents dans le produit MTNL. Ces produits se regrouperaient par domaines plus riches en certaines familles (alcools gras ou alkylpolyglucosides). Malgré la coexistence des phases, la phase de liquide condensé (LC) serait majoritaire indiquant une plus grande cohésion entre les composés, comparé au film de la PC90G.

IV.3.3. Etude du comportement des mélanges PC90G et MTNL à l'interface air/eau

IV.3.3.1. Isothermes de compression des mélanges de PC90G et MTNL

La variation de la pression interfaciale avec l'aire par molécule pour des monocouches des mélanges PC90G / MTNL, à quatre proportions différentes et à une température de 20 °C, sont montrées dans la **Figure 52**. Les proportions analysées étaient de 13 %mol (25 %w), 31 %mol (50 %w) ; 58 %mol (75 %w) et 80 %mol (90 %w) de PC90G. Chaque analyse a été faite au moins 3 fois pour vérifier la répétabilité. Les expériences ont été reproductibles sauf pour le mélange qui contient la quantité la plus importante de PC90G, à 80 %mol, (**Figure 52d**) qui a présenté des écarts entre les courbes à partir de 20 mN.m⁻¹. Dans ce dernier cas, il est évident que ces irrégularités sont produites par la quantité importante de PC90G sur la monocouche comme cela a été aussi constaté dans les isothermes de compression de la PC90G seule (voir **Figure 47**). Les courbes a), b), c) sont semblables à celles obtenues pour le MTNL seul avec la différence que l'ajout progressif de PC90G a un effet de décalage des courbes vers la droite. Cela indiquerait que les molécules de la PC90G, feraient augmenter l'aire moléculaire moyenne du mélange, ce qui serait dû à leur taille plus importante comparée aux molécules du MTNL.

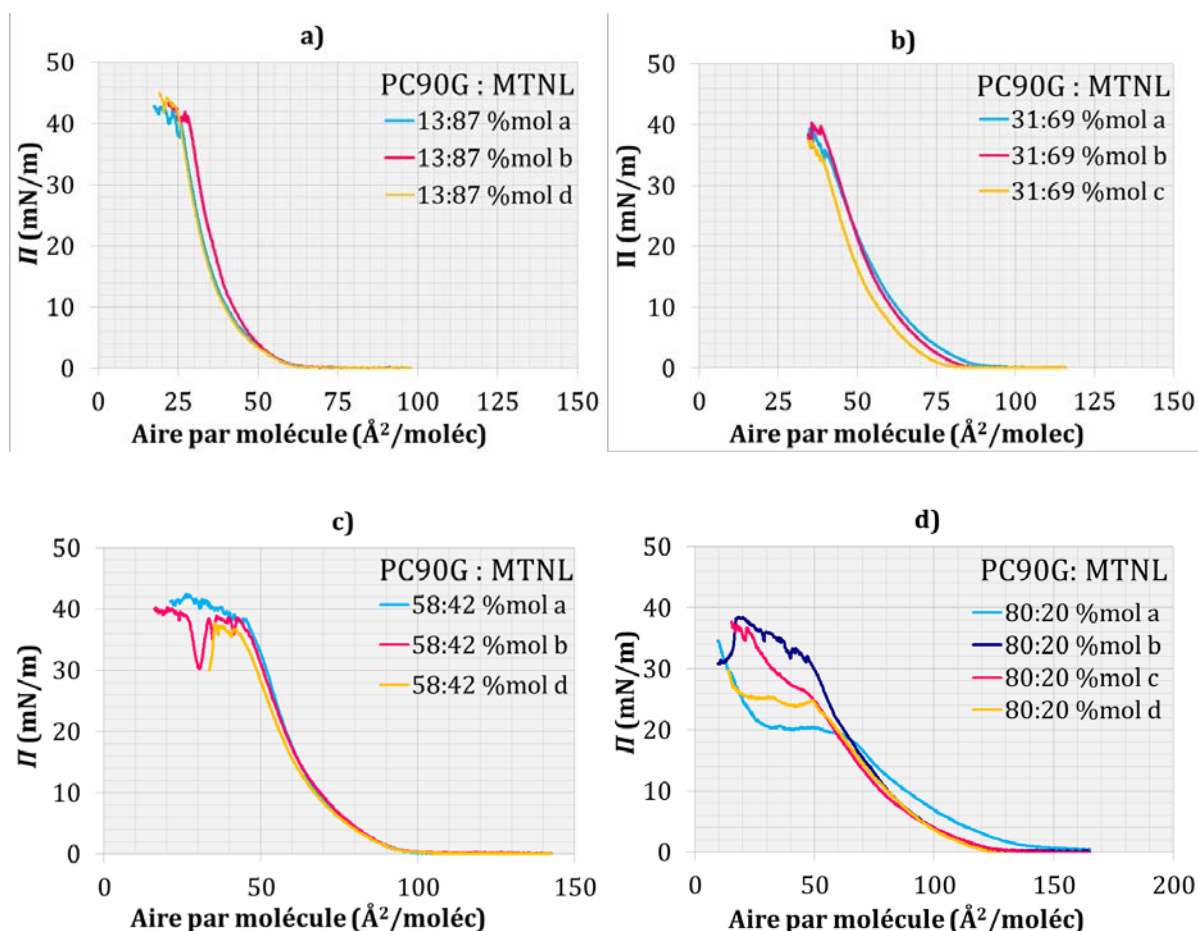


Figure 52. Isothermes de compression de films des mélanges PC90G+MTNL à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4

Analyse des films des tensioactifs en AFM

Le film interfacial obtenu pour le mélange PC90G/MTNL 50/50 %w (correspondant à 31:69 % mol) prélevé à 25 mN.m⁻¹ par la méthode de Langmuir Blodgett a été observé par microscopie AFM. La **Figure 53** montre les images résultantes de ces observations. Les phases observées sont les suivantes :

- i) Une phase en couleur orange très présente, qui serait en liquide expansé (LE), observé à $y \approx -2,5$ nm dans la **Figure 53c**.
- ii) Une phase jaune foncé correspondant à $y \approx 0$ nm dans la **Figure 53c** probablement en liquide condensé (LC).
- iii) Une phase jaune claire de liquide condensé (LC) formant des nanodomaines dispersés dans les deux autres phases et formant aussi des lignes placées à l'interface des phases majoritaires. Les hauteurs de pics observés sont entre 1,5 et 3,5nm dans la **Figure 53c**

Ces observations montrent que le film interfacial mixte a une structure complexe à la pression analysée. Elle est hétérogène et comprend 3 phases qui coexistent à 25 mN.m⁻¹. La phase de liquide

expansé (LE) est probablement formée par la PC90G, mélangée avec une fraction des alcools gras du MTNL ; les différentes phases condensées seraient composées par les alcools gras, la PC90G et les APG, seuls ou en mélanges selon les affinités. Les images montrent aussi que la phase la plus claire se met à la frontière entre les deux autres phases. Elle pourrait être composée par exemple par des impuretés de la PC90G qui se regrouperaient. L'identification précise de la nature des composés dans chacune des phases nécessiterait une analyse chimique, par exemple par spectrométrie Infra-Rouge ou Raman, mais cela n'a pas été envisagé dans ce travail. Un analyse de miscibilité qui confirme ce type d'interactions sera présenté postérieurement en §IV.3.3.4.

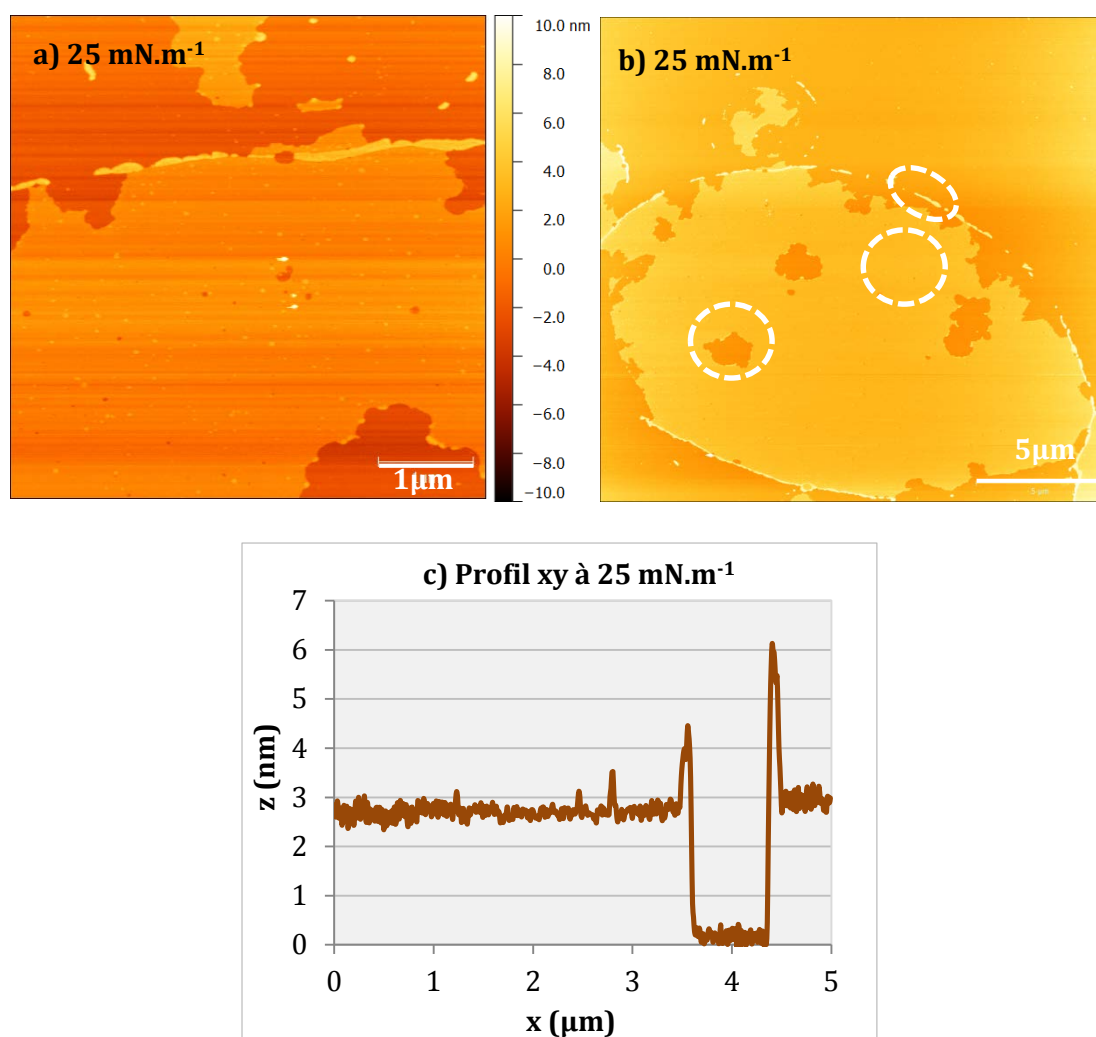


Figure 53. Images prises en microscopie AFM des films interfaciaux du mélange PC90G/MTNL 50/50 %w formés à l'interface air-eau à 25 mN.m⁻¹. Taille de l'image 5 μm x 5 μm. L'échelle de couleurs (en nanomètres) montrée à droite des images représente la hauteur dans la direction z des éventuelles structures retrouvées dans un plan perpendiculaire au film.

IV.3.3.2. Comparaison des isothermes de compression des mélanges et des produits purs

La **Figure 54** compare les isothermes de compression des deux produits tensioactifs étudiés et de leurs mélanges à différentes proportions. Vu la variabilité des isothermes de la PC90G seule (voir **Figure 47**), une courbe ayant une allure similaire à la dipalmitoilphosphatidylcholine (DPPC) pure a été choisie pour être présentée ici. Cette comparaison laisse voir clairement comment la hausse de la proportion de la PC90G dans le mélange fait augmenter la pression de surface du début de la compression, et fait diminuer les pentes des courbes à des concentrations importantes. Le MTNL de son côté, fait augmenter la pression donc baisser la tension interfaciale pour des aires plus faibles mais à une vitesse supérieure (pente plus prononcée) que la PC90G.

La PC90G a un fort pouvoir tensioactif (fait baisser la tension interfaciale et augmenter la pression interfaciale) même avec peu de molécules à l'interface. En revanche, quand l'interface est comprimée, elle reste en phase LE, ce qui limite la pression interfaciale. Le comportement du MTNL est contraire : à faible concentration il impacte peu la tension interfaciale. En revanche, dès que la surface par molécule est diminuée, il passe en partie en phase LC et impacte fortement la tension interfaciale.

Dans la plupart des cas, il est difficile de déterminer seulement avec ces courbes les phases présentes dans tout l'intervalle de pression car il n'y a pas de changement de pentes net ou de plateau sur les courbes qui indiqueraient des zones de transition. Ces analyses seront donc complétées par la détermination de la compressibilité des films et par des observations en AFM.

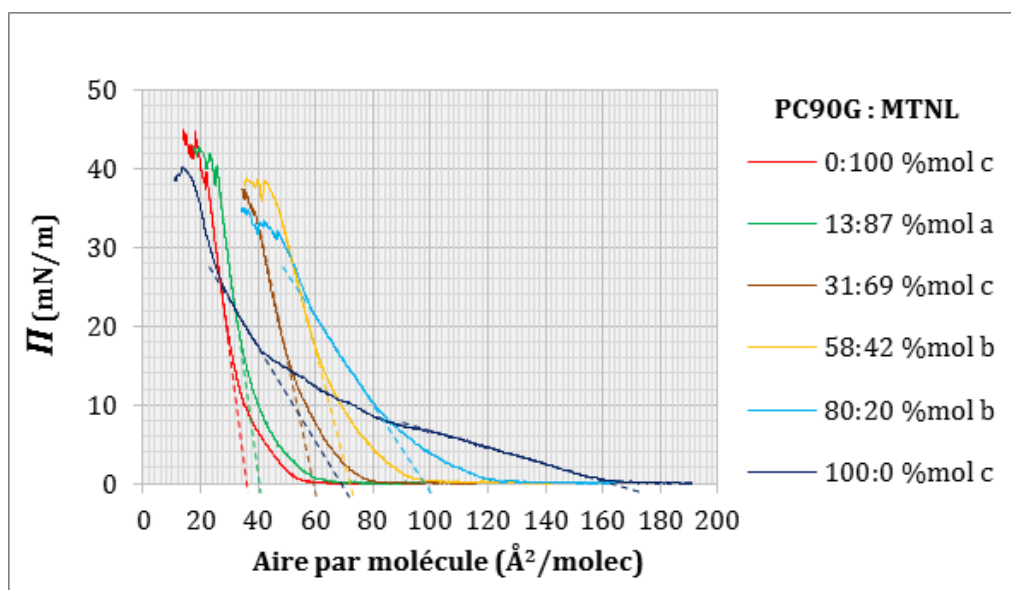


Figure 54. Isothermes de compression de films de PC90G et MTNL et leurs mélanges à 20°C sur une phase aqueuse tamponnée à pH=7.4

A ce jour la littérature n'a rapporté aucune isotherme de compression de monocouches mixtes de phospholipide/alcools gras/APG. En revanche, d'autres systèmes de monocouches mixtes de différents composés de la famille des phosphatidylcholines, comme le mélange DPPC/DPPG (dypalmitoilphosphatidylcholine/dypalmitoilphosphatidylglycerol) ont été reportés (Saad et al., 2009).

IV.3.3.3. Evolution de l'aire moyenne par molécule dans les films des mélanges

Les isothermes de compression sont utiles aussi pour déterminer l'aire occupée par une molécule dans une monocouche à une pression interfaciale donnée. Dans la **Figure 54** il est observé que les molécules présentes dans le MTNL (ayant une seule chaîne hydrocarbonée sans insaturations) occupent, à de faibles pressions, une aire par molécule plus faible que celles de la PC90G (composée par des molécules à 2 chaînes carbonées majoritairement insaturées). Dans le cas du MTNL, les molécules seraient plutôt linéaires et plus rigides (que la PC90G) du fait d'avoir une seule chaîne carbonée sans insaturations. Ces molécules pourraient s'aligner plus facilement les unes par rapport aux autres et auraient des interactions arrivant plus tardivement lors de la compression, comparé aux molécules de la PC90G. Dans le cas des molécules de la PC90G les deux chaînes carbonées impliquent l'occupation d'une aire supérieure à l'interface, ce qui provoquerait l'arrivée des interactions plus rapidement pendant la compression. Les conséquences sur la structure des monocouches seraient que le MTNL formerait plutôt des films condensés avec les chaînes bien alignées entre elles, alors que la PC90G formerait des monocouches plus expansées du fait des deux chaînes et des insaturations, augmentant la surface occupée par ces molécules.

Les isothermes de compression permettent aussi de déduire les aires occupées par les molécules au tout début de l'augmentation de pression (A_0) et au début de la phase de liquide condensé (A_c). Ces valeurs sont importantes car elles représentent les aires auxquelles les molécules commencent à interagir plus ou moins fortement en faisant augmenter la pression interfaciale. A_c correspond à l'aire occupée par les molécules dans la phase de liquide condensé (LC) dans laquelle les chaînes hydrocarbonées sont organisées. Sa valeur est ainsi comparable à l'aire occupée par la tête polaire des molécules à la surface, à de faibles pressions. Pour déterminer la valeur A_0 il suffit de relever des courbes de la **Figure 54**, l'aire des molécules juste avant de la montée en pression, c'est-à-dire à $\Pi=0$. La détermination de A_c se fait en extrapolant la zone linéaire correspondant à la phase de liquide condensé (LC) jusqu'à $\Pi=0$. Ceci est indiqué dans la **Figure 54** par les lignes pointillées (Erbil, 2006).

La variation des aires A_0 et A_c avec la composition est présentée dans la **Figure 55**.

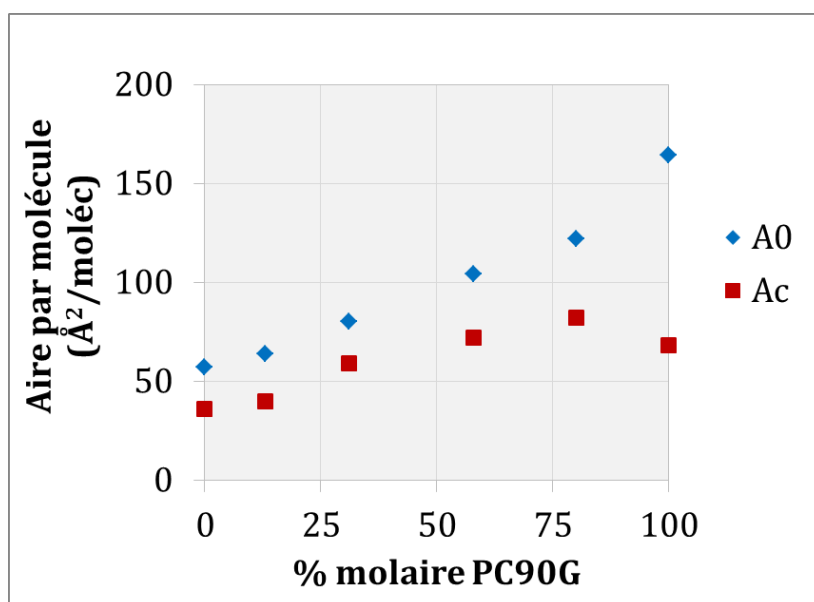


Figure 55. Aire limite par molécule des différents systèmes étudiés A_0 : début de l'augmentation de pression ; A_c : début de la phase de liquide condensé.

Les valeurs trouvées de A_c sont comparables aux valeurs reportées dans la littérature pour des molécules similaires : 33 Å^2 pour des APG (Karsa, 1999) et de $50\text{-}65 \text{ Å}^2$ à 25°C pour PC (pour différentes chaînes d'acides gras)(Miyoshi et Kato, 2015). Par ailleurs, les aires moléculaires des alcools gras sont de l'ordre de 22 Å^2 (Gaines, 1966).

Ces résultats montrent que dans la plupart des cas l'augmentation de la concentration de PC90G dans le film fait augmenter les aires A_0 et A_c . Pourtant il faut signaler que l'aire A_c d'un film formé uniquement par des molécules de PC est inférieure à celle d'un film mixte. La hausse de A_c dans une monocouche PC90G+MTNL est le résultat des interactions entre les molécules. Ces interactions feraient se séparer les molécules davantage et provoquerait la formation d'un film plus expansé. Une analyse plus détaillée sur ces interactions est présentée dans les prochains paragraphes sur l'analyse de miscibilité.

IV.3.3.4. Analyse de miscibilité : interactions entre MTNL et PC90G

La miscibilité des produits ainsi que le type d'interactions entre les molécules dans une monocouche peuvent être déterminées à partir de la construction des diagrammes d'aire moléculaire en fonction de la composition. Les courbes correspondantes au système PC90G+MTNL à trois pressions interfaciales (10 , 15 et 25 mN.m^{-1}) sont montrées sur la **Figure 56**. Elles ont été élaborées à partir des données des isothermes des **Figure 48**, **Figure 50** et **Figure 52** en relevant l'aire par molécule à une pression et à une concentration donnée.

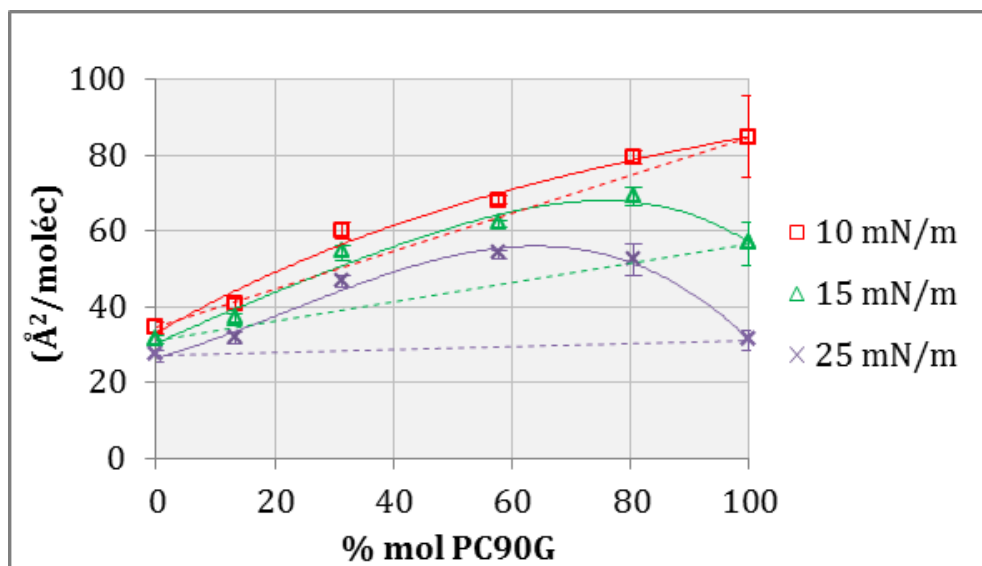


Figure 56. Diagrammes aire moléculaire – composition à 10, 15, 25 mN.m^{-1} , pour les monocouches de PC90G, MTNL et leurs mélanges à 20°C sur un tampon de pH=7,4

Dans le cas de la PC90G, ce sont les courbes ayant des allures similaires à la DPPC pure, a, b, c de la **Figure 48**, qui ont été prises en compte pour la construction de la **Figure 56**. L'analyse de miscibilité a été réalisée à 3 pressions : 10, 15 et 25 mN.m^{-1} , afin de mettre en évidence les variations éventuelles du comportement des molécules avec la pression interfaciale. La ligne pointillée représente un mélange idéal où l'aire moléculaire moyenne du film (A_{12}) ne changerait pas avec la concentration et suivrait donc une relation linéaire décrite par l'**Equation 56**. C'est également le cas lorsqu'un mélange n'est pas miscible et lorsqu'il n'y a pas d'interactions entre les molécules :

$$A_{12} = N_1 A_1 + N_2 A_2 \quad \text{Eq. 56}$$

Avec

A_{12} Aire moléculaire moyenne dans une monocouche mixte (PC90G + MTNL) ($\text{\AA}^2.\text{molecule}^{-1}$)

A_1, A_2 Aires moléculaires de chaque composé (PC90G ou MTNL) dans les films purs ($\text{\AA}^2.\text{molecule}^{-1}$)

N_1, N_2 Fractions molaires de chaque composé dans le film mixte (-)

Toute déviation par rapport à cette ligne idéale indique l'existence d'interactions intermoléculaires qui seront du type répulsives si les écarts sont positifs (au-dessus de la ligne) ou du type attractives si les écarts sont négatifs (au-dessous de la ligne).

La **Figure 56** montre qu'à toutes les pressions analysées, ce sont des interactions de type répulsif qui apparaissent entre les molécules lors d'un mélange des deux produits, ceci à toutes les concentrations testées. L'existence de ces interactions répulsives montre que les mélanges PC90G/MTNL forment des monocouches partiellement miscibles à l'interface air/eau et explique la formation des domaines observés lors des analyses AFM. En termes d'intensité, ces interactions sont moins importantes à 10 mN.m⁻¹, ce qui est cohérent puisque que les molécules sont moins proches les unes des autres à de faibles pressions. Au contraire, à 25 mN.m⁻¹, la déviation par rapport au mélange idéal est beaucoup plus importante, ce qui indique des répulsions aussi plus fortes. Aussi, à 25 mN.m⁻¹ le mélange qui présente l'écart à l'idéalité le plus important est celui correspondant à la formulation de l'émulsion : 31:69 %mol PC90G:MTNL. La principale conséquence de ces interactions répulsives est la formation de films plus expansés où les molécules occupent une surface plus élevée, comme le montrent les courbes des mélanges de la **Figure 54**. Ces forces répulsives seraient aussi à l'origine de la formation de domaines d'un des produits dans l'autre avec des arrangements moléculaires comme montré dans la **Figure 13** pour de mélanges partiellement miscibles. Les résultats de cette analyse de miscibilité sont en accord avec les observations réalisés en AFM (§IV.3.3.1) pour le mélange PC90G/MTNL où une séparation partielle de phases a été observée.

L'effet séparé des alcools gras et des APG sur le système analysé, ne peut pas être mis en évidence dans cette étude. Même si d'autres auteurs ont étudié le système PC/alcools gras et ont déterminé leur comportement en mélange, les résultats sont assez variables car ils sont propres à chaque système et dépendent de la nature des autres composés présents qui déterminent le type des interactions. Par exemple, pour un système PC+ hexadecanol, Lawrie et al., 2000, ont trouvé qu'à de faibles proportions de DPPC, les composés forment des monocouches miscibles et subissent des interactions attractives. D'autres molécules comme le cholestérol ont un effet « condenseur » sur la PC, car elles font diminuer l'aire occupée par les molécules de PC même à des aires inférieures à la somme des deux aires individuelles des molécules (Barnes et Gentle, 2011; Dynarowicz-Łatka et Hac-Wydro, 2004; Miyoshi et Kato, 2015). Dans le système étudié, le MTNL a cet effet condenseur sur le PC90G.

IV.3.3.5. Collapse des films pendant la compression

Le collapse des films interfaciaux (défini précédemment comme l'effondrement du film, **Figure 11**) des produits tensioactifs seuls et en mélange peut être observé sur la **Figure 54** lors de l'apparition des pics dans les isothermes pour les aires les plus faibles. Dans ces courbes il est observé que la pression à laquelle les films collapsent (Π_c) varient avec la composition. Lorsque la PC90G est en quantité faible (<13 %mol), il n'y a pas d'effet sur la pression de collapse. Mais si la quantité de ce produit est augmentée, Π_c diminue jusqu'à 13 % par rapport à la valeur obtenue en absence du produit soit $\Pi_{c\ MTNL} = 40,24 \pm 0,81\text{ mN.m}^{-1}$. Cette dépendance est un indice de la miscibilité des deux produits à l'interface air/eau (Chou et Chang, 2000). Egalement, la disparition d'un point caractéristique de Π_t indique aussi une miscibilité au moins partielle des composés puisque des monocouches mixtes immiscibles présentent une Π_t indépendante de la composition (Gaines, 1966; Lawrie et al., 2000).

Saad et al., 2009, ont étudié d'autres systèmes mixtes formés par des composés de la famille des phosphatidylcholines (DPPC/DPPG dypalmitoilphosphatidylcholine/dypalmitoilphosphatidylglycerol). Ces auteurs ont observé une augmentation de la pression de collapse lors de l'ajout de la phosphatidylcholine. Puisque la PC90G contient une proportion importante de composés avec des chaînes insaturées, le constat ici est le contraire, c'est-à-dire que l'ajout de la PC90G fait diminuer la pression de collapse.

IV.3.3.6. Compressibilité des films interfaciaux

Comme il a été évoqué auparavant, l'information fournie par les isothermes de compression des films mixtes n'est pas ferme par rapport aux phases (G, LE, LC, S) présentes dans la monocouche car les changements de pentes ne sont pas nets. L'analyse de la compressibilité du film (C^s) fournit des informations plus précises à ce sujet, car il s'agit d'un paramètre plus sensible aux changements structuraux des films. A partir des isothermes de compression, C^s est définie par l'expression suivante (Gaines, 1966) :

$$C^s = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)_T \quad (57)$$

Plusieurs valeurs de C^s sont utilisées dans la littérature comme des valeurs typiques pour l'identification des phases : un film en état de gaz aurait un C^s autour de 0,04; en état liquide les valeurs seraient comprises entre 0,07-0,0005 et en état solide entre 0,0005-0,001 (Sears et Stark, 1973). Ce sont des valeurs de référence qui peuvent apporter une aide au moment de

l'interprétation des résultats, même si parfois les intervalles se croisent. Le sens physique de la compressibilité peut être expliqué comme suit : lorsque les molécules sont en phase solide, très proches les unes des autres, elles ne pourront pas se rapprocher beaucoup plus lors d'une compression, donc C^s sera faible, mais lorsqu'elles sont en phase liquide et subissent une compression, elles peuvent se rapprocher davantage ce qui correspond à une diminution de l'aire occupée par molécule à la surface et à une compressibilité plus importante.

