

Université des Sciences et Technologies de Lille 1
Ecole doctorale
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Université de Carthage
Institut National Agronomique de Tunisie

Thèse en cotutelle

Pour obtenir le grade de

Docteur

**Etude du lien entre la physico-chimie de dérivés laitiers et leur
aptitude à l'encrassement lors du traitement thermomécanique en
échangeur de chaleur**

présentée par Marwa Khaldi

Soutenue le 24/05/2016 à Polytech Lille

M. Thierry Ruiz, Maître de conférences à l'Université de Montpellier
M. Luc Fillaudeau, Directeur de recherche à l'Université de Toulouse
M. Hamadi Attia, Professeur à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax
M. Mohamed Ali Ayadi, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax
M. Guillaume Delaplace, Directeur de recherche à l'INRA de Lille - PIHM UMET
Mme Salwa Bornaz, Professeure à l'Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis
M. Romain Jeantet, Professeur à Agrocampus Ouest
M. Thomas Croguennec, Professeur à Agrocampus Ouest
M. Christophe André, Enseignant-chercheur à HEI
M. Pascal Blanpain-Avet, Chargé de recherche à l'INRA de Lille - PIHM UMET
M. Didier Beudon, Directeur de recherche à Savencia

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Directrice de thèse
Invité/co-directeur de thèse
Invité/co-encadrant
Invité/co-encadrant
Invité/co-encadrant
Invité

**“ Tout obstacle renforce la
détermination. Celui qui s'est
fixé un but n'en change pas ”**

Léonard de Vinci

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Maître de conférences Thierry Ruitz pour avoir présidé le jury lors de ma soutenance de thèse. Je tiens également à remercier le Directeur de recherche Luc Fillaudeau et le Professeur Hamadi Attia qui m'ont fait le grand honneur de rapporter cette thèse ainsi que le Professeur Mohamed Ali Ayadi pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Guillaume Delaplace, Directeur de Recherche à l'INRA de Lille - PIHM UMET, sans qui ce travail de thèse n'aurait jamais eu lieu. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec lui. Je ne le remercierai jamais assez pour m'avoir enseigné son goût du perfectionnisme et son professionnalisme sans faille. Ses conseils avisés et ses critiques constructives m'ont particulièrement été bénéfiques dans la conduite et l'aboutissement de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance pour son soutien indéfectible et sa disponibilité dans les moments de doute.

Je tiens à adresser mes remerciements à Salwa Bornaz, Professeure à l'ESIAT, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse.

Ma reconnaissance va aussi à Romain Jeantet, Professeur à Agrocampus Ouest et co-directeur de thèse, pour l'attention portée à mon travail et le temps qu'il m'a consacré. Ses commentaires pertinents, constructifs et son aide inestimable m'ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit et des publications.

Je remercie infiniment Thomas Croguennec, Professeur à Agrocampus Ouest, Christophe André, Enseignant-chercheur à HEI, Pascal Blanpain-Avet, Chargé de recherche à l'INRA de Lille - PIHM UMET et Laurent Bouvier, Ingénieur d'études à l'INRA de Lille - PIHM UMET, pour leur participation active et leur implication dans le co-encadrement et le suivi de cette thèse. Leurs suggestions et connaissances éclairées ont permis d'enrichir cette thèse. Je leur suis reconnaissante pour leurs conseils autour de la physico-chimie des solutions laitières, des modèles cinétiques de dénaturation et de la simulation des profils de concentrations des différentes espèces protéiques. Leurs expériences ont été précieuses pour l'amélioration de la qualité finale de ce document de thèse et des publications.

Je remercie vivement les membres de PIHM pour leur accueil chaleureux, leur extrême gentillesse, leur générosité inestimable et leurs précieux encouragements.

Je tiens à remercier tout particulièrement Gilles Ronse, Thierry Six et Anne Moreau, Techniciens à l'INRA de Lille - PIHM UMET, pour leur précieuse contribution aux essais d'encrassement sur pilote et de dénaturation thermique. Je remercie également Maude Jimenez, Maître de conférences à l'UMET, et Séverine Bellayer, Ingénieur de recherche à l'UMET, pour leur aide sur les essais de caractérisation de la composition et de la structure de dépôts. J'ai énormément apprécié la qualité humaine des personnes citées ci-dessus, leurs grandes compétences et leurs disponibilités. Cette thèse n'aurait jamais abouti sans leurs collaborations.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Didier Beudon, Directeur de recherche à Savencia, et Nicolas Erabit, Ingénieur de recherche à Protarmor, pour leur appui et l'éclairage industriel apporté à cette thèse à travers leurs recommandations et leurs conseils.

Cette thèse a été pour moi une expérience scientifique, professionnelle et humaine formidable et très enrichissante. Que toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail trouvent ici une juste reconnaissance et l'expression de ma profonde gratitude.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à mes parents et mon frère Louka qui ont supporté mon stress et mes sautes d'humeur toujours avec tendresse et sourire et qui, malgré la distance, ont toujours été à mes côtés dans les bons comme les mauvais moments. Je leur dédie ce travail et espère être à la hauteur de leur fierté inconditionnelle.

“Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.” Marcel Proust

RESUME

Ce travail de thèse est une contribution à la compréhension de l'encrassement des échangeurs de chaleur à plaques (ECP) lors du traitement thermique de solutions de protéines du lactosérum. Ce travail vise principalement à établir les liens existants entre la composition des différentes solutions de lactosérum (teneurs en β -lactoglobuline (β -lg) et en calcium), leurs comportements en dénaturation et leurs aptitudes à encrasser les surfaces chaudes de l'ECP.

Cette étude a montré la forte influence de la teneur en calcium et du ratio molaire calcium/protéine sur : (i) les mécanismes de dénaturation thermique de la β -lg, (ii) les distributions des masses de dépôt protéique collectées, (iii) la dynamique de formation de dépôt et (iv) la structure des premières couches de dépôt en surface.

Par ailleurs, la détermination des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg et la connaissance de l'histoire thermique du produit ont permis de simuler les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg (native, dépliée et agrégée) le long de l'ECP et d'étudier la corrélation entre la masse de dépôt sec et les quantités de β -lg dénaturées dans l'ECP. Ainsi, cette simulation a pu mettre en évidence : (i) le faible rôle des agrégats dans les mécanismes d'encrassement et (ii) à la fois l'influence de l'espèce dépliée et de la teneur en calcium dans la distribution du dépôt protéique.

Enfin, une corrélation originale entre la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les paramètres cinétiques de dénaturation a été établie pour chaque solution protéique modèle étudiée, montrant ainsi l'impérieuse nécessité des approches de génie de la réaction chimique pour prédire l'encrassement protéique.

Mots clés : mécanismes d'encrassement de dérivés laitiers, échangeur de chaleur à plaques, calcium, β -lactoglobuline, dénaturation thermique, modélisation, analyse de la structure de dépôts.

Abstract

This Ph.D. work is a contribution for understanding the fouling in plate heat exchangers (PHE) during the heat treatment of whey protein solutions. This work aims at establishing the relationship between the composition of the different whey protein solutions (β -lactoglobulin content (β -lg) and calcium), their denaturation behaviour and their ability to foul the hot surfaces of the PHE.

This study showed the strong impact of the calcium content and the calcium/protein molar ratio on: (i) the β -lg thermal denaturation mechanisms, (ii) the distributions of the deposit fouling, (iii) deposit formation dynamics and (iv) the structure of the first deposit layers.

The determination of the β -lg denaturation kinetic constants and the knowledge of the thermal profile allowed to simulate the concentration profiles of the different β -lg species (native, unfolded and aggregated) along the PHE and to study the correlation between the dry deposit mass of and the amount of denatured β -lg in the PHE. This simulation highlighted: i) the negligible role of the aggregates in the fouling mechanisms and ii) both the influence of the unfolded species and the calcium content on the distribution of protein deposition.

Finally, a new correlation between the distribution of dry deposit masses in each channel of the PHE and the denaturation kinetic parameters was determined for each studied protein solution, showing thus that chemical reaction engineering approaches are requested for predicting proteinaceous fouling.

Key words: milk derivative fouling mechanisms, plate heat exchanger, calcium, β -lactoglobulin, heat-induced denaturation, modelling, structure deposit analyses.

ملخص

تهدف هذه الأطروحة إلى المساهمة في فهم بقايا المكونات التي تترسب على لوحات المبادلات الحرارية عند المعالجة الحرارية لسوائل بروتينات مصلى الألبان.

ويرتكز هذا العمل على بيان العلاقة بين مكونات مختلف سوائل مصلى الألبان (مستويات الكالسيوم و β - لكتوغلوبولين) وتفاعلاتها على تغيير طبيعتها وقدرتها على ترك بقايا المكونات على المساحات الساخنة للوحات المبادلات الحرارية. وقد أظهرت هذه الدراسة تأثير قوي لمحتوى الكالسيوم ونسبة الكالسيوم / البروتين على كل مجالات التغيير الحراري β - لكتوغلوبولين ، والتوزيع الجماعي للترسبات، وديناميكية تشكيل الترسبات و هيكله الطبقات الأولى للترسب على هذه المساحة.

وعلاوة على ذلك فإن تحديد الثوابت الحركية لتغير طبيعة المواد ومعرفة البيانات للوحات الحرارية مكنت من محاكاة تركيز الأنواع المختلفة من β - لكتوغلوبولين على لوحات المبادلات الحرارية ودراسة العلاقة بين الترسب الجاف وكميات β - لكتوغلوبولين المتغيرة في لوحات المبادلات الحرارية.

وهكذا فإن هذه المحاكاة أبرزت ضعف دور التكتلات على آليات الترسبات والتأثيرات الرئيسية للأنواع غير المطوية والكالسيوم على توزيع ترسب البروتين.

وأخيرا أنشئ لكل سائل ، ارتباط بين توزيع كتلة الترسبات الجافة في كل قناة من لوحات المبادلات الحرارية ومعطيات التغيير ، والتي تبرز الحاجة الملحة لمقاربة هندسية للتفاعل الكيميائي لتوقع الترسبات.

الكلمات الرئيسية: آليات ترسب مشتقات الحليب ، لوحات المبادلات الحرارية ، كالسيوم ، β - لكتوغلوبولين ، التغيير الحراري ، تصميم ، هيكله الطبقات الأولى للترسب.

Nomenclature

A	constante définie par l'équation 2.2, -
a	paramètre ajustable de la régression non linéaire, -
b	paramètre ajustable de la régression non linéaire, -
C_A	concentration en β -lg agrégée, g.L^{-1}
C_{Ca}	concentration en calcium, ppm
C_N	concentration en β -lg native, g.L^{-1}
C_{pec}	chaleur massique de l'eau chaude, $\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$
C_{pp}	chaleurs massique du produit, $\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$
C_S	concentration en β -lg soluble, g.L^{-1}
C_S^0	concentration initiale en β -lg soluble, g.L^{-1}
C_U	concentration en β -lg dépliée, g.L^{-1}
c	paramètre ajustable de la régression non linéaire, -
D_h	diamètre hydraulique entre 2 plaques de l'ECP, m
D_{h_0}	diamètre hydraulique de l'échangeur propre, m
d	paramètre ajustable de la régression non linéaire, -
E	espèce entre 2 plaques consécutives de l'ECP, m
E_{A_n}	énergie d'activation, J.mol^{-1}
$E_{A,unf}$	énergie d'activation de dépliement déterminée à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), J.mol^{-1}
$E_{A,agg}$	énergie d'activation d'agrégation déterminée à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), J.mol^{-1}
E_{A_1}	énergie d'activation de dépliement déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, J.mol^{-1}
E_{A_2}	énergie d'activation d'agrégation déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, J.mol^{-1}
e	espèce entre 2 plaques consécutives de l'ECP, m
e_d	épaisseur moyenne de la couche de dépôt, m
F_T	facteur correctif de la différence de température logarithmique moyenne, -
h_{ec}	coefficient de convection thermique de l'eau chaude, $\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$
h_p	coefficient de convection thermique de la solution protéique modèle, $\text{W.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$
k_{agg}	constante cinétique d'agrégation déterminée à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_d	constante d'accumulation du dépôt définie par l'équation 2.4, -
k_n	constante cinétique de dénaturation, $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_n°	facteur de fréquence de la réaction de dénaturation déterminé à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_{unf}°	facteur de fréquence de dépliement déterminé à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_{agg}°	facteur de fréquence d'agrégation déterminé à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_r	constante l'accumulation du dépôt définie par l'équation 2.5, -
k_{unf}	constante cinétique de dépliement déterminé à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$
k_l	constante cinétique de dépliement déterminée à partir du modèle de deux réactions successives, $\text{g}^{1-n}.\text{L}^{n-1}.\text{s}^{-1}$

k_2	constante cinétique de d'agrégation déterminée à partir du modèle de deux réactions successives, $g^{1-n}.L^{n-1}.s^{-1}$
k_1°	facteur de fréquence de dépliement déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, $g^{1-n}.L^{n-1}.s^{-1}$
k_2°	facteur de fréquence d'agrégation déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, $g^{1-n}.L^{n-1}.s^{-1}$
L	largeur de la plaque, m
$M_{d,i}$	masse de dépôt dans chaque canal, g
\dot{m}_p	débit massique du produit, $kg.s^{-1}$
\dot{m}_{ec}	débit massique de l'eau chaude, $kg.s^{-1}$
Nu_{ec}	nombre de Nusselt de la solution protéique modèle, -
Nu_p	nombre de Nusselt de l'eau chaude, -
n	ordre de la réaction de dénaturation déterminé à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007), -
n_1	ordre de réaction de dépliement déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, -
n_2	ordre de réaction d'agrégation déterminé à partir du modèle de deux réactions successives, -
Pr	nombre de Prandtl à la température moyenne de la solution protéique modèle, -
Q	débit, $L.h^{-1}$
Q_p	débit du produit, $L.h^{-1}$
Q_{ec}	débit de l'eau chaude, $L.h^{-1}$
R	constante des gaz parfaits égale à 8,314, $J.mol^{-1}.K^{-1}$
Re	nombre de Reynolds, -
R_{enc}	résistance totale du dépôt encrassant, en $m^2.^\circ C.W^{-1}$
r	ratio des constantes cinétiques de dénaturation, -
r_1	constante définie par les équations 3.17 et 3.22
r_2	constante définie par les équations 3.18 et 3.23
S	surface d'échange d'une plaque d'ECP, m^2
T	température, K
T_{ep}	température d'entrée du produit, K
T_{sp}	température de sortie du produit, $^\circ C$
T_{eec}	température d'entrée de l'eau chaude, K
T_{sec}	température de sortie de l'eau chaude, $^\circ C$
T_w	température de paroi, $^\circ K$
t	temps, s
U_g	coefficient de transfert de chaleur global, $W.m^{-2}.K^{-1}$
U_{g_0}	coefficient de transfert de chaleur global de l'échangeur propre, $W.m^{-2}.K^{-1}$
V_i	volume du canal, L
v	vitesse moyenne d'écoulement du fluide, $m.s^{-1}$
Y_n	constante définie par l'équation 3.4, -
ΔP	perte de charge de l'ECP encrassé, bar
ΔP_0	perte de charge de l'ECP propre, bar
ΔT	différence de température entre l'entrée et la sortie du produit, K
ΔTLN	différence de température logarithmique moyenne entre le produit et l'eau chaude, K
Δt	pas de temps, s
α	degré de dépliement, -
λ_d	conductivité thermique du dépôt encrassant, $W.m^{-1}.K^{-1}$

λ_{ec}	conductivité thermique à la température moyenne de la solution protéique modèle, $W.m^{-1}.K^{-1}$
λ_p	conductivité thermique à la température moyenne de l'eau chaude, $W.m^{-1}.K^{-1}$
μ	viscosité de la solution protéique modèle, Pa.s
ρ	densité de la solution encrassante modèle, $kg.m^{-3}$
ρ_d	masse volumique de la solution protéique modèle, $kg.m^{-3}$
τ	temps de passage de la solution protéique modèle dans l'ECP, s
ε	efficacité de l'ECP, -

LISTE DES ABREVIATIONS

A	β -lg agrégée
agg	agrégation
Ca	calcium
C_i	numéro du canal
ECP	échangeur de chaleur à plaques
ec	eau chaude
N	β -lg native
P_i	numéro de la plaque
p	produit
U	β -lg dépliée
unf	dépliection
S	β -lg soluble
WPC	solution à base de concentrats de protéines sériques
WPI	solution à base d'isolats de protéines sériques
β -lg	β -lactoglobuline
α -la	α -lactalbumine

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Préambule.....	5
1. L'encrassement des surfaces d'échange des équipements de transformation : une problématique multi-secteurs	6
2. L'encrassement des surfaces d'échange dans l'industrie laitière : positionnement et enjeux	8
2.1. Importance du secteur laitier Français et enjeux de maîtriser les encrassements.....	8
2.2. Importance des opérations de texturation/stabilisation par traitement thermique dans le secteur laitier.....	8
2.3. Impact environnemental et économique des encrassements laitiers.....	9
3. Etudes traitant de l'encrassement des échangeurs de chaleur par des dérivés laitiers.....	12
3.1. Composition chimique du lait et des dépôts de dérivés laitiers.....	12
3.1.1. Composition chimique du lait	12
3.1.2. Composition chimique du dépôt laitier	13
3.2. Mécanismes d'encrassement par des solutions protéiques du lactosérum	15
3.2.1. Composition en protéines du lactosérum	15
3.2.2. Mécanismes de dénaturation chaude de la β -lactoglobuline.....	16
3.2.3. Modèles simplifiés couramment utilisés pour décrire les cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg	18
3.2.4. Principaux facteurs physico-chimiques influençant les mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg	20
3.3. Mécanismes de formation du dépôt encrassant par des solutions protéiques du lactosérum.....	21
3.3.1. Mécanismes d'initiation et de croissance du dépôt encrassant	21
3.3.2. Principales controverses sur la formation du dépôt encrassant.....	23
a) Mécanismes prépondérants	23
b) Rôle des espèces dépliées et agrégées de β -lg dans la dynamique de dépôt.....	24
c) Eléments constituant la première couche de dépôt	24
3.3.3. Principaux facteurs physico-chimiques influençant l'encrassement laitier	25
a) Effets du pH du milieu	26
b) Effets du calcium	27
c) Effets de l'histoire thermique.....	28
d) Effets de la vitesse de la circulation du fluide	29
e) Effets du type et des caractéristiques de l'échangeur de chaleur	29
3.3.4. Modèles prédictifs de l'encrassement laitier	30
a) Modèles à une phase	30
b) Modèles à quatre phases	31
c) Modèles 2-D.....	31
3.4. Méthodologie de mesure de l'encrassement laitier	32
3.4.1. Méthodes directes.....	32
3.4.2. Méthodes indirectes.....	33
a) Mesure de l'encrassement à partir du suivi du coefficient de transfert de chaleur global.....	33
b) Mesure de l'encrassement à partir du suivi des pertes de charge.....	35
4. Conclusion	36

MATERIELS ET METHODES	38
<i>Chapitre 1 : Fluides modèles mis en œuvre pour les études de dénaturation et les essais d'encrassement en ECP</i>	39
1. Contraintes techniques pour le choix des solutions protéiques encrassantes	39
2. Poudre protéique retenue pour préparer les solutions protéiques modèles encrassantes : composition chimique et conditions de stockage	40
3. Mode d'élaboration des solutions protéiques modèles encrassantes retenues	41
<i>Chapitre 2 : Essais d'encrassement en pilote</i>	42
1. Plateformes expérimentales et conditions opératoires imposées dans l'ECP	42
1.1. Configuration d'ECP à 5 canaux	42
1.2. Configuration d'ECP à 10 canaux	48
2. Quantification des encrassements	50
2.1. Par pesée des masses de dépôt sec	50
2.2. Par la mesure du coefficient de transfert de chaleur global et de la perte de charge	52
3. Caractérisation de la composition et de la structure des premières couches de dépôt en surface	54
3.1. Par microanalyse par sonde électronique (EPMA)	55
3.2. Par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	55
<i>Chapitre 3 : Identification des cinétiques de dénaturation chaude de la β-lg</i>	57
1. Essais de dénaturation chaude de la β -lg en conditions statiques	57
2. Essais de dénaturation chaude de la β -lg en conditions dynamiques	59
3. Détermination de la concentration en β -lg soluble	61
4. Détermination des paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg	62
4.1. Modèle de Tolkach et Kulozik (2007)	63
Identification de l'ordre de réaction, (n)	63
Identification de la constante cinétique de dénaturation, (k_n)	65
4.2. Modèle avec deux réactions successives	69
Identification des ordres de réaction, (n_1 et n_2)	70
Identification des constantes cinétiques de dénaturation, (k_1 et k_2)	70
<i>Chapitre 4 : Détermination des concentrations des différentes espèces de β-lg dans l'ECP</i>	75
1. Simulation des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)	75
2. Simulation des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de deux réactions successives	78
RESULTATS ET DISCUSSIONS	80
<i>Chapitre 1 : Etude de l'influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt dans un échangeur de chaleur à plaques</i>	81
1. Dispositif expérimental utilisé pour les essais d'encrassement en pilote	81
1.1. Solutions modèles encrassantes étudiées pour les essais d'encrassement	81
1.2. Installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement	82
1.3. Conditions de procédé imposées	83
2. Discussions des résultats obtenus	85
2.1. Distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP à $Re = 2000$	85
2.2. Influence de la teneur en calcium sur la quantité de dépôt totale	87
2.3. Influence de la teneur en calcium sur la cinétique d'encrassement de l'ECP	88
2.4. Conductivité thermique et masse volumique des dépôts protéiques contenant du calcium	90
2.5. Corrélation entre la masse de dépôt, les conditions de procédé et la teneur en calcium des solutions encrassantes	91

3. Conclusion	94
<i>Chapitre 2 : Cinétiques de dénaturation thermique de la β-lactoglobuline des différentes solutions protéiques modèles</i>	97
1. Paramètres cinétiques de dénaturation thermique de la β -Ig pour les différentes solutions protéiques selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)	98
1.1. Influence des conditions expérimentales (conditions statiques vs conditions dynamiques) sur la dénaturation de la β -Ig et allure des courbes de dénaturation	98
1.2. Influence de la teneur en calcium sur la dénaturation thermique de la β -Ig	103
1.3. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la dénaturation thermique de la β -Ig	107
2. Paramètres cinétiques de dénaturation thermique de la β -Ig pour les différentes solutions protéiques modèles selon le modèle avec deux réactions successives	111
3. Conclusion	115
<i>Chapitre 3 : Encrassement des échangeurs de chaleur à plaques par les solutions protéiques modèles étudiées</i>	117
1. Influence du profil thermique sur la distribution de la masse de dépôt sec dans l'échangeur de chaleur à plaques	118
1.1. Cas de la configuration de l'ECP de 5 canaux	118
1.2. Cas de la configuration de l'ECP de 10 canaux	121
2. Influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt sec par canal et la masse totale de dépôt collectée dans l'échangeur de chaleur à plaques	123
2.1. Influence de la teneur en calcium sur la distribution de la masse de dépôt sec par canal pour différents profils thermiques	123
2.2. Influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt totale pour différents profils thermiques	126
3. Influence du profil thermique et de la teneur en calcium sur la résistance thermique d'encrassement	127
4. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la masse de dépôt sec par canal et la masse totale de dépôt collectée dans l'ECP	129
4.1. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la distribution de la masse de dépôt sec pour un profil thermique fixé	129
4.2. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la masse totale de dépôt collectée dans l'ECP pour un profil thermique fixé	131
5. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la résistance thermique d'encrassement	133
6. Observation visuelle du dépôt encrassant à faible et fort ratios molaires calcium/protéine	135
7. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la croissance du dépôt protéique : caractérisation des premières couches de dépôt en surface de l'ECP	137
<i>Chapitre 4 : Etude de la relation entre les espèces de β-lg en solution et la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP pour différentes solutions protéiques modèles</i>	142
1. Influence du profil thermique sur à la fois la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg en solution simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)	142
2. Influence du profil thermique sur à la fois la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg en solution simulées avec le modèle de deux réactions successives	147
3. Comparaison entre les concentrations des agrégats calculées et mesurées en sortie de l'ECP à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) et le modèle de deux réactions successives ($n_1 = n_2 = 1,5$)	151

4. Conclusion	155
Chapitre 5 : Etude de la relation entre le ratio des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg et la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP pour différentes solutions de WPI	157
1. Allure des courbes masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour nos solutions protéiques modèles et différentes configurations d'ECP	158
2. Influence de ratio molaire calcium/protéine sur l'allure des courbes masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$	162
3. Evolution de la masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour des données expérimentales rapportées dans la littérature	165
4. Conclusion	168
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174
ANNEXES	190
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	198

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Exemple d'encrassement en pétrochimie et en industrie laitière	6
Figure 1.2. Exemple de dépôts formés suite à un traitement thermique des aliments :	7
Figure 1.3. Encrassement dans un échangeur de chaleur à plaques	10
Figure 1.4. Répartition des dépôts de type A et B le long d'un programme thermique de stérilisation	14
Figure 1.5. Structure tertiaire de la β -Ig	16
Figure 1.6. Mécanisme de la dénaturation chaude de la β -Ig	17
Figure 1.7. Mécanismes de dénaturation chaude de la β -Ig comprenant les différents complexes possibles avec d'autres protéines du lait	18
Figure 1.8. Mécanisme plus simplifié de la dénaturation de la β -Ig	19
Figure 1.9. Mécanismes d'adhésion des protéines de β -Ig sur les surfaces en acier inoxydable	22
Figure 1.10. Dépôt d'une solution de protéine sérique contenant du calcium formé sur la surface de l'échangeur de chaleur	26
Figure 2.1. Schéma de l'installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement (configuration de l'ECP à 5 canaux)	43
Figure 2.2. Plaque utilisée pour les essais d'encrassement.	43
Figure 2.4. Les profils thermiques imposés dans l'ECP de 5 canaux.	47
Figure 2.5. Montage de l'installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement (configuration de l'ECP à 10 canaux)	48
Figure 2.6. Représentation de la configuration de l'ECP à 10 canaux utilisée pour les essais d'encrassement.	49
Figure 2.7. Les profils thermiques imposés dans l'ECP à 10 canaux.	49
Figure 2.8. Essais de reproductibilité des masses de dépôt sec mesurées sur les plaques de l'ECP.	51
Figure 2.9. Exemple de l'évolution des températures d'entrée et de sortie du produit et de l'eau chaude durant un traitement thermique de 2 heures (profil thermique # 1)	52
Figure 2.10. Exemple de l'évolution du coefficient de transfert de chaleur global durant le traitement thermique dans l'ECP (profil thermique #1) d'une solution modèle de WPI	53
Figure 2.11. Exemple de l'évolution de la perte de charge durant le traitement thermique dans l'ECP (profil thermique #1) d'une solution modèle de WPI.	54
Figure 2.12. Exemple d'un profil de température de dénaturation chaude de la β -Ig pour une solution de WPI à une teneur en calcium fixe	58
Figure 2.13. Dispositif expérimental utilisé à l'échelle pilote pour les essais de dénaturation chaude de la β -Ig (solution modèle de WPI à 1% p/p contenant 100 ppm de calcium total ...	60
Figure 2.14. Représentation de la configuration de l'ECP utilisée pour les essais de dénaturation chaude en conditions dynamiques	60
Figure 2.15. Exemple d'une cinétique de dénaturation de la β -Ig soluble à 85°C pour une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total	62
Figure 2.16. Exemple d'une régression linéaire pour n = 1,5 et n = 2 permettant de déterminer la constante cinétique de dénaturation à 85°C d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total	64

Figure 2.17. Evolution des constantes cinétiques k_n avec la température selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) : Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg où des ajustements par plage de températures ont été réalisés sur les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation (k_{unf} et k_{agg}).	65
Figure 2.18. Degré de dépliement selon Tolkach et Kulozik (2007) défini à partir du graphe d'Arrhenius d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.	67
Figure 2.19. Evolution au cours du temps des concentrations des différentes espèces de β -lg selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007).	68
Figure 2.20. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg.	71
Figure 2.21. Exemple d'un ajustement des constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation à 85°C pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant.....	72
Figure 2.22. Evolution au cours du temps des concentrations des différentes espèces de β -lg selon le modèle de deux réactions successives.	73
Figure 2.23. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total obtenu en utilisant le modèle de deux réactions successives.	74
Figure 2.24. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007).	77
Figure 2.25. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de deux réactions successives.	79
Figure 2.1. Plateforme expérimentale utilisée pour les essais d'encrassement d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p).	82
Figure 2.2. Représentation de la configuration de l'ECP utilisée pour les essais d'encrassement.	83
Figure 2.3. Profil thermique en solution déterminé numériquement et imposé le long de l'ECP.	84
Figure 2.4. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP pour différents teneurs en calcium allant de 72,9 à 85,6 ppm à $Re = 2000$	86
Figure 2.5. Comparaison de la masse de dépôt totale en fonction de la teneur en calcium.....	87
Figure 2.6. Comparaison de la résistance thermique d'encrassement en fonction de la teneur en calcium d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p) pour différents nombres de Reynolds : (a) 2000 et (b) 3200.	89
Figure 2.7. Relation entre la résistance thermique d'encrassement et la masse de dépôt totale pour différents teneurs de calcium (70–87,4 ppm).	90
Figure 2.8. Comparaison entre les masses de dépôt par canal ($M_{d,i}/\rho.e^3$) expérimentales et prédites	93
Figure 4.1. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de la solution protéique modèle de WPI à 1% (p/p) et 100 ppm de calcium total.	99
Figure 4.2. Comparaison du graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de la solution protéique modèle de WPI à 1% (p/p) et 100 ppm de calcium total et de celui de Petit et al. (2011).	100