La compressibilité C^s peut être représentée en fonction de la pression interfaciale comme montré dans la **Figure 57**.

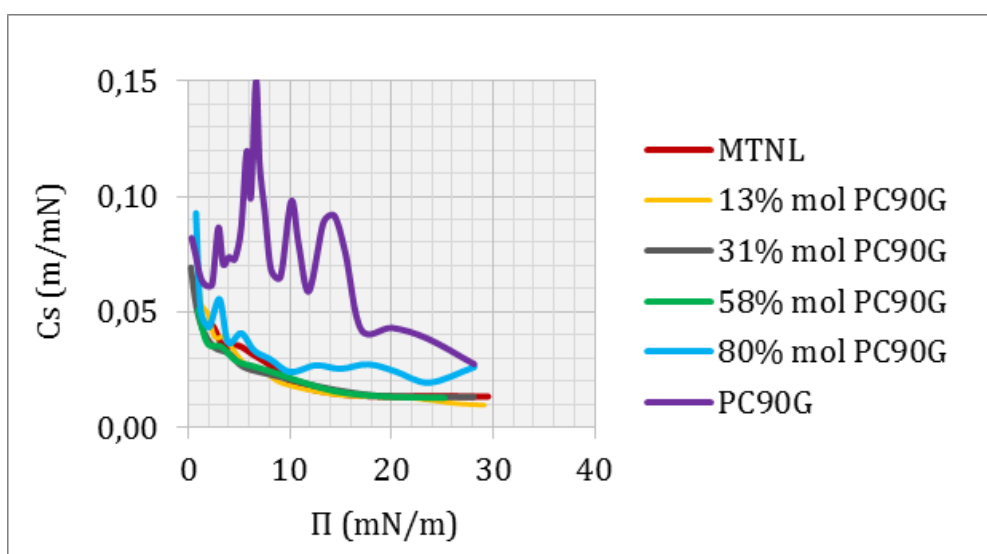


Figure 57. Comparaison de C_s (compressibilité) des monocouches des surfactants seuls et en mélange

La compressibilité (**Figure 57**) diminue petit à petit avec la pression pour les films de MTNL, 13 %mol PC90G, 31 %mol PC90G, 58 %mol PC90G et 80 %mol PC90G et se stabilise à partir de $\approx 18 \text{ mN.m}^{-1}$ pour les courbes MTNL, 13, 31, 58 %mol PC90G et de 10 pour 80 %mol PC90G. Ces points de stabilisation indiqueraient donc le début de la phase LC.

La comparaison des courbes de compressibilité de la **Figure 57**, indiquent aussi que l'ajout de PC90G à des proportions de 13 %mol PC90G, 31 %mol PC90G et 58 %mol PC90G, n'a pas d'effet sur cette caractéristique par rapport à une monocouche formée uniquement de MTNL. Par contre, le mélange à 80 %mol de PC90G, fait augmenter la compressibilité presque dans tout l'intervalle de pressions. De son côté, un film de PC90G exhibe en général, des compressibilités beaucoup plus importantes que le reste des systèmes analysés.

IV.3.4. Comparaison des résultats de goutte pendante et de balance de Langmuir

L'interface huile/eau est saturée par la PC90G à une concentration de 0,1 %w dans l'huile ($7,5 \cdot 10^{17}$ molécules PC90G/g huile), et environ 0,5%w pour le MTNL ($8,5 \cdot 10^{18}$ molécules MTNL/g huile). Ce résultat est cohérent avec l'organisation des deux tensioactifs présentée pour l'interface air/eau ; il faut introduire plus de molécules d'alcools et d'alkylpolyglucosides (APG) pour qu'ils aient un effet marqué sur la tension interfaciale.

En considérant qu'il est nécessaire d'avoir une concentration dans l'huile à l'équilibre avec l'interface supérieure à 0,5 %w dans l'huile, les deux produits PC90G et MTNL sont en large excès dans l'émulsion qui contient 15% w de PC90G et 15% de MTNL dans l'huile.

Dans les deux cas, la diffusion des tensioactifs dans la phase liquide semble l'étape limitante pour la formation du film à l'interface. L'équilibre d'adsorption de la PC90G est atteint en environ 20 s à 0,5%w et 10 min à 0,1%w alors qu'il est atteint en 17 min à 0,5 %w et 17 h à 0,1 %w pour le MTNL. Il a été supposé que la cinétique d'adsorption lente du MTNL peut être due à des structures lamellaires se formant près de l'interface huile/eau, déjà mise en évidence pour les alkylpolyglucosides dans la littérature. Après l'analyse de l'interface air/eau, il est possible de supposer que le MTNL doit être à une concentration assez importante à l'interface puis induire des interactions latérales entre le APG et les alcools gras pour modifier de façon importante et stable la tension interfaciale.

Aux concentrations les plus élevées de l'étude de l'interface huile/eau (0,1 et 0,5 %w), le mélange présente un comportement proche de celui de la PC90G. Il est possible que la PC s'adsorbe de façon plus favorable que le MTNL et provoque sa désorption partielle. Dans l'analyse de l'interface air/eau, il a été constaté en mélange à forte pression la désorption de composés mais il n'était pas possible de les identifier.

En revanche, aux faibles concentrations à l'interface huile/eau le MTNL domine la dynamique d'adsorption à temps court puis la PC prend le dessus. Aux faibles concentrations, la diffusion dans la phase liquide intervient ; or le MTNL contient des alcools moins encombrants qui diffusent probablement plus vite que les PC. Celles-ci arrivent plus tard à l'interface mais elles provoquent une baisse plus importante de la tension interfaciale.

Une compétition a été mise en évidence entre les deux produits, mais pas de synergie. Les composés ont plutôt tendance à se repousser, même s'il y a une certaine miscibilité des deux composés dans le film interfacial.

Dans quelle phase est l'interface huile/eau de l'émulsion préparée ? liquide condensé (LC) ou liquide expansé (LE) ?

Pour le déterminer, il faudrait trouver la quantité de chacun des tensioactifs à l'interface huile/eau dans l'émulsion et la rapporter à la surface disponible, basée par exemple sur la granulométrie de l'émulsion. Ensuite l'aire occupée par molécule pourrait être calculée. Cette aire pourrait être rapportée sur le graphique de la **Figure 54** (pression interfaciale en fonction de l'aire par molécule) pour établir la phase de la monocouche ainsi que la pression interfaciale. En connaissant la pression interfaciale, des analyses en AFM de monocouches prélevées à une telle pression pourraient être également réalisées.

Pour déterminer le nombre de composés à l'interface, il pourrait être envisagé de centrifuger la phase grasse et de quantifier les tensioactifs. Dans le cas des lipides, cela reste difficile à faire car les molécules peuvent aussi se dissoudre dans la phase huile. La masse extraite n'est donc pas représentative des interfaces de façon sûre. Ces mesures sont en revanche réalisables dans le cas des tensioactifs hydrophiles (Chabrand et al., 2008; Surel et al., 2014), non étudié ici.

La question de la phase LE ou LC de l'interface de l'émulsion n'a pas pu être répondue ici.

L'analyse de l'interface réalisée dans le **Chapitre IV** a permis de mettre en évidence la complexité qu'elle peut avoir. Même en considérant un mélange synthétique, l'interface huile/eau est loin d'une image simple de monocouche de composés amphiphiles répartis de façon harmonieuse présentant des propriétés comme la tension interfaciale connues et stables dans le temps. L'interface est plus ou moins bien recouverte de composés amphiphiles qui peuvent partiellement se mélanger, se regrouper sous forme d'ilots, avec une cohésion variable suivant la nature des composés et des interactions latérales présentes. Cette organisation dépend de la concentration des composés disponibles, et se structure à différentes vitesses en fonction des mécanismes mis en jeu.

Il est clair que dans un extrait réel de microalgues, l'organisation des composés amphiphiles à l'interface entre la phase aqueuse et les lipides potentiellement libérés sera très variable selon la souche, le milieu de culture et le mode de fractionnement choisi. Les résultats obtenus dans ce travail sont un premier pas vers une meilleure compréhension de la structure des milieux complexes qui seront fractionnés. Nous en sommes loin et il sera probablement difficile de la

prédire dans tous les cas. Mais la prise de conscience de cette organisation complexe est une étape nécessaire pour le développement des procédés de séparation.

IV.4. Conclusions sur la caractérisation des interfaces

Interface huile/eau

A de faibles concentrations, la PC90G s'est montrée plus efficace pour l'abaissement de la tension interfaciale que le MTNL même si dans les premières secondes, ce dernier a présenté une cinétique d'adsorption plus rapide. Par ailleurs, le mélange de ces deux composés a montré des valeurs de la tension interfaciale γ à l'équilibre comprises entre celles des deux surfactants seuls (plus proches des valeurs du MTNL) et des cinétiques d'adsorption comprises aussi entre celles des deux produits. Ainsi, aucune synergie entre les deux surfactants n'a été observée à aucune des concentrations testées.

A la concentration la plus importante testée (0,5% w/w de surfactant dans la phase huile), l'adsorption de la PC90G et du mélange PC90G/MTNL à l'interface huile/eau ont été plus rapides que celle du MTNL (20 s pour la PC90G et le mélange et 1000 s pour le MTNL), mais cette différence ne se reflète pas dans les valeurs de la tension interfaciale à l'équilibre, voisines et de l'ordre de 1 mN/m. Etant donné que dans l'émulsion, la concentration en tensioactif est beaucoup plus importante (30% w/w total de PC90G+MTNL dans la phase huile), ces résultats suggèrent que la couverture de l'interface se ferait presque instantanément au moment de la formation de l'interface dans le procédé d'émulsification, même si une concurrence des composés vers l'interface a lieu ou si des structures multilamellaires se forment dans la phase aqueuse.

Interface eau/air

Tensioactifs seuls : Il a été constaté que la PC90G forme des monocouches avec des molécules plus expansées que le MTNL. Cette caractéristique donne à ce film interfacial une plus grande compressibilité par rapport à une monocouche de MTNL seul. Dans le cas du MTNL, les molécules seraient plutôt linéaires et moins rigides (que la PC90G) du fait d'avoir une seule chaîne carbonée sans insaturations alors que la PC90PG comporte deux chaînes avec des insaturations. Ces molécules de MTN pourraient s'aligner plus facilement les unes par rapport aux autres et auraient des interactions arrivant plus tardivement lors de la compression comparé aux molécules de la PC90G. En revanche, les couches de MTN, plus condensées, sont moins compressibles, la pression augmente plus rapidement sous compression.

Mélange de tensioactifs : Il a été observé que les monocouches mixtes de PC90G+MTNL à la proportion utilisée dans l'émulsion (50/50 %w) sont des films stables à la compression jusqu'à des pressions interfaciales proches de $\approx 40 \text{ mN.m}^{-1}$. Cette stabilité serait donnée par la présence du MTNL qui fournit à la monocouche une structure riche en phase de liquide condensé (LC). Ces films ont aussi une certaine flexibilité donnée par la présence de la PC90G formant de films riches en phase de liquide expansé (LE). En revanche une augmentation de la proportion de ce dernier produit fait diminuer la pression de collapse des films et donc leur stabilité à la compression.

Aire moyenne des molécules à l'interface : les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la concentration de PC90G dans le film fait augmenter les aires occupées par les molécules à l'interface (A_0 et A_C). Ceci est le résultat du type d'interactions entre les molécules, comme indiqué au paragraphe suivant.

Interactions : Lorsque les deux surfactants sont présents dans une monocouche, des interactions de type répulsif apparaissent entre les molécules, ceci à toutes les concentrations testées et à de pressions entre $10\text{-}25 \text{ mN.m}^{-1}$. Ces interactions sont la cause de la formation de films plus expansés quand les surfactants se mélangent puisqu'elles forcent les molécules à s'éloigner les unes des autres et donc à occuper plus de surface.

Compressibilité : Les monocouches ayant une haute compressibilité se caractérisent par le fait qu'elles sont riches en phase de liquide expansé. C'est le cas pour les films de PC90G qui ont présenté une compressibilité plus importante que le reste des systèmes analysés. Par contre l'ajout de ce produit dans les mélanges n'a d'effet sur cette propriété qu'à une concentration molaire de 80 % en PC90G parmi les concentrations testées.

Chapitre V. Résultats et discussions sur la filtration membranaire

V.1. Introduction

La troisième partie de cette étude vise à filtrer un mélange représentatif d'un surnageant de broyat de microalgues pour concentrer les lipides qu'il contient. Plusieurs membranes en polyéthersulfone PES, polyacrylonitrile PAN, et polyfluorure de vinylidène PVDF avec différents seuils de coupure en microfiltration MF et ultrafiltration UF ont été testées. Leurs performances en termes de perméabilité, de taux de rétention, de tendance au colmatage et de nettoyabilité sont comparées. L'effet des caractéristiques de la membrane telles que la taille de pores et leur hydrophilicité ou hydrophobicité sur le flux de perméat et le colmatage est aussi analysé. La taille de gouttelettes de lipides lors de la filtration a été suivie afin de d'identifier un éventuel phénomène de coalescence. Finalement, un premier lien entre les propriétés physicochimiques du mélange et les performances de la filtration est proposé.

V.2. Compactage et perméabilité à l'eau

$L_{p_{eau}}$

La valeur de la perméabilité initiale à l'eau des membranes est influencée directement par le compactage, puisque durant ce procédé les pores de la membrane se referment faisant diminuer le flux du perméat, ceci jusqu'à atteindre une structure stable qui changera peu pendant la filtration de l'émulsion. Ainsi, la fin de l'étape de compactage est marquée par la stabilisation du flux de perméat et donc d'une perméabilité à l'eau caractéristique de la membrane propre. Comme la valeur de la perméabilité à l'eau de la membrane neuve $L_{p_{eau}}$ est le résultat de la compaction de la membrane, ces deux aspects seront analysés ensemble.

Le **Tableau 25** montre la durée de l'étape de compactage pour chacune des membranes testées ainsi que les perméabilités à l'eau mesurées après cette étape. Des fortes variations de ces deux caractéristiques ont été observées pour un même type de membrane, probablement à cause de l'hétérogénéité du matériau polymère, pas seulement entre différentes feuilles (comme observé pour la membrane de PES 300 kDa, essai 3 et 4) mais aussi sur une même feuille (comme le cas des deux coupons testés de PES 200 kDa, essai 1 et 2).

Tableau 25. Temps de compactage et perméabilités à l'eau L_{peau} après compactage, à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle

Membrane	Essai*	t compac. (h)	L_{peau} fournisseur (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	L_{peau} expérim. (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	Incert. k=2** (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	Rinçage initial
PES 200 kDa	1	24	297 - 360	128	27	EtOH rinç. léger
	2	4		20	6	EtOH rinç. léger
PES 300 kDa	3	5	685 - 852	753	114	EtOH 50%, 0,5 bar, 30 min
	4	22,5		24	8	EtOH rinç. léger
PAN 500 kDa	5	5,5	416 - 970	81	15	EtOH rinç. léger
	6	6,5		62	12	EtOH rinç. léger
	7	23		127	20	EtOH rinç. léger
	8	21,5		119	18	EtOH rinç. léger
	9	19		117	21	EtOH rinç. léger
PVDF 0,4 µm	10	7	16213 - 19816	435	70	EtOH rinç. léger
	11	18		53	11	EtOH rinç. léger
	12	18,5		328	62	EtOH rinç. léger
PVDF 1,5 µm	13	24	14895 - 18867	296	46	EtOH 50%, 0,5 bar, 30 min
	14	24,5		66	10	EtOH rinç. léger

*Chaque essai a été fait sur un coupon différent

**k = facteur d'élargissement du calcul d'incertitude

Pour la plupart des expériences, les perméabilités mesurées expérimentalement ont été largement inférieures aux intervalles préconisés par le fournisseur, ce qui suggère que ces valeurs ne correspondent pas aux valeurs des membranes compactées. La perméabilité à l'eau d'une membrane neuve sans compactage a été mesurée uniquement pour une membrane de PAN (résultat non inclus dans le **Tableau 25**). La valeur obtenue, dans ces conditions, a été de 351 L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹ c'est qui est environ de 3 à 6 fois plus important que la perméabilité à l'eau des membranes compactées, et proche de la valeur fournisseur.

Dans le cas des expériences avec les membranes PES 300 kDa et PVDF 1,5 µm, des valeurs très différentes ont été obtenues entre les réplicats. Ceci pourrait être dû aux différences des protocoles de conditionnement : les membranes utilisées dans les essais 3 de PES 300 kDa et 13 de PVDF 1,5 µm, ont été traitées avec de l'éthanol à 50% pendant 30 min pour l'élimination du produit de conditionnement. L'éthanol a pu faire augmenter la perméabilité soit par gonflement de pores de la membrane, soit par modification de l'hydrophilicité du matériau. Ceci a été constaté pour la membrane en PES 300 kDa (essai 3) avec la mesure de la perméabilité à l'eau avant et après le rinçage avec de l'EtOH. Dans ce cas la valeur a doublé après le traitement. Le contact avec certains produits chimiques peut même faire changer le taux de rétention des membranes, comme signalé par Winston Ho et Sirkar, 2012 pour une membrane en PS après un nettoyage avec un

détergent contenant du SDS. Afin d'éviter la modification des caractéristiques de la membrane par l'EtOH, l'étape d'élimination du produit de conditionnement a été limitée à un rinçage léger à l'éthanol.

Même si dans tous les cas le compactage a été réalisé jusqu'à atteindre un flux de perméat stable, des variations du flux à l'eau ont été observées pour un même coupon. Dans l'essai 1 de PES 200 kDa et l'essai 5 de PAN 500 kDa, des changements de +11 % et de -15 % respectivement ont été observés entre la perméabilité à l'eau mesurée juste à la fin du compactage et celle mesurée le lendemain avant filtration de l'émulsion. Pour la membrane en PES 200 kDa, l'augmentation pourrait être expliquée par une tendance du polymère à retrouver sa forme originale (relaxation du matériau) lorsqu'elle n'est pas en fonctionnement et qu'aucune pression n'est exercée. Les pores se dilateraient pendant la nuit. Dans le cas de la membrane PAN 500 kDa, essai 5, la diminution de la perméabilité de 15 % est probablement due à un compactage qui n'était pas encore fini et qui a donc continué le lendemain. Pour éviter ces variations, dans la mesure du possible, la durée du compactage a été prolongée jusqu'au lendemain, afin d'enchaîner directement avec l'expérience de détermination des conditions critiques.

Finalement, la membrane PAN 500 kDa présente la variation de perméabilité à l'eau la moins importante, malgré des temps de compactage différents.

V.3. Sélection des conditions opératoires

L'objectif de cette partie expérimentale est de déterminer les flux et pression critiques des membranes. Ce afin d'établir les conditions d'opération optimales pour effectuer la filtration de l'émulsion avec un flux de perméat suffisant tout en limitant l'effet du colmatage. Tel qu'il a été expliqué dans la partie bibliographique (voir **Figure 21**), le colmatage peut être limité si la pression de travail est inférieure à la pression critique.

Pour estimer des conditions de fonctionnement raisonnables pour chaque membrane, l'émulsion préparée (2 %w de phase huile) a été filtrée et les courbes de flux de perméat J en fonction de la pression transmembranaire PTM , $J = f(PTM)$, ont été établies pour chaque coupon de membrane testée comme décrit en §II.4.7. Quelques exemples sont montrés dans la **Figure 58** (les résultats des autres expériences sont présentés en **Annexe III**). Comme montré dans la **Figure 21** le flux et la pression critiques (J_{crit} , P_{crit}) ont été estimés à partir de ces graphes et correspondent au point à partir duquel le flux J n'est plus linéaire avec la pression transmembranaire PTM . Le flux limite et

la pression maximale (J_{lim} , P_{max}) correspondent au point à partir duquel le flux J devient constant et indépendant de la PTM. Afin de permettre une comparaison adéquate des différents types de membranes, des expériences similaires en termes de protocole de conditionnement (rinçage initial et temps de compactage) sont présentées sur cette figure. Egalement, pour pouvoir comparer les différentes membranes dans les mêmes conditions, la vitesse tangentielle a été fixée à 1 m.s^{-1} pour toutes les expériences. La pression transmembranaire minimale du système liée à la perte de charge pour atteindre cette vitesse était de $\approx 0,2 \text{ bar}$ (vanne de régulation 100 % ouverte). En conséquence, pour la construction des courbes de $J = f(PTM)$, aucune évaluation du flux de perméat au-dessous de cette pression n'a été possible.

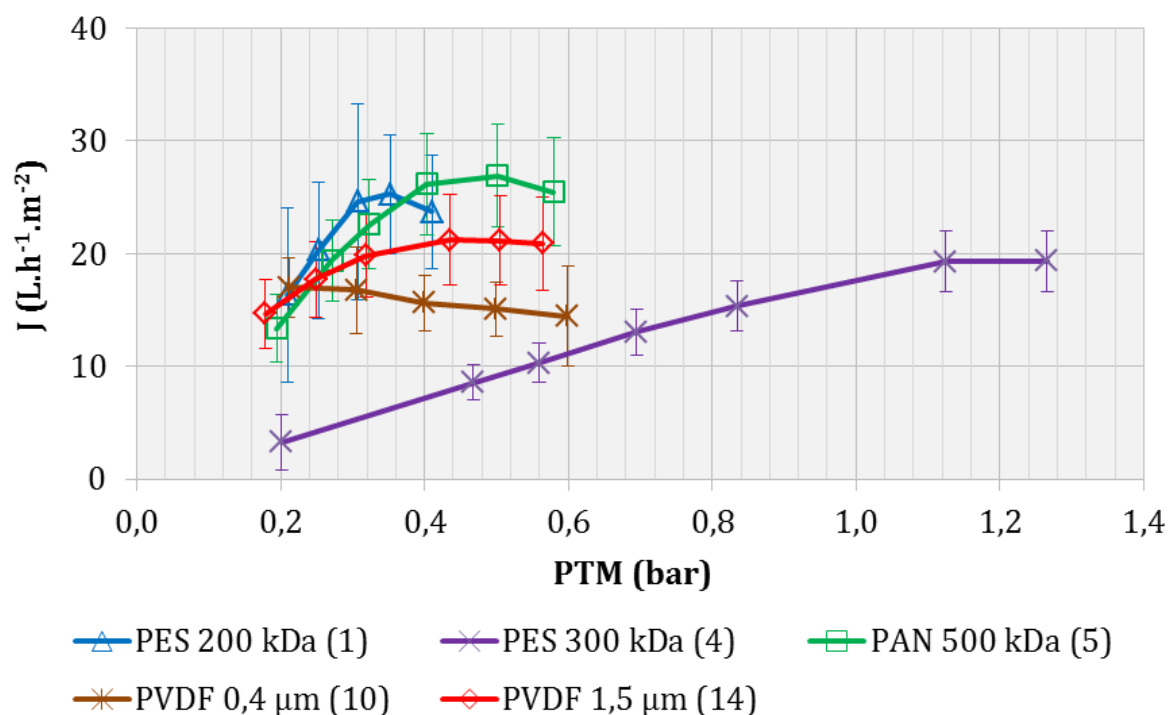


Figure 58. Courbes de variation du flux de perméat avec la pression transmembranaire établies pour la détermination des conditions critiques pour la filtration de l'émulsion à 30°C et 1 m.s^{-1} de vitesse tangentielle pour différentes membranes (numéro d'essai en parenthèse). Les expériences les plus similaires en termes de protocole de conditionnement (rinçage initial et temps de compactage) ont été choisies pour la comparaison.

Le **Tableau 26** synthétise les valeurs de J_{crit} , P_{crit} , J_{lim} et P_{max} obtenues pour toutes les expériences réalisées. La valeur de P_{crit} indique la pression transmembranaire au-dessous de laquelle la filtration de l'émulsion peut être conduite en limitant le colmatage irréversible. Comme il a été signalé auparavant dans le **Tableau 5**, les pressions couramment utilisées en microfiltration vont

de 0,5 à 1 bar et en ultrafiltration de 1 à 5 bar. Les pressions critiques trouvées expérimentalement pour la plupart des cas des expériences réalisées dans ce travail sont au-dessous des limites inférieures de ces intervalles. Globalement il peut être remarqué que dans la plupart des cas les valeurs de P_{crit} sont inférieures à 0,4 bar (avec une exception pour les membranes PES 200 kDa essai 2 et PES 300 kDa essai 4), et que la pression P_{max} est entre 1 à 2 fois la P_{crit} et que les J_{lim} sont entre 1 et 1,4 fois J_{crit} . Malgré les différences des matériaux testés et de leurs seuils de coupure, les flux critiques obtenus sont du même ordre de grandeur, entre 10 et 35 $L.h^{-1}.m^{-2}$, le plus important étant pour un des coupons de la membrane PVDF 1,5 μm , ce qui est logique étant donné que c'est la membrane avec la taille de pores la plus importante. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres auteurs. Montalescot, 2015, a trouvé de pressions critiques aussi faibles, de 0,2 bar lors de la filtration des surnageants des broyats de microalgues sur des membranes céramiques d'ultrafiltration UF à 1 $m.s^{-1}$. Nguyen, 2013 a également obtenu une P_{crit} entre 0,1 et 0,3 bar pour la récolte de *Chlorella vulgaris* à 0,2 g/L avec une membrane ayant un seuil de coupure de 0,5 μm .

Tableau 26. Conditions de pression et de flux critiques (estimées) et maximales des membranes testées pour la filtration de l'émulsion à 30°C et 1 $m.s^{-1}$ de vitesse tangentielle

Membrane	Essai	P_{crit} (bar)	J_{crit} ($L.h^{-1}.m^{-2}$)	Incert. J_{crit} $k=2$ ($L.h^{-1}.m^{-2}$)	P_{max} (bar)	J_{lim} ($L.h^{-1}.m^{-2}$)	Incert. J_{lim} $k=2$ ($L.h^{-1}.m^{-2}$)	P_w (bar)
PES 200 kDa	1	0,3	25	9	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,2
	2	1,2	10	2	1,5	13	2	1,0
PES 300 kDa	3	0,2	13	3	0,3	14	3	0,2
	4	1,0	15	2	1,1	19	3	0,8
PAN 500 kDa	5	0,4	22	4	0,5	27	5	0,3
	6	0,3	11	3	0,4	13	3	0,2
	7	0,2	17	2	0,3	20	4	0,3
	8	0,2	14	2	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,3
	9	0,2	21	4	0,3	25	4	0,2
PVDF 0,4 μm	10	0,2	17	3	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,2
	11	0,2	20	4	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,2
	12	0,2	10	3	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,2
PVDF 1,5 μm	13	0,2	35	8	$\approx P_{crit}$	$\approx J_{crit}$	-	0,2
	14	0,2	15	3	0,4	21	4	0,2

k=facteur d'élargissement utilisée dans le calcul de l'incertitude. P_w = pression de travail

Ces résultats (**Figure 58** et **Tableau 26**) montrent des comportements proches pour les membranes PES 200 kDa, PAN 500 kDa et PVDF 0,4 μm , pour lesquelles la filtration de l'émulsion nécessite des pressions faibles (leurs pressions critiques sont entre 0,2 et 0,4 bar) pour des flux

critiques similaires (entre 15 et 25 L.h⁻¹.m⁻²). La membrane en PES 300 kDa nécessite une pression au-dessus de 0,8 bar pour atteindre un flux similaire de 15 L.h⁻¹.m⁻².

Comme il a été dit précédemment, la pression transmembranaire minimale du système liée à la perte de charge à 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle a été de 0,2 bar. Comme il est observé dans le **Tableau 26**, pour plusieurs expériences (essai 3 et du 7 à 14), la P_{crit} correspond à cette pression minimale de 0,2 bar, ce qui limite le choix de la pression de travail P_w à cette valeur. Pour plusieurs essais la pression maximale est atteinte dès 0,2 bar, ne permettant pas une estimation de la pression critique. Pour les essais 7 et 8 la pression de travail P_w a été choisie en fonction de la valeur obtenue pour une expérience précédente réalisée pour une membrane du même matériau (essai 5), même si les valeurs de P_w sont supérieures à P_{crit}.

Les deux membranes PES 200 kDa testées ainsi que les deux en PES 300 kDa, ont montré des pressions critiques P_{crit} très différentes pour la même référence mais des flux critiques J_{crit} similaires. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces comportements : i) l'hétérogénéité des membranes d'un même matériau et d'un même seuil de coupure, tel qu'il a été mentionné dans V.2 qui aurait comme conséquence des performances différentes au cours de la filtration ; ii) une structure de la membrane variable au cours de la filtration malgré l'étape de compactage, qui pourrait avoir des conséquences sur les conditions critiques obtenues à posteriori.

Afin de mieux comparer les variations des flux avec la pression, une normalisation avec la perméabilité à l'eau des membranes propres J/J_{eau} a été réalisée. Les valeurs de J/J_{eau} ont été obtenues selon l'**Equation 58**, à partir des valeurs mesurées de J à plusieurs pressions (même valeurs de la courbe J=f(PTM)) et les valeurs du flux à l'eau à la même pression. (**Figure 59**).

$$\frac{J}{J_{eau}} = \frac{J_{30\text{ }^{\circ}\text{C à PTM}}}{Lp_{eau\text{ }30\text{ }^{\circ}\text{C}} \cdot PTM} \quad \text{Eq. 58}$$

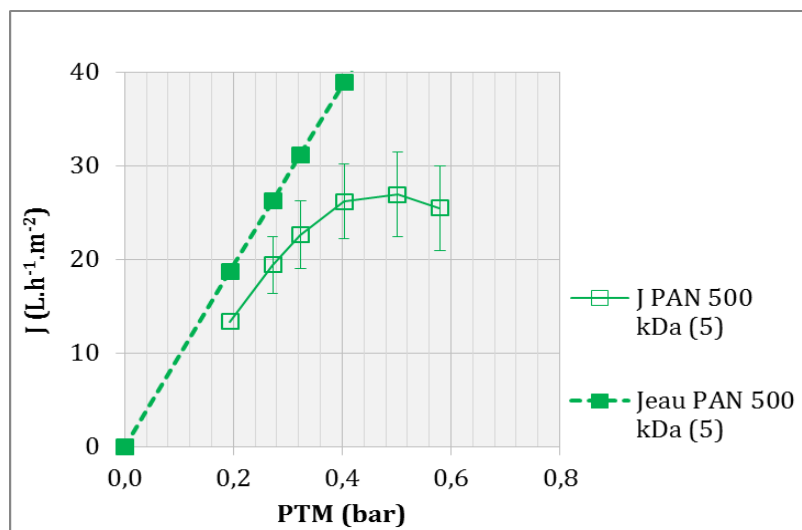


Figure 59. Comparaison du flux à l'eau (J_{eau}) et du flux de perméat (J) lors de la filtration de l'émulsion pour une membrane PAN 500 kDa à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle.

Les courbes de la **Figure 60** montrent la variation des flux de perméat normalisés (J/J_{eau}) en fonction de la pression transmembranaire.

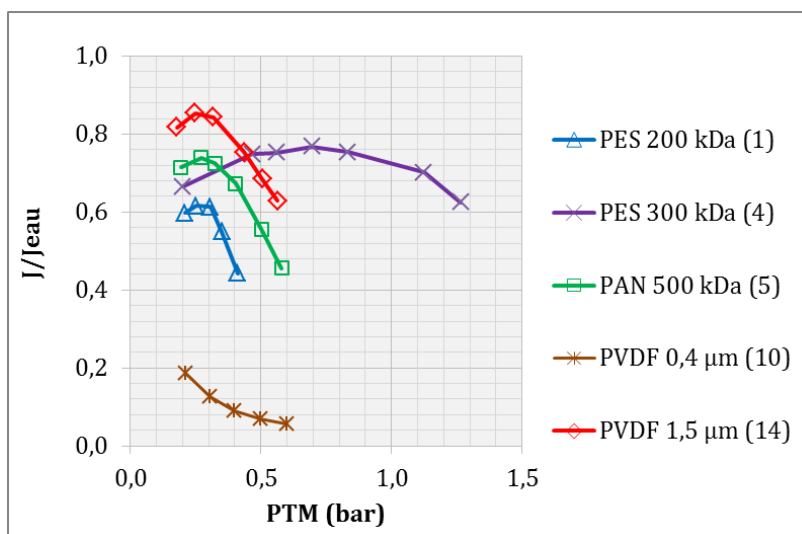


Figure 60. Flux de perméat normalisé (J/J_{eau}) de la filtration de l'émulsion pour les membranes testées à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle

Ces courbes sont aussi utiles pour la détermination des flux et des pressions critiques, signalés par le changement de courbure à partir duquel le ratio J/J_{eau} commence à diminuer (cf. **Equation 59**) en supposant que la viscosité est la même pour tous les perméats et qu'elle est égale à celle de l'eau pure. Aux pressions moins importantes, et avant la diminution de J/J_{eau} , le colmatage est plutôt réversible. La réduction de ce flux normalisé indique une forte augmentation de la résistance au passage du liquide R_f avec la pression, signalant ainsi le début du colmatage.

$$\frac{J}{J_{eau}} = \frac{\frac{PTM}{\mu \cdot (R_m + R_f)}}{\frac{PTM}{\mu \cdot R_m}} = \frac{R_m}{R_m + R_f} \quad \text{Eq. 59}$$

Concernant les deux membranes en PVDF, lorsqu'elles sont comparées, le flux critique de la membrane à 0,4 µm est particulièrement faible par rapport au flux à l'eau de la membrane propre (à peine 20 %), ce qui contraste avec le résultat obtenu pour la membrane de 1,5 µm en PVDF, ayant un flux critique de 85% du flux à l'eau (le plus important parmi les membranes comparées). Cette différence peut être expliquée par la taille des pores plus importante et une plus grande mouillabilité de la membrane de PVDF 1,5 µm (angle de contact $\theta_{PVDF\ 1,5\mu m} = 82,3^\circ \pm 0,7$ contre $\theta_{PVDF\ 0,4\mu m} = 95,1^\circ \pm 1,2$). Ces deux caractéristiques favorisent le passage d'eau à travers la membrane, mais aussi des gouttelettes de lipides qui ont des diamètres bien plus petits que le diamètre des pores (ce qui sera confirmé plus tard par la valeur plus faible du taux de rétention, **Tableau 37**). Elles ne provoquent donc pas un fort colmatage de la membrane. La population des gouttelettes de diamètre supérieur à 1,5 µm est elle retenue. La membrane de PVDF 0,4 µm est au contraire une membrane hydrophobe avec une taille de pores moins importante, l'eau passe donc moins facilement et les gouttelettes d'huile peuvent créer un colmatage plus important.

Pour les membranes en PES l'effet du seuil de coupure plus important de la membrane à 300 kDa, l'a emporté sur l'hydrophilicité de la membrane de 200 kDa (angle de contact $\theta_{PES\ 200\ kDa} = 79,4^\circ \pm 0,5$ contre $\theta_{PES\ 300\ kDa} = 89,0^\circ \pm 0,9$). Les rapports J/J_{eau} obtenus ont été de 75 % pour la 300 kDa et de 60 % pour la 200 kDa. Si les membranes PES et PVDF 0,4 µm sont comparées, il est possible de supposer que le très fort colmatage de cette dernière est dû à des tailles de gouttelettes de lipides proches du seuil de coupure (*cf.* distribution de taille émulsion faite avec granulomètre laser, présenté dans la section §V.4.1, **Figure 62**).

Finalement la membrane de PAN 500 kDa a montré un rapport J/J_{eau} similaire à la membrane de PES ayant un seuil de coupure plus proche, c'est-à-dire, la PES 300 kDa.

En résumé, comparée aux autres membranes, la PAN 500 kDa a montré plus de stabilité après le conditionnement et après le compactage. Les conditions critiques montrent aussi une variabilité entre les différents coupons moins importante comparée aux autres membranes : les pressions critiques sont entre 0,2 à 0,4 bar et les flux critiques entre 11 et 22 L.h⁻¹.m⁻².

V.4. Concentration de l'émulsion

L'objectif de ces expériences est de concentrer l'huile en faisant la filtration de l'émulsion avec recirculation du rétentat et soutirage du perméat. La pression de travail P_w utilisée dans chaque essai correspond à la valeur présentée dans le **Tableau 26**.

V.4.1. Granulométrie initiale de l'émulsion

La **Figure 61** et le **Tableau 27** présentent la distribution granulométrique et les diamètres Dv_{10} , Dv_{50} et Dv_{90} des émulsions au point initial de la concentration pour une sélection d'essais (voir **Annexe II** pour plus d'explications sur la granulométrie). Une légère variabilité est observée entre les distributions mais les valeurs des diamètres médians en volume Dv_{50} restent cependant proches : entre 2,4 μm et 3,0 μm .

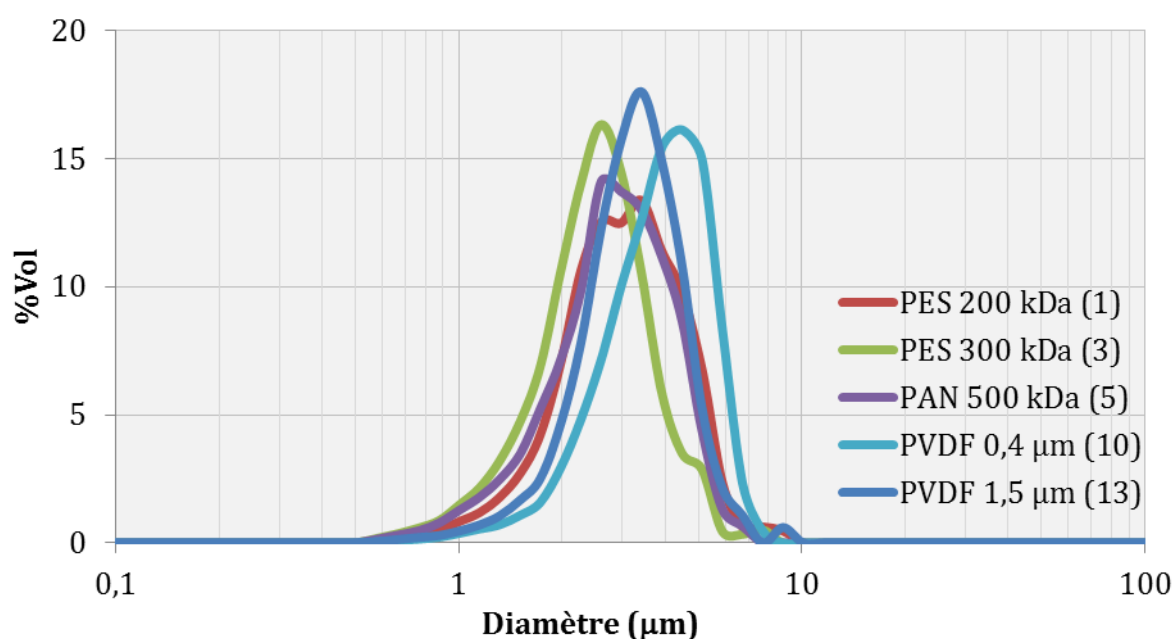


Figure 61. Distributions granulométriques initiales en volume de plusieurs émulsions avant filtration, obtenues par microscopie + analyse d'image.

Tableau 27. Granulométries de départ des émulsions concentrées pour plusieurs essais, déterminées par microscopie couplé à analyse d'image

Membrane	Essai	Lp eau avant concentration ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	Dv10* (μm)	Dv50* (μm)	Dv90* (μm)	Observations
PES 200 kDa	1	157	1,6	2,8	4,5	Filtration+nettoyage
PES 300 kDa	3	436	1,4	2,4	3,7	Filtration+nettoyage
PAN 500 kDa	5	81	1,5	2,7	4,2	Après J-PTM
PVDF 0,4 μm	10	278	2,1	3,7	5,2	Filtration+nettoyage
PVDF 1,5 μm	13	670	1,9	3,0	4,4	Filtration+nettoyage

*Dv10, Dv50 et Dv90 = diamètres au-dessous desquels se trouvent respectivement 10 %, 50 % et 90 % en volume des gouttelettes dans la distribution

Pour l'essai 5, la concentration a été réalisée immédiatement après la détermination des courbes $J = f(PTM)$ en utilisant la même émulsion et sans réalisation de nettoyage entre les deux expériences. Aucun changement de granulométrie des gouttelettes des lipides n'a été détecté pendant l'expérience de détermination de $J = f(PTM)$. Pour les essais 1, 3, 10 et 13, il s'agit des membranes qui avaient été utilisées une première fois et ensuite nettoyées avant de faire la concentration. Pour ces expériences, l'émulsion a été directement utilisée après sa préparation. Les perméabilités à l'eau des membranes neuves ou des membranes propres après la première utilisation selon le cas, sont aussi présentées dans le **Tableau 27**.

La limite de détection du microscope étant d'environ 0,5 μm , les granulométries obtenues par cette méthode ne représentent que la partie supérieure de la distribution des gouttelettes. Pourtant, l'émulsion contient aussi des gouttelettes d'un diamètre inférieur à 0,5 μm , ce qui a été vérifié ultérieurement à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer 3000 de Malvern arrivé au laboratoire GEPEA en décembre 2016 (méthodologie détaillée en **Annexe I**). La **Figure 62** montre un exemple de ces distributions. Deux pics sont observés avec des Dv50 de 0,07 μm et 1,94 μm . Ce qui vérifie l'existence des gouttelettes de diamètre inférieur à la limite de détection du microscope. Il est important de signaler donc qu'une partie des gouttelettes fines pourraient traverser les pores de certaines membranes, particulièrement pour les membranes PVDF 0,4 μm et PVDF 1,5 μm ayant les seuils de coupure les plus importants. En plus, les gouttelettes les plus grosses des lipides pourraient être déformées par le cisaillement, ce qui faciliterait leur insertion notamment dans les pores des membranes les plus hydrophobes.

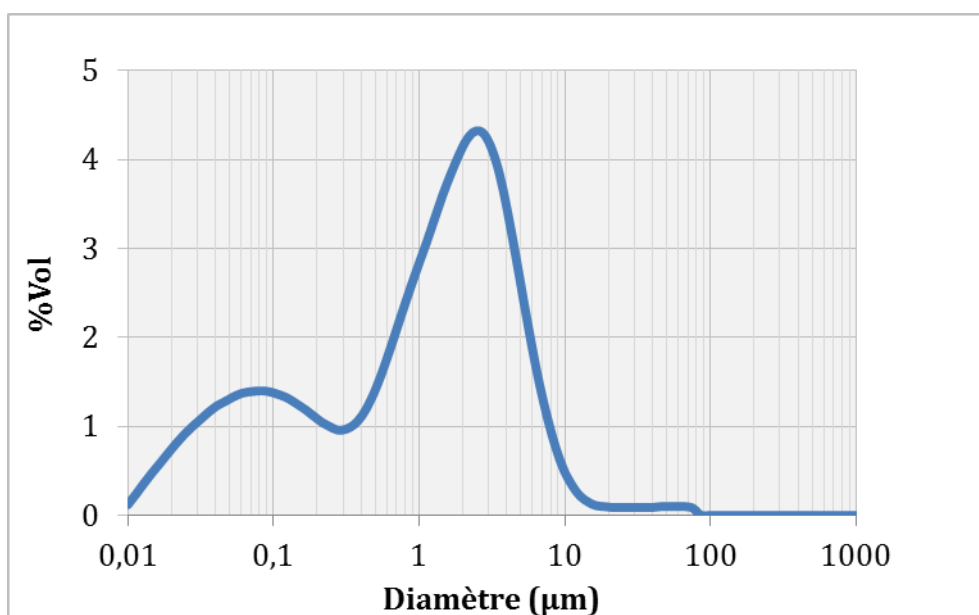


Figure 62. Distribution granulométrique initiale en volume d'une émulsion typique avant filtration, obtenue par granulométrie laser.

V.4.2. Analyse des flux et du colmatage

L'évolution du flux sera analysée en se basant entre autre sur l'hydrophilie des membranes, caractérisée par les angles de contact avec l'eau reportés dans le **Tableau 11**. Considérant qu'une membrane est dite hydrophobe si l'angle de contact est $> 90^\circ$, la seule membrane hydrophobe est la PVDF $0,4 \mu\text{m}$. La membrane PES 300 kDa est dans les limites hydrophobe/hydrophile. La membrane la plus hydrophile est la PAN 500 kDa suivie de la PES 200 kDa et ensuite de la PVDF $1,5 \mu\text{m}$.

La **Figure 63** donne l'évolution du flux de perméat pendant la concentration pour les essais sélectionnés pour comparaison. Ces expériences ont été réalisées à pression (P_w préalablement choisie), température (30°C) et vitesse tangentielle constantes (1 m.s^{-1}). Dans le cas des essais 1, 3, 10 et 13, les expériences ont été réalisées sur des membranes neuves. Dans le cas de l'essai 5, il s'agit d'une membrane PAN propre réutilisée. La comparaison des flux normalisés, présentée dans la **Figure 64** en complément des rapports du flux initial (J_i) et du flux à un $\text{FRV}=2$ ($J_{\text{FRV}=2}$) au flux à l'eau (J_{eau}) (J_i/J_{eau} et $J_{\text{FRV}=2}/J_{\text{eau}}$ respectivement) du **Tableau 28** permet de voir plus clairement la perte du flux pendant la filtration et met en évidence l'évolution du colmatage pour les différentes membranes.

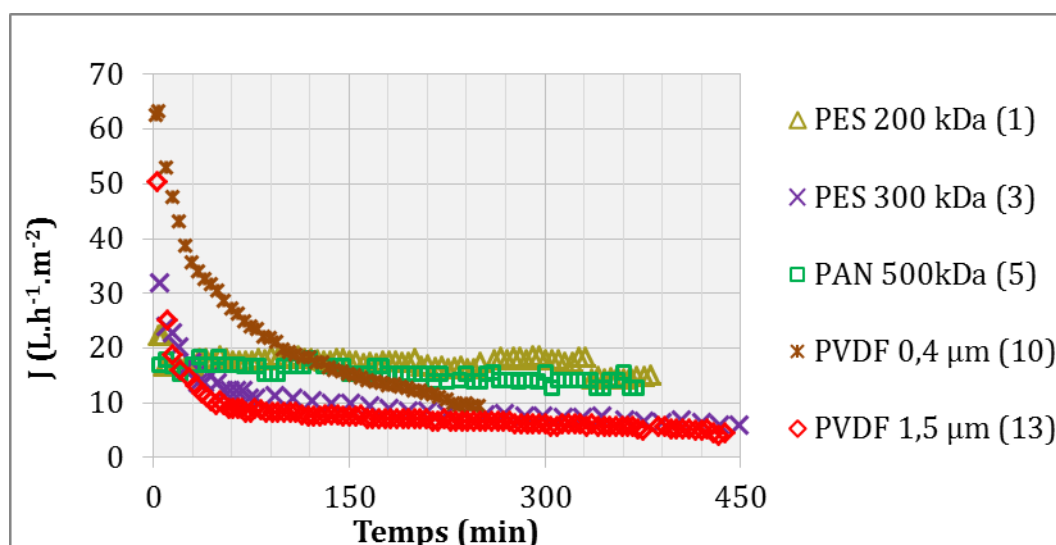


Figure 63. Evolution dans le temps du flux de perméat pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle.

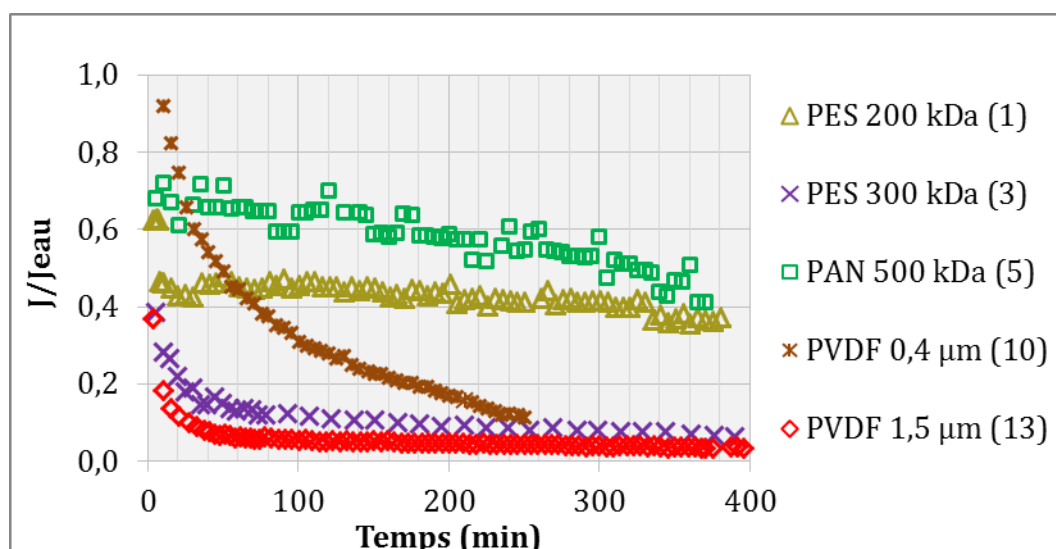


Figure 64. Évolution dans le temps du flux de perméat normalisé (J/Jeau) pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle.

Tableau 28. Flux initiaux de perméat J_i lors de la concentration de l'émulsion et flux initiaux normalisés J_i/J_{eau} des membranes testées

Membrane	Essai	J_i (FRV=1) (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	J_i FRV=1/ J_{eau}	$J_{FRV=2}/J_{eau}$	RFR _{FRV=1} (%)	RFR _{FRV=2} (%)	RFR _{FRV=3} (%)
PES 200 kDa	1	18	51	37	49	63	63
PES 300 kDa	3	42	51	8	49	92	-
PAN 500 kDa	5	17	70	58	30	42	52
PVDF 0,4 µm	10	66	83	20	17	80	88
PVDF 1,5 µm	13	46	34	3	66	97	-

RFR : réduction relative de flux

Dans la **Figure 63**, il est observé que les deux membranes en PVDF sont les membranes ayant au début de la filtration les flux de perméat les plus importants, ce qui est cohérent avec leurs diamètres des pores et leurs perméabilités à l'eau, les plus élevées. Elles présentent aussi les chutes de flux les plus prononcées avec la PES 300 kDa qui est aussi une membrane peu hydrophile. Dans le cas de la membrane PVDF 0,4 μm , l'hydrophobicité pourrait être une cause de cette chute, en particulier en début d'expérience, puisque un dépôt plus prononcé pourrait se développer sur cette membrane vu l'affinité de l'huile avec le matériau. Le flux normalisé J/J_{eau} pour la membrane PVDF 0,4 μm diminue fortement et régulièrement tout au long de la filtration. Cela qui peut se voir avec la réduction relative de flux RFR qui indique que cette membrane perd 80 % de son flux à l'eau à un FRV=2 (**Tableau 28**). Cela appuie également l'hypothèse d'un blocage progressif des pores tout au long de l'expérience. Dans le cas de la membrane PVDF 1,5 μm , la courbe de J/J_{eau} présente une chute rapide au cours de la première heure puis une stabilisation du flux. Même si la membrane présente une meilleure mouillabilité, une partie des gouttelettes de diamètre supérieur à 1,5 μm peuvent s'accumuler à la surface (blocage de pores ou accumulation). De plus la taille de pores plus importante permet un passage des fines gouttelettes à travers la membrane, confirmé par un perméat laiteux et non limpide, ce qui pourrait provoquer un colmatage par blocage partiel des pores mais aussi une adsorption dans le milieu poreux (réduction du diamètre des pores) et donc une chute de flux. C'est une des membranes avec la réduction relative de flux RFR la plus importante à FRV=2, moment auquel 97 % du flux à l'eau a été perdu. Pour ces deux membranes en PVDF, les gouttelettes des lipides peuvent être amenées à l'intérieur des pores même si sa taille est supérieure à la taille des pores. Ceci parce que les gouttelettes sont des corps déformables qui peuvent être forcées à entrer dans les pores par l'effet de la pression, si cette pression est supérieure à la pression capillaire de la phase huile (Hlavacek, 1995). Les membranes hydrophobes faciliteraient ce phénomène.

Certains auteurs ont fait des remarques concernant l'utilisation des membranes de microfiltration MF pour le traitement des émulsions. Ils considèrent que les membranes MF fournissent un flux de perméat plus important, mais qu'elles ont plus de tendance au blocage de pores. Ce serait moins le cas des membranes UF, qui donnent un flux de perméat plutôt stable puisque l'huile ne traverse pas la membrane (Hlavacek, 1995). Susan et al., 2017, ont mesuré des flux de perméat beaucoup plus importants pour des membranes en PVDF, entre 73-252 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, mais c'étaient des membranes plus hydrophiles (angle de contact $< 75^\circ$) avec des diamètres de pore entre 23 et 100 nm. Ils ont trouvé aussi des valeurs de réduction relative de flux RFR assez élevées. L'émulsion traitée avait une taille moyenne des gouttelettes de 0,3 μm .

La membrane PES 300 kDa a présenté un comportement très proche de la PVDF 1,5 μm , malgré les différences de seuil de coupure : réductions relatives de flux de 92 % et de 97 %

respectivement. Ce qui pourrait être expliqué par la mouillabilité proche de ces deux membranes, qui ont des angles de contact à l'eau de $89^{\circ} \pm 0,9^{\circ}$ et de $82^{\circ} \pm 0,7^{\circ}$ respectivement. Cependant le perméat est dans ce cas limpide. Les mécanismes de colmatage peuvent donc être différents. Un colmatage externe pour la membrane PES 300 kDa pourrait être envisagé.

Si les deux membranes en PES sont comparées, même si la valeur de J_i/J_{eau} est la même à un facteur de réduction volumique de $\text{FRV}=1$, le flux de la membrane 300 kDa à un $\text{FRV}=2$ est réduit à 8 % du flux à l'eau. Ceci indique que cette dernière membrane moins hydrophile et avec un seuil de coupure supérieur a développé un colmatage plus important. Ce colmatage se met en place rapidement au cours de la première heure de filtration. Il est probable que ce soit à cause de la formation d'un colmatage extérieur type gâteau, couplé dans le cas de la PES 300 kDa à un blocage de certains pores. La taille médiane des gouttelettes des émulsions filtrées dans les cas de ces deux membranes (déterminées par microscopie + analyse d'image) sont : $D_{v50} = 2,8 \mu\text{m}$ pour la PES 200 kDa, et $D_{v50} = 2,4 \mu\text{m}$ pour la PES 300 kDa. Mais il faut rappeler que ces valeurs correspondent aux gouttelettes les plus grosses ; les fines n'étant pas détectées au microscope. Dans les deux cas, le colmatage dû au blocage des pores est moins probable ou en tout cas devrait être beaucoup moins important que dans le cas de la PVDF $1,5 \mu\text{m}$ vu les différences entre la distribution de taille des gouttelettes des émulsions et le seuil de coupure.

Par ailleurs, les membranes de PAN 500 kDa et la PES 200 kDa, qui sont les plus hydrophiles, présentent des flux initiaux plus faibles mais stables pendant la filtration. À un facteur de réduction volumique de $\text{FRV} = 2$ la membrane PAN 500kDa présente encore 58 % de son flux à l'eau. Le maintien du flux est dû à l'hydrophilicité de la membrane, limitant l'accumulation d'huile et facilitant le passage de l'eau. La faible pente de la courbe J/J_{eau} montre une augmentation lente et progressive de la résistance due au colmatage. La diminution de flux au cours du temps pendant la filtration d'une émulsion sur des membranes hydrophiles a été expliqué par d'autres auteurs par l'adsorption de surfactant dans les pores, par la couche de polarisation de la concentration et par le blocage de pores par les gouttelettes d'huile (S. Lee et al., 1984; Lipp et al., 1988).

La **Figure 65** donne la variation des flux de perméat en fonction du facteur de réduction volumique FRV .

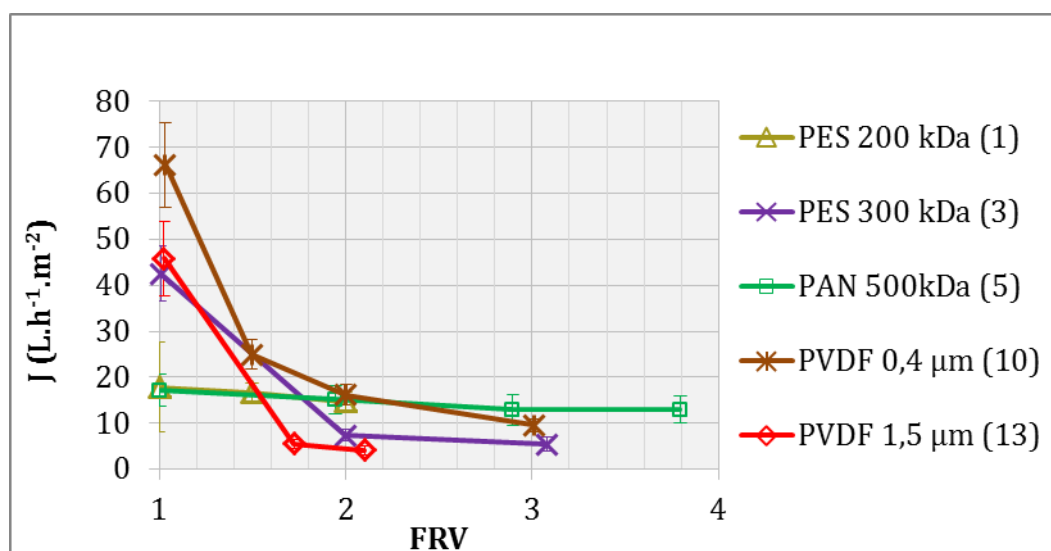


Figure 65. Evolution du flux de perméat avec le facteur de réduction volumique FRV pendant la concentration de l'émulsion à 30 °C et 1 m.s⁻¹ de vitesse tangentielle.

Si les courbes sont comparées à FRV=2, les membranes de PAN 500 kDa, PES 200 kDa et PVDF 0,4 µm montrent un flux de perméat très proche, mais si la filtration continue, les tendances montrent un flux pour la PAN légèrement supérieur. La performance des membranes en PES 300 kDa et PVDF 1,5 µm en termes du flux de perméat est moins importante que pour les autres membranes lorsque l'émulsion est plus concentrée, c'est-à-dire que ces membranes développent un colmatage plus prononcé lorsque la concentration en huile augmente.

En résumé, selon l'analyse des flux au cours de la filtration les membranes PAN 500 kDa et PES 200 kDa, qui sont les membranes les plus hydrophiles, présentent un flux plus stable pendant la concentration, ce qui se traduit en un développement du colmatage moins important. En revanche, les membranes en PVDF 0,4 µm, PES 300 kDa et PVDF 1,5 µm, qui ont une mouillabilité à l'eau moins importante, subissent plus le colmatage par les lipides de l'émulsion et présentent une diminution de flux beaucoup plus importante au cours de la concentration.