Figure 4.3. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de solutions modèles de WPI à 1% (p/p) et à différents teneurs en calcium total (100 et 120 ppm).....	104
Figure 4.4. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) d'une solution de β -lg quasi-pure contenant différents teneurs en calcium (Petit et al., 2011).	106
Figure 4.5. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et différents teneurs en WPI (allant de 0,25 à 2,5% p/p).	108
Figure 4.6. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg avec le modèle de deux réactions successives en fixant $n_1 = n_2 = 1,5$ pour à la fois la réaction de dépliement et d'agrégation.....	113
Figure 4.7. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg avec le modèle de deux réactions successives en fixant $n_1 = 1$ pour la réaction de dépliement et $n_2 = 2$ pour l'agrégation.....	114
Figure 4.8. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP d'une configuration de 5 canaux pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm.	118
Figure 4.9. Dépôt formé dans le 2 ^{ème} canal de l'ECP pour le profil thermique # 1 (température moyenne du canal = 71°C).	120
Figure 4.10. Dépôt formé dans le 5 ^{ème} canal de l'ECP pour le profil thermique # 1 (température moyenne du canal = 84°C).	120
Figure 4.11. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP d'une configuration de 10 canaux pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm.	122
Figure 4.12. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ou 120 ppm... ..	124
Figure 4.13. Masse de dépôt totale obtenue dans l'ECP pour des solutions modèles de WPI à différents teneurs en calcium total (100 et 120 ppm) et différents profils thermiques.....	126
Figure 4.14. Evolution de la résistance thermique d'encrassement dans le temps au sein de l'ECP à différents profils thermiques pour des solutions de WPI à 1% (p/p) contenant différents teneurs en calcium total (100 ppm : symboles pleins ; 120 ppm : symboles vides).	127
Figure 4.15. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP obtenue lors du traitement thermique (profil thermique #1 fixé) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium totale fixée (100 ppm) et à teneur en WPI allant de 0,25 à 2,5% (p/p).	130
Figure 4.16. Masse de dépôt totale en fonction du ratio molaire calcium/protéine des différentes solutions de WPI étudiées.	132
Figure 4.17. Evolution de la résistance d'encrassement dans le temps au sein de l'ECP obtenue lors du traitement thermique (profil thermique #1 fixé) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et à teneur en WPI allant de 0,25 à 2,5% p/p).	133
Figure 4.18. Couches de dépôt formées dans les différents canaux de l'ECP après 2 h d'essais d'encrassement avec des solutions modèles de WPI à 2,5% (p/p).....	136
Figure 4.19. Couches de dépôt formées dans les différents canaux de l'ECP après 2 h d'essais d'encrassement avec des solutions modèles de WPI à 0,25% (p/p).....	136
Figure 4.20. Cartographies X des éléments Fe, Cl, S et Ca de la section transversale de la couche de dépôt des solutions modèles de WPI à : a) 0,25% (p/p) et b) 2,5% (p/p).	138
Figure 4.21. Analyse XPS des particules de calcium.....	140

Figure 4.22. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les 5 canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques imposés (#1, #2, #3 et #4).	143
Figure 4.23. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les différents canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) pour une solution de β -lg quasi-pure et différents profils thermiques.	146
Figure 4.24. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les 5 canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées à partir du modèle de 2 réactions successives en imposant les ordres de réactions $n_1 = n_2 = 1,5$ pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques.	148
Figure 4.25. Comparaison entre les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées à partir du modèle de 2 réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$ (trait continu) et $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$ (trait discontinu) en fonction du temps de séjour dans l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques.	150
Figure 4.26. Comparaison entre les profils thermiques de paroi et de produit pour l'essai #1.	154
Figure 4.27. Courbes de la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal en fonction de $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) contenant 100 et 120 ppm de calcium total et différents profils thermiques imposés dans l'ECP.....	159
Figure 4.28. Variation de la masse de dépôt sec dans chaque canal en fonction du ratio.....	161
Figure 4.29. Variation de la masse de dépôt sec dans les différents canaux de l'ECP en fonction du ratio $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour différents ratios molaires calcium/protéine.	163
Figure 4.30. Variation de la masse de dépôt sec le long de l'ECP en fonction de $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour une solution de β -lg quasi-pure et différentes conditions de procédé.....	166

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Composition chimique moyenne du lait de vache (% p/p)	12
Tableau 2.1. Paramètres de procédé (mesurés et calculés) imposés dans l'ECP des différents essais d'encrassement.....	84
Tableau 3.1. Composition de la poudre de WPI	40
Tableau 3.2. Teneur initiale et finale en calcium pour les différentes solutions modèles	41
Tableau 3.3. Caractéristiques géométriques des plaques V7 (Leuliet, 1988)	44
Tableau 3.4. Conditions opératoires étudiées à l'échelle pilote avec l'ECP à 5 canaux : débits et températures moyennes d'entrée et de sortie de la solution de WPI et de l'eau chaude.....	46
Tableau 3.5. Coefficients de transfert de chaleur globaux calculés au démarrage des essais d'encrassement d'une solution modèle de WPI (1% p/p contenant 100 ppm de calcium total) pour différents profils thermiques imposés dans l'ECP.....	53
Tableau 3.6. Expression de Y_n pour $n = 1,5$ et $n = 2$	63
Tableau 4.1. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg des essais pilote et laboratoire (avec un ordre de réaction de 1,5) et comparaison avec les valeurs rapportées dans la littérature.	102
Tableau 4.2. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg de solutions modèles de WPI à 1% (p/p) et à différents teneurs en calcium total (100 et 120 ppm) (avec un ordre de réaction de 1,5).....	104
Tableau 4.3. Paramètres cinétiques de dénaturation d'une solution de β -lg quasi-pure contenant différents teneurs en calcium total (Petit et al., 2011).	106
Tableau 4.4. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et à différents teneurs en WPI (allant de 0,25 à 2,5% p/p).....	110
Tableau 4.5. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg à partir du modèle de deux réactions successives.	115
Tableau 4.6. Comparaison entre les concentrations des agrégats calculées et simulées à la sortie de l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et pour différents profils thermiques	151
Tableau 4.7. Simulation de la concentration de la β -lg agrégée à la sortie de l'ECP à partir des températures en proche paroi et comparaison avec la concentration des agrégats mesurée pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total	154
Tableau A 1. Récapitulatif des paramètres simulés et calculés permettant d'analyser le comportement encrassant de chacune des solutions protéiques modèles étudiées durant un traitement thermique en ECP.	190
Tableau A.2. Conditions opératoires étudiées par Petit et al. (2013) pour des essais d'encrassement en ECP d'une solution de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) avec 264 ppm de calcium total.	194
Tableau A.3. Masses de dépôt et ratios des constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation des 21 essais d'encrassement d'une solution de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) avec 264 ppm de calcium total.	195

INTRODUCTION

Face à la demande croissante des pays émergents (Chine, Inde, Brésil, etc.), l'industrie agro-alimentaire est plus que jamais confrontée à l'élaboration et la transformation de nouveaux produits lactés.

Par ailleurs, dans un contexte de concurrence mondiale et de hausse des coûts des matières premières, la nécessité de valoriser l'intégralité des éléments du lait est de plus en plus forte pour les industriels laitiers tel est le cas des protéines solubles présentes dans les lactosérums issus de la transformation fromagère ou dans les dans les perméats de microfiltration du lait. Compte tenu de leurs propriétés fonctionnelles (pouvoir gélifiant ou moussant) et nutritionnelles (alimentation pour sportif, poudres infantiles), les voies de séparation et de maîtrise des propriétés de ces protéines a fait l'objet de très nombreuses études récentes. Ces dérivés lactés coproduits (lactosérum) ou non (perméat de microfiltration) subissent généralement à un moment ou un autre de leur itinéraire technologique de transformation, une opération de traitement thermique visant à atteindre leur stabilisation microbiologique (pasteurisation, stérilisation) et/ou des finalités organoleptiques (texture-cuisson).

A l'heure actuelle, dans les lignes de production industrielles, le chauffage des produits laitiers est encore principalement réalisé par contact avec une paroi chaude au sein d'un échangeur de chaleur à plaques. Bien que cette technologie conventionnelle ait été éprouvée dans de multiples applications, elle comporte aussi des limites clairement identifiées, telles que l'encrassement des surfaces d'échanges.

Ces problèmes de sécurité des aliments et ces risques de contamination des surfaces d'échanges liés à la présence de souillures, non souhaitées sur les parois d'équipements, sont devenus ces dernières années des enjeux considérables pour les industries agro-alimentaires. En effet, la pression exercée par la demande sociétale et politique (répercussion médiatique d'un problème sanitaire, impacts environnementaux associés aux cycles de nettoyage chimique fréquents) n'a cessé de s'accroître sur les transformateurs laitiers. Ainsi, il est apparu ces deux dernières décennies, un intérêt grandissant pour réduire et maîtriser les encrassements de ces équipements à l'échelle industrielle.

Les mécanismes complexes responsables de la formation de dépôt sur les surfaces des échangeurs de chaleur sont encore loin d'être complètement élucidés. En effet, il existe un

réel manque de connaissances sur la relation entre les réactions chimiques en solution à l'échelle moléculaire et la formation de dépôt protéique en surface à l'échelle macroscopique.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux visant à étudier les réactions chimiques de dénaturation chaude de différentes solutions modèles de β -lactoglobuline (β -lg) et à établir leur lien avec le phénomène d'encrassement des échangeurs de chaleur à plaques (ECP) à l'échelle pilote (distribution des dépôts, caractérisation de la structure des dépôts).

Partant des lacunes générales sur la compréhension du phénomène d'encrassement, nous nous sommes fixés, dans ce travail de thèse, quatre objectifs :

- 1) Identifier les cinétiques de dénaturation chaude de solutions de β -lg contenant différentes concentrations en protéine et en calcium. Il s'agira de quantifier précisément les constantes réactionnelles de différentes solutions protéiques par des essais en laboratoire et en pilote. Par l'analyse de cette base de données expérimentales et confrontation avec la littérature, il s'agira de comprendre le rôle de certains constituants en solution (nature des assemblages protéiques, concentration en protéine, teneur en calcium) sur la réactivité chimique. Il s'agira aussi de mieux identifier les mécanismes prédominants de la dénaturation chaude de la β -lg (dépliage, agrégation) en fonction des plages de températures et les limites de certains schémas réactionnels simplifiés et des méthodes de détermination de ces paramètres cinétiques. Au terme de cette analyse, nous tenterons de proposer les paramètres physico-chimiques clés à considérer pour prédire a priori la réactivité d'une solution de β -lg en présence de calcium ;
- 2) Mieux comprendre comment les paramètres de procédé et la physico-chimie de la solution encrassante impactent les phénomènes d'encrassement. Il s'agira notamment de quantifier pour les solutions modèles protéiques étudiées les encrassements obtenus pour différents profils thermiques. Par l'analyse des essais d'encrassement, nous illustrerons le rôle du calcium dans le phénomène d'encrassement protéique lors des traitements de pasteurisation. Nous mènerons des analyses supplémentaires de caractérisation de dépôt pour déterminer si le calcium est un élément modifiant uniquement la réaction de dénaturation ou un constituant impliqué dans la formation du dépôt participant à la liaison des espèces protéiques constituant le dépôt ;
- 3) Identifier le ou les espèce(s) protéique(s) impliquée(s) dans la formation du dépôt. Notamment, quelles sont parmi les différentes espèces protéiques de la β -lg en capacité de souiller les surfaces celles réellement responsables du dépôt ? Pour cela, nous développerons un modèle simplifié de génie de la réaction simulant les concentrations

des espèces protéiques présentes au sein de l'ECP et les mettrons en relation avec la distribution des quantités de dépôt mesurées pour différentes conditions de procédé ;

- 4) Proposer une corrélation entre la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les paramètres cinétiques de dénaturation thermique de la β -Ig (ordre de réaction, énergies d'activation et facteurs de fréquence). Nous tenterons de confronter cette corrélation aux travaux de la littérature.

Cette thèse est présentée en trois parties. Ces dernières sont chacune divisées en plusieurs chapitres :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique qui permettra de mieux comprendre : (i) les mécanismes de dénaturation chaude de la β -Ig, (ii) les mécanismes de formation du dépôt encrassant, (iii) les paramètres influençant l'encrassement laitier et (iv) les méthodes courantes pour suivre et quantifier les encrassements laitiers ;
- Dans la deuxième partie, nous présenterons les moyens expérimentaux et les techniques analytiques mis en œuvre pour accomplir les investigations expérimentales ;
- La dernière partie est dédiée à l'énoncé et à l'analyse des résultats expérimentaux obtenus.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Préambule

Dans ce chapitre bibliographique, nous allons revenir sur les principaux travaux traitant du phénomène d'encrassement dans les échangeurs de chaleur. En tout premier lieu, nous donnerons quelques généralités sur l'encrassement des surfaces d'échange des équipements industriels. Puis, nous centrerons notre propos exclusivement sur les phénomènes d'encrassement des échangeurs de chaleur traitant des produits laitiers.

Nous montrerons d'abord l'importance du secteur laitier en France et des opérations de thermisation en échangeurs de chaleur afin de texturer ou stabiliser les produits laitiers. Ceci nous aidera à illustrer les impacts économiques et environnementaux des encrassements laitiers.

Nous présenterons ensuite la composition chimique du lait et d'un dépôt laitier pour mettre en avant les protéines majoritairement impliquées dans les encrassements selon les paramètres de transformation.

Puis, nous détaillerons les travaux portant sur l'identification des mécanismes de dénaturation et d'encrassement des solutions protéiques de lactosérum proposés dans la littérature. Une attention particulière sera portée pour illustrer le rôle de certains facteurs physico-chimiques sur les mécanismes de dénaturation et d'encrassement et les modèles proposés. Nous tenterons de faire émerger les principales controverses de la littérature sur la formation du dépôt encrassant.

Enfin, nous présenterons quelques méthodes de suivi de l'encrassement habituellement mis en œuvre en échangeurs. Nous nous focaliserons uniquement sur les méthodes qui seront appliquées ultérieurement dans le cadre de ce travail de thèse afin de détecter les cinétiques d'encrassement dans les échangeurs de chaleur.

1. L'encrassement des surfaces d'échange des équipements de transformation : une problématique multi-secteurs

L'encrassement se définit comme l'accumulation d'un dépôt de matière indésirable (organique ou minéral) sur les surfaces des équipements (Taborek et al., 1972 ; Bott, 1988 ; Oliveira et al., 1993). L'encrassement est un problème fréquent lors du traitement thermique dans des échangeurs de chaleur. L'encrassement des surfaces des équipements industriels a été reconnu comme un problème multi-secteurs (Kuppan, 2000 ; McDonald et Magande, 2012). En effet, ce phénomène se produit très fréquemment dans des procédés de transformation (chimiques ou non) non isothermes : cas des procédés avec apport de chaleur comme par exemple le cracking en pétrochimie ou la texturation/stabilisation en agroalimentaire (figure 1.1) (Awad, 2011).



*Figure 1.1. Exemple d'encrassement en pétrochimie (© Merus)
et en industrie laitière (© SmartFlow).*

Résoudre/diminuer les encrassements restent encore aujourd'hui un défi majeur pour les équipementiers élaborant des échangeurs de chaleur (Bott, 2001). L'encrassement des équipements industriels engendre des coûts économiques importants (réduction de l'efficacité du transfert thermique, augmentation de la fréquence des opérations de maintenance et de nettoyage, etc.). De ce fait, de nombreux industriels et chercheurs se sont intéressés à élucider les mécanismes à l'origine de l'adhésion d'un dépôt sur une surface.

L'encrassement est un phénomène très complexe impliquant plusieurs mécanismes très différents selon le secteur (Mansoori, 2001). Quel que soit le secteur, les formations de dépôts sont fortement liés à la composition et aux caractéristiques physico-chimiques des produits en contact avec la surface, aux propriétés de surface de la paroi chaude (rugosité, énergie de surface), à la nature de l'échangeur de chaleur (type tubulaire ou à plaques, géométrie, circulation co ou contre-courant), au mode de transfert de chaleur (direct ou indirect), aux

conditions opératoires imposées (essentiellement températures d'entrée et débits du fluide caloporteur ou calo récepteur et produits à traiter).

De ce fait, plusieurs catégories de dépôts ont été répertoriées. Le type du dépôt est différent d'une industrie à l'autre. Il peut s'agir de dépôts de carbonate de calcium, de sulfate de calcium, de sulfate de barium, de silice ou de fer dans le cas du traitement de l'eau. Dans l'industrie laitière, l'encrassement ou le dépôt est majoritairement associé à la dénaturation thermique de la β -lg rendant son adhésion possible à la surface chaude.

Epstein, (1981) a proposé une classification des dépôts en cinq groupes basés sur les principaux mécanismes physiques ou chimiques à l'origine de leur formation. Selon cette classification, les dépôts peuvent être cristallins, à base de matière biologique, issus de réactions chimiques, de produits de corrosion, ou de particules de matières.

Dans l'industrie alimentaire (qui est notre secteur industriel), les dépôts peuvent aussi être distingués selon le type de matériel le constituant (Bourion, 1998) :

- le dépôt microbiologique : il s'agit de l'accumulation de micro-organismes sur les surfaces. Ces derniers sont simplement adhérents ou colonisent les surfaces sous forme de biofilms ;
- le dépôt minéral : il est le plus souvent issu des fragments du produit ou de l'eau utilisée dans les processus de fabrication ;
- le dépôt organique : il s'agit de l'accumulation macroscopique des fragments du produit (protéine, matière grasse, etc.). C'est ce type de dépôt qui se produit majoritairement pour l'industrie laitière.

Dans l'industrie agro-alimentaire, il n'est pas rare que les mécanismes cités par Epstein (1981) se produisent simultanément, donnant lieu à un dépôt composite (Bott, 1990 ; Sheikholeslami, 1999) (figure 1.2).

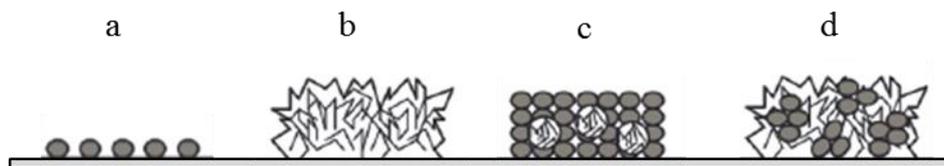


Figure 1.2. Exemple de dépôts formés suite à un traitement thermique des aliments : a) adsorption d'une monocouche de protéine, b) cristallisation, c) dépôt protéique avec inclusions de minéraux, d) dépôt minéral avec inclusions protéiques (Boxler, 2014).

2. L'encrassement des surfaces d'échange dans l'industrie laitière : positionnement et enjeux

2.1. Importance du secteur laitier Français et enjeux de maîtriser les encrassements

Moteur de l'économie française, la filière laitière affiche un excédent commercial de plus 3,8 milliards € en 2014. Avec 250 000 emplois (dont 56 500 dans l'industrie) répartis sur tout le territoire, la filière génère un chiffre d'affaires de 27,7 milliards € pesant autant que la construction aéronautique dans l'économie française (ESANE, 2010). L'industrie laitière a réalisé en 2011 près de 750 millions € d'investissements.

La France est le deuxième producteur européen de lait après l'Allemagne (Eurostat, 2011 ; Agreste, 2011). Les 24,6 milliards de litres de laits collectés (Eurostat, 2014) sont utilisés pour fabriquer :

- à 75% des produits laitiers grand public : laits liquides, yaourts, desserts lactés, fromages, beurre et crème. C'est le marché grand public qui génère le plus de valeur : environ 86% du CA de la filière ;
- à 25% des produits intermédiaires utilisés dans l'alimentaire, les secteurs chimiques et pharmaceutiques. Parmi eux, le lactosérum (petit-lait), la poudre de lait, la caséine (protéine du lait) et le babeurre.

2.2. Importance des opérations de texturation/stabilisation par traitement thermique dans le secteur laitier

Les échangeurs de chaleur sont des équipements très souvent rencontrés dans l'industrie laitière où ils participent à de nombreuses étapes de transformation visant à assurer la qualité et la sécurité alimentaire des produits finaux. En effet, la transformation de plus 24,6 milliards de litres de lait chaque année en France situe l'importance des enjeux liés à la maîtrise des traitements thermiques.

Dans l'industrie laitière, le traitement thermique est un processus intensif d'énergie puisque chaque produit est chauffé au moins une fois (de Jong, 1997). Un échangeur de chaleur est un dispositif permettant de transférer de la chaleur entre l'utilité (fluide caloporteur ou calo récepteur) et le produit à traiter. Dans la plupart des cas, les deux fluides ne sont pas en contact, et le transfert s'effectue à travers une surface d'échange. Lors de ce

transfert de chaleur, une formation non souhaitée de dépôt est fréquemment observée sur les parois de l'équipement.

La pasteurisation et la stérilisation représentent les principaux traitements thermiques utilisés pour la transformation du lait. La différence se situe au niveau des gammes de température et des temps d'application. Une fois le lait traité, il doit répondre à des normes sanitaires et qualitatives très strictes (directive 92/46/CEE du conseil du 16 juin 1992 relative aux règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait).

La pasteurisation est un traitement thermique modéré, visant à détruire la majeure partie des bactéries et des agents pathogènes. Différents barèmes thermiques (couple temps/température) sont appliqués, comme la pasteurisation à basse température (63°C pendant 30 minutes), la pasteurisation à 72–76°C pendant 15 à 20 s et la pasteurisation à haute température (80-85°C ou plus pendant 5 s).

La stérilisation consiste à porter le lait à une température de 115°C pendant 15 à 20 min, ou à 150°C pendant 2 secondes pour le lait UHT (Ultra Haute Température, le lait le plus consommé en France). La quasi-totalité des micro-organismes présents sont détruits, assurant ainsi une conservation de longue durée du produit fini.

2.3. Impact environnemental et économique des encrassements laitiers

Le lait est un produit générateur d'encrassement lors de la pasteurisation ou la stérilisation (figure 1.3). L'encrassement des équipements de transformation dans l'industrie laitière a des conséquences fâcheuses et nécessite des contre-mesures plus contraignantes que dans d'autres industries (pétrolières par exemple). Le nettoyage des échangeurs de chaleur s'effectue au moins une fois par jour (Lalande et René, 1988 ; Georgiadis et al., 1998), pour maintenir l'efficacité de la production et garder les normes d'hygiène strictes requises dans la transformation des aliments.

La faible conductivité thermique des dépôts générés en paroi de l'échangeur induit une diminution de l'efficacité thermique de l'échangeur. Au final, en présence d'encrassement, une augmentation de la résistance thermique aux transferts de chaleurs est clairement constatée (Benning et al., 2003 ; Grijspeerdt et al., 2004 ; Jun and Puri, 2005a ; Mahdi et al., 2009).

De plus, une diminution de l'efficacité hydraulique de l'équipement est observée en présence d'encrassement. En effet, une augmentation de la perte de charge dans l'échangeur de chaleur, due à une diminution de la section de passage se produit (Benning et al., 2003 ; Grijspeerdt et al., 2004 ; Fryer et al., 2006). Ceci engendre irrévocablement une augmentation de l'énergie de pompage à délivrer pour maintenir le débit d'écoulement souhaité.

Casanueva-Robles et Bott (2005) ont montré que la perte d'efficacité thermique et hydraulique des échangeurs encrassés, se traduisait également par une émission accrue de dioxyde de carbone.



Figure 1.3. Encrassement dans un échangeur de chaleur à plaques.

L'encrassement des échangeurs thermiques induit aussi un certain nombre de risques sanitaires. En effet, suite à la cuisson du dépôt formé sur les parois d'échange, une détérioration de la qualité organoleptique du produit fini due au relargage dans le produit de composés indésirables (goût cuit, brunissement) peut être observée. Quand le nettoyage et la désinfection sont incomplets dans certaines zones de l'installation, on peut également craindre le développement de biofilm causant la contamination du produit (Daufin et al., 1987 ; Fryer et al., 2006 ; Jun et Puri, 2007).

L'encrassement des installations pénalise très lourdement la rentabilité des entreprises concernées. En effet, l'encrassement a été estimé à travers le monde à une perte de plusieurs milliards €/an. En industrie, le coût de l'encrassement représente 0,1 à 0,3% du Produit National Brut (PNB) (Garrett-Price et al., 1985 ; Bohnet, 1987 ; Chenoweth, 1990 ; Müller-Steinhagen et al., 1993 ; Xu et al., 2007). Visser et Jeurink, (1997) ont indiqué que le coût de l'encrassement laitier a atteint en France 150 millions €/an en 1990 et 36 millions €/an dans les Pays-Bas en 1986. Les coûts de perte de produit ont été estimés dans les Pays-Bas aux alentours de 3,20 € par tonne de dépôt (de Jong et al., 2002).

Parmi les coûts supplémentaires liés aux contre-mesures découlant de l'encrassement, nous pouvons noter :

- de nouveaux investissements de 10 à 50% (Awad, 2011) en raison d'un surdimensionnement et d'un remplacement précoce des échangeurs détériorés. Müller-Steinhagen (2000) a montré qu'un surdimensionnement des échangeurs de chaleur de 30 à 40% entraîne des coûts supplémentaires d'environ 25%. Une mauvaise évaluation de l'encrassement peut également engendrer un sous-investissement entraînant un mauvais fonctionnement de l'installation ;
- le coût du nettoyage des équipements dû à l'utilisation excessive d'eau de rinçage et de détergents (acide, soude). L'encrassement des installations et leur nettoyage représente 80% des coûts de production dans les industries laitières (van Asslet et al., 2005 ; Bansal et Chen, 2006). Environ 1,7 kg de soude et 0,6 kg d'acide (Spreer, 2005) ou 3 kg d'agents désinfectants et nettoyants et 1,5 m³ d'eau (Guignard et al., 2009) sont nécessaires par tonne de lait traité, correspondant en Allemagne à une consommation annuelle de 70–90 millions de tonnes d'agents nettoyants et désinfectants et 45 millions d'eau (Boxler, 2014). Pour d'autres produits laitiers tels que le fromage ou le yaourt, la consommation de l'eau peut aller jusqu'à 6 m³ par tonne de produit (Guignard et al., 2009).
- le coût des opérations de maintenance supplémentaires. Environ 15% de ces coûts sont attribués à l'entretien des échangeurs de chaleur et des chaudières et 50% sont dus à l'encrassement (Thackery, 1980) ;
- les dépenses énergétiques supplémentaires générées par la diminution du coefficient de transfert thermique et par l'augmentation de la puissance mécanique nécessaire au pompage du fluide ;
- le coût de l'immobilisation des installations pour procéder à des opérations de nettoyage impactant fortement la marche globale du site. Müller-Steinhagen (2000) a estimé cette perte à environ 1,5 millions \$/jour.

Ainsi, pour toutes les raisons évoquées précédemment, l'encrassement des échangeurs de chaleur a des conséquences économiques fâcheuses. Dans ce contexte, la minimisation de l'encrassement représente un enjeu important autant d'un point de vue scientifique (compréhension des mécanismes d'encrassement) qu'industriel (réduction des coûts de production et amélioration de la qualité des produits).

3. Etudes traitant de l'encrassement des échangeurs de chaleur par des dérivés laitiers

Dans cette partie, nous reviendrons sur ce qui est connu sur les phénomènes d'encrassement des échangeurs de chaleur traitant des produits laitiers.

Nous commencerons par présenter la composition chimique du lait et d'un dépôt laitier pour identifier les protéines majoritairement impliquées dans les encrassements selon les paramètres de transformation.

3.1. Composition chimique du lait et des dépôts de dérivés laitiers

3.1.1. Composition chimique du lait

Sous l'appellation dérivés laitiers (ou encore appelés produits laitiers), nous considérons le lait et l'ensemble des produits laitiers allant des produits plus ou moins solides (fromages, crèmes desserts) aux plus liquides (boissons lactées). La composition chimique de ces produits étant très complexe, seuls les principaux composés présents dans le lait de vache (matière première de la majorité des produits laitiers) seront brièvement présentés.

Le lait est un fluide complexe constitué d'un certain nombre de composants thermiquement instables (protéines, minéraux, etc.). Les proportions respectives de ces composants sont représentées dans le tableau 1.1.

*Tableau 1.1. Composition chimique moyenne du lait de vache (% p/p)
(Walstra et al., 1999 ; Michalski et al., 2004 ; Lucey et Horne, 2009).*

Eau	87,5
Lactose	4,6
Matière grasse	3,9
Protéines	3,4
Minéraux	0,8

Environ 78 % de ces protéines sont des caséines comprenant quatre composants majeurs : α_1 , α_2 , β et K , à respectivement 40, 10, 35 et 12% (p/p). Ces caséines sont organisées dans le lait sous forme de micelles, constituées à 92% de protéines et à 8% de minéraux inorganiques, essentiellement de phosphate de calcium (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989).

3.1.2. Composition chimique du dépôt laitier

La composition et le type de dépôt laitier dépendent très fortement de la composition du dérivé laitier initial et du traitement thermique appliqué.

Le dépôt laitier peut être classé en deux catégories (Burton, 1968 ; Lund et Bixby 1975 ; Visser et Jeurink 1997 ; Changani et al., 1997) :

- le dépôt de type A (ou dépôt protéique) se forme à des températures comprises entre 75°C et 100°C à la surface d'un échangeur de chaleur. Il est blanc, spongieux et un peu dense. Ce dépôt est essentiellement composé de 50–60% de protéines (essentiellement des protéines du lactosérum et plus particulièrement la β -lactoglobuline), 30–35% de minéraux (essentiellement du calcium et du phosphate) et 5% de lipides (Lyster, 1965 ; Daufin et al., 1987 ; Belmar-Beiny et al., 1993). Delplace et al. (1994) note une différence significative entre la composition chimique du lait entier et celle d'un dépôt laitier (la teneur en protéines d'un lait entier est de seulement 5%). Bell et Sanders (1944), Lalande et al., (1989), Hiddnik et al., (1986) et de Jong et al., (1992) ont montré le rôle fondamental que jouent les protéines du lactosérum dans la formation du dépôt de type A. Il est établi que la protéine majoritaire de ce dépôt laitier est la β -lg, pourtant elle représente que 32% des protéines du lait (Bylund, 1995) ;
- le dépôt de type B (ou dépôt minéral) apparaît à des températures supérieures à 105°C. Il est gris, compact, granuleux et dur. Il est composé de 70% de minéraux (principalement du phosphate de calcium), 15-20% de protéines et 5% de matières grasses. Lyster (1965) a étudié la composition en minéraux de ce type de dépôt et a noté que le calcium et le phosphore représentent 90% de la teneur totale en minéraux dans le dépôt encrassant contre seulement 30% de la teneur en minéraux dans le lait. Ce dépôt est dû essentiellement à la précipitation des phosphates de calcium à des températures élevées (Burton, 1968 ; Lalande et al., 1984). Lalande et al. (1989) ont montré que les formes des phosphates de calcium trouvés dans les dépôts de type B peuvent être très diverses : phosphates de calcium hydratés ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), phosphates octocalciques ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{OH}$).

La figure 1.4 illustre la répartition des dépôts de type A et B susceptibles de se produire au cours d'un programme thermique de stérilisation. Selon l'intervalle de températures rencontré, le dépôt de type A ou B peut être prépondérant.

Compte tenu du fait que le dépôt de type A, est le plus redoutable pour l'industrie laitière de par son volume et sa présence en quantité importante, nous nous sommes intéressés à la compréhension de la formation de ce type de dépôt. Les traitements thermiques appliqués dans la partie expérimentale n'ont jamais excédé 93°C. Nous n'avons pas travaillé sur du lait directement mais sur des solutions de lactosérum, riche en β -lg (cette protéine est la plus abondante dans le lactosérum).