V.4.3. Concentration de l'huile et taux de rétention

Le **Tableau 29** et le **Tableau 30** donnent l'évolution de la proportion d'huile respectivement dans le rétentat dans le perméat ainsi que la matière sèche au cours de la filtration. La quantité d'huile

des échantillons a été déterminée à partir des résultats des analyses de matière sèche, compte tenu des sels présents dans les résidus. Les suivis du pH et de la conductivité pendant la filtration (résultats présentés en **Annexe VII**) ont montré que les sels de phosphate du tampon utilisé pour la préparation de l'émulsion ne sont pas retenus par la membrane. La concentration correspondante des sels est donc considérée constante dans le rétentat et dans le perméat et égale à la concentration initiale dans le tampon, soit 0,08 % w/w pour tout FRV.

Tableau 29. Variation du pourcentage de matière sèche M.S. et du pourcentage d'huile dans le rétentat avec le facteur de réduction volumique FRV

Membrane	Essai	FRV 1		FRV 1,5		FRV 2		FRV 3		FRV 4	
		M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)
PES 200 kDa	1	2,18	2,10	3,18	3,10	4,10	4,02	-	-	-	-
PES 300 kDa	3	2,29	2,21	-	-	4,28	4,20	6,35	6,27	-	-
PAN 500 kDa	5	2,17	2,09	-	-	3,94	3,86	5,83	5,75	7,55	7,47
PVDF 0,4 µm	10	1,85	1,77	2,42	2,34	3,59	3,51	6,40	6,32	-	-
PVDF 1,5 µm	13	2,20	2,12	-	-	4,23	4,15	-	-	-	-

Tableau 30. Variation du pourcentage de matière sèche M.S. et du pourcentage d'huile dans le perméat avec le facteur de réduction volumique FRV

Membrane	Essai	FRV 1,5		FRV 2		FRV 3		FRV 4	
		M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)	M.S. (%)	huile (%)
PES 200 kDa	1	0,05	0	0,06	0	-	-	-	-
PES 300 kDa	3	-	-	0,06	0	0,05	0	-	-
PAN 500 kDa	5	-	-	0,06	0	0,07	0	0,07	0
PVDF 0,4 µm	10	0,05	0	0,05	0	0,05	0	-	-
PVDF 1,5 µm	13	-	-	0,14	0,06	-	-	-	-

Parmi les échantillons de perméat, le seul à avoir une matière sèche supérieure à la concentration de sels du tampon (0,08 % w/w) est l'échantillon de la membrane PVDF 1,5 µm à FRV=2 (**Tableau 30**). Ainsi, c'est le seul échantillon sur lequel une quantité d'huile a pu être déterminée. Pour les

autres échantillons, la quantité d'huile serait trop faible, voire inexistante pour être détectée par la méthode d'analyse employée.

La **Figure 66** montre la relation linéaire entre les logarithmes du facteur de concentration FC et du facteur de réduction volumique FRV qui a été vérifiée dans tous les cas. Cela indique que le taux de rétention reste constant, ou varie peu, au cours de la filtration.

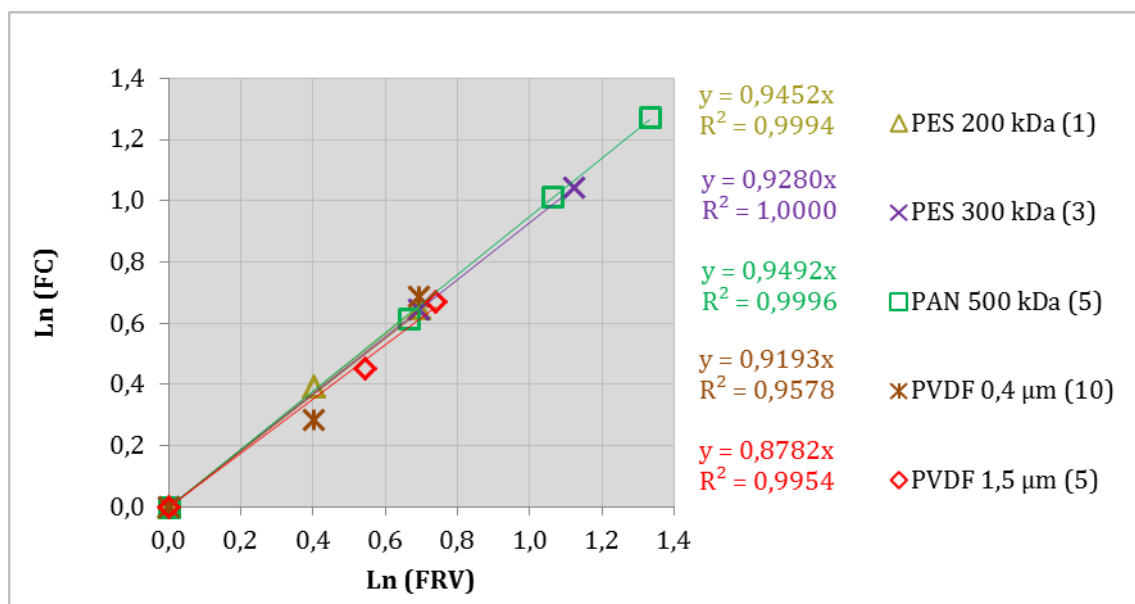


Figure 66. Variation du logarithme du facteur de concentration d'huile en fonction du logarithme du facteur de réduction volumique

Les droites de la **Figure 66** ne montrent pas de différence significative de rétention de l'huile par les différentes membranes. Cependant, dans le cas des membranes en PVDF 1,5 μm et 0,4 μm , un passage d'huile dans le perméat a été constaté : le perméat était laiteux et non limpide comme pour les autres membranes.

Le taux de rétention TR a été calculé à partir des pentes des droites de la **Figure 66**, selon l'équation reliant FC et FRV (**Equation 40**). Les valeurs obtenues des taux de rétention pour les expériences sélectionnées sont présentées dans le **Tableau 31**.

Tableau 31. Taux de rétention TR et pourcentage d'huile retenu dans le système après filtration

Membrane	Essai	TR
PES 200 kDa	1	0,95
PES 300 kDa	3	0,93
PAN 500 kDa	5	0,95
PVDF 0,4 μm	10	0,92
PVDF 1,5 μm	13	0,87

Même si toutes les expériences n'ont pas été effectuées jusqu'au même facteur de réduction volumique à cause des flux de perméat faibles pour certaines membranes, les taux de rétention sont tous proches de 0,93 sauf pour la PVDF 1,5 μm qui a montré une rétention un peu plus faible, de 0,87.

Les membranes les plus hydrophiles et présentant un faible seuil de coupure semblent avoir un taux de rétention supérieur.

Les membranes PVDF ne sont pas performantes en termes de rétention d'huile. Cependant, elles pourraient être intéressantes pour déstabiliser les gouttelettes de l'émulsion par perméation à travers le milieu poreux, comme proposé par plusieurs auteurs (Daiminger et al., 1995; Hlavacek, 1995; Zhu et al., 2014), en optimisant les conditions opératoires, notamment l'augmentation de la PTM.

V.4.4. Effet de la filtration sur la distribution de taille des gouttelettes d'huile

L'objectif de cette partie de l'étude est d'identifier l'éventuelle coalescence ou division des gouttelettes de lipides pendant la filtration. L'évolution de ces distributions granulométriques a été suivie par analyse microscopique couplée à un traitement d'images comme décrit en §II.4.13.1. Un exemple des images obtenues par microscopie est présenté dans la **Figure 67**. Il est important de rappeler que ces distributions ne représentent que la partie des gouttelettes les plus grosses qui est en dessus de la limite de détection du microscope utilisé (0,5 μm).

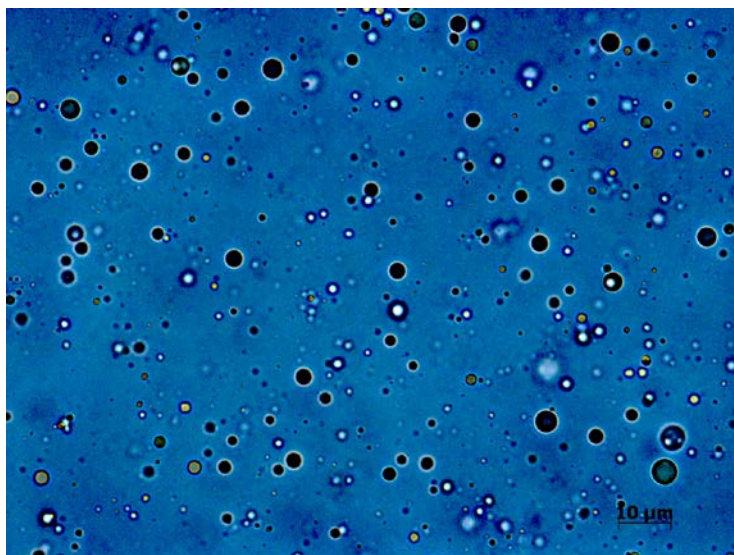


Figure 67. Observation microscopique des gouttelettes de lipides d'une émulsion avant filtration. Membrane PVDF 1,5 μm (5).

Les distributions en volume des gouttelettes du rétentat de diamètre supérieur à 0,5 μm pour une sélection d'essais aux différents facteurs de réduction volumique FRV sont présentées de la **Figure 68** à la **Figure 72**. Les grandeurs caractéristiques de ces distributions, Dv10, Dv50 et Dv90, (diamètres en-dessous desquels se trouvent 10 %, 50 % et 90 % des gouttelettes respectivement, en volume) sont résumés dans le **Tableau 32**. Finalement, afin de mieux observer l'évolution de la taille avec la concentration, la **Figure 73** montre la variation des Dv50 normalisés par le Dv50 de l'émulsion initiale pour les différents FRV.

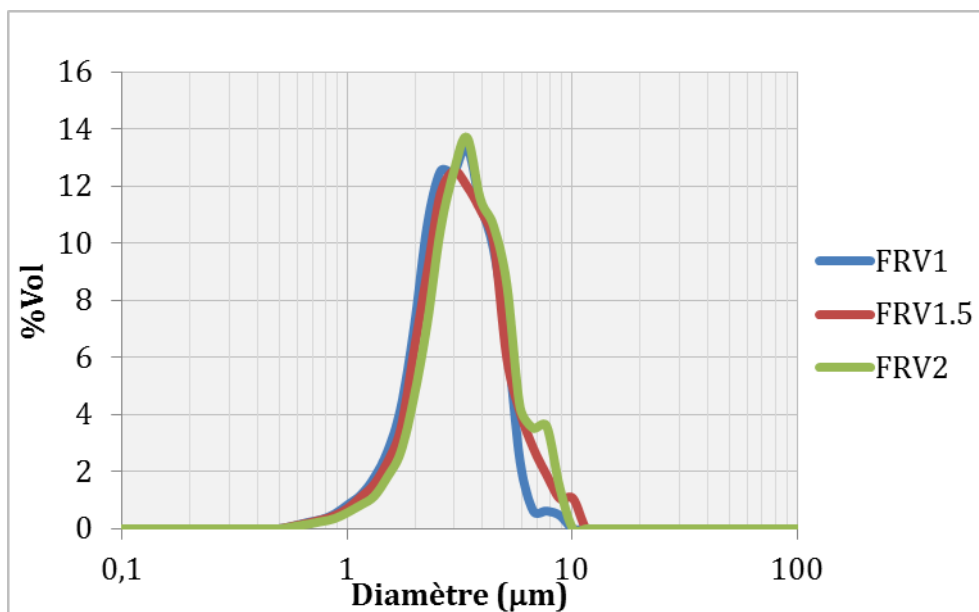


Figure 68. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PES 200 kDa (1)

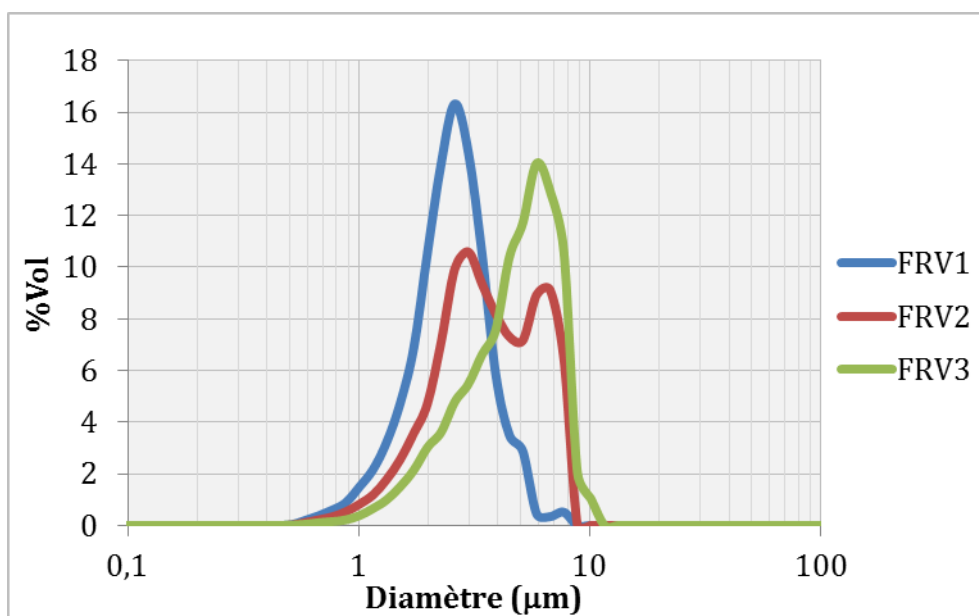


Figure 69. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PES 300 kDa (3)

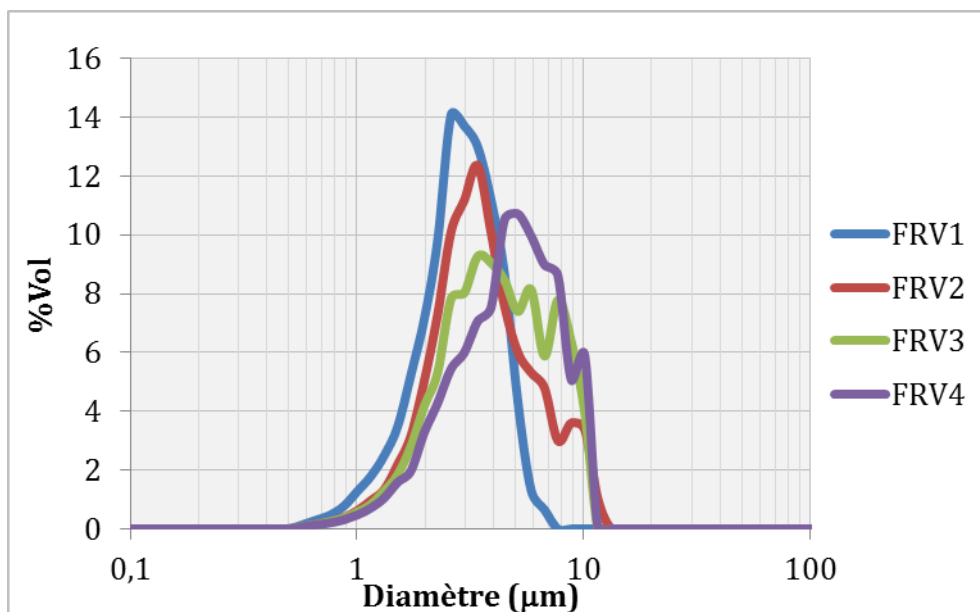


Figure 70. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PAN 500 kDa (5)

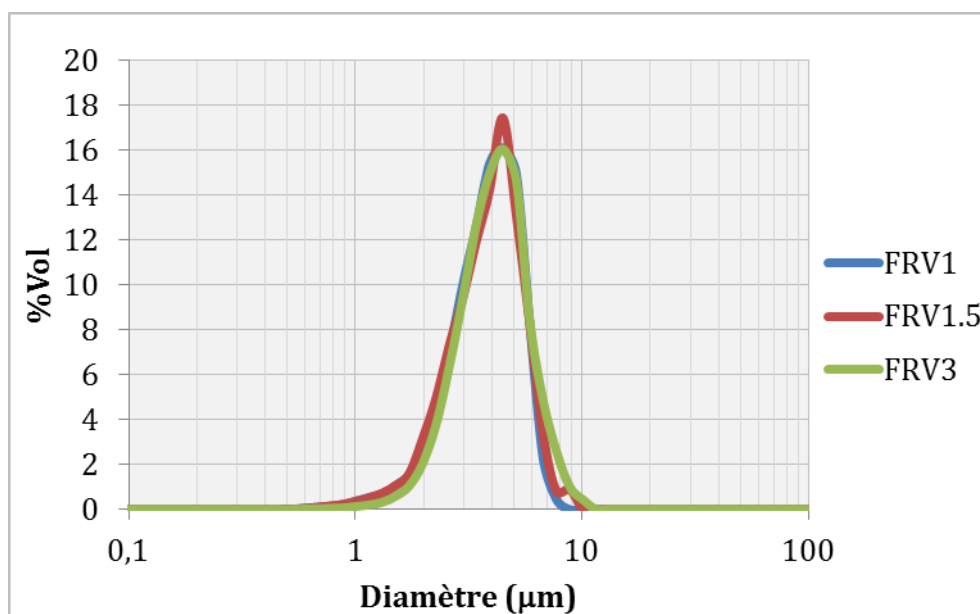


Figure 71. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 0,4 μm (10)

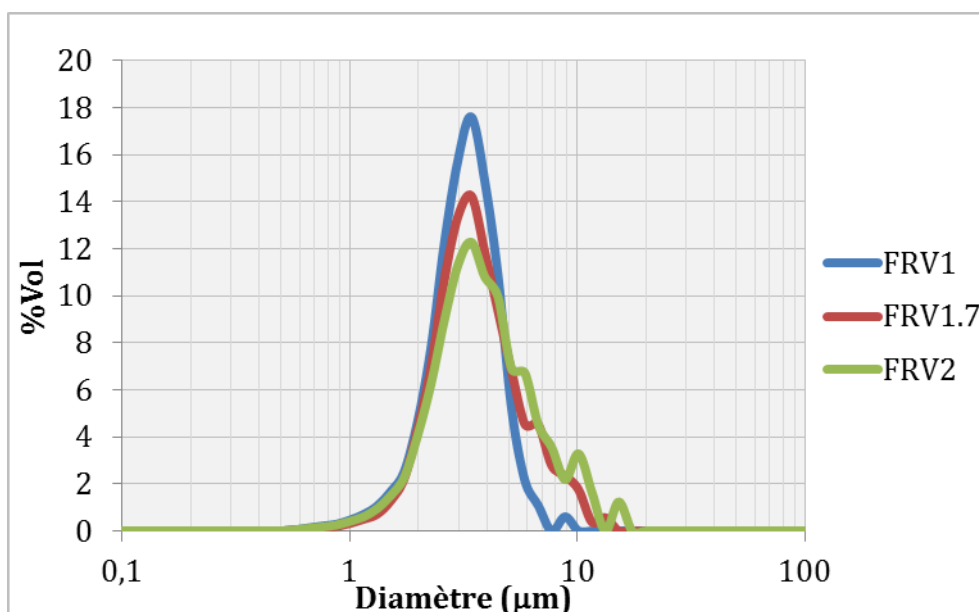


Figure 72. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 µm (13)

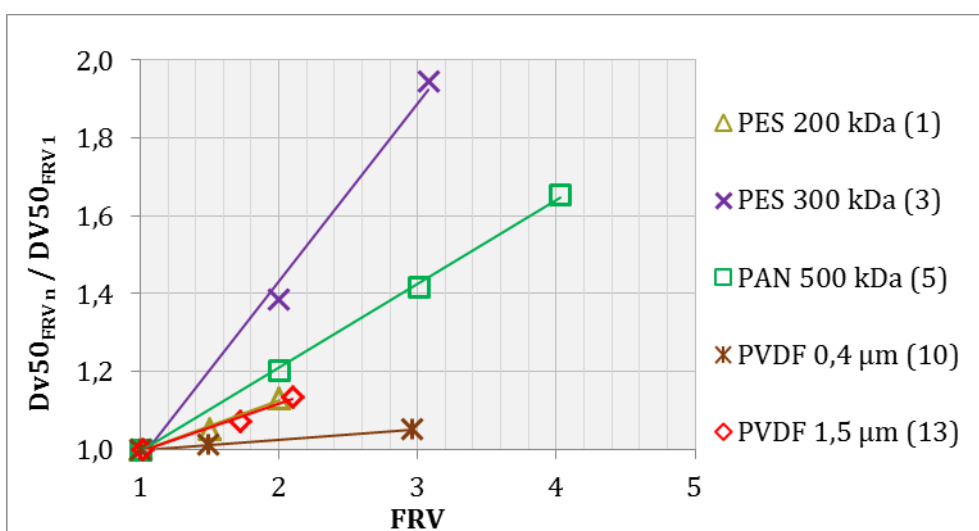


Figure 73. Evolution des Dv50 normalisés des gouttelettes du rétentat avec le facteur de réduction volumique FRV lors de la concentration de l'émulsion

Tableau 32. Diamètres Dv10, Dv50 et Dv90 caractérisant les distributions en volume des gouttelettes des lipides dans le rétentat lors de la filtration de l'émulsion pour une sélection de membranes

Membrane	Essai	FRV	Dv10 (µm)	Dv50 (µm)	Dv90 (µm)
PES 200 kDa	1	1	1,6	2,8	4,6
		1,5	1,7	3,0	5,3
		2	1,8	3,2	5,8
PES 300 kDa	3	1	1,4	2,4	3,7
		2	1,7	3,3*	6,4
		3	2,0	4,6	7,1
PAN 500 kDa	5	1	1,5	2,7	4,2
		2	1,8	3,2	7,1
		3	1,8	3,8	7,8
		4	2,0	4,4	7,9
PVDF 0,4 µm	10	1	2,1	3,7	5,2
		1,5	2,1	3,7	5,4
		3	2,4	3,8	5,8
PVDF 1,5 µm	13	1	1,9	3,0	4,4
		1,7	2,0	3,3	6,3
		2	2,0	3,4	7,2

* Ø Pic 1=3,0 Ø Pic 2=6,7

La **Figure 73** montre une augmentation de la taille des gouttelettes de diamètre supérieur à 0,5 µm au cours de la concentration plus importante pour les essais avec les membranes en PES 300 kDa et PAN 500 kDa que pour les autres membranes. Il a été observé que cette augmentation est linéaire avec le facteur de réduction volumique FRV. Ceci peut être expliqué par le fait que le nombre de collisions des gouttelettes augmente au fur et à mesure que le volume de la phase aqueuse diminue. Si l'interface a été déstabilisée par la filtration, ces collisions peuvent donner lieu au phénomène de coalescence, ce qui a été vérifié avec ces expériences.

La largeur des distributions obtenues au microscope montre des gouttelettes allant entre 0,5 µm (limite de détection du microscope) et ≈ 10 µm. Les distributions obtenues des émulsions initiales sont plutôt monomodales sur cette gamme de taille, tandis qu'à des FRV > 1 des irrégularités apparaissent pour les plus grands diamètres. Ces courbes irrégulières, notamment celles de la PES 300 kDa à FRV = 2 (bimodal, pics à 3,0 et 6,7 µm) (**Figure 69**), celles de la PAN 500 kDa à tous les FRV > 1 (**Figure 70**) et de la PVDF 1,5 µm à tous les FRV > 1 (**Figure 72**), témoignent de l'apparition du phénomène de coalescence : les gouttelettes les plus grosses détectées au microscope se font de plus en plus présentes avec la concentration de l'huile. Il ne faut pas oublier que ces analyses ont été faites sur la base des grosses gouttelettes observées au microscope mais qu'il existe aussi une partie de fines dont le comportement devrait être analysé avec granulométrie laser.

Les membranes PES 200 kDa et PVDF 0,4 μm , présentent des distributions proches aux différents FRV. Le DV50 n'a pas augmenté de plus de 5 % à un FRV=1,5. Ces résultats contrastent avec l'augmentation de taille très importante obtenue pour la PES 300 kDa et la PAN 500 kDa. Pour un FRV = 2 le Dv50 a augmenté de 20 et 40 % respectivement. À un FRV = 3, le Dv50 pour la PES 300 kDa a presque doublé.

Le suivi de la granulométrie des gouttelettes dans le perméat au cours de la filtration a été fait uniquement pour l'essai 13 de PVDF 1,5 μm , pour lequel un passage d'huile à travers la membrane a été observé. Pour la membrane PVDF 0,4 μm , cela n'a pas été possible à cause de la faible concentration des échantillons, même si la présence des gouttelettes a été constatée lors des observations microscopiques. Les grandeurs caractéristiques des granulométries du perméat de PVDF 1,5 μm sont présentées dans le **Tableau 33**. Dans les cas des perméats les distributions ont été obtenues avec l'analyse d'un nombre supérieur d'images du microscope afin d'avoir un nombre de gouttelettes suffisant pour avoir une taille moyenne invariable. Les distributions correspondantes sont montrées dans la **Figure 74**. Les distributions de taille de gouttelettes dans les perméats sont multimodales à trois pics. Le diamètre correspondant de ces pics ne changent pas entre le FRV 1,7 et 2. Comme dans le rétentat, ces distributions témoignent d'une augmentation de taille mais la relation avec le facteur de réduction volumique FRV n'est pas linéaire et semble plutôt aléatoire. La coalescence commence probablement à l'intérieur des pores par la déstabilisation de l'interface comme suggéré par Hlavacek, 1995.

Tableau 33. Diamètres Dv10, Dv50 et Dv90 caractérisant les distributions en volume des gouttelettes de lipides dans le perméat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 μm

Membrane	Essai	FRV	Dv10 (μm)	Dv50 (μm)	Dv90 (μm)	Ø Pic 1 (μm)	Ø Pic 2 (μm)	Ø Pic 3 (μm)
PVDF 1,5 μm	13	1*	1,9	3,0	4,4	-	-	-
		1,7	2,2	4,5	8,0	3,409	5,122	8,816
		2	2,1	4,1	7,3	3,409	5,122	8,816

*Distribution initiale de l'émulsion

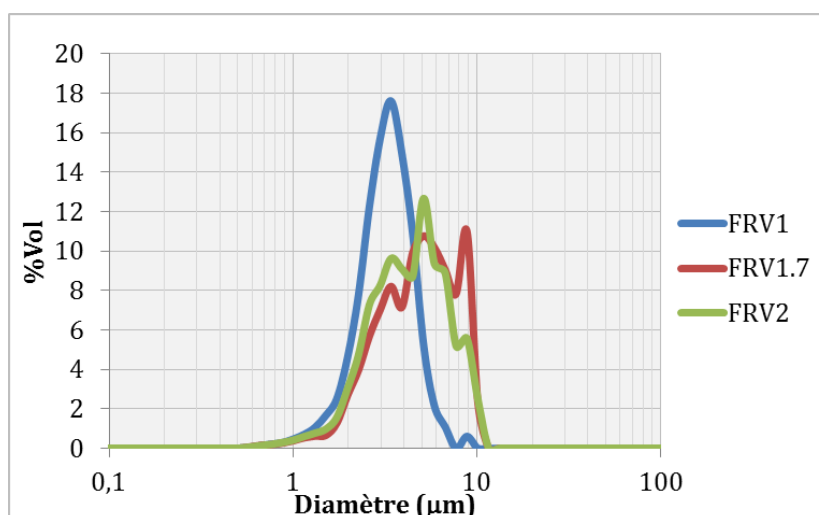


Figure 74. Distribution granulométrique en volume des gouttelettes des lipides du perméat lors de la filtration de l'émulsion pour la membrane PVDF 1,5 µm (13)

V.4.5. Bilan matière. Détermination de la quantité d'huile restant dans le système et dans la membrane

L'évaluation de la quantité d'huile restant dans le système (sur la membrane et sur d'autres composants du pilote comme les tuyaux, le collecteur support de la membrane, parmi d'autres) a été faite à partir d'un bilan de matière sur l'huile. Les équations correspondantes (**Equation 48 à 53**) ont été présentées dans la section §II.4.12 du chapitre de Matériels et Méthodes. Ce bilan a été réalisé à partir des résultats de matière sèche des échantillons de perméat et de rétentat prélevés pendant la concentration de l'émulsion (**Tableau 29** et **Tableau 30**).

Lors d'une étude réalisée en parallèle au laboratoire GEPEA, la quantité d'huile restant pendant la filtration de l'émulsion, sur une membrane PAN 500 kDa du même fournisseur (Orelis) a été déterminée. Le système utilisé pour cette filtration était un pilote de filtration dynamique FD. La masse d'huile retenue sur la membrane par unité de surface était de $q_{FD}^{PAN} = 0,8595 \text{ g.m}^{-2}$ pour une concentration d'huile dans l'émulsion de 2,2 % w/w (Villafaña, 2017). Sur la base de ce résultat une estimation de la quantité d'huile restant sur la membrane PAN 500 kDa et dans le pilote Rayflow (q_{FT}^{PAN}) utilisé dans ce travail a été calculée. Ceci est possible en supposant que l'adsorption d'huile sur la membrane suit une loi linéaire avec la concentration, donc le coefficient q_{FD}^{PAN} (défini par l'**Equation 60**) permet de faire le calcul selon l'**Equation 61**:

$$q_{FT}^{PAN} = \frac{q_{FD}^{PAN}}{c_{FD}^{PAN}} \cdot c_{FT}^{PAN} \quad \text{Eq. 60}$$

$$m_{\text{huile membrane}} = q_{FT}^{PAN} \cdot s \quad \text{Eq. 61}$$

Avec

q_{FD}^{PAN} ; q_{FT}^{PAN}	masse d'huile retenue sur la membrane PAN par unité de surface lors d'une expérience réalisée dans un pilote de filtration dynamique FD ou tangentielle FT (g.m ⁻²)
c_{FD}^{PAN} , c_{FT}^{PAN}	proportion d'huile dans le rétentat après filtration de l'émulsion par filtration dynamique et tangentielle, respectivement
s	surface de la membrane (m ²)

De cette manière, $q_{FT}^{PAN} = 1,521 \text{ g}_{\text{huile}}.\text{m}^{-2}$, c'est-à-dire 4,4 % de la quantité total d'huile de l'émulsion. La quantité perdue dans le pilote, peut ainsi être calculé comme la différence entre la masse totale d'huile manquant :

$$m_{\text{huile pilote}} = m_{\text{huile manquant}} - m_{\text{huile membrane}} \quad \text{Eq. 62}$$

Les quantités initiales estimées d'huile $M_{i \text{ huile}}$ et celles restant dans le système et/ou sur la membrane sont présentées dans le **Tableau 34**. La totalité d'huile perdue pendant la filtration se répartirait en 1,1 % qui resterait dans la membrane et 98,9 % dans le pilote. L'estimation de l'huile restant sur les autres membranes (**Tableau 34**) a été calculée en supposant que ce pourcentage d'huile perdue dans le pilote reste constant pour toutes les expériences. Aucune estimation n'a été faite pour la membrane PVDF 0,4 µm puisque comme précisé précédemment, l'huile présente dans le perméat n'a pas été déterminée.

Tableau 34. Quantité d'huile perdue dans le système après concentration de l'émulsion à un FRV=2

Membrane	Essai	$m_{i \text{ huile}}$ (g)	$m_{f \text{ huile}}$ (g)	$m_{\text{huile manquant}}$ (g)	% huile manquant	$m_{\text{huile memb.}}$ (g)	$m_{\text{huile pilote}}$ (g)	q_{FT} (g.m ⁻²)
PES 200 kDa	1	60,020	57,495	2,525	4,2	0,029	2,496	2,218
PES 300 kDa	3	36,217	34,487	1,730	4,8	0,020	1,710	1,520
PAN 500 kDa	5	34,421	32,690	1,731	5,0	0,020	1,711	1,521
PVDF 0,4 µm	10	36,061	30,111	5,950	16,5	-	-	-
PVDF 1,5 µm	13	36,129	34,092	2,037	5,6	0,023	2,013	1,789

q_{FT} = quantité d'huile accumulée sur la membrane par unité de surface (FT : filtration tangentielle).
 $m_{f \text{ huile}}$: masse d'huile récupérée dans le rétentat, perméat et échantillons prélevés à FRV=2

À l'exception de la membrane en PVDF 0,4 μm , les pourcentages d'huile perdue dans le système ou sur la membrane sont très proches, entre 4 et 6%. La valeur beaucoup plus importante pour la membrane en PVDF 0,4 μm peut être expliquée par la quantité d'huile constatée dans le perméat qui n'a pas été quantifiée à cause de la faible concentration des échantillons et des limitations de l'appareil utilisé pour l'analyse. Il est possible aussi que la perte soit plus grande dans la membrane, ce qui expliquerait le fort colmatage.

De cette façon, les membranes de PES 200 kDa et PVDF 1,5 μm seraient celles sur lesquelles se perdraient la quantité la plus importante d'huile de l'émulsion par m^2 de membrane. Dans le cas de la membrane en PVDF 1,5 μm , ce résultat serait en accord avec l'analyse de colmatage dans laquelle il a été déterminé que cette membrane développait un des colmatages les plus prononcé. Dans le cas de la membrane PES 200 kDa, une accumulation d'huile plus importante que pour les autres membranes n'était pas attendue selon les valeurs obtenues pour la réduction relative de flux RFR (**Tableau 28**) qui indiquent une perte de flux moins importante que pour les membranes PES 300 kDa et que pour les deux membranes PVDF. Il est possible que la structure du dépôt formé sur la membrane ne soit pas compacte mais poreuse. Et que de cette façon l'impact sur la réduction du flux ne soit pas plus importante comparé aux autres membranes.

V.5. Évaluation de l'efficacité du nettoyage

Cette partie de l'étude a été réalisée pour déterminer s'il était aisé de retrouver la perméabilité à l'eau initiale des membranes. Le nettoyage a été fait comme décrit en §II.4.10 avec un rinçage initial à l'eau, suivi d'un nettoyage avec des solutions diluées de SDS et d'EtOH, alternés avec différents rinçages. Les perméabilités des membranes propres, après la filtration et après chaque étape de nettoyage ont été déterminées. La perméabilité à la fin du nettoyage est notée $L_{\text{après nett. EtOH}}$. Le **Tableau 35** montre les résultats de ces expériences.

Tableau 35. Perméabilités à l'eau avant et après nettoyage à 30 °C et 1 m⁻¹.s⁻¹ de vitesse tangentielle. Récupération de la perméabilité à l'eau après filtration de l'émulsion FRR

	PES 200 kDa (1)	PES 300 kDa (3)	PAN 500 kDa (*)	PVDF 0,4 µm (12)	PVDF 1,5 µm (13)
Lp_{eau} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	157	436	325	328	670
Lp_{fin concentration} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	59	21	162	47	17
Lp_{après rinçage eau} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	60	27	196	-	202
Lp_{après nett. SDS} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	140	219	309	-	574
Lp_{après nett. EtOH} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	122	234	293	69	573
FRR = Lp_{eau} récup. après nett. (%)	78	54	90	21	86

*Expérience initiale réalisée pour la définition du protocole de nettoyage. FRR=ratio de récupération de flux

En général, une membrane est considérée propre quand FRR > 90 %, c'est-à-dire quand la perméabilité à l'eau est récupérée au-delà de cette valeur. Ceci est le cas pour la membrane PAN 500 kDa et la membrane en PVDF 1,5 µm qui a également un FRR proche de 90 %.

Ces expériences montrent également que la membrane en PVDF 0,4 µm est particulièrement difficile à nettoyer, avec le protocole utilisé, qui n'a permis la récupération que de 21 % de la perméabilité initiale à l'eau. Pour cette membrane les données de Lp après rinçage à l'eau et après SDS ne sont pas disponibles mais le même protocole de nettoyage a été suivi pour toutes les membranes.

Le rinçage à l'eau n'a eu d'effet que sur la membrane PVDF 1,5 µm. Dans ce cas 30% de la perméabilité de la membrane propre a été récupérée avec cette étape alors que pour les autres membranes de nature différente la perméabilité n'a presque pas changée après le rinçage avec de l'eau.

Lors des comparaisons des perméabilités après SDS et après EtOH des membranes PES 200 kDa et PAN 500 kDa, une légère diminution de perméabilité est observée entre les deux étapes. Ceci pourrait être expliqué par la présence de traces de SDS qui pourraient rester après la première étape mais qui sont éliminées ensuite par le rinçage avec de l'EtOH. Le SDS est aussi utilisé en mélange avec un autre alcool comme testé par Hu et al., 2003. Ces auteurs ont testé une solution diluée de SDS/pentanol 1,9/3,7 % w pour nettoyer des membranes en PVDF et en PES utilisées dans la filtration d'une émulsion d'huile dans l'eau H/E préparée à partir d'huile pour moteur. Ces auteurs ont rapporté la récupération de 96 % de la perméabilité à l'eau avec la solution employée.

Les nettoyages les moins efficaces ont été ceux des membranes PVDF 0,4 µm suivis par les membranes PES. Dans ces cas il serait nécessaire de tester d'autres produits plus adaptés pour

l'élimination de ce type de colmatage. Par exemple, les membranes en PES utilisés dans l'industrie laitière sont traités avec une solution basique pour l'élimination du composant organique du colmatage (Diagne, 2013). Il est important de souligner que dans ce travail, des solutions diluées de NaOH et de HNO₃, ont été testés sur une membrane colmatée de PAN, mais ils se sont avérés inefficaces sur ce matériau. Ces solutions n'ont pas été testées sur les membranes en PES ni sur les PVDF. C'est pourquoi, le protocole de nettoyage proposé devra être revu pour être adapté et optimisé dans le cas d'une étude approfondie sur des membranes autres que PAN.

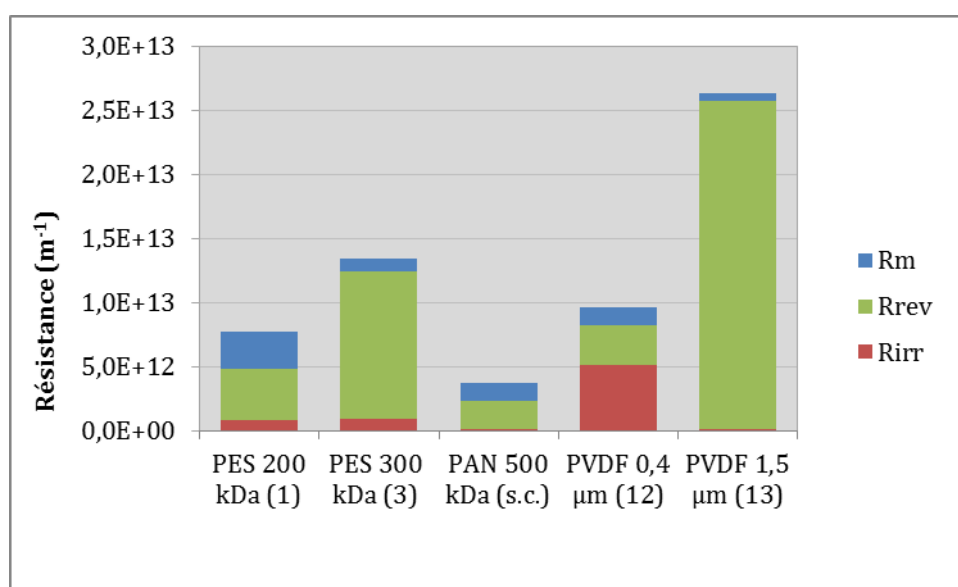
V.6. Évaluation des résistances dues au colmatage

La diminution du flux de perméat pendant la filtration est une conséquence directe de l'augmentation de la résistance du milieu poreux au passage de l'eau. Cette hausse est entraînée par le développement de nouvelles résistances dues à la polarisation de la concentration et au colmatage. Le **Tableau 36** et la **Figure 75** montrent les résistances des membranes propres R_m et les résistances réversibles R_{rev} et irréversible R_{irr} développées lors des essais de concentration de l'émulsion. Ceux-ci correspondent aux essais réalisés avant le nettoyage dont l'analyse a été présentée dans le point précédent. Les résistances ont été calculées à partir des perméabilités obtenues avant et après nettoyage et des flux à un facteur de concentration $FRV=2$. La méthode de calcul a été présentée en §II.4.11 de Matériels et Méthodes.

Tableau 36. Résistances totale R_{tot} , réversible R_{rev} , irréversible R_{irr} , et résistance du colmatage R_f de quelques membranes à $FRV=2$

	PES 200 kDa (1)	PES 300 kDa (3)	PAN 500 kDa (*)	PVDF 0,4 μm (12)	PVDF 1,5 μm (13)
R_m (m^{-1})	2,9E+12	1,0E+12	1,4E+12	1,4E+12	6,7E+11
R_{rev} (m^{-1})	4,0E+12	1,2E+13	2,2E+12	3,1E+12	2,6E+13
R_{irr} (m^{-1})	8,2E+11	8,9E+11	1,5E+11	5,1E+12	1,1E+11
R_{tot} (m^{-1})	7,7E+12	1,3E+13	3,7E+12	9,6E+12	2,6E+13
R_m/R_{tot} (%)	37,3	7,7	37,4	14,3	2,5
R_{rev}/R_{tot} (%)	52,1	85,8	58,5	32,2	97,0
R_{irr}/R_{tot} (%)	10,6	6,6	4,1	53,5	0,4
R_f/R_{tot} (%)	62,7	92,3	62,6	85,7	97,5

R_m : Résistance hydraulique de la membrane propre. R_{rev} : Résistance due au colmatage réversible (qui inclut la résistance chimiquement et physiquement réversible). R_{irr} : Résistance due au colmatage irréversible qui reste malgré le nettoyage. R_{tot} : Résistance totale à l'écoulement (composé par R_m , par la résistance due au colmatage et la résistance due à la polarisation de concentration). cf. §1.4.2.2.3 pour plus de détails sur les résistances. *Expérience initiale réalisée pour la définition du protocole de nettoyage.

Figure 75. Résistances totale, réversible et irréversible de quelques membranes à $FRV=2$

Comme il est observé dans la **Figure 75**, la résistance R_m (de la membrane propre) la plus importante est celle de la membrane en PES 200 kDa. Elle est entre 2 et 4 fois celle des autres membranes. C'est cohérent avec le faible seuil de coupure. A l'opposé, la résistance R_m la plus faible a été obtenue pour la membrane en PVDF 1,5 μm , ayant le diamètre des pores le plus important.

La membrane ayant la résistance totale la plus importante à $FRV=2$ (hauteur total des barres de la **Figure 75**) est la membrane en PVDF 1,5 μm suivi de la PES 300 kDa. La PVDF 1,5 μm montre une résistance totale entre 2 et 7 fois plus élevée que celles des autres membranes. Ce résultat confirme les constats réalisés dans les analyses de flux et de colmatage : cette membrane a montré un développement très fort du colmatage au cours de la filtration, s'opposant de plus en plus au passage du liquide à travers la membrane, ce qui se traduit en une diminution de flux et en une hausse très importante de sa résistance totale. Malgré ce désavantage, la résistance développée est majoritairement réversible.

Parmi toutes les membranes, celle en PVDF 0,4 μm , a présenté la résistance irréversible (R_{irr}) la plus importante (**Tableau 36**). Ce qui est cohérent avec le fort colmatage obtenu et l'hydrophobicité de la membrane. Les interactions plus fortes entre le matériau et l'huile comparé aux autres membranes provoqueraient une installation plus importante du colmatage irréversible.

La membrane de PAN 500 kDa montre les meilleures performances, avec une résistance totale beaucoup plus faible que les autres et une résistance due au colmatage représentant un des plus faibles pourcentages, ce qui est cohérent avec le fait qu'elle est la plus hydrophile.

Lorsque l'évolution de la résistance totale de la membrane au cours de la filtration est analysée (**Figure 76**), il est observé une hausse subite des résistances des membranes PVDF 1,5 μm , PES 300 kDa suivies par la PVDF 0,4 μm . Au contraire, la membrane en PES 200 kDa et la PAN 500 kDa montrent une variation très faible de la résistance, voir une stabilisation dans le cas de la PAN 500 kDa. Cette caractéristique de ces deux dernières membranes s'avère très intéressante pour la concentration de l'émulsion car cela indique une stabilisation du colmatage dans le temps et donc un flux de perméat stable également.

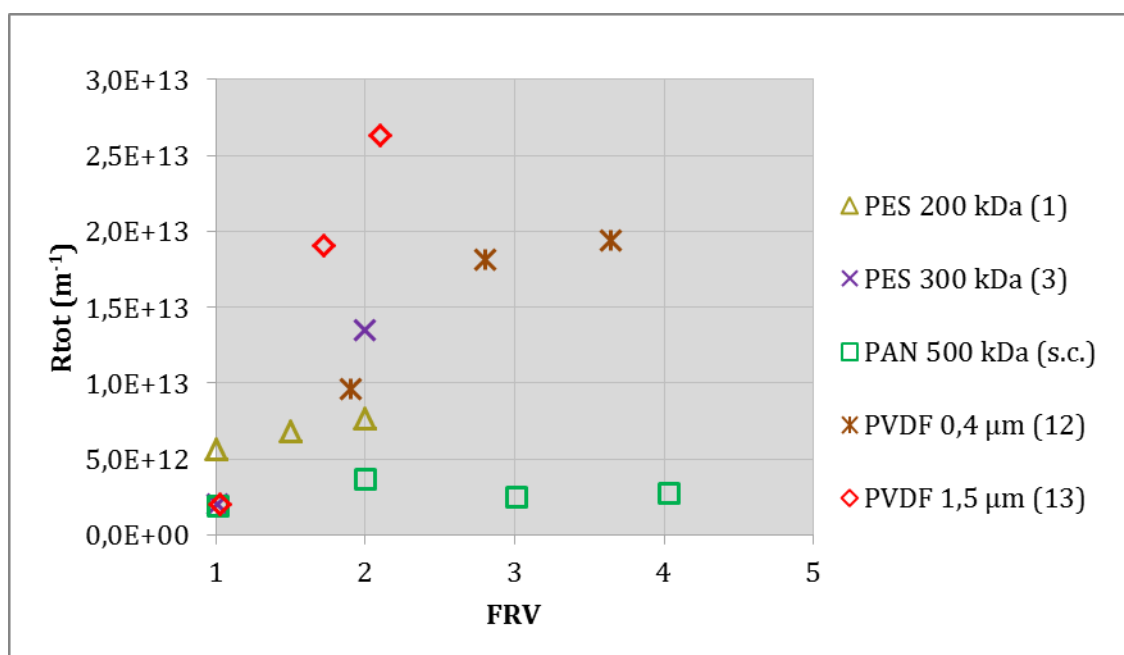


Figure 76. Évolution de la résistance totale R_{tot} au cours de la concentration de l'émulsion

L'apparition du colmatage et l'augmentation de la résistance ne peut pas être évitée, mais il est possible de les réduire par une sélection appropriée de la membrane en termes de compatibilité chimique du matériau avec l'huile (mouillabilité par l'huile) et de la taille des pores avec celles des gouttelettes de l'émulsion. Le colmatage peut aussi être réduit par l'optimisation des conditions opératoires (vitesse tangentielle, pression, turbulence et cisaillement) qui permettraient d'agir sur le colmatage et de réduire la couche de polarisation de la concentration.

V.7. Sélection d'une membrane pour la séparation des lipides de l'émulsion

Dans ce travail, les membranes ont été comparées sur la base de leur tenue aux conditions de travail (stabilité des performances lors du compactage et du nettoyage), des flux de perméat J , du taux de rétention des lipides TR , de la réduction relative de flux RFR par rapport au flux à l'eau, du colmatage R_f/R_{tot} et de la nettoyabilité (ratio de récupération de flux ou FRR). Le **Tableau 37** reprend les valeurs obtenues pour ces variables afin de les comparer et de sélectionner les membranes les plus performantes pour la concentration de l'émulsion.

Tableau 37. Tableau comparatif des performances des membranes testées pour la filtration de l'émulsion

	PES 200 kDa	PES 300 kDa	PAN 500 kDa	PVDF 0,4 µm	PVDF 1,5 µm
L_{peau} (L.h⁻¹.m⁻².bar⁻¹)	128	753	81	435	296
P_{crit} (bar)	0,3	0,2	0,4	0,2	0,2
J_{crit} (L.h⁻¹.m⁻²)	25	13	22	17	35
J_{FRV=2} (L.h⁻¹.m⁻²)	15	7	15	16	4
J_{FRV=3} (L.h⁻¹.m⁻²)	-	5	13	10	-
RFR_{FRV=2} (%)	63	92	42	80	97
TR (%)	95	93	95	92	87
M_{huile mem.FRV2} (g . m⁻²)	2,2	1,5	1,5	-	1,8
FRR (%)	78	54	90	260	86
R_{tot} (m⁻¹)	7,70E+09	1,30E+10	3,70E+09	6,60E+09	2,60E+10
R_f/R_{tot} (%)	62,7	92,3	62,6	75,5	97,5

Les principales conclusions de cette comparaison sont résumées ci-dessous :

Conditionnement et compactage : la membrane PAN 500 kDa a montré plus de stabilité après le conditionnement et après le compactage. Aucun indice sur un gonflement de pores ou changement de structure n'a été remarqué après ces étapes de préparation.

Flux de perméat et stabilité du flux : La membrane PAN 500 kDa a montré un des flux les plus importants à FRV2 et le plus important à FRV3. Elle a été aussi la membrane avec le flux le plus stable parmi les matériaux testés. La membrane PES 200 kDa et la PVDF 0,4 µm ont montré aussi de flux importants à FRV2 mais la PVDF a moins de stabilité lors de la concentration.

Colmatage et résistances : la membrane PAN 500 kDa, suivie de la membrane PES 200 kDa ont présenté les réductions relatives de flux les plus faibles, ce qui se traduit par un colmatage moins importante et par de faibles augmentation de résistances dues aux colmatages.

Taux de rétention : Les taux de rétention sont proches pour toutes les membranes, sauf pour la membrane PVDF 1,5 µm qui a un TR plus faible. Cette dernière membrane pourrait être utilisée pour des essais de coalescence comme vu dans la partie bibliographique.

Nettoyage : La membrane PAN 500 kDa a montré la récupération de flux après nettoyage la plus importante, suivi de la PVDF 1,5 µm. Cette dernière est particulièrement facile à nettoyer.

En conclusion, comme il a été vu tout au long de ces analyses, l'efficacité de la séparation de l'huile de l'émulsion dépend en grande partie du matériau membranaire et de son seuil de coupure. Il a été vu que la membrane PAN 500 kDa suivie par la PES 200 kDa, qui sont les matériaux les plus hydrophiles, sont les membranes présentant au global les meilleures performances pour la

concentration de l'émulsion notamment en termes de flux de perméat, de stabilité de ce flux et de colmatage. La membrane PVDF 1,5 μm est intéressante pour l'étude de la transmission de l'huile à travers la membrane et de la coalescence des gouttelettes des lipides. Une membrane efficace doit fournir un flux de perméat important et stable lors du procédé de filtration. Elle doit avoir également une grande sélectivité et être facilement nettoyable, d'où l'importance de la sélection de la membrane pour la séparation de lipides de l'émulsion formulée dans le contexte du bioraffinage de microalgues.

V.8. Conclusions sur la filtration membranaire

Cette partie du travail a concerné l'étude de la filtration membranaire d'une émulsion d'huile dans l'eau H/E, formulée sur la base de la composition lipidique d'un surnageant de broyat de microalgues. L'étude a compris le test de 5 membranes de MF et de UF, avec différentes caractéristiques d'hydrophilicité/hydrophobicité. Les membranes ont été évaluées en termes de flux de perméat, stabilité lors des étapes de conditionnement, compactage et nettoyage, réduction de flux pendant la concentration, récupération de flux après nettoyage, colmatage et développement de résistances et taux de rétention. Ces caractéristiques ont été comparées et les membranes les plus performantes ont été sélectionnées.

Les principales conclusions de cette étude de filtration sont présentées dans les paragraphes qui suivent :

La rétention des lipides par les membranes est principalement déterminée par l'affinité de la phase lipidique par le matériau membranaire ainsi que par le seuil de coupure. La membrane la plus hydrophile PAN 500 kDa, suivie par la PES 200 kDa ont montré les meilleurs performances en termes du flux de perméat au cours de la concentration. Ces membranes ont présenté aussi les colmatages les moins importantes parmi les membranes testées. Les tailles de pores de ces deux membranes semblent adéquates pour la rétention des gouttelettes des lipides de l'émulsion.

Les membranes les plus hydrophobes, PVDF 1,5 et PES 300 kDa ont montré des chutes de flux très importantes au début de la filtration, et des pertes du flux à l'eau aussi importantes. Ces deux membranes ont développé des colmatages et des résistances plus importants que les autres membranes. La membrane PVDF 1,5 μm , qui est celle ayant le diamètre des pores le plus

important, laisse passer la phase lipidique à travers les pores de la membrane. Il semblerait que ce passage déstabilise l'émulsion et qu'une coalescence pourrait avoir lieu dans ses pores.

La filtration membranaire de l'émulsion a été à l'origine de la coalescence des gouttelettes de lipides dans le rétentat au cours de la concentration, notamment pour les membranes PES 300 kDa et PAN 500 kDa. Le cisaillement subi par les gouttelettes lors de sa circulation dans le circuit du rétentat semble déstabiliser l'interface. Associé à l'élévation du nombre des collisions entre les gouttelettes au cours de la concentration, cela faciliterait la coalescence.

Lors des expériences, des inconvénients liés à la forte hétérogénéité des matériaux membranaires d'un coupon à l'autre ont été observés. Ce manque d'homogénéité a entraîné des fortes variations dans les résultats obtenus pour une même membrane.

Même si le SDS a été efficace dans la plupart des cas pour nettoyer les membranes, il peut laisser des traces qui modifient les caractéristiques d'hydrophilicité des matériaux et qui augmentent la perméabilité initiale à l'eau de la membrane. Cette effet a été plus prononcé pour la membrane PVDF 0,4 μm . Le protocole de nettoyage doit être optimisé pour les membranes sélectionnées.

Les points faibles de la concentration de l'émulsion avec les membranes testées ont été principalement le colmatage, les pertes très importantes de la perméabilité à l'eau lors de premières minutes de la filtration ainsi que la diminution des flux de perméat en fonction du facteur de réduction volumique.

V.9. Lien entre procédé de filtration et interfaces

Au cours du **Chapitre V** les performances de la filtration pour concentrer des lipides dispersés en phase aqueuse ont été étudiées pour différents matériaux membranaires. Un colmatage des membranes a été mis en évidence, la quantité de matière accumulée sur la membrane a été estimée, et une légère coalescence des gouttelettes les plus grosses constatée. Dans les paragraphes suivants, sur la base des résultats expérimentaux obtenus dans les **Chapitres IV** et **V**, les hypothèses qu'ont été formulées dans l'introduction de ce travail (**Figure 1**) sur le devenir des gouttelettes d'huile au cours de la filtration sont analysées.

Analyse des conditions de filtration

Les gouttelettes présentes dans l'émulsion sont soumises au cours du procédé à plusieurs forces dans la veine liquide et à la membrane : la force stabilisante de la tension interfaciale qui favorise la sphéricité, et les forces d'inertie, de viscosité et de gravité qui peuvent engendrer une déformation (Charcosset, 2012; Couderc et al., 2008). Le détachement d'une goutte déjà sur la membrane n'est pas considéré ici.

L'importance de ces forces peut être évaluée à l'aide de certains nombres adimensionnels :

Le nombre de Weber compare les effets de l'inertie aux effets de la tension interfaciale

$$We = \frac{\rho_c U_{rel}^2 d_{goutte}}{\gamma} \quad \text{Eq. 63}$$

Le nombre de Eötvös (ou nombre de Bond) compare l'effet de la gravité (poussée d'Archimède) à ceux de la tension interfaciale :

$$Eo = \frac{\Delta \rho_c g d_{goutte}^2}{\gamma} \quad \text{Eq. 64}$$

Le nombre capillaire qui compare les effets visqueux aux effets de tension interfaciale :

$$Ca = \frac{\mu_c U_{rel}}{\gamma} \quad \text{Eq. 65}$$

Avec

ρ_c	Masse volumique de la phase continue (kg.m ⁻³)
U_{rel}	Vitesse relative de la phase continue par rapport à la goutte (m.s ⁻¹)
d_{goutte}	Diamètre de la goutte (m)
γ	Tension interfaciale (N.m ⁻¹)
g	Accélération de la pesanteur (m.s ⁻²)
μ_c	Viscosité de la phase continue (Pa.s)

Si ces trois nombres sont très inférieurs à 1, la tension interfaciale prédomine et la goutte n'est pas déformée. En revanche, si l'un des trois nombres est proche ou supérieur à 1, la gouttelette se déforme.

Une estimation de E_0 pour une gouttelette de 3 µm de diamètre (avec une masse volumique $\rho_{huile} = 900 \text{ g.L}^{-1}$), en suspension dans l'eau ($\rho_{eau} = 1000 \text{ g.L}^{-1}$, de viscosité 10^{-3} Pa.s) avec une tension interfaciale 1 mN.m^{-1} (comme indiqué dans le **Tableau 23** pour un mélange PC90G +MTNL à concentration importante) donne :

$$E_0 = 8,8 \cdot 10^{-6}$$

L'effet de la gravité (poussée d'Archimède) serait donc négligeable.

Si la gouttelette est dans la veine liquide, elle est à la même vitesse que le liquide, la vitesse relative est nulle et la gouttelette ne serait pas déformée.

Si la gouttelette se place près de la paroi dans une zone de gradient de vitesse (la couche limite) ou se dépose sur la paroi, en prenant une vitesse de liquide de 1 m.s^{-1} comme utilisé au cours de la filtration, les nombres de Weber et Capillaire estimés sont les suivants :

$$We = 3$$

$$Ca = 1$$

Les forces d'inertie et les effets visqueux ne sont plus négligeables.

Il est également possible de calculer la pression de Laplace à l'intérieur de la gouttelette :

$$P_l = \frac{4\gamma_{ow}}{d_{goutte}} \quad \text{Eq. 66}$$

La pression pour une goutte de 3 µm serait de 0,01 bar. La gouttelette près de la membrane subit une pression supérieure à 0,2 bar lors de la filtration, elle peut donc se déformer.

Au cours de la filtration les gouttelettes sont amenées près de la paroi. Si elles se déposent et se déforment, elles peuvent aussi interagir avec le matériau, s'accumuler et éventuellement former un film.

Afin de déterminer si les lipides ont une affinité avec les différents matériaux utilisés, des angles de contacts ont été mesurés (rapport interne GEPEA 2017). Etant donné la difficulté pour solubiliser les tensioactifs à froid dans la phase huile hors émulsion, seules les huiles purifiées (principalement composées de TAG) ont été utilisées. Des membranes propres et sèches ont été employées. Pour les trois matériaux (PAN, PES et PVDF), les angles de contact sont compris entre 40 et 50°, inférieurs à ceux mesurés avec l'eau (75 à 95°). Les membranes présentent donc une affinité pour les huiles. Au cours de la filtration, les membranes sont hydratées et les gouttelettes recouvertes de tensioactifs avec pour certains une charge partielle, il est probable qu'une répulsion ait lieu. Pourtant les déformations des gouttelettes pourront faciliter le contact entre la membrane et les lipides.

Une fois les lipides déposés à la surface de la membrane, peuvent-ils pénétrer le matériau ?