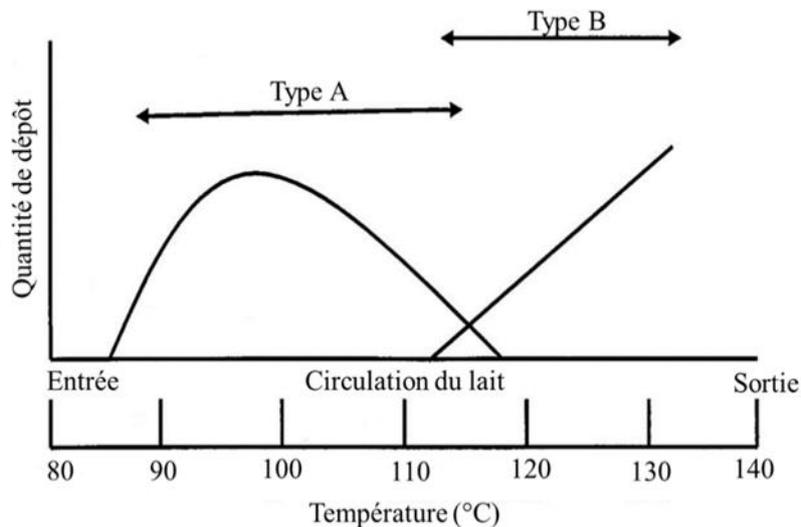


Figure 1.4. Répartition des dépôts de type A et B le long d'un programme thermique de stérilisation (Burton, 1994).

Compte tenu de la concurrence mondiale et de hausse des coûts des matières premières, la nécessité de valoriser l'intégralité des éléments du lait est de plus en plus forte pour les industriels laitiers. Ainsi, le lactosérum traditionnellement considéré comme un sous-produit de la fabrication du fromage contenant de faibles teneurs en nutriments, est de nos jours de plus en plus récupéré pour être valorisé. Il s'agit notamment d'augmenter la valeur ajoutée de ce constituant traditionnellement destiné à l'alimentation animale afin d'obtenir des ingrédients fonctionnels ou aromatiques. En effet, en raison de leurs propriétés tensioactives (Kilara, 1994 ; Chobert, 2012), les protéines sériques sont des ingrédients intéressants pour augmenter l'aptitude au fouettage, l'émulsification, le pouvoir moussant, la stabilisation, la gélification et la texturation d'une solution protéique (de Wit, 1990 ; Patel et al., 2007 ; Donato et al., 2009). Cette valorisation nécessite des opérations de concentration et de traitement thermiques.

3.2. Mécanismes d'encrassement par des solutions protéiques du lactosérum

Dans ce qui suit, dans un premier temps, les protéines majoritaires du lactosérum (β -lg, α -lactalbumine) seront présentées.

Puis, dans un second temps, nous décrirons le mécanisme de dénaturation chaude de la β -lg, protéine majoritaire du lactosérum et du dépôt laitier de type A. Nous évoquerons les modèles cinétiques simplifiés qui ont été proposés pour rendre compte de cette dénaturation.

Nous discuterons dans un troisième temps, l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la dénaturation de la β -lg.

3.2.1. Composition en protéines du lactosérum

Les fractions des protéines sériques contiennent un très grand nombre de composants, à savoir : la β -lg, l' α -lactalbumine (α -la), la bovine sérum albumine et les immunoglobulines avec des teneurs respectives de 2,7, 1,2, 0,25 et 0,65 g.L⁻¹. La β -lg est majoritaire (54%), correspondant à environ 3,5 g.L⁻¹ dans le lait (Lalande et al., 1989), suivie de l' α -la (21%). Elles représentent 90% des protéines totales du lactosérum (Kinsella, 1984). Le reste de la fraction protéique est constituée de protéines dites mineures telles que : la lactoperoxydase et la transferrine (Fox et Kelly, 2006).

Nous présentons simplement ici les principales propriétés physico-chimiques de la β -lg et l' α -la :

- la β -lg est constituée de 162 acides aminés pour un poids moléculaire de 18,3 kDa (Papiz et al., 1986 ; Hambling et al., 1992 ; Verheul et al., 1999) et une taille d'environ 3 nm (Mulvihill et Donovan, 1987). Son point isoélectrique est d'environ 5,3 (Lalande et René, 1988) et sa température de dénaturation est estimée à 77°C (Nielsen et al., 1995 ; Relkin, 1996 ; Havea et al., 2001 ; Linmark-Mansson et al., 2005), qui dépendent fortement de l'environnement chimique. Sa structure moléculaire comporte 6–10% d'hélices α , 44–52% de feuillets β et 15–20% de coudes β (Casal et al., 1988 ; Dong et al., 1996 ; Qi et al., 1997). La molécule de β -lg, comme le montre la figure 1.5, contient deux ponts disulfures (Cys₁₀₆-Cys₁₁₉ et Cys₆₆-Cys₁₆₀) et un groupement thiol libre caché à l'intérieur de la molécule (Cys₁₂₁) à l'état natif (Relkin, 1996 ; Labouré et al., 2004 ; Perez et Pilosof, 2004) ;
- l' α -la renferme 123 acides aminés pour un poids moléculaire de 14,3 kDa. Elle présente deux ponts disulfures et un ion calcium intervenant dans sa stabilisation (Ribadeau-Dumas et Grappin, 1989). Elle contient une faible proportion d'acides aminés structurés

en hélice α (30%) et en feuillets β (9%). Elle possède une plus grande résistance aux traitements thermiques que la β -lg (Lyster, 1970 ; Lalande et al., 1985 ; Mulvihill et Donovan, 1987 ; Gotham et al., 1992 ; Delplace et al., 1994).

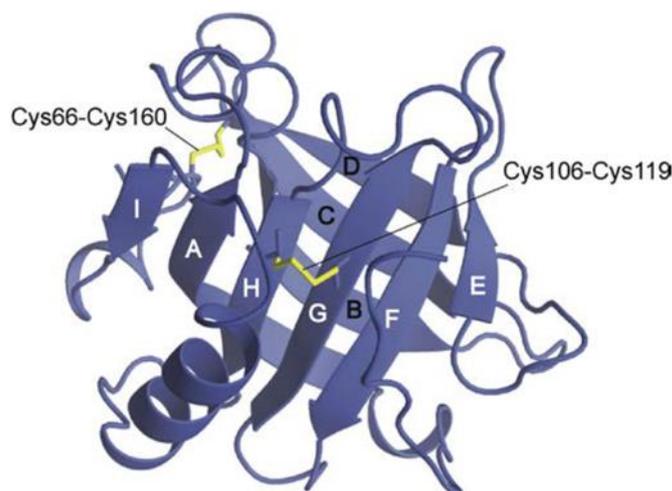


Figure 1.5. Structure tertiaire de la β -lg (Ikeguchi, 2014).

3.2.2. Mécanismes de dénaturation chaude de la β -lactoglobuline

Le mécanisme de dénaturation chaude de la β -lg a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux (Griffin et al., 1993 ; Qi et al., 1995 ; Dong et al., 1996 ; Elofsson et al., 1996 ; Iametti et al., 1996 ; Oldfield et al., 2005 ; Tolkach et al., 2007 ; Petit et al., 2011) donnant lieu à plusieurs modèles décrivant le comportement thermique de solutions de β -lg quasi-pure. Le modèle dénaturation thermique de la β -lg généralement accepté consiste en un procédé à plusieurs étapes, (Mulvihill et Donovan, 1987 ; Tolkach et Kulozik, 2007), tel que présenté dans la figure 1.6.

A température ambiante et pH physiologique (7,4), la β -lg en solution est à l'état natif sous forme de dimères (N_2) (Lalande et René, 1988 ; Kim et Lund, 1998 ; Sava et al., 2005). A 40°C, la forme dimère se dissocie réversiblement en monomères natifs (N). Chaque monomère possède deux ponts disulfures et un groupement thiol qui se situent à l'intérieur de la molécule. Entre 40 et 55°C, la β -lg subit un léger changement dans sa structure tertiaire. En effet, le monomère subit une transition intramoléculaire en formant l'état R (N_R) (Mulvihill et Donovan, 1987 ; Tolkach et Kulozik, 2007). L'état R de la β -lg se distingue de l'état natif seulement par des changements conformationnels mineurs (spécialement l'hélice α qui masque le groupe thiol libre) (Tolkach et Kulozik, 2007). La molécule de β -lg à l'état R est

capable de former des agrégats. Cependant, l'agrégation est négligeable dans ce cas (Tolkach et Kulozik, 2011).

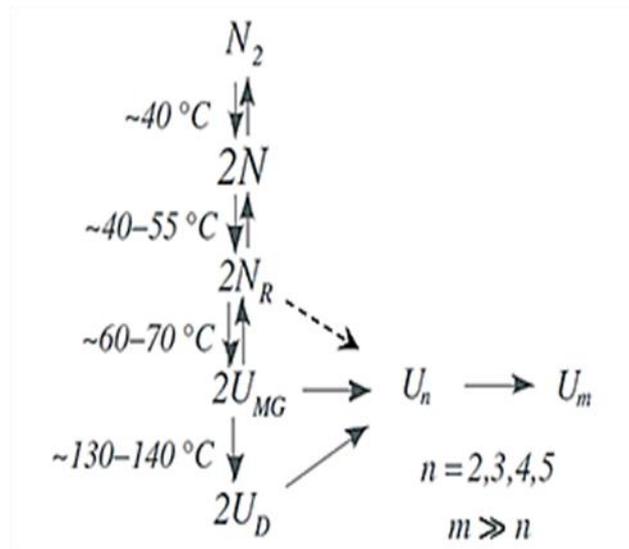


Figure 1.6. Mécanisme de la dénaturation chaude de la β -lg (Tolkach et Kulozik, 2007).

Une température supérieure à 60°C entraîne un dépliement réversible de la protéine, ce qui correspond à une altération de sa structure tertiaire suite à la rupture des liaisons non covalentes et l'acquisition d'une réactivité (thiol), formant ainsi l'état " molten globule " (U_{MG}) qui est capable de provoquer l'agrégation de la β -lg (Delplace et al., 1997 ; Santos et al., 2006). La structure de la molten globule est réversible puisque les liaisons covalentes ne sont pas rompues et la β -lg se replie lorsque la température revient à la température ambiante. La formation de l'état molten globule prend fin à $80-90^{\circ}\text{C}$. Enfin, à des températures entre 130 et 140°C , la β -lg irréversiblement dénaturée (U_D), également sujette à l'agrégation, se forme suite à la destruction de la structure secondaire de la protéine. Les agrégats (U_m) ou les polymères (U_n) peuvent alors réagir avec l'état R, la molten globule et la β -lg irréversiblement dénaturée.

Une fois dépliée, la β -lg peut réagir avec les autres molécules de β -lg ou les autres protéines présentes au sein de la solution de lactosérum. Selon Boxler (2014), trois réactions principales sont à privilégier (figure 1.7) :

- (i) les molécules de β -lg dépliées interagissent entre elles afin de former des agrégats contenant encore un groupe thiol libre (chemin V, figure 1.7) ou les molécules de β -lg dépliées interagissent entre elles pour former des agrégats sans groupe thiol libre (chemins II et XI, figure 1.7) ;

- (ii) les molécules de β -lg dépliées peuvent former un complexe avec la caséine κ via une réaction d'échange thiol-disulfure et des interactions hydrophobes à la surface de la micelle de caséine (chemin III, figure 1.7) (Fink et Kessler, 1985 ; Paulsson et Dejmeck, 1990) ;
- (iii) les molécules de β -lg dépliées peuvent former un complexe avec l' α -la (chemin IV, figure 1.7) (Jeurnink et de Kruif, 1995 ; Kim et Lund, 1998 ; de la Fuente et al., 2002). Ces complexes α -la- β -lg peuvent eux même s'associer à la micelle de caséine (chemin VIII, figure 1.7) (Oldfield et al., 2005). Boxler (2014) précise que les agrégats ne disposant plus d'un groupe thiol libre sont incapables d'interagir via une réaction thiol-disulfure (Oldfield et al., 2005) et restent en solution.

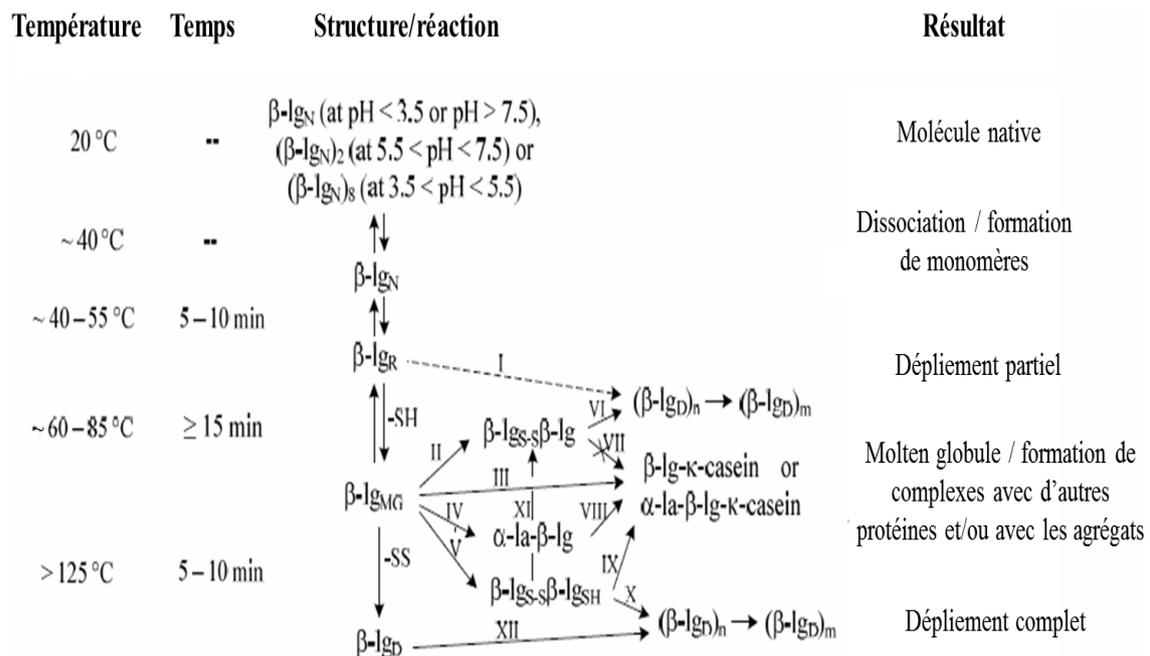


Figure 1.7. Mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg comprenant les différents complexes possibles avec d'autres protéines du lait (Boxler, 2014).

3.2.3. Modèles simplifiés couramment utilisés pour décrire les cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg

Pour donner une vue concise de la dénaturation chaude de la β -lg à des températures entre 60 et 100°C, Oldfield et al. (2005) ont proposé un modèle plus simplifié du mécanisme de dénaturation. Ce modèle résume la dénaturation chaude de la β -lg en une succession de deux réactions : $N \rightarrow U \rightarrow A$.

Lors du traitement thermique, la β -lg native (N) se déplie pour former la β -lg molten globule ou encore appelée la β -lg réversiblement dépliée (U). C'est le dépliement. L'espèce U réagit ensuite avec la β -lg native ou d'autres protéines dépliées, via des échanges disulfures ou une oxydation de thiol, pour former la β -lg irréversiblement dénaturée ou encore appelée agrégats (A). Chaque étape de la réaction de dénaturation (dépliement et agrégation) est gouvernée par la cinétique.

Tolkach et Kulozik (2007) ont montré que ce modèle cinétique, associé à une quantification des protéines de β -lg solubles (S , avec $S = N + U$) par analyse HPLC, permet d'évaluer les concentrations des différentes espèces de la β -lg (native, dépliée et agrégée) en fonction du temps de chauffe et par conséquent, de caractériser les cinétiques des réactions de dépliement et d'agrégation de la β -lg (figure 1.8).

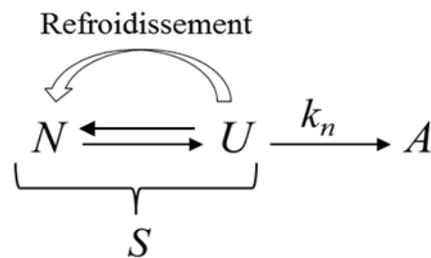


Figure 1.8. Mécanisme plus simplifié de la dénaturation de la β -lg (Tolkach et Kulozik, 2007). (k_n : constante cinétique de la réaction de dénaturation pour un ordre de réaction égal à n).

La détermination des constantes cinétiques de dénaturation de la β -lg (fonction de la température) a été l'objet de nombreuses publications (Lyster, 1970 ; Danneberg, 1986 ; Tolkach et Kulozik, 2007 ; Petit et al., 2011 ; Wolz et Kulozik, 2015). Cependant, malgré la diversité des méthodes utilisées (électrophorèse, immunodiffusion, HPLC, etc.), les résultats sont assez cohérents et la grande majorité des auteurs montre que la réaction de dénaturation de la β -lg est une réaction d'ordre n :

$$-\frac{dC_S}{dt} = k_n C_S^n \quad (1.1)$$

avec C_S la concentration en β -lg soluble, k_n la constante cinétique de dénaturation et n l'ordre de réaction allant de 1 à 2.

La résolution de cette équation fournit différentes expressions de C_S en fonction de n :

Pour $n \neq 1$,

$$C_S(t) = C_S^0(1 + (n - 1) k_n (C_S^0)^{n-1} t)^{1/1-n} \quad (1.2)$$

Pour $n = 1$,

$$C_S(t) = C_S^0 e^{-k_n t} \quad (1.3)$$

avec C_S^0 la concentration initiale en β -lg soluble (au temps zéro) et t le temps.

Les équations 1.2 et 1.3 permettent de calculer la constante cinétique de dénaturation à une température donnée :

Pour $n \neq 1$,

$$k_n = \frac{\left(\frac{C_S(t)}{C_S^0}\right)^{1-n} - 1}{t \cdot (n-1)(C_S^0)^{n-1}} \quad (1.4)$$

Pour $n = 1$,

$$k_n = \frac{-\ln\left(\frac{C_S(t)}{C_S^0}\right)}{t} \quad (1.5)$$

3.2.4. Principaux facteurs physico-chimiques influençant les mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg

Il est établi qu'un certain nombre de facteurs physico-chimiques influence la dénaturation chaude de la β -lg (Galani, 1997), tel que :

- le pH durant le traitement thermique (Monahan et al., 1995 ; O'Kennedy, 2006 ; de Wit, 2009 ; O'Kennedy et Mounsey, 2009) ;
- les profils thermiques imposés (Dannenberg et Kessler, 1988 ; de Wit, 1990 ; Monahan et al., 1995 ; Oldfield et al., 2000) ;
- la concentration de la β -lg native des solutions de protéines sériques (Kessler et Beyer, 1991 ; Gotham et al., 1992 ; Verheul et al., 1998 ; Oldfield et al., 2005) ;
- la force ionique de la solution (Verheul et al., 1998 ; O'Kennedy et Mounsey, 2009) ;
- la composition en minéraux, essentiellement la concentration en calcium (Anema et McKenna, 1996 ; Croguennec et al., 2004 ; Navarra et al., 2007). En effet, le calcium

joue un rôle important dans la dénaturation de la β -g. Xiong et al. (1992) ont montré qu'une augmentation de la concentration en CaCl_2 (de 5 à 20 mmol) abaissait la température de dénaturation de 83°C à 75°C. Petit et al. (2011) ont également noté que les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation dépendent fortement de la concentration en calcium (les constantes cinétiques de dénaturation de la β -lg augmentent avec l'augmentation de la teneur en calcium). Il faut noter que la présence de calcium ne modifie pas le mécanisme global de dénaturation de la β -lg (l'ordre de réaction demeure le même et ce, quelle que soit la teneur en calcium) mais influence fortement les cinétiques de dénaturation de la β -lg, principalement dans la zone d'agrégation. Il semble donc que le calcium catalyse l'agrégation de la protéine par échange de charges (Petit et al., 2011). Par ailleurs, Phan-Xuan et al. (2013) ont montré que le calcium favorise la formation de gros agrégats (de l'ordre de 300 nm).

3.3. Mécanismes de formation du dépôt encrassant par des solutions protéiques du lactosérum

Dans ce qui suit, les mécanismes d'initiation et de croissance du dépôt laitier sur les surfaces d'échange seront présentés.

Puis, dans un second temps, nous décrirons les controverses et les questions ouvertes qui existent dans la littérature concernant la formation du dépôt encrassant.

Finalement, nous discuterons l'effet de certains paramètres physico-chimique sur les mécanismes d'adhésion du dépôt et nous présenterons les modèles prédictifs proposés dans la littérature.

3.3.1. Mécanismes d'initiation et de croissance du dépôt encrassant

Burton (1968) a montré que, quels que soient les dépôts, les mécanismes suivants participent à la formation du dépôt sur les surfaces des échangeurs de chaleur :

- réaction chimique ayant lieu dans le produit, qui transforme les constituants chimiques en une ou plusieurs espèces capables de se déposer sur la surface ;
- transport des constituants encrassants du produit (constituant initial ou précurseur de l'encrassement) vers la surface ;
- adsorption des constituants encrassants du produit en surface pour former la première couche de dépôt ;

- croissance de la seconde couche de dépôt : fixation d'autres constituants et/ou des constituants encrassants initiaux (i.e. à l'origine de la formation de la première couche de dépôt) ;
- croissance et élimination des couches successives de dépôt par effet des contraintes mécaniques induites par l'écoulement.

Plus tard, Hiroshi et al. (1995) a proposé un mécanisme général couramment admis décrivant la formation du dépôt de dérivés laitiers sur les surfaces en acier inoxydable (figure 1.9).

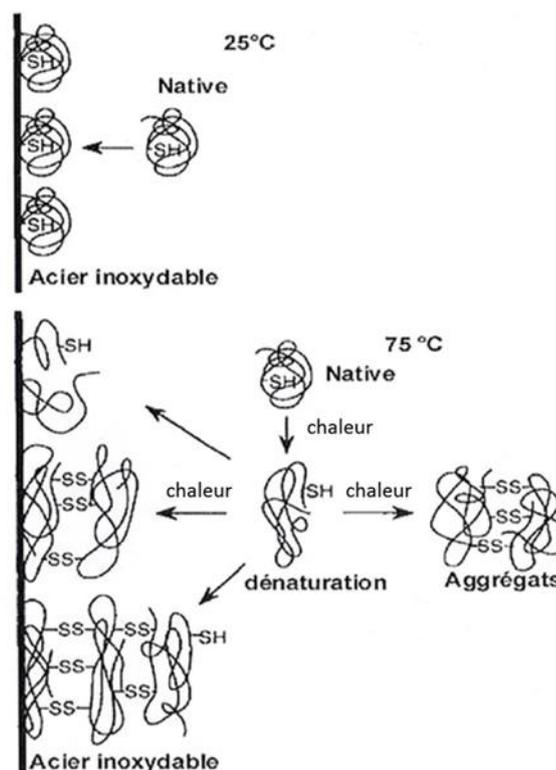


Figure 1.9. Mécanismes d'adhésion des protéines de β -lg sur les surfaces en acier inoxydable (Itoh et al., 1995).

A basse température (25°C), les molécules de β -lg sont adsorbées sur les surfaces jusqu'à formation de la monocouche. Cette interaction protéine-surface dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la température, la conformation de la protéine et les propriétés de surface du matériau. A haute température (75°C), après la formation instantanée de cette monocouche, la chaleur dénature les molécules de β -lg activant ainsi le groupement thiol initialement masqué.

La molécule de β -lg dépliée, devenue thermiquement instable, peut alors choisir entre deux scénarii :

- interaction avec une autre molécule à la paroi, formant ainsi des ponts disulfures avec les molécules déjà adhérees ;
- interaction avec une autre molécule du produit, formant ainsi des agrégats de β -lg. Ces agrégats peuvent, soit rester dans la solution ou migrer vers la paroi pour former des ponts disulfures avec les molécules existantes, favorisant ainsi le développement des couches successives de dépôt.

3.3.2. Principales controverses sur la formation du dépôt encrassant

a) Mécanismes prépondérants

Si les auteurs s'accordent assez bien sur les différentes étapes à l'origine de l'encrassement des surfaces par des dérivés laitiers :

- dénaturation de la β -lg en solution et formation de protéines dépliées et agrégées ;
- transport des β -lg dépliées et agrégées vers la surface ;
- réactions en surface qui engendrent l'adhésion des protéines à la surface, entraînant la formation du dépôt ou sa croissance suite à l'incorporation d'autres protéines et/ou des ions de calcium dans la couche de dépôt ;
- réentraînement (migration possible de certains constituants du dépôt vers le produit) ou arrachement possible de certaines couches du dépôt,

il n'en est pas de même en ce qui concerne l'étape prépondérante du mécanisme d'encrassement contrôlant la formation du dépôt.

En effet, pour Toyoda et al. (1994), Georgiadis et al. (1998), Georgiadis et Macchietto (2000), Bansal et Chen (2005) et Bansal et al. (2005), l'encrassement est contrôlé à la fois par les réactions de transport des constituants encrassants vers la surface ainsi que les réactions en solution (dénaturation) et en surface (ancrage de la matière encrassante à la surface ou sur la couche précédemment déposée).

Par contre, de Jong et van der Linden (1992), de Jong et al. (1992) et Grijspeerd et al. (2004) indiquent que l'encrassement n'est pas limité par le transport de la matière encrassante vers la surface. Ces résultats sont en accord avec ceux de Paterson et Fryer (1988), Fryer et Belmar-Beiny (1991), Jeurnink et al. (1996), Boxler et al. (2013) qui précisent que la formation du dépôt est limitée uniquement par les réactions en solution et en surface.

b) Rôle des espèces dépliées et agrégées de β -lg dans la dynamique de dépôt

Le rôle des espèces dépliée et agrégée dans la formation du dépôt encrassant sur les surfaces des échangeurs de chaleur est également encore loin d'être complètement élucidé.

Toyoda et al. (1994) ont proposé un modèle d'encrassement laitier en supposant que seuls les agrégats entraînent la formation du dépôt. De même, Changani et al. (1997) ont démontré que l'encrassement protéique se produit lorsque les agrégats sont proches de la surface de l'échangeur de chaleur.

D'un autre côté, Belmar-Beiny et al. (1993) Chen et al. (2001), Bansal et Chen (2005) et Bansal et al. (2005) considèrent qu'à la fois les agrégats et les protéines dépliées participent à la formation du dépôt.

Enfin, Lalande et al. (1985), Arnebrant et al. (1987) et Kessler et Beyer (1991), Grijspeerdt et al. (2004) et Jun et Puri (2005b) considèrent que la réaction de dépliement est la seule réaction gouvernant le dépôt, ce qui laisserait supposer que c'est l'espèce dépliée qui est responsable de la croissance du dépôt.

Ceci est en accord avec les travaux de van Asslet et al. (2005) qui ont souligné que les agrégats ne sont pas impliqués dans les réactions d'encrassement des échangeurs de chaleur et les travaux récents de Blanpain-Avet et al. (2012) et Jimenez et al. (2013). Blanpain-Avet et al. (2012) ont montré que la β -lg dépliée est l'espèce précurseur de la formation du dépôt, à partir de l'analyse de la structure de dépôt par spectroscopie Raman d'une solution d'isolats de protéines sériques. Récemment, Jimenez et al. (2013) ont noté l'absence d'agrégats dans les premières couches de dépôt laitier par des techniques AFM. Ceci conforte aussi les observations de :

- de Jong et al. (1992) qui notent que la formation d'agrégats permet de réduire l'encrassement ;
- René et Lalande (1988), Gothman et al. (1992), Delplace et al. (1997), Visser et Jeurnink (1997), Jun et Puri (2007) et Mahdi et al. (2009) qui ont indiqué que l'encrassement est contrôlé par la réaction d'agrégation.

c) Eléments constituant la première couche de dépôt

Le phosphate de calcium et les protéines sériques ont depuis longtemps été recensés comme des composants clés du dépôt encrassant (Visser et Jeurnink, 1997). Plusieurs études ont tenté de déterminer lequel de ces deux éléments se dépose en premier sur la surface de l'échangeur de chaleur.

Certains travaux ont suggéré que les protéines sont adsorbées en premier sur la surface de l'échangeur de chaleur, en raison de leur forte activité en surface (Fryer et Belmar-Beiny, 1991). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté que la première couche de dépôt est essentiellement minérale (Tissier et Lalande, 1986, Foster et al., 1989, Fryer, 1989, Fryer et Belmar-Beiny, 1991), suivie d'une couche de dépôt protéique plus spongieuse.

Maubois (1984) a proposé deux éventuels mécanismes : soit la protéine dénaturée agit comme un noyau sur la croissance des sels minéraux, soit la protéine est adsorbée sur la surface des sels minéraux.

Jimenez et al. (2013) ont démontré, à partir d'analyses des surfaces de dépôt, que la protéine est la première à se déposer durant les essais d'encrassement de solutions de protéines sériques contenant du CaCl_2 . Delsing et Hiddink (1983) ont noté que les protéines forment la première couche de dépôt. Ces auteurs ont également constaté que la croissance du dépôt protéique n'est possible qu'en présence de calcium.

Par ailleurs, l'analyse du dépôt encrassant, après un long traitement thermique, montre que le dépôt se formant près de la surface contient une très forte teneur en minéraux (Belmar-Beiny et Fryer, 1992). Cette observation ne peut être expliquée par le fait que les minéraux se forment en premier sur la surface mais uniquement par la diffusion des minéraux à travers le dépôt jusqu'à la surface (Bansal et Chen, 2006).

Foster et Green (1990) ont montré toutefois que la couche protéique est diffuse et irrégulière. Les minéraux pourraient donc la traverser, permettant ainsi aux couches de minéraux et de protéines de se former simultanément.

3.3.3. Principaux facteurs physico-chimiques influençant l'encrassement laitier

La figure 1.10 extraite de Boxler (2014) synthétise les principaux facteurs influençant la formation du dépôt (M_d) aux surfaces des échangeurs de chaleur durant un essai d'encrassement pour une solution de protéines sériques contenant du calcium.