Afin de le vérifier il est possible de calculer la pression capillaire $P_{capillaire}$, pression qu'il faudrait appliquer pour faire pénétrer un liquide dans un pore (Charcosset, 2012; Nazir et al., 2010).

$$P_{capillaire} = \frac{4\gamma_{ow}\cos\theta}{d_p} \quad \text{Eq. 67}$$

Avec

$P_{capillaire}$	Pression capillaire (Pa)
γ_{ow}	Tension interfaciale entre l'huile et l'eau (N.m ⁻¹)
θ	Angle de contact entre l'huile et la membrane immergée dans l'eau
d_p	Diamètre du pore (m)

En première approximation, sous l'hypothèse que l'angle de contact est du même ordre de grandeur que celui mesuré sur une membrane sèche, les valeurs suivantes sont obtenues: 1 bar pour la membrane PAN (d_p de 30 nm, information fournisseur), 1,4 bar pour la membrane PES 200 KDa (d_p estimé à 20 nm), 0,07 bar pour la membrane PVDF 0,4 μm ($d_p = 0,4 \mu\text{m}$), et 0,02 bar pour la membrane PVDF 1,5 μm ($d_p = 1,5 \mu\text{m}$). Il apparaît alors que les pressions de travail utilisées au cours de la filtration (**Tableau 26**) soient inférieures à la pression capillaire, sauf dans le cas des membranes PVDF. Pour ces deux dernières, la pénétration des gouttelettes dans la membrane est possible, ce qui est confirmé par les résultats de l'analyse des flux (où une réduction relative du flux RFR supérieure à 80 % a été observée à un FRV=2).

Impact des conditions de filtration sur l'interface huile-eau

Lors de la filtration, les gouttelettes de lipides peuvent être soumises à un cisaillement ou un écrasement aux abords de la membrane comme il est montré dans la **Figure 77**.

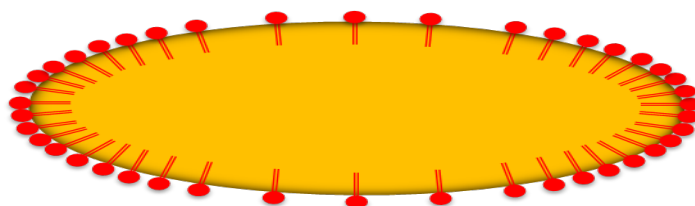


Figure 77. Représentation d'une gouttelette d'huile soumise à un cisaillement ou un écrasement aux abords de la membrane pendant la filtration

A l'interface, dans la zone étirée, la pression interfaciale est faible, la phosphatidylcholine (PC) pourrait jouer son rôle de tensioactif en phase liquide expansé (LE). En cas d'étirement trop important (aire par molécule supérieure à 160 Å²/molécule), l'arrivée de la PC à l'interface pour compenser l'étirement dépendrait de sa concentration. Si elle est élevée la PC pourrait arriver rapidement à l'interface depuis la phase liquide. Si la concentration est faible, ce tensioactif pourrait ne pas atteindre l'interface rapidement.

Dans la zone compressée ce sont les alkylpolyglucosides et les alcools qui influenceraient majoritairement la tension interfaciale, en formant des zones de liquide condensé (LC). Le collapse, la formation de doubles couches et de relargage de tensioactif dans les phases liquides est alors envisageable.

Est ce que les gouttelettes risquent de se diviser, de coalescer ou de s'étaler sur la membrane ?

Il est difficile d'affirmer lesquels de ces phénomènes auront lieu pour un mélange donné. Cependant il est possible de poser certaines hypothèses :

- i) Si les tensioactifs sont assez disponibles pour recouvrir l'interface étirée, il sera plus facile d'augmenter l'aire de l'interface et en conséquence de diviser les gouttelettes.
- ii) Si les tensioactifs ne le sont pas, ou si le film à l'interface est particulièrement rigide en raison des fortes interactions latérales (LC), il sera plus difficile de diviser les gouttelettes.

La coalescence des gouttelettes et le mouillage de la membrane dépendront de la possibilité de rapprocher les gouttelettes, de diminuer le film d'eau entre elles et la membrane (dépendant entre autre de la charge de surface générant des répulsions électrostatiques et de l'hydratation des groupes de surfaces). Il faudra ensuite déstabiliser le film. Il semble que ce soit plus facile avec des interfaces présentant une faible cohésion entre les molécules donc plutôt en phase liquide expansée (LE). La présence de différentes natures de chaînes hydrophobes limiterait la cohésion du film.

La structure du film peut éventuellement influencer les interactions entre les gouttes, avec la membrane ou d'autres molécules.

D'après l'analyse des interfaces air/eau, certaines phases de l'interface seraient riches en certains composés, contenant soit majoritairement des alkylglucosides, soit des phosphatidylcholines en présence d'alcools gras ; elles peuvent être plus ou moins cohésives : Ces phases pourraient être des zones privilégiées de répulsion ou d'interaction, soit avec les autres gouttelettes, soit avec la membrane, éventuellement avec certains solvants, ou différents composés amphiphiles tels que les protéines ou les sucres. Par exemple, les zones en phase de liquide expansé (LE) contenant les PC pourraient être plus faciles à déstabiliser que les zones portant des APG en phase de liquide condensé (LC).

Conclusion sur le lien entre le procédé de filtration et les analyses des interfaces

Dans cette dernière section, le lien entre procédé de filtration et caractérisation des interfaces a été tracé. Comme il a été dit à la fin du **Chapitre IV**, ce travail représente un premier pas vers la compréhension du comportement des biomolécules dans un mélange complexe lors de son fractionnement par filtration membranaire.

Conclusions générales

Cette thèse s'inscrit dans un projet de développement du bioraffinage de microalgues par voie humide. On s'est intéressé ici plus particulièrement à la récupération de lipides produits par des microalgues cultivées en carence azotée, avec à terme une application dans le domaine des biocarburants de troisième génération. Ce travail a eu lieu dans le cadre du projet interdisciplinaire Energie du CNRS « Algues, Molécules, Territoires ».

La stratégie adoptée était la suivante : une analyse de produits réels a été réalisée afin de déterminer quelle était la composition de la fraction lipidique et son organisation. Une solution synthétique (émulsion d'huile dans l'eau) représentative d'un broyat de microalgues a été formulée. Les performances de la filtration membranaire pour la concentration des lipides ont été évaluées sur ce mélange synthétique. Le comportement des lipides polaires à l'interface huile/eau présents dans l'émulsion a également été étudié. Ces résultats ont finalement permis de faire un premier pas dans la compréhension du lien entre performances du procédé et comportement des biomolécules aux interfaces huile-eau dans les mélanges à fractionner.

Afin de définir la composition de la solution synthétique, dans un premier temps le profil lipidique des échantillons de différentes cultures de la microalgue *Parachlorella kessleri* cultivée en carence d'azote, des broyats et des surnageants a été caractérisé. La fraction lipidique était constituée de lipides neutres et de lipides polaires. Les acides gras majoritaires étaient les acides oléique, linoléique, linolénique et palmitique. Parmi les lipides polaires la phosphatidylcholine (PC) a été identifiée comme le phospholipide majoritaire et le sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) comme le principal glycolipide. A partir de ces informations une solution synthétique représentative du broyat a été proposée et son procédé d'obtention par émulsification a été développé. Cette émulsion est composée d'une phase lipidique contenant 70 w% de lipides neutres (mélange 30/70 %w d'huiles d'avocat/camelina) et 30 %w de lipides polaires (mélange de produits émulsifiants industriels PC90G/MTNL 50/50 %w comprenant des phospholipides, des alcools gras et de glycolipides).

L'interface huile/eau présente dans l'émulsion obtenue dans la première partie de ce travail, a été caractérisée par la méthode de la goutte pendante. Il a été démontré qu'à des faibles concentrations, le produit tensioactif contenant les phospholipides (PC90G) était plus efficace pour l'abaissement de la tension interfaciale que le produit contenant les glycolipides (MTNL). Lorsque les deux produits étaient présents à l'interface aucune synergie n'a été observée à aucune des concentrations testées. A de plus fortes concentrations en tensioactif (jusqu'à 0,5 %w de la

phase lipidique), il a été observé que l'adsorption à l'interface (et donc l'abaissement de la tension interfaciale) était plus rapide dans le cas du PC90G seul dans le système ou lors du mélange PC90G/MTNL que dans le cas du MTNL seul. C'est pourquoi dans le cas de l'émulsion, contenant une quantité beaucoup plus importante de lipides polaires (30 %w de la phase lipidique), une couverture de l'interface très rapide serait attendue.

Le comportement des produits tensioactifs utilisés dans l'émulsion a été aussi caractérisé à l'interface eau-air par la méthode de la Balance de Langmuir. Il a été constaté que la PC90G forme des monocouches avec des molécules plus expansées et donc plus compressibles que les monocouches de MTNL. Dans les monocouches formées par un mélange des tensioactifs PC90G et MTNL correspondant à la composition de l'émulsion, les films interfaciaux se sont avérés stables à la compression. Une coexistence des phases en liquide condensée et liquide expansée a été observée. Egalement pour ces monocouches mixtes, des interactions de type répulsif ont été constatées entre les composés des différents produits. Ces interactions seraient à l'origine de la formation de films plus expansés.

La partie finale du travail de recherche a concerné l'étude de la séparation des lipides de l'émulsion synthétique par filtration membranaire. Dans cette étude 5 membranes de MF et de UF, des matériaux divers hydrophiles et hydrophobes ont été testées. La performance des différentes membranes lors de la concentration de l'huile de l'émulsion a été comparée en termes de flux de perméat, stabilité lors des étapes de conditionnement, compactage et nettoyage, réduction de flux pendant la concentration, récupération de flux après nettoyage, colmatage et développement de résistances, taux de rétention et nettoyabilité. Les membranes les plus hydrophiles en PAN 500 kDa et PES 200 kDa ont montré les meilleures performances pour la concentration de l'huile de l'émulsion en termes de flux de perméat et de colmatage développé pendant la filtration. Les membranes les plus hydrophobes, PVDF 1,5 et PES 300 kDa ont développé des colmatages plus importants que les autres membranes et en conséquence ont présenté une perte de flux plus significative au cours de la concentration. La membrane PVDF 1,5 μm ayant le diamètre des pores le plus important parmi les membranes testées permet le passage des lipides à travers la membrane. La coalescence a été constatée dans le rétentat et s'est avérée plus importante aux concentrations plus grandes de l'huile, principalement pour les essais réalisées avec les membranes en PES 300 kDa et PAN 500 kDa.

La coalescence pendant la filtration est directement liée à la déstabilisation de l'interface huile/eau pendant ce procédé. Cette déstabilisation pourrait provenir du i) cisaillement subi par l'interface lors de l'écoulement dans le module membranaire ou/et des ii) interactions ayant lieu entre les molécules tensioactives et les matériaux des membranes. Dans les deux cas, les

molécules de surfactants pourraient être amenées à se désorber de l'interface favorisant ainsi la coalescence des gouttelettes des lipides. Cette coalescence est plus importante lorsque l'huile est plus concentrée grâce au procédé de filtration.

Finalement, afin de contribuer à la compréhension du lien existant entre les phénomènes d'interface et la filtration membranaire, une analyse qui inclut des nombres adimensionnels et la pression de Laplace d'une gouttelette de lipide, a permis de mettre en relation la tension interfaciale avec des forces pouvant avoir un effet sur la déformation des gouttelettes lors de la filtration. Il en résulte que les gouttelettes seraient déformées par l'effet de la pression de travail utilisée lors de la filtration de l'émulsion et que ces déformations pourraient faciliter les interactions entre la phase huile et les matériaux membranaires. Aussi, pour certaines membranes (PVDF), la pénétration des gouttelettes dans leurs pores serait possible selon l'estimation de leur pression capillaire, ce qui pourrait être associé au fort colmatage observé avec les membranes de ce matériau.

Perspectives

Les perspectives de ce travail sont nombreuses : le développement du bioraffinage des microalgues pour la valorisation des biomolécules nécessite encore des travaux à la fois sur des mélanges synthétiques pour avancer dans la compréhension, et des travaux sur les extraits réels de microalgues pour tester les conditions de filtration qui ont été sélectionnées.

Dans le cadre des travaux réalisés sur la filtration membranaire de mélanges synthétiques : il serait intéressant de réaliser des filtrations à des facteurs de concentration plus importants pour déterminer à partir de quand l'émulsion peut être déstabilisée de façon plus significative. L'analyse de l'impact des conditions opératoires (pression transmembranaire, température, hydrodynamique) et de la composition des solutions synthétiques sur la performance de la filtration pourrait être réalisée pour les deux membranes présentant les meilleures performances pour la concentration de l'émulsion : PAN 500 kDa et PES 200 kDa.

Si la coalescence reste faible, des expériences de déstabilisation de l'émulsion pourraient être conduites en utilisant les membranes les plus hydrophobes pour récupérer les lipides du côté du perméat. Dans ce cas il pourrait être envisagé de travailler avec une solution plus concentrée en lipides mais une sélection adéquate des conditions d'opération serait nécessaire pour favoriser le passage des lipides à travers la membrane.

Sur la base de la solution synthétique formulée, une complexification progressive de la composition avec par exemple dans un premier temps l'ajout de polysaccharides ou de protéines permettrait de se rapprocher du système complexe qu'est un broyat réel de microalgues. Cela impliquerait de fortes modifications des interfaces huile-eau et des interactions avec la membrane.

Une caractérisation de l'interface émulsion/membrane pourrait permettre de faire le lien entre le comportement des molécules stabilisant l'interface huile/eau et le comportement de l'émulsion pendant la filtration membranaire. Il serait par exemple utile de quantifier plus précisément les lipides accumulés sur la membrane et d'identifier si les lipides sont uniquement à la surface ou s'ils ont pénétré le milieu poreux (travail initié dans le cadre du projet MACCLIME).

Les conditions de filtration identifiées devront être testées sur des extraits de microalgues réels afin d'analyser les éventuelles différences de comportement, et proposer des pistes pour la définition des mélanges synthétiques et pour le procédé.

Références bibliographiques

Abadi, S. R. H., M. R. Sebzari, M. Hemati, F. Rekabdar, et T. Mohammadi. (2011). Ceramic membrane performance in microfiltration of oily wastewater. *Desalination* 265, 222-228.

Adamson, A. W. et A. P. Gast. (1997). *Physical Chemistry of Surfaces*, 6^e éd. New York: Wiley.

Ahlgren, G., I.-B. Gustafsson, et M. Boberg. (1992). Fatty Acid Content and Chemical Composition of Freshwater Microalgae. *Journal of Phycology* 28, 37-50.

Aimar, P., P. Bacchin, et A. Maurel. (2010a). Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires : techniques séparatives sur membranes base documentaire : TIB331DUO*.

Aimar, P., P. Bacchin, et A. Maurel. (2010b). Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) Aspects théoriques : perméabilité et selectivité. *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires : techniques séparatives sur membranes base documentaire : TIB331DUO*.

Alonso, D. L., E.-H. Belarbi, J. Rodríguez-Ruiz, C. I. Segura, et A. Giménez. (1998). Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry* 47, 1473-1481.

Angles, E., P. Jaouen, J. Pruvost, et L. Marchal. (2017). Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. *Algal Research* 21, 27-34.

Aptel, P., P. Moulin, et F. Quemeneur. (2002). *Micro et ultrafiltration: Conduite des essais pilotes. Traitement des eaux et effluents*. France: Club Français de Membranes.

Bacchin, P., P. Aimar, et R. W. Field. (2006). Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications. *Journal of Membrane Science* 281, 42-69.

Bahtz, J., D. Knorr, C. Tedeschi, M. E. Leser, B. Valles-Pamies, et R. Miller. (2009). Adsorption of octanoic acid at the water/oil interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74, 492-497.

Balduyck, L., S. Bijttebier, C. Bruneel, G. Jacobs, S. Voorspoels, J. Van Durme, et al. (2016). Lipolysis in *T-Ischrysis lutea* during wet storage at different temperatures. *Algal Research* 18, 281-287.

Balduyck, L., T. Stock, S. Bijttebier, C. Bruneel, G. Jacobs, S. Voorspoels, et al. (2017). Integrity of the microalgal cell plays a major role in the lipolytic stability during wet storage. *Algal Research* 25, 516-524.

Baoukina, S., L. Monticelli, H. J. Risselada, S. J. Marrink, et D. P. Tieleman. (2008). The molecular mechanism of lipid monolayer collapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 10803-10808.

Barnes, G. et I. Gentle. (2011). *Interfacial Science: An Introduction*. Italy: OUP Oxford.

Baudonnet, L., J.-L. Grossiord, et F. Rodriguez. (2004). Physicochemical characterization and in vitro release of salicylic acid from O/W emulsions prepared with Montanov 68: effect of formulation parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30, 975-984.

- Becker, E. W. (1993). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press.
- Berton, C. (2011). *Construction raisonnée d'interfaces pour protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation* (Thèse de doctorat). Université de Nantes.
- Bigogno, C., I. Khozin-Goldberg, S. Boussiba, A. Vonshak, et Z. Cohen. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry* 60, 497-503.
- Bilad, M. R., H. A. Arafat, et I. F. J. Vankelecom. (2014). Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. *Biotechnology advances* 32, 1283-1300.
- Birdi, K. S., D. T. Vu, L. Moesby, K. B. Andersen, et D. Kristensen. (1994). Structures of lipid and biopolymer monolayers investigated as Langmuir-Blodgett films by atomic force microscopy. *Surface and Coatings Technology* 67, 183-191.
- Bjornsson, W. J., K. M. MacDougall, J. E. Melanson, S. J. B. O'Leary, et P. J. McGinn. (2012). Pilot-scale supercritical carbon dioxide extractions for the recovery of triacylglycerols from microalgae: a practical tool for algal biofuels research. *Journal of Applied Phycology* 24, 547-555.
- Bottier, C., J. Géan, F. Artzner, B. Desbat, M. Pézolet, A. Renault, et al. (2007). Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768, 1526-1540.
- Briant, J. (1989). *Phénomènes d'interface, agents de surface: Principes et modes d'action*, Ecole nati. Rueil-Malmaison, Hauts-de-Seine: Editions TECHNIP.
- Brochete, P. (2013). Emulsification- Elaboration et étude des émulsions. In *Techniques de l'ingénieur*.
- Cabane, B. et S. Hénon. (2003). *Liquides : Solutions, dispersions, émulsions, gels*. Paris: Belin.
- Canselier, J.-P. et M. Poux. (2004). Procédés d'émulsification. In *Techniques de l'Ingénieur*.
- Chabrand, R. M., H.-J. Kim, C. Zhang, C. E. Glatz, et S. Jung. (2008). Destabilization of the Emulsion Formed during Aqueous Extraction of Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85, 383-390.
- Charcosset, C. (2012). *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceuticals*. United Kingdom: Elsevier.
- Chen, G., Y. Jiang, et F. Chen. (2007). Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry* 104, 1580-1585.
- Chen, Y.-C., C.-H. Chang, Y.-M. Yang, J.-R. Maa, J.-L. Lin, et C.-H. Wu. (2007). Interaction of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine with n-Hexadecanol in Monolayer and Liposome. *Journal of the Chinese Chemical Society* 54, 317-322.
- Cheryan, M. et N. Rajagopalan. (1998). Membrane processing of oily streams . Wastewater treatment and waste reduction 151.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 26, 126-131.

- Chou, T.-H. et C.-H. Chang. (2000). Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed DPPC/cholesterol monolayers at the air/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 17, 71-79.
- Christie, W. W. (2009). *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3^e éd. Bridgwater, England: The Oily Press.
- Cohen, Z. (1999). *Chemicals from Microalgae*. CRC Press.
- Cote, G. (1998). Extraction liquide-liquide - Bases physico-chimiques des procédés. *Techniques de l'Ingénieur* j2761.
- Couderc, J. P., C. Gourdon, et Liné. (2008). *Phénomènes de transfert en génie des procédés*, 1^{ère}.
- Daiminger, U., W. Nitsch, P. Plucinski, et S. Hoffmann. (1995). Novel techniques for oil / water separation 99, 197-203.
- Dalmazzone, C. (2000). Génération mécanique des émulsions. *Oil & Gas Science and Technology* 55.
- Denis, J. et J.-C. Hipeaux. (1997). *Physico-chimie des lubrifiants. Analyses et essais*. Paris: Editions Technip.
- Destribats, M. (2011). *Emulsions stabilisées par des particules colloïdales stimulables : propriétés fondamentales et matériaux*. Université de Bordeaux 1.
- Diagne, N. W. (2013). *Le nettoyage : une étape-clef pour une production durable par procédé à membrane : réflexion sur le lien entre conditions de production et nettoyabilité d'une membrane PES de l'industrie laitière*. Université de Rennes 1.
- Dickhout, J. M., J. Moreno, P. M. Biesheuvel, L. Boels, R. G. H. Lammertink, et W. M. de Vos. (2017). Produced water treatment by membranes: A review from a colloidal perspective. *Journal of Colloid and Interface Science* 487, 523-534.
- Dong, T., E. P. Knoshaug, P. T. Pienkos, et L. M. L. Laurens. (2016). Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy* 177, 879-895.
- Doumeix, O. (2011). *Opérations unitaires en génie biologique. Les émulsions*. Paris: CRDP de Paris - Centre Régional de Documentation Pédagogique de Paris.
- Dubois, V., S. Breton, M. Linder, J. Fanni, et M. Parmentier. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 710-732.
- Dukhin, S., G. Kretzschmar, et R. Miller. (1995). *Dynamics of Adsorption at Liquid Interfaces - Theory, Experiment, Application*, Vol. 1. Elsevier.
- Duroudier, J.-P. (1999). *Pratique de la filtration*. Lavoisier.
- Dynarowicz-Łatka, P. et K. Hac-Wydro. (2004). Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 37, 21-25.

- El Kabbaze, H. (2008). *Traitement des solutions modèles du lait par des membranes de nanofiltration et d'osmose inverse*. Université Mohamed V - Algdal, Rabat.
- Erbil, H. Y. (2006). *Surface Chemistry of Solid and Liquid Interfaces*. Wiley-Blackwell.
- Faibish, R. S. et Y. Cohen. (2001). Fouling and rejection behavior of ceramic and polymer-modified ceramic membranes for ultrafiltration of oil-in-water emulsions and microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 191, 27-40.
- Fernandes, B., J. Teixeira, G. Dragone, A. A. Vicente, S. Kawano, K. Bišová, et al. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology* 144, 268-274.
- Frappart, M., A. Massé, M. Y. Jaffrin, J. Pruvost, et P. Jaouen. (2011). Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. *Desalination* 265, 279-283.
- Friberg, S., P. O. Jansson, et E. Cederberg. (1976). Surfactant association structure and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 55, 614-623.
- Gaines, G. L. (1966). *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*. USA: Interscience Publishers.
- Gennes, P.-G. de, F. Brochard-Wyart, et D. Quéré. (2005). *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin.
- Gerardo, M. L., D. L. Oatley-Radcliffe, et R. W. Lovitt. (2014). Integration of membrane technology in microalgae biorefineries. *Journal of Membrane Science* 464, 86-99.
- Ghislain, C. Y., C. Michaël, R. Bernardus, S. Michailovich, et W. Adrianus. (2007). Oil bodies and method of producing such oil bodies.
- Giorno, F., R. Mazzei, et L. Giorno. (2013). Purification of triacylglycerols for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalgae by membrane technology. *Bioresource Technology* 140, 172-178.
- Greenwell, H. C., L. M. L. Laurens, R. J. Shields, R. W. Lovitt, et K. J. Flynn. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of The Royal Society Interface* 7, 703-726.
- Grimi, N., A. Dubois, L. Marchal, S. Jubeau, N. I. Lebovka, et E. Vorobiev. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology* 153, 254-259.
- Günerken, E., E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, et R. H. Wijffels. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances* 33, 243-260.
- Gunstone, F. D. (2002). *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties, and Uses*. Blackwell.
- Gunstone, F. D., J. L. Harwood, et A. J. Dijkstra. (2007). *The lipid Handbook*, 3rd éd. CRC Press. Tylor & Francis Group.
- Halim, R., M. K. Danquah, et P. A. Webley. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30, 709-732.

- Hlavacek, M. (1995). Break-up of oil-in-water emulsions induced by permeation through a microfiltration membrane. *Journal of Membrane Science* 102, 1-7.
- Holčápek, M., P. Jandera, P. Zderadička, et L. Hrubá. (2003). Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1010, 195-215.
- Hong, A., A. G. Fane, et R. Burford. (2003). Factors affecting membrane coalescence of stable oil-in-water emulsions. *Journal of Membrane Science* 222, 19-39.
- Hu, X., E. Bekassy-Molnar, et G. Vatai. (2003). Analysis and characterization of membrane fouling of ultrafiltration separation for oil-in-water emulsion. *Chemical Papers* 57, 16-20.
- Huang, X., Z. Huang, W. Wen, et J. Yan. (2013). Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology* 25, 129-137.
- Iglauer, S., Y. Wu, P. Shuler, Y. Tang, et W. A. Goddard III. (2009). Alkyl polyglycoside surfactant-alcohol cosolvent formulations for improved oil recovery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 339, 48-59.
- Jayasinghe, C. et D. Gray. (2014). Lipid Bodies Isolated Microalgae Residues as a Source for Bioethanol Production. In S.-K. Kim (Ed.), *Seafood Processing By-Products*, p. 407-421. Springer New York.
- Jenck, J., O. Lépine, J. Legrand, P. Dreno, D. Grizeau, et C. Dupré. (2011). Valorisation industrielle des microalgues photosynthétiques. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés dans les domaines de l'énergie et de l'environnement. Réf. in 201*.
- Jiang, L. Y. et J. M. Zhu. (2013). Separation technologies for current and future biorefineries—status and potential of membrane-based separation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment* 2, 673-690.
- Jones, J., S. Manning, M. Montoya, K. Keller, et M. Poenie. (2012). Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 1371-1381.
- Jubeau, S., L. Marchal, J. Pruvost, P. Jaouen, J. Legrand, et J. Fleurence. (2013). High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology* 25, 983-989.
- Kajitvichyanukul, P., Y.-T. Hung, et L. K. Wang. (2011). Membrane Technologies for Oil-Water Separation. In *Membrane and Desalination Technologies*, Vol. 13, p. 639-668. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Karsa, D. R. (1999). *Design and Selection of Performance Surfactants*, Vol. 2. CRC Press.
- Kestin, J., M. Sokolov, et W. A. Wakeham. (1978). Viscosity of liquid water in the range -8 °C to 150 °C. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 7, 941-948.

- Kim, J., G. Yoo, H. Lee, J. Lim, K. Kim, C. W. Kim, et al. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 31, 862-876.
- Kleinegris, D. M. M., M. Janssen, W. A. Brandenburg, et R. H. Wijffels. (2011). Two-phase systems: potential for in situ extraction of microalgal products. *Biotechnology Advances* 29, 502-507.
- Kobayashi, N., E. A. Noel, A. Barnes, J. Rosenberg, C. DiRusso, P. Black, et G. A. Oyler. (2013). Rapid Detection and Quantification of Triacylglycerol by HPLC-ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* Strains. *Lipids* 48, 1035-1049.
- Koltuniewicz, A. B., R. W. Field, et T. C. Arnot. (1995). Cross-flow and dead-end microfiltration of oily-water emulsion. Part I: Experimental study and analysis of flux decline. *Journal of Membrane Science* 102, 193-207.
- Lachaise, J. et J.-L. Salager. (1991). Méthodes d'analyse granulométrique. FIRP. Laboratoire de formulation, interfaces, rhéologie et procédés.
- Larpent, C. (1995). Tensioactifs. In *Techniques de l'Ingénieur*. Paris.
- Lawrie, G. A., I. R. Gentle, et G. T. Barnes. (2000). The structure of mixed monolayer films of DPPC and hexadecanol. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 171, 217-224.
- Lee, J.-H., K. C. Jones, K.-T. Lee, M.-R. Kim, et T. A. Foglia. (2003). High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Structured Lipids Produced by Interesterification of Macadamia Oil with Tributyrin and Tricaprylin. *Chromatographia* 58, 653-658.
- Lee, S., Y. Aurelle, et H. Roques. (1984). Concentration polarization, membrane fouling and cleaning in ultrafiltration of soluble oil. *Journal of Membrane Science* 19, 23-38.
- Legrand, J. (2013). *Emulsions alimentaires et foisonnement*. Lavoisier.
- Li, J., R. Miller, et H. Möhwald. (1996). Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces 2. Comparison of isotherms of insoluble and soluble films of phospholipids at different fluid/water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 114, 123-130.
- Li, N. N., A. G. Fane, W. S. Winston Ho, et T. Matsuura. (2008). *Advanced Membrane Technology and Applications*. Canada: Wiley.
- Lipp, P., C. H. Lee, A. G. Fane, et C. J. D. Fell. (1988). A fundamental study of the ultrafiltration of oil-water emulsions. *Journal of Membrane Science* 36, 161-177.
- Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16, 391-404.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, O. Ménard, E. Beaucher, F. Rousseau, J. Fauquant, et al. (2011). Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry* 125, 355-368.
- Lopez, C., M.-N. Madec, et R. Jiménez-Flores. (2010). Lipid Rafts in the Bovine Milk Fat Globule Membrane Revealed by the Lateral Segregation of Phospholipids and Heterogeneous Distribution of Glycoproteins. *Food Chemistry* 120, 22-33.

- Mansour, H. M. et G. Zografi. (2007). Relationships between equilibrium spreading pressure and phase equilibria of phospholipid bilayers and monolayers at the air-water interface. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 23, 3809-3819.
- Mansour, M. P., D. M. F. Frampton, P. D. Nichols, J. K. Volkman, et S. I. Blackburn. (2005). Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C24-C28 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology* 17, 287-300.
- Maurel, A. (2017). Techniques séparatives à membranes - Considérations théoriques. *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires - Génie de la réaction chimique : techniques séparatives à membranes*.
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition*, 2^e éd. CRC Press.
- Mengesha, A. E. et P. M. Bummer. (2010). Simple Chromatographic Method for Simultaneous Analyses of Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine, and Free Fatty Acids. *AAPS PharmSciTech* 11, 1084-1091.
- Meullemiestre, A., C. Breil, M. Abert-Vian, et F. Chemat. (2016). Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology* 211, 190-199.
- Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances* 13, 491-551.
- Miller, R. et V. Fainerman. (1998). The drop volume technique. In *Drops and bubbles in interfacial research. Interactions of emulsion drops*, D. Möbius, R. Miller., Vol. 6. Elsevier Science B.V.
- Miyoshi, T. et S. Kato. (2015). Detailed Analysis of the Surface Area and Elasticity in the Saturated 1,2-Diacylphosphatidylcholine/Cholesterol Binary Monolayer System. *Langmuir* 31, 9086-9096.
- Montalescot, V. (2015). *Contribution au bioraffinage de microalgues oléagineuses : impact de la destruction cellulaire sur le fractionnement en voie humide des composés intracellulaires*. Ecole Centrale de Nantes, Saint Nazaire.
- Montalescot, V., T. Rinaldi, R. Touchard, S. Jubeau, M. Frappart, P. Jaouen, et al. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology* 196, 339-346.
- Morrison, W. R. et L. M. Smith. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *Journal of Lipid Research* 5, 600-608.
- Moulai-Mostefa, N., O. Akoum, M. Nedjihoui, L. Ding, et M. Y. Jaffrin. (2007). Comparison between rotating disk and vibratory membranes in the ultrafiltration of oil-in-water emulsions. *Desalination* 206, 494-498.
- Moutel, B., O. Gonçalves, F. Le Grand, M. Long, P. Soudant, J. Legrand, et al. (2016). Development of a screening procedure for the characterization of *Botryococcus braunii* strains for biofuel application. *Process Biochemistry* 51, 1855-1865.
- Mulder, M. (1996). *Basic Principles of Membrane Technology*, 2^e éd. London: Kluwer Academic Publishers.

- Mura, S., F. Pirot, M. Manconi, F. Falson, et A. M. Fadda. (2007). Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. *Journal of Drug Targeting* 15, 101-108.
- Myers, D. (2006). *Surfactant Science and Technology*, 3rd Edition. Wiley Interscience.
- Nazir, A., C. G. P. H. Schroën, et R. M. Boom. (2010). Premix emulsification: A review. *Journal of Membrane Science* 1-11.
- Neuman, R. D. et S. Fereshtekhou. (1988). Electron microscopic structure of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* 125, 34-44.
- Nguyen, T. D. P. (2013, janvier 1). *Récolte de biomasse microalgale par floculation naturelle et procédés membranaires*. Nantes.
- Novelect. (1993). *Les applications innovantes des techniques membranaires dans l'industrie*. Paris: Novelect.
- O'Brien, R. (2008). *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications, Third Edition*. CRC Press.
- Pantelic, I. (2014). *Alkylpolyglucosides: from natural origin surfactants to prospective delivery systems*. Elsevier.
- Paquin, P. et J. Giasson. (1989). La microfluidisation comme procédé d'homogénéisation d'une boisson à base de matière grasse laitière. *Lait* 69.
- Peng, Y., F. Guo, Q. Wen, F. Yang, et Z. Guo. (2017). A novel polyacrylonitrile membrane with a high flux for emulsified oil/water separation. *Separation and Purification Technology* 184, 72-78.
- Pichot, R., R. L. Watson, et I. T. Norton. (2013). Phospholipids at the Interface: Current Trends and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 11767-11794.
- Přibyl, P., V. Cepák, et V. Zachleder. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 549-561.
- Prosser, A. J. et E. I. Franses. (2001). Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air-water interface: review and evaluation of equilibrium models. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 178, 1-40.
- Pruvost, J., G. Van Vooren, G. Cogne, et J. Legrand. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology* 100, 5988-5995.
- Qu, X.-J., Y.-J. Fu, M. Luo, C.-J. Zhao, Y.-G. Zu, C.-Y. Li, et al. (2013). Acidic pH based microwave-assisted aqueous extraction of seed oil from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.). *Industrial Crops and Products* 43, 420-426.
- Rabiller-Baudry, M. (2016). Nettoyage et décolmatage des membranes de filtration. In *Techniques de l'Ingénieur*.
- Reis, P., R. Miller, M. Leser, H. Watzke, V. B. Fainerman, et K. Holmberg. (2008). Adsorption of polar lipids at the water-oil interface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24, 5781-6.

Remigy, J. C. et S. Desclaux. (2007). Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Techniques de l'Ingénieur*.

Řezanka, T. et M. Podojil. (1989). Preparative separation of algal polar lipids and of individual molecular species by high-performance liquid chromatography and their identification by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 463, 397-408.

Rinia, H. A., R. A. Demel, J. P. J. M. van der Eerden, et B. de Kruijff. (1999). Blistering of Langmuir-Blodgett Bilayers Containing Anionic Phospholipids as Observed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 77, 1683-1693.

Roleda, M. Y., S. P. Slocombe, R. J. G. Leahey, J. G. Day, E. M. Bell, et M. S. Stanley. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource technology* 129, 439-49.

Rotenberg, Y., L. Boruvka, et A. W. Neumann. (1983). Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 93, 169-183.

Ryckebosch, E., C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, K. Goiris, K. Muylaert, et I. Foubert. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry* 160, 393-400.

Saad, S. M. I., Z. Policova, E. J. Acosta, M. L. Hair, et A. W. Neumann. (2009). Mixed DPPC/DPPG Monolayers at Very High Film Compression. *Langmuir* 25, 10907-10912.

Scharnagl, N. et H. Buschatz. (2001). Polyacrylonitrile (PAN) membranes for ultra- and microfiltration. *Desalination* 139, 191-198.

Sears, D. F. et R. E. Stark. (1973). Classic Techniques of Surface Science. In *Biological Horizons in Surface Science*, p. 1-33. New York: Academic Press.

Shchipunov, Y. (1997). Self-organising structures of lecithin. *Russian chemical Reviews* 66, 301-322.

Shchipunov, Y. A. et A. F. Kolpakov. (1991). Phospholipids at the oil/water interface: adsorption and interfacial phenomena in an electric field. *Advances in Colloid and Interface Science* 35, 31-138.

Sheehan, J., T. Dunahay, J. Benemann, et P. Roessler. (1998). *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic species Program - Biodiesel from Algae*. USA: NREL-National Renewable Energy Laboratory.

Shene, C., M. T. Monsalve, D. Vergara, M. E. Lienqueo, et M. Rubilar. (2015). High pressure homogenization of *Nannochloropsis oculata* for the extraction of intracellular components: Effect of process conditions and culture age. *European Journal of Lipid Science and Technology* n/a-n/a.

Siaut, M., S. Cuiné, C. Cagnon, B. Fessler, M. Nguyen, P. Carrier, et al. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* 11, 7.

Siegenthaler, P.-A. et N. Murata. (2006). *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Springer Science & Business Media.

- Somasundaran, P. (2006). *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, Vol. 1. CRC Press.
- Song, B. et J. Springer. (1996). Determination of Interfacial Tension from the Profile of a Pendant Drop Using Computer-Aided Image Processing. *Journal of Colloid and Interface Science* 184, 77-91.
- Spiden, E. M., P. J. Scales, S. E. Kentish, et G. J. O. Martin. (2013). Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. *Biochemical Engineering Journal* 70, 120-126.
- Spiden, E. M., B. H. J. Yap, D. R. A. Hill, S. E. Kentish, P. J. Scales, et G. J. O. Martin. (2013). Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresource Technology* 140, 165-171.
- Sun, D., X. Duan, W. Li, et D. Zhou. (1998). Demulsification of water-in-oil emulsion by using porous glass membrane. *Journal of Membrane Science* 146, 65-72.
- Surel, C., J. Fouquier, N. Perrot, A. Mackie, C. Garnier, A. Riaublanc, et M. Anton. (2014). Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. *Food Hydrocolloids* 34, 3-9.
- Susan, L. Y., S. Ismail, B. S. Ooi, et H. Mustapa. (2017). Surface morphology of pvdf membrane and its fouling phenomenon by crude oil emulsion. *Journal of Water Process Engineering* 15, 55-61.
- Tadros, T. F. (2013). Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In T. F. Tadros (Ed.), *Emulsion Formation and Stability*, p. 1-75. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Taleb, A., R. Kandilian, R. Touchard, V. Montalescot, T. Rinaldi, S. Taha, et al. (2016). Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production. *Bioresource Technology* 218, 480-490.
- Taleb, A., J. Pruvost, J. Legrand, H. Marec, B. Le-Gouic, B. Mirabella, et al. (2015). Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource Technology* 177, 224-232.
- Taleb, Aumaya. (2015). *Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs* (Génie des Procédés). Université de Nantes, Saint Nazaire.
- Touhami, Y., G. H. Neale, V. Hornof, et H. Khalfalah. (1996). A modified pendant drop method for transient and dynamic interfacial tension measurement. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 112, 31-41.
- Vandamme, T. F., D. Poncelet, et P. Subra-Paternault. (2007). *Microencapsulation: des sciences aux technologies*. Paris: Editions Tec & Doc.
- Vidyashankar, S., K. S. VenuGopal, G. V. Swarnalatha, M. D. Kavitha, V. S. Chauhan, R. Ravi, et al. (2015). Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source. *Biomass and Bioenergy* 77, 75-91.
- Vié, V., N. Van Mau, E. Lesniewska, J. P. Goudonnet, F. Heitz, et C. Le Grimellec. (1998). Distribution of Ganglioside GM1 between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir* 14, 4574-4583.

Villafaña, L. (2017). *Etude de la filtration dynamique d'une émulsion huile dans l'eau. Mesure d'angles de contact des membranes PES, PVDF et PAN. Rapport interne du laboratoire GEPEA.*

Villalonga, F. (1968). Surface chemistry of 1- α -dipalmitoyl lecithin at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 163, 290-300.

Viswanathan, T., S. Mani, K. C. Das, S. Chinnasamy, A. Bhatnagar, R. K. Singh, et M. Singh. (2012). Effect of cell rupturing methods on the drying characteristics and lipid compositions of microalgae. *Bioresource Technology* 126, 131-136.

Wagner, K. et G. Brezesinski. (2007). Modifying dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers by n-hexadecanol and dipalmitoylglycerol. *Chemistry and Physics of Lipids* 145, 119-127.

Wang, G. et T. Wang. (2012). Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 135-143.

Wege, H. A., J. A. Holgado-Terriza, A. W. Neumann, et M. A. Cabrerizo-Vílchez. (1999). Axisymmetric drop shape analysis as penetration film balance applied at liquid-liquid interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 156, 509-517.

Winston Ho, W. S. et K. K. Sirkar. (2012). *Membrane Handbook*, Vol. I. Springer Science & Business Media.

Xu, Q., M. Nakajima, Z. Liu, et T. Shii. (2011). Soybean-based Surfactants and Their Applications. In T.-B. Ng (Ed.), *Soybean - Applications and Technology*. InTech.

Yuan, C. et L. J. Johnston. (2002). Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies. *Journal of Microscopy* 205, 136-146.

Zhao, C., J. Xue, F. Ran, et S. Sun. (2013). Modification of polyethersulfone membranes – A review of methods. *Progress in Materials Science* 58, 76-150.

Zhu, Y., D. Wang, L. Jiang, et J. Jin. (2014). Recent progress in developing advanced membranes for emulsified oil/water separation. *NPG Asia Materials* 6, e101.

Sites internet

ALC. (2007). About Soy Phospholipids. Consulté 3 mai 2016, à l'adresse <http://www.americanlecithin.com/aboutphos.html>

Avanti Polar Lipids. (2016). Critical Micelle Concentrations (CMCs). *Avanti Polar Lipids*. Consulté 1 octobre 2017, à l'adresse <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/cmcs/>

ChemSpider. (2017). ChemSpider. Consulté 1 octobre 2017, à l'adresse www.chemspider.com.

Seppic. (2016a). Montanov 68. *SEPPIC*. Consulté 3 mai 2016, à l'adresse <https://www.seppic.com/fr/montanov-68>

Seppic. (2016b). Montanov L. *SEPPIC*. Consulté 3 mai 2016, à l'adresse <https://www.seppic.com/fr/montanov-l>

Seppic. (2017c). Ceramosides HP. *SEPPIC*. Consulté 3 mai 2016, à l'adresse <https://www.seppic.com/fr/ceramosides-hp>

Annexe I. Caractérisation de l'émulsion par granulométrie laser

Des analyses complémentaires de taille de l'émulsion avant filtration ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer 3000 de Malvern acquis par le laboratoire GEPEA en janvier 2017. Cet appareil permet de mesurer des particules dans l'intervalle entre $0,01\mu\text{m}$ et $3500\mu\text{m}$ avec une précision de 0,6 %. Les analyses ont été faites dans un échantillonneur Hydro LV de 600 mL de capacité. Un indice de réfraction de 1,47 correspondant à l'huile de colza et un indice d'absorption nul a été utilisé pour les analyses. Quelques gouttes sont ajoutées à la cuve Hydro LV contenant 600mL d'eau agitée à 1500 tpm. La quantité d'échantillon permet d'atteindre une obscurité entre 2,5 - 3 %.

Annexe II. Distribution de taille de particules

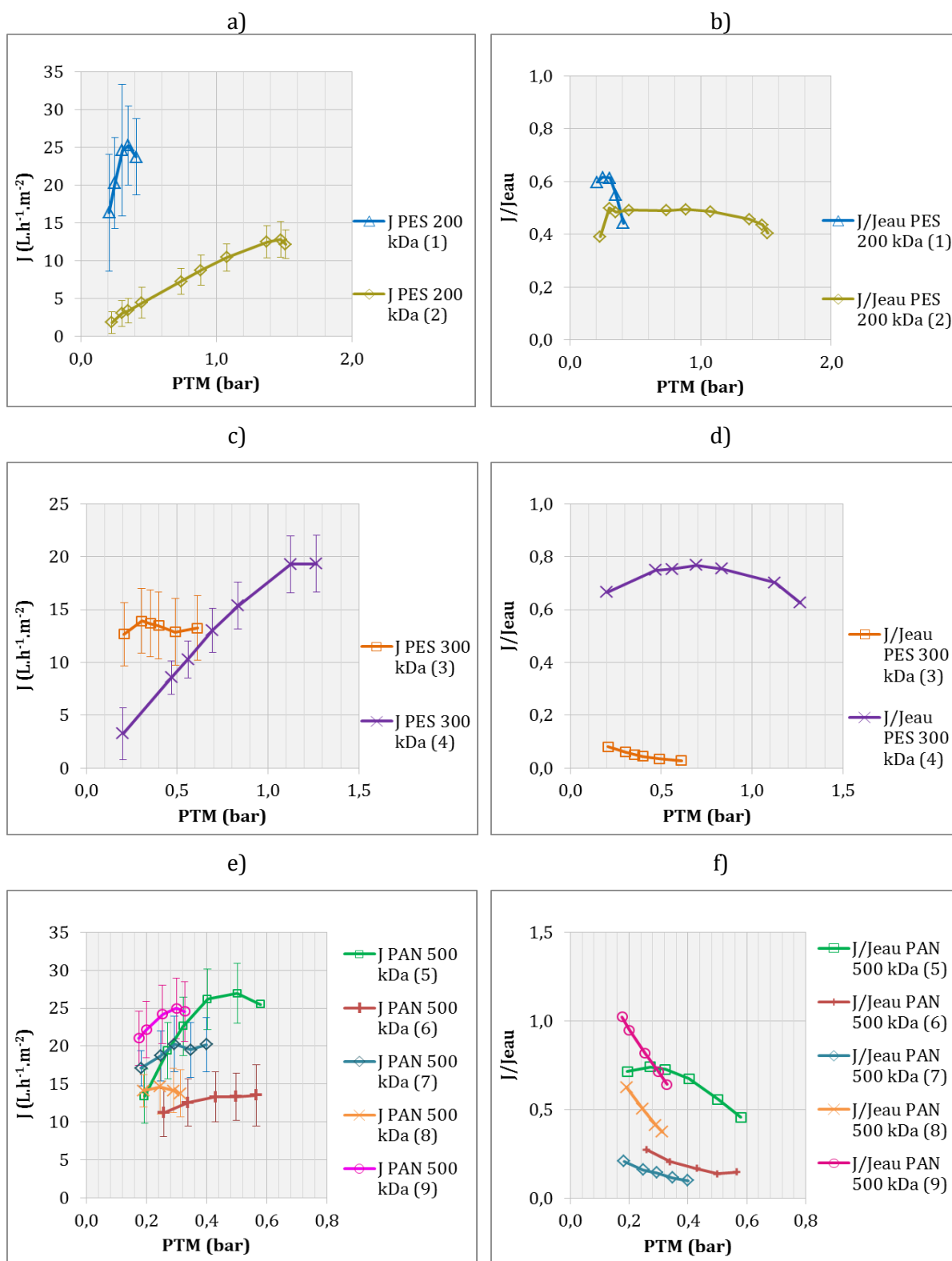
La taille de gouttelettes des lipides est un paramètre déterminant des caractéristiques des émulsions. Par exemple, un produit avec une granulométrie très fine (plus visqueuses que celles portant de grosses gouttelettes) (Doumeix, 2011), aura une meilleure stabilité.

Les distributions de taille peuvent être déterminées par rapport au nombre de particules, à la surface total ou au volume total, ces deux dernières étant très répandues pour la caractérisation des émulsions. Plusieurs diamètres peuvent caractériser une distribution granulométrique : i) D_{10} exprime diamètre moyen de la distribution en nombre, ii) D_{32} exprime le diamètre moyen de la distribution en surface et iii) D_{43} exprime le diamètre moyen de la distribution en volume.

Il est possible aussi de présenter les distributions granulométriques par les diamètres D_{10} , le D_{50} et D_{90} qui correspondent aux diamètres au-dessous desquels se trouvent le 10 %, le 50 % et le 90 % des particules. Le D_{50} représente la médiane de la taille de particules analysées.

Une adéquate présentation de résultats doit être choisie selon l'application. Dans le cas des émulsions, la granulométrie est souvent présentée avec les diamètres de la distribution cumulée en volume Dv_{10} , le Dv_{50} et Dv_{90} . Ces trois diamètres permettent de voir, en plus du diamètre médian, la largeur de la distribution. Parce que les distributions en volume donnent aussi une idée de la masse de la phase dispersée, dans ce travail, toutes les analyses granulométriques ont été présentées en termes de distributions en volume.

Annexe III. Variation du flux de perméat (J) et du flux normalisé (J/Jeau) avec la pression transmembranaire (PTM) pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion



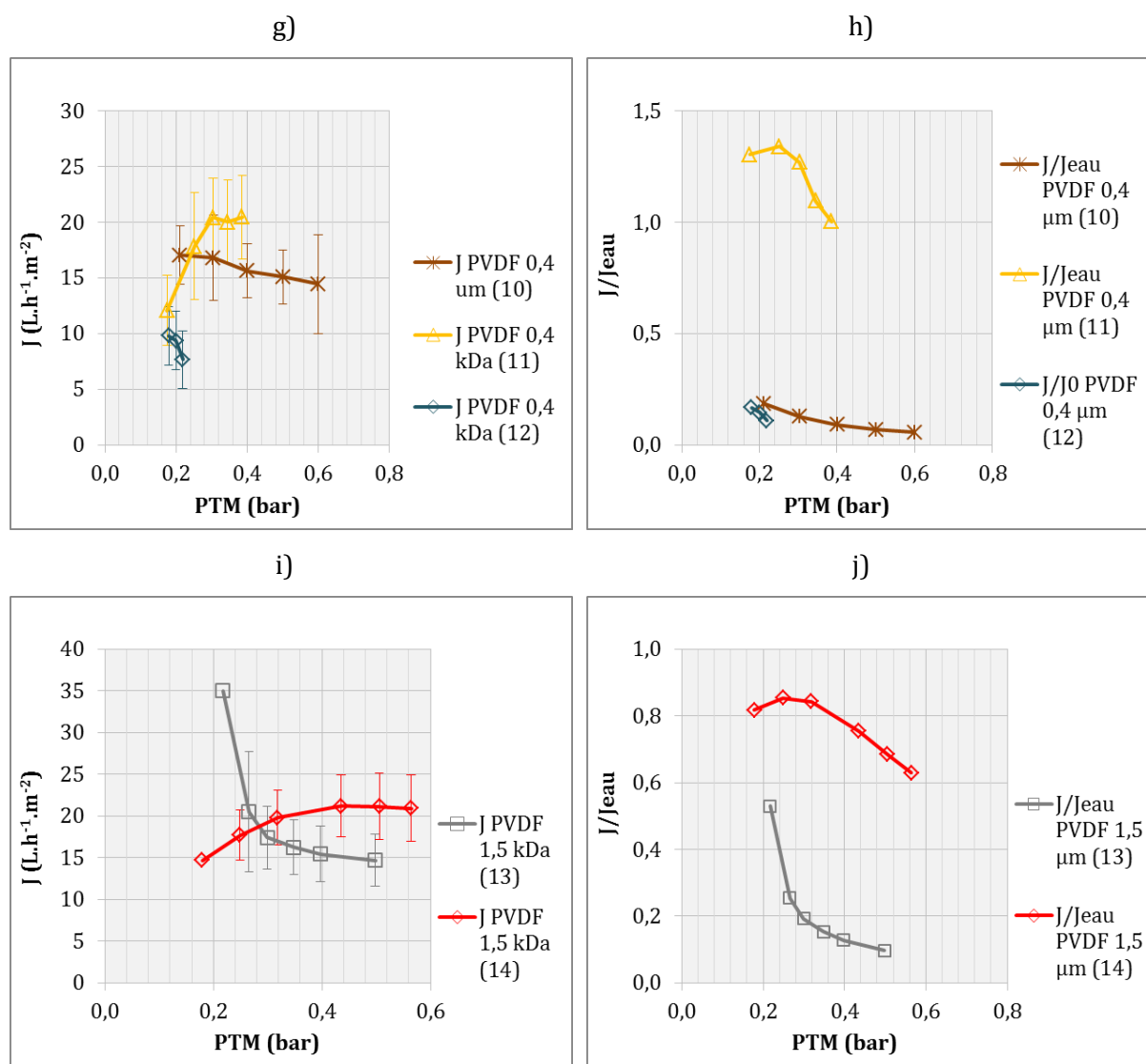


Figure 78. Variation du flux de perméat (J) (gauche) et du flux normalisé (J/Jeau) (droite) avec la pression transmembranaire (PTM) pour des essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PES 200 kDa, (c) (d) PES 300 kDa, (e) (f) PAN 500 kDa, (g) (h) PVDF 0,4 μm et (i) (j) PVDF 1,5 μm. Numéro d'essai entre parenthèse.