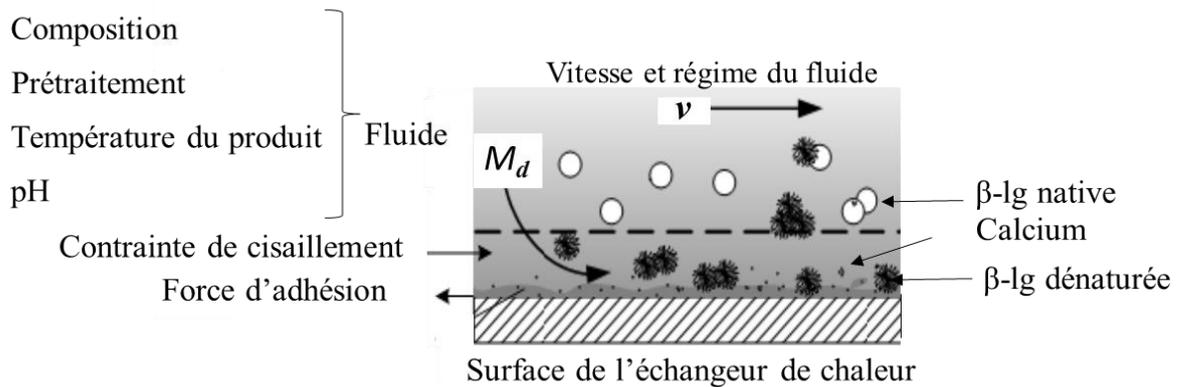


Figure 1.10. Dépôt d'une solution de protéine sérique contenant du calcium formé sur la surface de l'échangeur de chaleur (Boxler, 2014).

a) Effets du pH du milieu

L'effet du pH sur l'encrassement est très complexe. Il est lié au processus de dénaturation des protéines (essentiellement la β -lg) et au mécanisme de précipitation des minéraux. Le pH du lait varie entre 6,6 et 6,8 (Visser et Jeurink, 1997). La quantité de dépôt augmente nettement avec le pH acide mais son effet diffère selon la nature de l'encrassement :

- dépôt protéique : à des faibles valeurs de pH ($\text{pH} < 2$), les ponts disulfures ne peuvent pas se former et le dépôt est considérablement réduit. A $\text{pH} = 4,65$, proche du point isoélectrique de la β -lg ($\text{pH} = 5,13$), les protéines commencent à s'agréger conduisant ainsi à la formation d'un dépôt plus important. Pour des valeurs de pH allant de 5,6 à 6,5 et à des températures supérieures à 60°C , le groupement thiol devient réactif, le phénomène d'agrégation s'intensifie avec le temps de chauffage et une accumulation de dépôt protéique est observée sur les surfaces de l'échange de chaleur (Visser et Jeurink, 1997). Pour des valeurs de pH entre 6,5 et 7 (cas de la majorité des produits laitiers), la β -lg se dénature et adhère aux surfaces de l'échangeur de chaleur suite à la formation d'agrégats de plus grande taille.
- dépôt minéral : pour des valeurs de pH inférieures à 6 et des températures de 60°C , Andritsos et al. (2002) n'ont observé aucun dépôt pour des essais d'encrassement d'environ 2 heures. A des valeurs de pH supérieures à 6, le dépôt minéral commence à se former et le taux d'encrassement augmente fortement dans l'intervalle de pH allant de 6,25 à 6,35, lorsque la solution devient trouble.

Le pH n'affecte donc pas uniquement la quantité de dépôt. Il est également responsable de sa composition. Cette dernière subit plusieurs modifications telles que l'augmentation de la

teneur en minéraux et la diminution de la teneur en protéine, suite à la chute du pH (Skudder et al., 1986 ; Lewis et Heppell, 2000).

b) Effets du calcium

Les ions de calcium sont essentiels à la croissance des couches de dépôt (Xiong, 1992). Changani et al. (1997) ont montré qu'en présence de calcium la quantité de dépôt augmente linéairement.

L'analyse du dépôt encrassant révèle que les couches de dépôt formées à faible teneur en calcium ont une texture spongieuse et molle alors que le dépôt formé à forte teneur en calcium est plus dense et élastique (Guérin et al., 2007). Cette observation est en accord avec les travaux de Pappas et Rothwell (1991) qui ont montré que, lors du chauffage et en présence de calcium, la β -lg s'agrège complètement pour former des structures compactes.

Roefs et Kruif (1994) et Jeurink et Kruif (1995) ont rapporté qu'une augmentation ou une diminution de la teneur en calcium dans le lait affecte la stabilité à la chaleur et entraîne un encrassement plus important. Les ions de calcium présents dans le lait influencent la température de dénaturation de la β -lg, favorisent l'agrégation et agissent sur la croissance du dépôt encrassant en formant des ponts entre les protéines adsorbées sur la surface de l'échangeur de chaleur et les agrégats formés en solution (Xiong, 1992 ; Christian et al., 2002). Jeurink et Kruif (1995) ajoutent que lors de la formation des agrégats, les molécules de β -lg dénaturées peuvent s'associer à des molécules de phosphate de calcium et à d'autres protéines présentes dans le lait. Ces ions de calcium précipitent à hautes températures, leur présence favorise donc la précipitation de l'ensemble vers la paroi. Simmons et al. (2007) ont observé une diminution de la taille des agrégats suite à l'augmentation de la teneur en calcium.

Par ailleurs, Delsing et Hiddink (1983), Daufin et al. (1987) et de Jong et al. (1998) ont montré que l'ajout de calcium contribue non seulement à l'accroissement de la quantité de dépôt mais aussi à l'augmentation de la quantité de caséines présentes dans le dépôt. En outre, un changement dans la composition du dépôt protéique a été observé passant de protéines sériques à des caséines (Jeurink et al., 1996). Jeurink et de Kruif (1995) ont montré qu'aussi bien l'augmentation que la diminution de la teneur en calcium entraîne une augmentation de l'encrassement laitier.

Le calcium agit également sur les changements conformationnels de la molécule de β -lg, facilitant ainsi la dénaturation de la protéine et favorisant la cinétique d'agrégation. Une très faible augmentation de la teneur en calcium influence fortement la formation du dépôt (Guérin et al., 2007). Quatre effets ou une combinaison d'entre eux sont à l'origine de l'augmentation de l'encrassement et des cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg (Belmar-Beiny et Fryer, 1993 ; Simons et al., 2002 ; O'Kennedy et Mounsey, 2009) :

- réticulation intermoléculaire de groupes carboxyliques ou chargés négativement, suite à la formation de complexes protéine- Ca^{2+} -protéine ;
- effet protecteur sur la protéine chargée négativement ;
- changements conformationnels causés par les ions de calcium, altérant ainsi les interactions hydrophobiques et l'agrégation à fortes températures ;
- formation de ponts entre la protéine adsorbée sur la surface et la protéine agrégée formée en solution.

Cependant, O'Kennedy et Mounsey (2009) ont montré qu'un excès en calcium entraîne un effet inhibiteur sur l'agrégation de la protéine.

c) Effets de l'histoire thermique

La température est le principal facteur contrôlant l'encrassement laitier (Burton, 1968 ; Belmar-Beiny et al., 1993 ; Toyoda et al., 1994 ; Jeurink et al., 1996 ; Santos et al., 2003). En effet, l'augmentation de la température entraîne un très important dépôt encrassant, et selon la plage de températures étudiée (supérieure à 110°C), la nature du dépôt change du type A au type B (Burton 1968). Chen et Bala (1998) ont étudié l'effet des températures de surface et en solution sur le dépôt protéique et ont noté que la température de surface serait à l'origine de la formation du dépôt encrassant. Ces auteurs ont également rapporté que pour des températures de surface inférieures à 68°C et des températures en solution supérieures à 84°C, aucun encrassement n'a été observé.

Le préchauffage du lait est à l'origine de la dénaturation et de l'agrégation des protéines (principalement la β -lg), conduisant ainsi à un très faible encrassement lors de son passage dans la zone de chauffage de l'échangeur de chaleur (Burton, 1968 ; Foster et al., 1989). La dénaturation de la β -lg et son association avec les micelles de caséine entraîne une réduction du dépôt de type A (Lalande et Tissier, 1985).

d) Effets de la vitesse de la circulation du fluide

La formation du dépôt laitier est également influencée par la vitesse de circulation du fluide dans l'échangeur de chaleur (Visser et al., 1997). Belmar-Beiny et al. (1993) et Santos et al. (2003) ont noté une diminution de l'encrassement suite à l'augmentation de la turbulence. En effet, Lund et Bixby (1975), Bott (1990) ont montré que plus la vitesse du fluide est élevée dans l'échangeur de chaleur, plus le dépôt est faible. Belmar-Beiny et al. (1993) ont ajouté que plus la vitesse de circulation du fluide est élevée, plus le transport des molécules de la β -lg vers la sortie de l'installation est rapide. Par ailleurs, Paterson et Fryer (1988) et Changani et al. (1997) ont observé une diminution de l'épaisseur de la sous-couche limite laminaire, suite à l'augmentation de la vitesse du fluide. Des vitesses d'écoulement très élevées favorisent également le réentraînement du dépôt suite à l'augmentation de la contrainte de cisaillement (Rakes et al., 1986).

Andritsos et al. (2002) ont cependant mentionné qu'une augmentation de la vitesse du fluide tend à augmenter la masse de dépôt minéral. Ce résultat pourrait être expliqué par la nature de ce type de dépôt (phosphate de calcium) compact et adhérent, ce qui minimise le processus de réduction du dépôt encrassant. Ce phénomène reste néanmoins peu fréquent.

e) Effets du type et des caractéristiques de l'échangeur de chaleur

Les échangeurs de chaleur à plaques sont communément utilisés dans les industries laitières parce qu'ils offrent plusieurs avantages tels qu'un transfert de chaleur de haute performance, un faible gradient de température, une forte turbulence et une facilité d'entretien. Cependant, les échangeurs de chaleur à plaques sont sujets à l'encrassement en raison de leurs canaux étroits (Delplace et al., 1994) et des plaques adjacentes présentant des points de contact répartis sur l'étendue de ces plaques (Belmar-Beiny et al., 1993). En outre, afin d'avoir un transfert de chaleur efficace, la température de paroi doit être considérablement plus élevée que la température en solution entraînant ainsi un dépôt laitier plus difficile à éliminer. Les caractéristiques hydrauliques et thermiques complexes des échangeurs de chaleur à plaques rendent l'analyse du dépôt laitier plus difficile. L'utilisation d'écoulement co et contre-courant dans le même échangeur complique encore plus l'analyse du dépôt (Bansal et Chen, 2006). Wahlgren et Arnebrant (1991) et Flint et al. (2000) ont également rapporté que le dépôt qui se colle sur la surface de l'échangeur de chaleur, influence non seulement l'encrassement mais aussi l'adhésion des microorganismes (Skudder et Biss, 1987 ; Fryer et al., 1993 ; Ayadi et al., 2004).

3.3.4. Modèles prédictifs de l'encrassement laitier

La complexité des réactions mises en jeu, la composition chimique des produits et des paramètres intervenant dans les phénomènes d'encrassement, rendent la modélisation et la prédiction de ce phénomène délicate. Cependant, de nombreux auteurs ont proposé d'établir des modèles afin de décrire l'encrassement laitier dans les échangeurs de chaleur tubulaires et à plaques. Dans ce qui suit, nous présentons les principaux modèles de dynamique d'encrassement laitier de la littérature, en distinguant les modèles à une phase et ceux à quatre phases puis les modèles à deux dimensions (2-D).

a) Modèles à une phase

Le modèle à une phase est typiquement utilisé pour décrire la répartition moléculaire monodirectionnelle de la protéine native en fonction de la température. Dans ce cas, il n'y a pas de réaction réversible participant au processus d'encrassement.

Comme cela a été étudié et modélisé dans des travaux antérieurs tels que ceux de Lyster (1970), la concentration en β -lg native à la sortie des échangeurs de chaleur a été décrite avec succès par une cinétique de dénaturation chaude d'ordre deux. Par ailleurs, Delplace et al. (1994) ont effectué des essais dans un ECP avec un arrangement complexe de l'écoulement. Basée sur des conditions en régime stationnaire, la détermination numérique du profil de température pour chaque canal a été utilisée pour simuler la quantité de β -lg dénaturée en sortie de l'ECP. Plus tard, Delplace et Leuliet (1995) ont étudié l'encrassement par un concentré de protéines de lactosérum de plusieurs arrangements de l'écoulement d'un ECP en mesurant à la fois le coefficient de transfert de chaleur et la masse de dépôt sec. Un modèle empirique a ainsi été développé afin de prédire la masse de dépôt sec (notée $M_{d,i}$ dans le i -ème canal) dans chaque canal par le biais du calcul de la dénaturation thermique de la β -lg (équation 1.6). Le modèle empirique proposé reposait sur une simulation numérique des profils de température, à l'état stationnaire.

$$\frac{M_{d,i}}{S.V_i} = 0,127 \Delta C_i^{0.5} \quad (1.6)$$

où S est la surface d'échange, V_i le volume (constant) du canal et ΔC_i la différence de concentration de β -lg native entre l'entrée et la sortie dans le numéro de canal i .

b) Modèles à quatre phases

Le modèle à quatre phases représente l'ensemble des réactions des quatre espèces de la β -lg (native, dépliée, agrégée et déposée en surface). Ce modèle couvre à la fois les réactions en solution et en surface durant le processus de dénaturation de la protéine, qui inclue le dépliement de l'espèce native, l'agrégation et la formation du dépôt en surface (Visser et Jeurink, 1997).

Tandis que les modèles précités (comprenant une seule phase protéinique) sont des processus de réaction homogène en solution, le modèle à quatre phases est intimement relié à un processus de transfert de matière ou de réaction en surface (Visser et Jeurink, 1997).

de Jong et al. (1992) et de Jong (1996) ont développé un modèle mathématique dans lequel sont considérées à la fois les réactions en surface et celles en solution. La dénaturation de la β -lg a été décrite comme une cinétique de réactions consécutives de dépliement et d'agrégation (de Wit et Klarenbeek, 1989). Le modèle a été appliqué aux ECP avec les données empiriques de cinétiques de dépliement et d'agrégation de la β -lg.

En prolongeant le travail de de Jong et al. (1992), Toyoda et Fryer (1997) ont développé un modèle dans lequel ils font l'hypothèse que pour chaque protéine présente, le transfert de matière a lieu entre le fluide et la paroi. Néanmoins, ces auteurs ont indiqué que seuls les agrégats peuvent adhérer à la paroi, de telle façon que la quantité déposée est proportionnelle à la concentration de β -lg agrégée au sein de la couche limite thermique. Les travaux de Toyoda et Fryer (1997) ont été approfondis par Georgiadis et al., (1998) et Georgiadis et Macchietto (2000) en y ajoutant le comportement hydrodynamique dans l'échangeur.

c) Modèles 2-D

Les modèles dynamiques 2-D permettent de réaliser une étude exhaustive de l'encrassement laitier dans les ECP en tenant en compte l'effet des corrugations des plaques (Jun et Puri, 2005 et Jun et Puri, 2007), à l'inverse des modèles d'encrassement cités ci-dessus qui sont basés sur une distinction 1-D de l'écoulement.

Jun et al. (2004) ont développé un modèle d'encrassement 2-D en l'associant avec des équations d'équilibre de matière afin de prédire la distribution du dépôt laitier. Les équations de Navier-Stokes de dynamique des fluides ont été résolues et couplées avec l'équation de l'énergie d'équilibre et une cinétique d'encrassement à trois phases.

Bouvier et al. (2014) ont effectué une analyse CFD en 2-D pour simuler localement les mécanismes de dénaturation de la β -lg induite par la chaleur et ont confronté les mesures des

masses de dépôt le long de l'ECP avec le profil de concentration des différentes espèces de β -lg (native, dépliée et agrégée). Ce modèle montre clairement que la forme dépliée de la β -lg est l'espèce précurseur de l'encrassement protéique lors de la pasteurisation de lactosérum dans la plage de températures allant de 75 à 110°C.

Plus récemment, Choi et al. (2013) ont élaboré des modèles d'encrassement à 3-D permettant d'évaluer l'importance de l'orientation des corrugations des plaques de l'échangeur de chaleur.

3.4. Méthodologie de mesure de l'encrassement laitier

Dans ce qui suit, nous présenterons quelques méthodes courantes de suivi de l'encrassement habituellement employées en échangeur. Ces méthodes seront mises en œuvre dans la partie Matériels et Méthodes afin de détecter les cinétiques d'encrassement dans les échangeurs de chaleur. Dans la littérature, des mesures dites “ directes ” et “ indirectes ” peuvent être distinguées pour quantifier l'encrassement d'une installation. Dans ce paragraphe, nous détaillerons le principe et l'écueil de ces deux types de mesures.