Annexe IV. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau

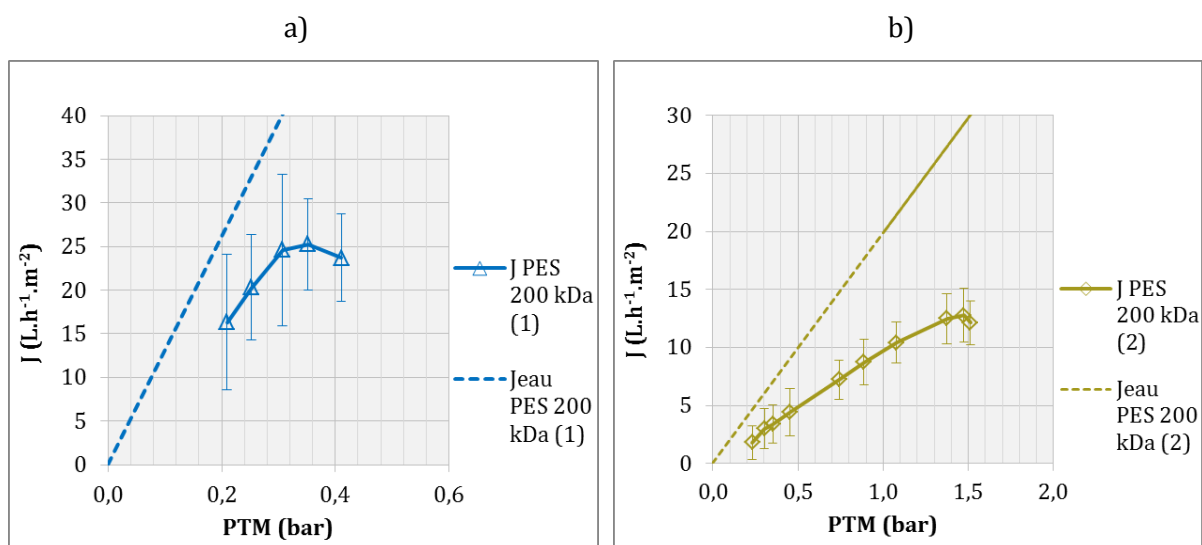


Figure 79. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PES 200 kDa

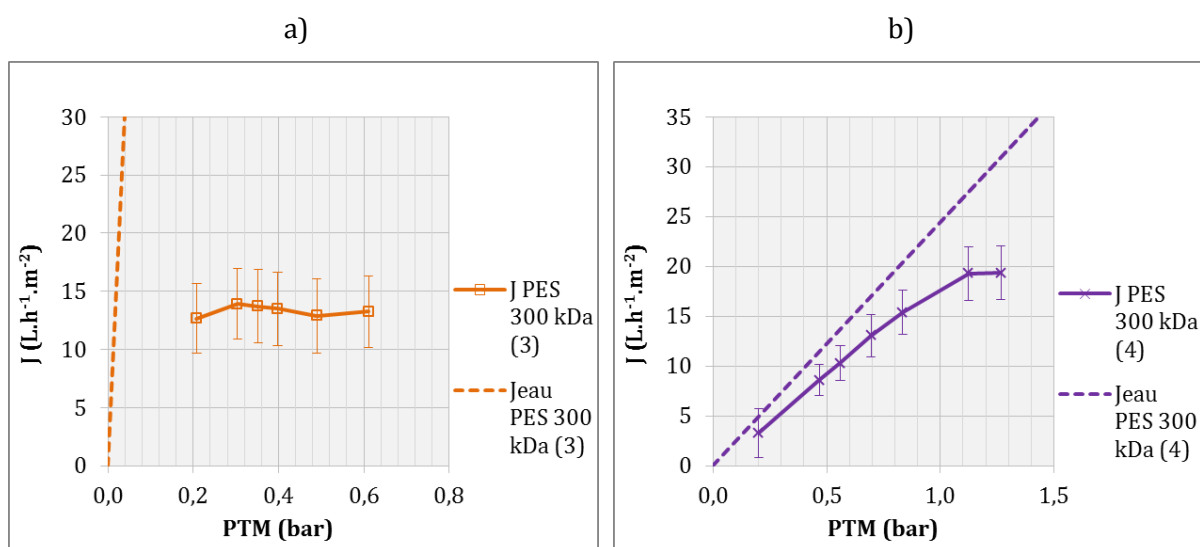


Figure 80. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PES 300 kDa

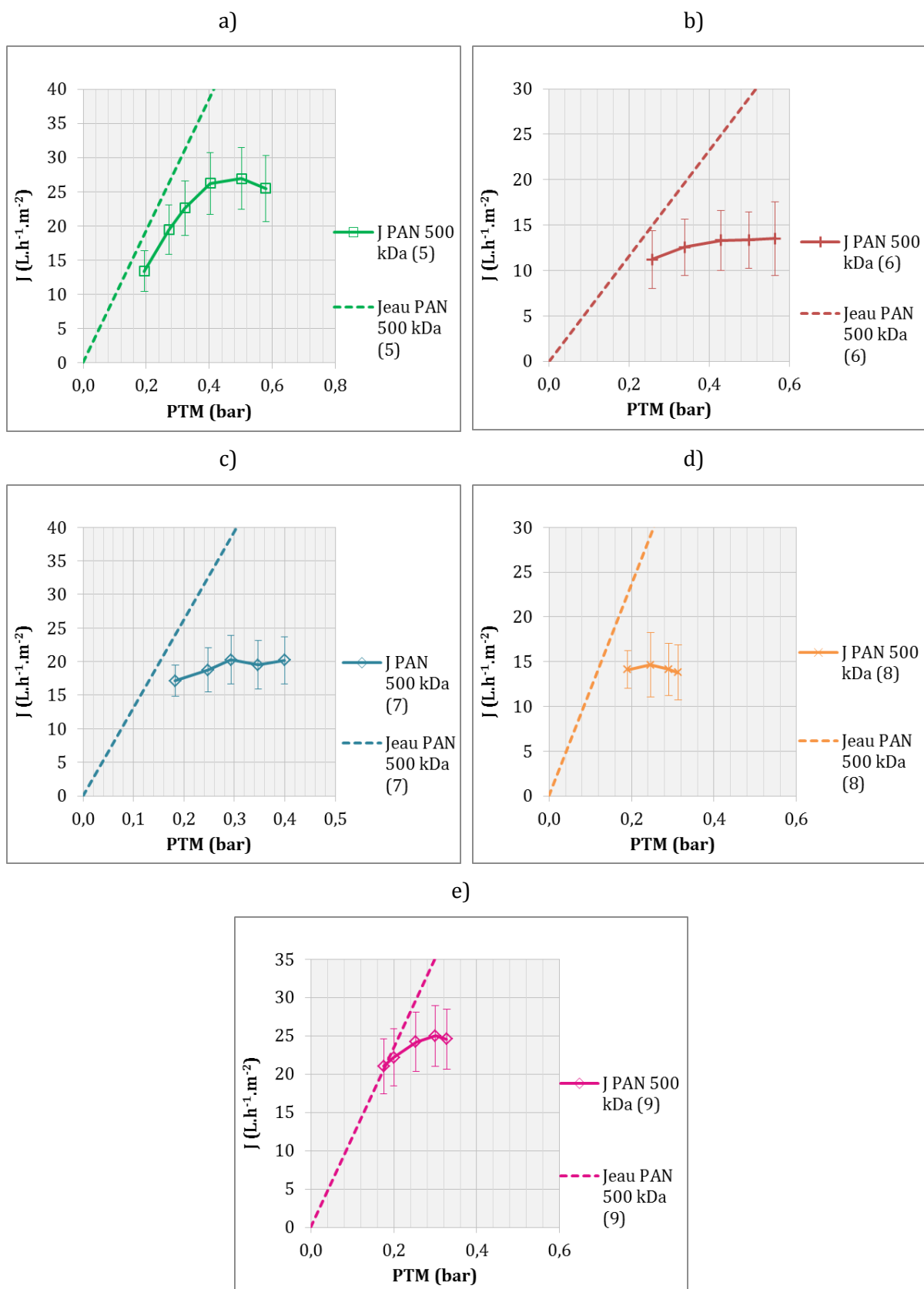


Figure 81. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PAN 500 kDa

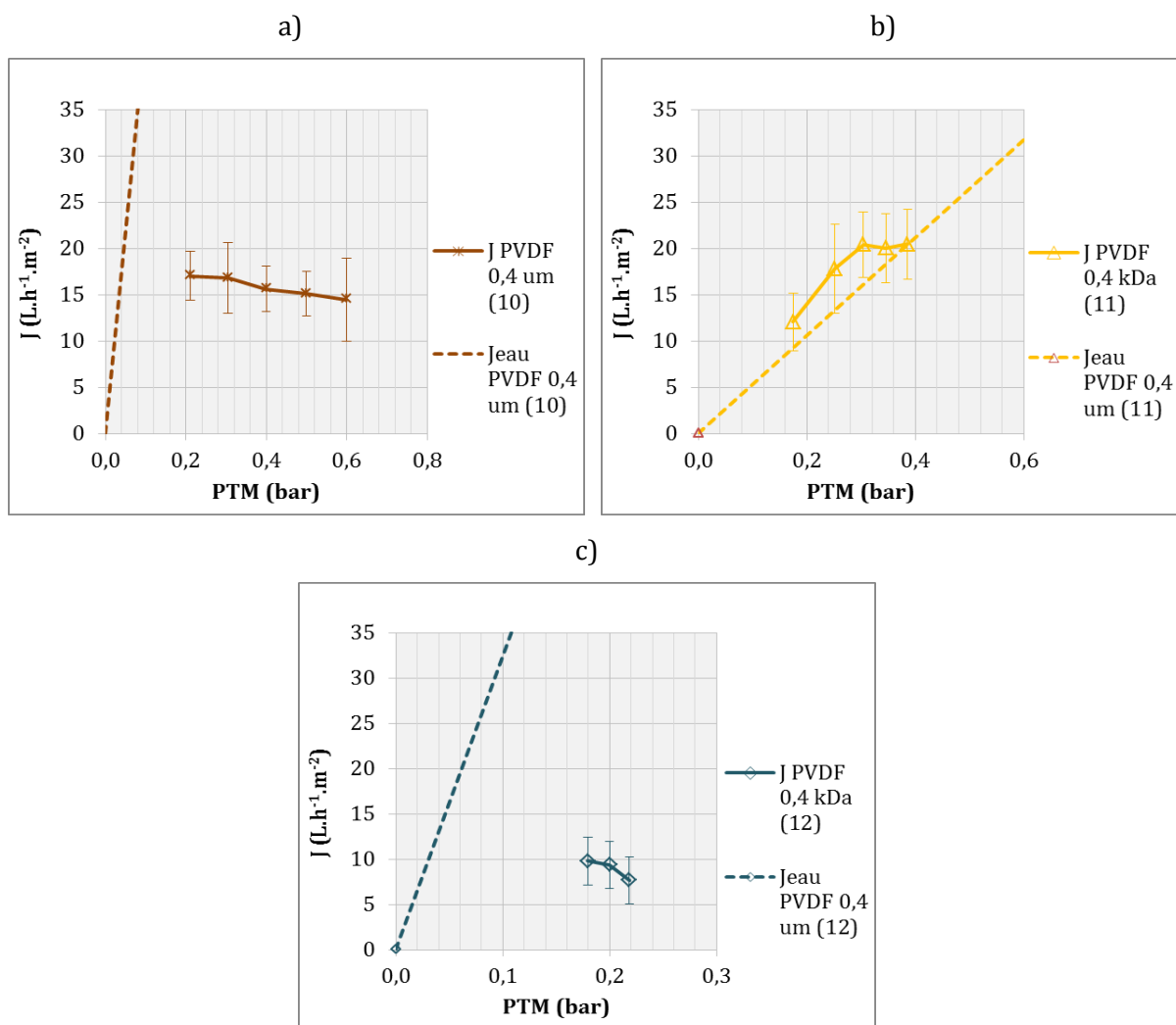


Figure 82. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes PVDF $0,4 \mu\text{m}$

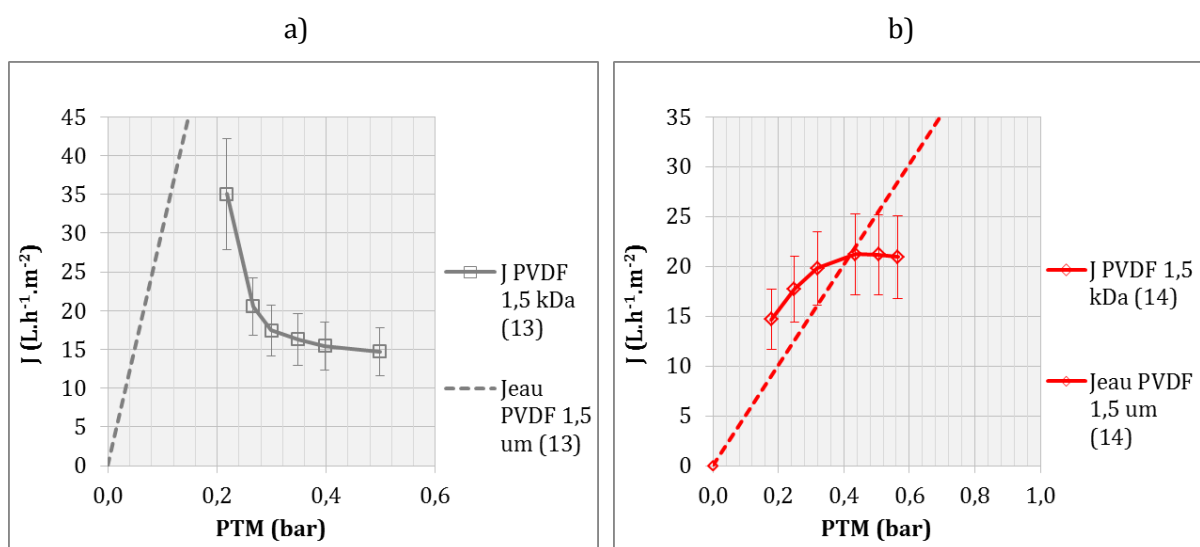


Figure 83. Flux de perméat de filtration de l'émulsion comparé au flux à l'eau pour des essais de filtration avec des membranes en PVDF $1,5 \mu\text{m}$

Annexe V. Filtration de l'émulsion: J et J/Jeau en fonction du temps

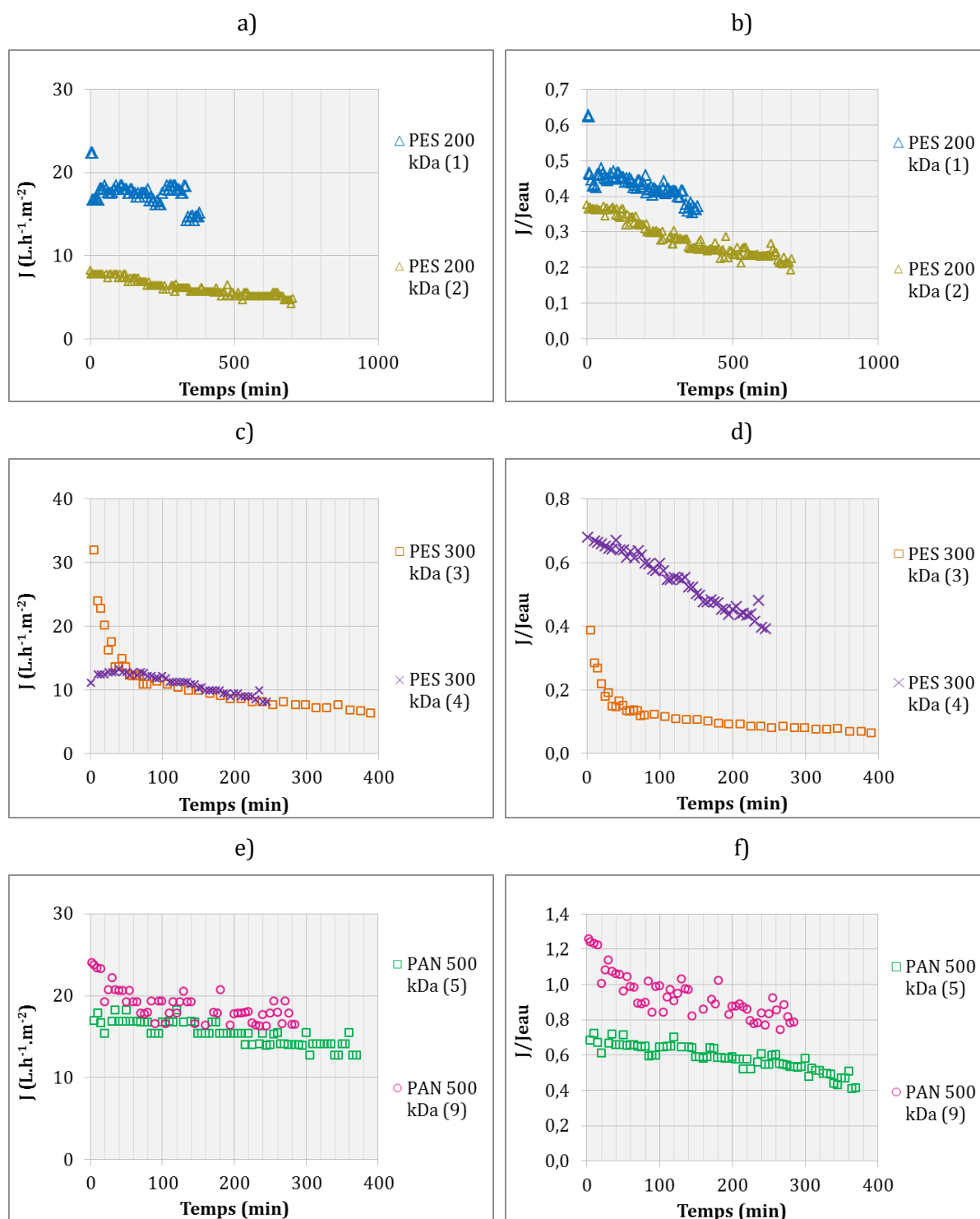


Figure 84. Flux de perméat et flux normalisé en fonction du temps pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PES 200 kDa, (c) (d) PES 300 kDa, (e) (f) PAN 500 kDa

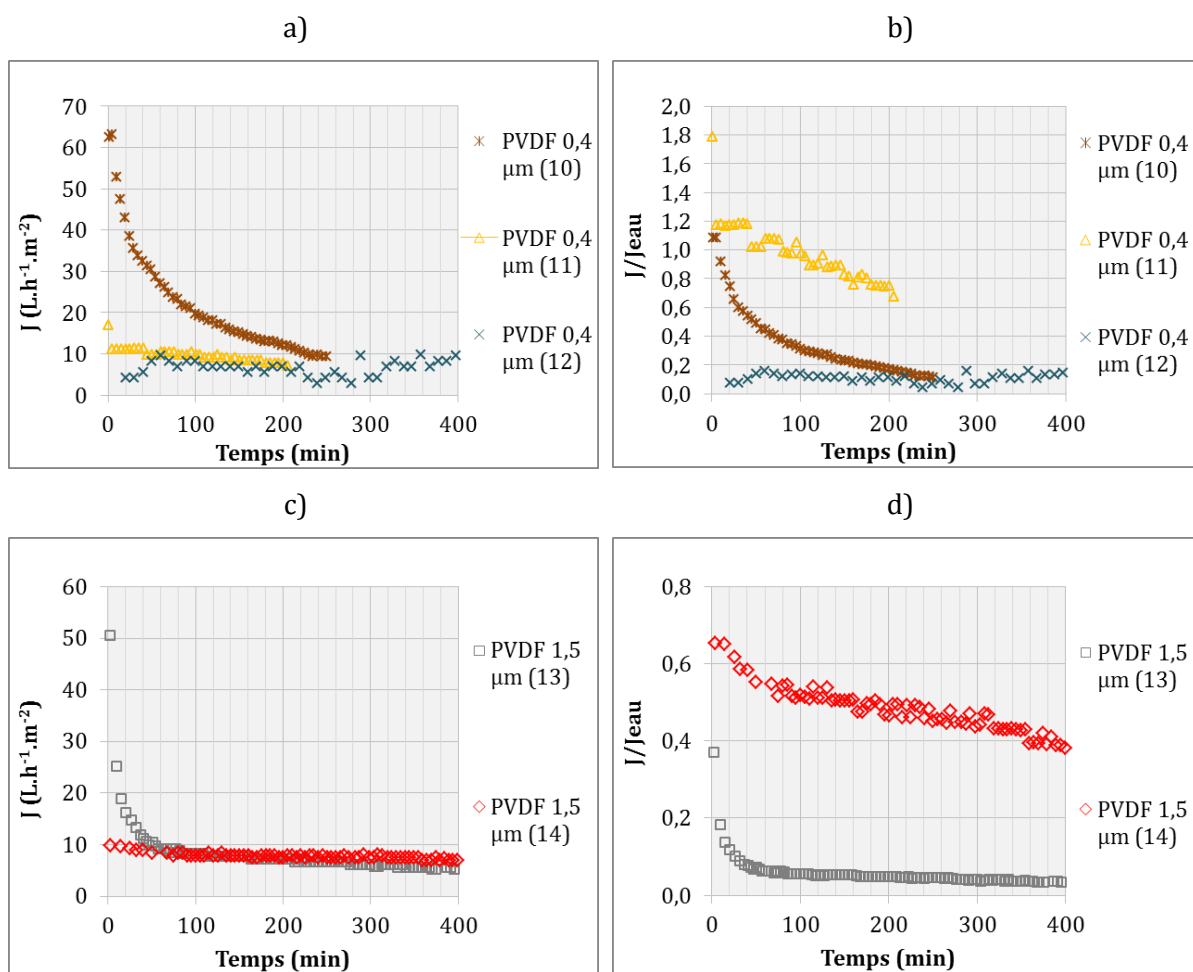


Figure 85. Flux de perméat et flux normalisé en fonction du temps pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) (b) PVDF 0,4 µm, (c) (d) PVDF 1,5 µm

Annexe VI. Filtration de l'émulsion: J en fonction du FRV

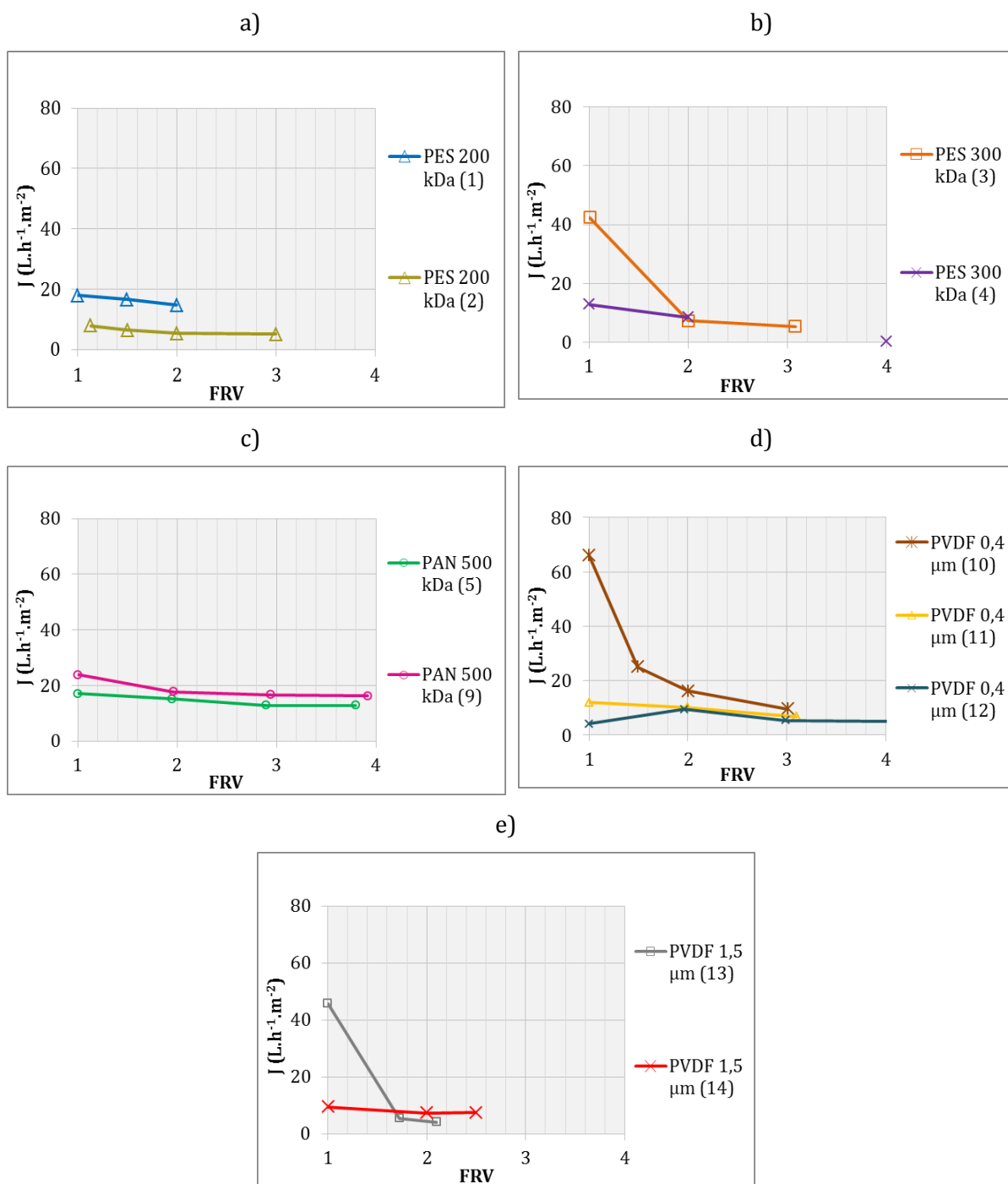


Figure 86. Flux de perméat en fonction du FRV pour plusieurs essais de filtration de l'émulsion avec des membranes (a) PES 200 kDa, (b) PES 300 kDa, (c) PAN 500 kDa, (d) PVDF 0,4 μm et (e) PVDF 1,5 μm

Annexe VII. Suivi du pH et de la conductivité pendant la filtration

Le **Tableau 38** montre le pH des échantillons de rétentat et de perméat ainsi que la conductivité des perméats pendant la concentration de l'émulsion pour plusieurs expériences.

Tableau 38. Évolution du pH et de la conductivité lors de la concentration de l'émulsion à 25°C

Membrane	Essai	FRV	pH (25 ° C)		Conductivité (μS/cm) (25 ° C)
			Rétentat	Perméat	Perméat
PES 200 kDa	1	1,0	7,3	-	-
		1,5	7,3	7,2	731,0
		2,0	7,3	7,1	809,0
PES 300 kDa	3	1,0	7,4	-	-
		2,0	-	-	726,0
		3,0	-	-	765,0
PAN 500 kda	5	1,0	7,5	-	-
		2,0	7,4	7,4	774,4
		3,1	7,5	7,4	863,0
		4,1	7,5	7,4	890,3
PVDF 0,4 μm	10	1,0	7,5	-	-
		1,5	7,4	7,4	794,0
		2,0	7,4	7,4	802,0
		3,0	7,4	7,4	817,0
PVDF 1,5 μm	13	1,0	7,4	-	-
		1,7	-	-	773,0
		2,1	-	-	774,0

Annexe VIII. Analyse de la fraction TAG de l'échantillon HPD85 (B3)

This table gives the TAGs composition of nitrogen starved *Parachlorella kessleri* for samples of Batch B3. A Triacylglycerol (TAG) is represented by its 3 fatty acids. CN: carbon number; DB: double bond, ECN: equivalent carbon number; P: palmitic (16:0); S: stearic (18:0); O: oleic (18:1 n-9), L: linoleic (18:2 n-6); Po: Palmitoleic (16:1) M: Myristic (14:0); Ln: Linolenic (18:3 n-3)*. Only for HPD85.

Tableau 39: Triacylglycerols identified in lipid extracts from nitrogen starved P.Kessleri (B3) by HPLC-ELSD and MALDI TOF analysis.

MALDI TOF TAG m/z [M+Na] ⁺	Composition Hypothétique TAG	CN : DB	ECN	HPLC-ELSD % TAG (g/100g)		
				CI	HPD85	SupHPD85
895.8	LnLnLn	54 : 9	36	traces	traces	traces
897.8	LLnLn	54 : 8	38			
	MLnLn	50 : 6	38	traces	traces	traces
871.8	PoLnLn*	52 : 7	38			
899.8	OLnLn	54 : 7	40			
	LLLn	54 : 7	40	5.1	9.5	4.3
873.8	PLnLn	52 : 6	40			
	PoLLn*	52 : 6	40			
901.8	OLLn	54 : 6	42			
	LLL	54 : 6	42			
	SLnLn	54 : 6	42			
875.8	PLLn	52 : 5	42	12.8	16.8	11.7
	PoOLn*	52 : 5	42			
	PoLL*	52 : 5	42			
849.8	MOLn	50 : 4	42			
	MLL	50 : 4	42			
903.9	OOLn	54 : 5	44			
	OLL	54 : 5	44			
	SLLn	54 : 5	44			
877.8	POLn	52 : 4	44			
	PLL	52 : 4	44			
	PoOL*	52 : 4	44	31.5	25.9	30.1
	PoSLn*	52 : 4	44			
851.8	MOL	50 : 3	44			
	PLnP	50 : 3	44			
	PPoL*	50 : 3	44			
	PoOPo*	50 : 3	44			
	MSLn	50 : 3	44			
905.9	OLO	54 : 4	46			
	SOLn	54 : 4	46			
	SLL	54 : 4	46			
879.9	POL	52 : 3	46			
	OOPo*	52 : 3	46	33.4	28.5	35.0
	PSLn	52 : 3	46			
	PoSL*	52 : 3	46			
853.8	MOO	50 : 2	46			
	PPL	50 : 2	46			
	MSL	50 : 2	46			

MALDI TOF TAG m/z [M+Na] ⁺	Composition Hypothétique TAG	CN : DB	ECN	HPLC-ELSD % TAG (g/100g)		
				CI	HPD85	SupHPD85
907.9	OOO	54 : 3	48			
	SOL	54 : 3	48			
	SSLn	54 : 3	48	14.0	14.9	15.3
881.9	POO	52 : 2	48			
	PSL	52 : 2	48			
Not identified			50	3.2	4.4	3.7

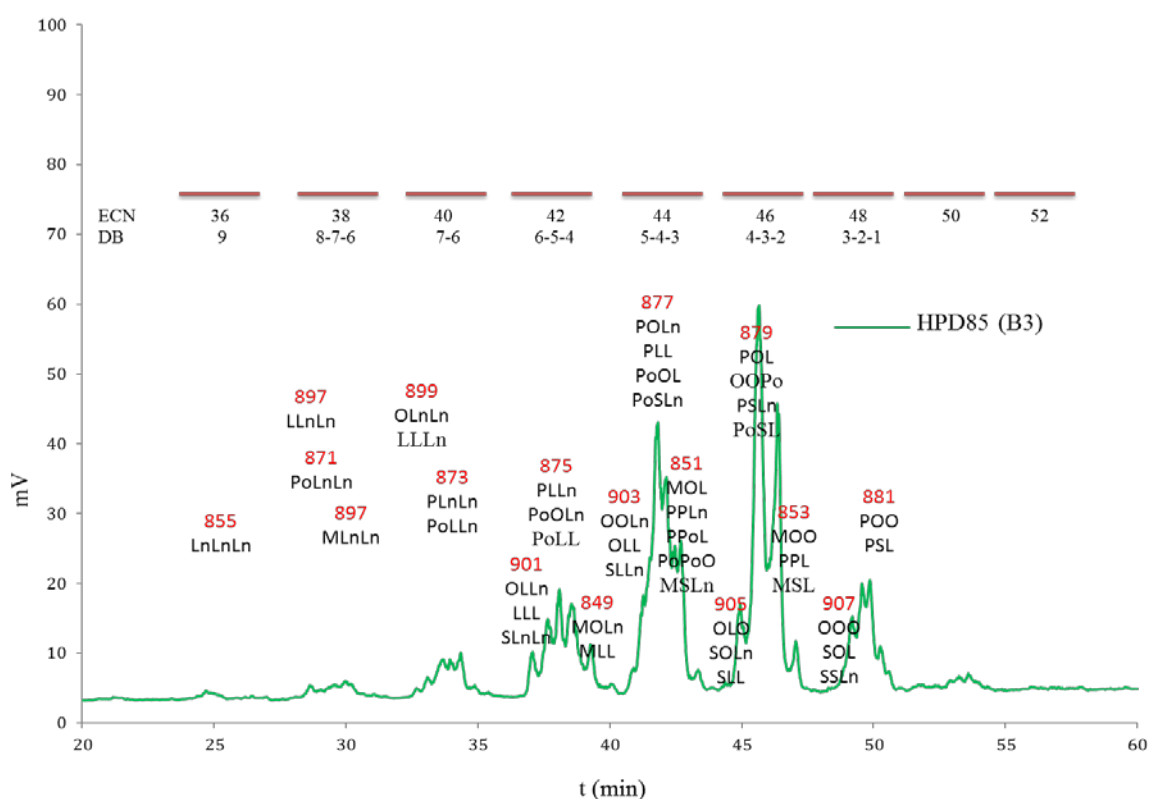


Figure 87. Probable TAG composition of HPD85 (B3) sample. Results from HPLC and Maldi TOF analysis. ECN = equivalent carbon number. DB = double bond. P: palmitic acid (16:0); S: stearic acid; O: oleic acid, L: linoleic acid; Po: palmitoleic acid; M: myristic acid; Ln: linolenic acid..

Thèse de Doctorat

Erika CLAVIJO RIVERA

Etude physicochimique du comportement d'une solution synthétique d'un broyat de microalgues et de la séparation par procédés membranaires des lipides qu'il contient

Physicochemical study of a ground microalgae synthetic mixture and its lipids separation by membrane processes

Résumé

Ce travail est développé dans un contexte de bioraffinage de produits issus de microalgues. L'objectif principal était d'étudier la filtration membranaire de lipides produits par des microalgues ainsi que de comprendre les phénomènes physicochimiques pouvant avoir lieu à l'interface liquide-liquide lors de la séparation. Pour cela, trois axes de recherche ont été suivis. Initialement, sur la base de la caractérisation d'un broyat réel de la microalgue *P. kessleri*, cultivée en conditions de carence en azote, un mélange synthétique constitué d'une émulsion d'huile dans l'eau a été préparé. Une composition spécifique a été définie et un protocole d'émulsification a été établi. Deuxièmement, le comportement des surfactants de l'émulsion à l'interface huile/eau et air/eau a été évalué par la méthode de la goutte pendante et de la balance de Langmuir. La tension interfaciale à l'équilibre, la dynamique d'adsorption (interface huile/eau) et les isothermes de compression (interface air/eau) ont été ainsi déterminées. Finalement, afin d'évaluer la séparation des lipides de l'émulsion par des procédés membranaires, les performances de plusieurs membranes hydrophobes et hydrophiles (polyéthersulfone, polyfluorure de vinylidène, polyacrylonitrile) de micro et ultrafiltration ont été examinées pour la concentration des lipides de l'émulsion préparée. En complément, afin de fournir des éléments permettant d'évaluer le lien entre les propriétés de l'interface huile/eau et les performances de la filtration, l'évolution de la taille de gouttelettes et l'apparition du phénomène de coalescence et de colmatage au cours de la filtration, ont été analysés.

Mots clés

Bioraffinage de microalgues, biocarburants, filtration membranaire, émulsion, phénomènes d'interface, lipides.

Abstract

This work is developed within the framework of microalgae biorefinery. The main objective was to study the membrane separation of lipids produced by microalgae and to understand the physicochemical phenomena that can occur at the liquid-liquid interface during separation. To this purpose, three main axes of research were followed. Initially, based on the characterization of a real suspension of ground *P. kessleri* microalgae, growth under starving nitrogen conditions, a synthetic mixture, consisting of an oil-in-water emulsion, was prepared. A specific composition was formulated and an emulsification protocol was established. Then, the behavior of the surfactants of the emulsion at the oil/water and air/water interface was evaluated using the pendant drop and Langmuir trough methods. The interfacial tension at equilibrium, the adsorption dynamics (oil/water interface) and the pressure isotherms (air/water interface) were determined. Finally, in order to evaluate the separation of the lipids from the emulsion by membrane processes, the performances of several hydrophobic and hydrophilic micro and ultrafiltration membranes (polyethersulfone, polyvinylidene fluoride, polyacrylonitrile) were assessed for a lipid concentration equivalent to the prepared emulsion. In addition, in order to provide elements allowing to evaluate the link between the properties of the oil / water interface and the filtration performances, the evolution of droplet size and the arising of the coalescence phenomenon and clogging during filtration, were analyzed.

Key Words

Microalgae biorefinery, biofuel, membrane filtration, emulsion, , interfacial phenomena, lipids.