3.4.1. Méthodes directes

La pesée de la masse de dépôt dans les canaux de l'échangeur de chaleur et l'observation visuelle du dépôt sont les mesures les plus directes du phénomène d'encrassement. Cependant, ces mesures ne peuvent pas se pratiquer sur tous les équipements. En effet, elles sont plus aisées dans le cas des échangeurs à plaques que dans le cas des échangeurs tubulaires, en raison de la facilité d'accès aux surfaces d'échange.

La méthodologie pour peser les plaques varie entre les études (léger rinçage ou non, mode de séchage : étuve ou à l'air ambiant, temps de séchage). En effet, en raison de la teneur en eau encore présente dans le dépôt au moment du démontage de l'échangeur de chaleur, la pesée du dépôt humide aboutit à une précision moindre que la pesée d'un dépôt sec réalisée dans des conditions standardisées (Delplace, 1995). Ainsi, de nombreux auteurs ont étudié les masses de dépôt sec présentes dans chaque canal pour évaluer l'encrassement après un certain temps de fonctionnement de l'échangeur (Buron, 1967 ; Lalande et al., 1984 ; Delplace et al. 1994 ; Yoon et Lund, 1994 ; Fryer et al., 1996 ; Petit et al., 2013).

Ces méthodes directes présentes néanmoins un inconvénient majeur. En effet, les informations obtenues à travers ces mesures ne sont pas dynamiques. Ces mesures ne reflètent l'état de l'échangeur de chaleur qu'au moment de l'arrêt du traitement thermique et ne

précisent en aucun cas l'évolution du dépôt dans le temps. De plus, les pesées ne fournissent qu'une information globale de la distribution du dépôt encrassant.

D'autres mesures directes telles que la microscopie électronique (Tissier et Lalande, 1986 ; Guérin et al., 2007), le TOF-SIMS (Jimenez et al., 2013) et l'AFM (Goode et al., 2013) ont été effectuées sur les dépôts. Ces techniques ont notamment permis d'évaluer la structure et la topographie des dépôts à un temps donné. Elles nécessitent une prise et une préparation des échantillons à analyser, qui ne sont pas adaptées au suivi en ligne de l'évolution de l'encrassement.

3.4.2. Méthodes indirectes

Le développement d'une couche de dépôt sur les surfaces d'un échangeur de chaleur entraîne très souvent une importante baisse des performances thermiques et hydrodynamiques. La mesure de l'encrassement peut donc être déterminée en suivant la diminution avec le temps des performances de l'échangeur.

a) *Mesure de l'encrassement à partir du suivi du coefficient de transfert de chaleur global*

La formation d'une couche de dépôt sur la surface d'échange entraîne une résistance au transfert thermique supplémentaire, provoquant ainsi la baisse du coefficient de transfert de chaleur global de l'installation. Il faut donc augmenter la puissance thermique fournie pour maintenir le programme thermique souhaité, comme l'indique l'équation suivante :

$$\dot{m}_p C_{p_p}(T_{sp} - T_{ep}) = \dot{m}_{ec} C_{p_{ec}}(T_{eec} - T_{sec}) = U_g S \Delta TLN F_T \quad (1.7)$$

$$\Delta TLN = \frac{(T_{sec}-T_{ep})-(T_{eec}-T_{sp})}{\ln\left(\frac{T_{sec}-T_{ep}}{T_{eec}-T_{sp}}\right)} \quad (1.8)$$

avec \dot{m}_p et \dot{m}_{ec} respectivement les débits massiques du produit et de l'eau chaude, T_{ep} et T_{sp} respectivement les températures d'entrée et de sortie du produit, T_{eec} et T_{sec} respectivement les températures d'entrée et de sortie de l'eau chaude, C_{p_p} et $C_{p_{ec}}$ les chaleurs massiques respectivement du produit et de l'eau chaude, U_g le coefficient de transfert de chaleur global, S la surface de transfert de chaleur, F_T le facteur correctif de ΔTLN traduisant l'écart entre l'échangeur réel et un échangeur théorique à co ou contre-courant pur, ΔTLN la différence de température logarithmique moyenne entre le produit et l'eau chaude.

Etant donné que \dot{m}_p et T_{ep} sont le plus souvent fixés, il faut donc agir sur le système pour maintenir le programme thermique subit par le produit. Yoon et Lund (1994) ont défini deux méthodes qui peuvent être utilisées pour parvenir à cet objectif :

- la première méthode consiste à augmenter \dot{m}_{ec} ;
- la deuxième méthode consiste à augmenter T_{eec} au fur et à mesure du développement de l'encrassement.

Yoon et Lund (1994) ont constaté que la deuxième méthode permet de garder un traitement thermique plus constant et semble donc plus indiquée que la première méthode.

Il est donc possible de suivre l'encrassement d'un échangeur de chaleur en reportant l'évolution dans le temps de U_g ou les grandeurs qui en découlent. En effet, Ling et Lund (1978) ont utilisé l'évolution de $\frac{U_g}{U_{g0}}$ (où U_{g0} est le coefficient de transfert de chaleur global de l'échangeur propre). La même représentation a été utilisée plus tard par Delplace (1995) pour décrire l'évolution de l'encrassement d'un échangeur de chaleur à plaques par des solutions de protéines sériques.

Il est également possible de suivre l'évolution de l'encrassement en reportant l'évolution de la résistance totale du dépôt encrassant (R_{enc}) dans le temps. Cette grandeur est définie par l'équation suivante :

$$R_{enc} = \frac{1}{U_g} - \frac{1}{U_{g0}} \quad (1.9)$$

En supposant que l'encrassement est uniformément réparti dans l'échangeur, cette résistance peut être décrite comme étant le rapport entre l'épaisseur moyenne de la couche de dépôt sur les parois de l'échangeur de chaleur (e_d) et la conductivité thermique de cette dernière (λ_d).

$$R_{enc} = \frac{e_d}{\lambda_d} \quad (1.10)$$

Il semble donc possible d'estimer une épaisseur moyenne de dépôt via le suivi de la résistance totale du dépôt encrassant et de la connaissance de la conductivité thermique des dépôts.

Cependant, il faut rester prudent quant à la fiabilité de cette méthode puisque l'hypothèse posée (uniformité de la répartition du dépôt) nous amène à calculer une épaisseur moyenne équivalente, qui ne traduit pas forcément la réalité et occulte la présence probable d'épaisseurs importantes dans certaines zones critiques (points de contact, entrée/sortie de chaque canal). Par ailleurs, il est difficile d'estimer la valeur de λ_d car le dépôt est généralement poreux, contenant de l'eau et des protéines à différentes proportions. Pour un dépôt de β -lg, Davies et al. (1997) ont indiqué une valeur de λ_d de $0,38 \text{ W.m}^{-1}.\text{°C}^{-1}$. Rose et al. (2000) ont proposé pour le même type de dépôt des valeurs allant de $0,13$ à $0,33 \text{ W.m}^{-1}.\text{°C}^{-1}$ et Tuladhar et al. (2002) ont attribué la valeur de $0,26 \text{ W.m}^{-1}.\text{°C}^{-1}$.

b) Mesure de l'encrassement à partir du suivi des pertes de charge

La formation d'une couche de dépôt sur les surfaces d'un échangeur réduit les performances hydrodynamiques des échangeurs, entraînant une augmentation de la puissance de pompage nécessaire au maintien du débit du produit à traiter. Cette diminution est exprimée par l'évolution de la perte de charge en fonction du temps de traitement. Ainsi, Burton (1966), Fryer (1989) et Delplace (1995) ont suivi la formation du dépôt encrassant lors du traitement thermique des produits laitiers.

Une approche basée sur la réduction du diamètre hydraulique (D_h), a été proposée par Lalande et al. (1985) et René et Lalande (1987) visant à estimer l'épaisseur de dépôt à partir de l'évolution de la mesure de la perte de charge (ΔP). Pendant l'encrassement de l'échangeur, la perte de charge augmente (Burton, 1966 ; Fryer, 1989). Elle est traduite par l'équation suivante :

$$\frac{D_{h_0} - D_h}{D_{h_0}} = 1 - \left(\frac{\Delta P_0}{\Delta P} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (1.11)$$

avec ΔP_0 la perte de charge de l'installation propre au débit du produit, D_{h_0} et D_h respectivement les diamètres hydrauliques de l'échangeur propre et de l'échangeur encrassé.

L'épaisseur du dépôt (e_d) peut être calculée à partir du diamètre hydraulique $D_h = D_{h_0} - e_d$ et par conséquent, par l'intermédiaire des mesures de pertes de charge :

$$e_d = D_{h_0} \cdot \left(1 - \left(\frac{\Delta P_0}{\Delta P} \right)^{\frac{1}{3}} \right) \quad (1.12)$$

La mesure de la perte de charge permet donc d'évaluer l'encrassement d'un échangeur de chaleur. Cependant, l'utilisation de cette relation doit se faire avec précaution, comme l'ont indiqué Burton (1967), Schreier et al. (1994) et Delplace (1995). En effet, la perte de charge peut évoluer différemment lors des essais effectués dans les mêmes conditions et donner lieu aux mêmes masses de dépôt (Burton, 1968). Cette variation peut s'expliquer par la sensibilité de cette mesure aux phénomènes d'encrassement. Par ailleurs, cette technique n'est pas suffisamment sensible à la détection de fines épaisseurs de dépôt et ne peut nullement renseigner sur la distribution du dépôt le long de l'échangeur de chaleur. La mesure de la perte de charge renseigne donc d'avantage sur l'état des performances hydrodynamiques de l'échangeur de chaleur que sur la quantité de dépôt.

A travers les deux méthodes décrites ci-dessus, il semble que ΔP et U_g sont reliés théoriquement à l'épaisseur du dépôt dans l'échangeur de chaleur. Il est néanmoins difficile d'obtenir des évolutions d'épaisseur de dépôts identiques en se basant sur des mesures simultanées du U_g et de ΔP .

Les travaux de Toyoda et al. (1994) portant sur l'encrassement d'un ECP par des solutions de protéines du lactosérum sont assez significatifs sur ce point. Ces auteurs ont montré qu'on pouvait obtenir trois évolutions totalement différentes de ΔP avec le temps et obtenir néanmoins des évolutions identiques du U_g .

4. Conclusion

L'état des connaissances réalisé dans le chapitre bibliographie a mis en évidence dans un premier temps, l'impact négatif de l'encrassement laitier sur les performances des échangeurs de chaleur conventionnels. Il en ressort que la mise en œuvre d'un traitement thermique de pasteurisation favorise la dénaturation des protéines et leur adhésion systématique à la paroi.

Les travaux portant sur l'encrassement des échangeurs de chaleur par les produits laitiers montrent que ce phénomène est complexe à appréhender et à modéliser car il est gouverné non seulement par des facteurs liés à la composition chimique des assemblages protéiques à pasteuriser mais aussi par les conditions opératoires de chauffage, la géométrie et les propriétés de paroi des échangeurs.

Cet état de l'art a permis néanmoins dans un second temps, de mettre en évidence certaines lacunes de la littérature. Tout d'abord, bien que différents travaux mentionnent abondamment l'influence du calcium sur les phénomènes d'encrassement protéique, très peu

données chiffrées reliant réellement la quantité de dépôt à la teneur en calcium après un traitement thermique dans un échangeur de chaleur existant et aucun modèle prédictif d'encrassement ne prend en considération la teneur en calcium des solutions protéiques.

Cet état de connaissance, nous empêche de conclure définitivement si le calcium est vraiment un constituant clé impliqué dans la formation du dépôt, qui participe à la liaison des espèces protéiques constituant le dépôt, et si la teneur en calcium doit être intégrée dans les approches de modélisation de dépôt.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1 : Fluides modèles mis en œuvre pour les études de dénaturation et les essais d'encrassement en ECP

Dans ce premier chapitre, nous décrirons premièrement le cahier des charges et les choix effectués pour la mise au point de solutions protéiques modèles encrassantes. Nous détaillerons ensuite la composition chimique et le mode d'obtention des solutions protéiques modèles encrassantes retenues.

1. Contraintes techniques pour le choix des solutions protéiques encrassantes

Les fluides modèles encrassants doivent satisfaire les contraintes suivantes :

- Contenir un nombre limité d'assemblages protéiques (caséine, protéines sériques, etc.) et d'éléments minéraux pour simplifier le nombre de complexations possibles entre les espèces protéiques et les sels (calcium, citrate, phosphate) une fois le traitement thermique initié ;
- Etre riches en β -lg (non dénaturée par la chaleur ou par un agent chimique) pour être représentatifs des dérivés laitiers et permettre ainsi d'obtenir des encrassements importants dans les ECP. Il est admis que la β -lg joue en effet un rôle très important dans les phénomènes d'encrassement laitier (Belmar-Beiny et al., 1993) ;
- Permettre d'obtenir une composition en calcium variable, mais contrôlée ;
- Permettre d'obtenir des résultats d'encrassement les plus reproductibles possibles. Notre choix ne se portera donc pas sur le lait (enrichi en calcium) comme fluide modèle. En effet, le lait est sujet à d'importantes variations en composition chimique selon les saisons et dispose d'une faible stabilité au stockage ;
- Etre facile à préparer et à stocker sans qu'il y ait altération dans le temps. Cette contrainte est importante car nos essais expérimentaux nécessitent de grandes quantités de protéines.

Dans ce contexte, acheter un lot de poudre protéique, le stocker en chambre froide et réhydrater ces poudres, avant chaque essai d'encrassement, pour obtenir des solutions protéiques de composition souhaitée semble être une solution intéressante.

2. Poudre protéique retenue pour préparer les solutions protéiques modèles encrassantes : composition chimique et conditions de stockage

En se basant sur les contraintes citées ci-dessus, nous avons choisi de reconstituer une solution modèle à base d'isolats de protéines laitières (WPI). Il s'agit du Promilk 852 FB1 (Ingredia, Arras, France) conditionné sous forme de poudre. La composition chimique de cette poudre est donnée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Composition de la poudre de WPI

Composants	Promilk 852 FB1 (% p/p)
Protéines totales	80,1
<i>β-Lg</i>	66,0
<i>α-La</i>	13,3
Lipides	1,0
Lactose	11,0
Minéraux	2,9
<i>Calcium</i>	4,0
<i>Sodium</i>	1,7
<i>Phosphate</i>	2,4

Cette poudre riche en β -lg et contenant très peu de minéraux permet d'étudier la formation du dépôt de type A (essentiellement protéique) et de limiter la formation du dépôt de type B.

Le Promilk 852 FB1 est conditionné en sacs de 20 kg stockés en chambre froide à 4°C. L'emballage protège la poudre de l'humidité et d'une exposition à la lumière ce qui assurent une longue durée de conservation. Les sacs utilisés pour nos essais expérimentaux appartiennent tous au même lot de fabrication afin d'assurer une qualité la plus constante possible.

3. Mode d'élaboration des solutions protéiques modèles encrassantes retenues

Les solutions de β -lg à 0,25, 0,5, 1, 2 et 2,5% (p/p) sont préparées à température ambiante par dissolution de respectivement 2,5, 5, 10, 20 et 25 g de la poudre de WPI (Promilk 852 FB1) dans 1 L d'eau osmosée. Différentes concentrations de chlorure de calcium CaCl_2 (anhydre, 96%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sont ajoutées aux solutions de β -lg pour obtenir une teneur en calcium total de 100 et 120 ppm (tableau 2.2). Les concentrations en calcium des différentes solutions modèles ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Spectro AA 55B, Varian, Palo Alto, USA).

Tableau 2.2. Teneur initiale et finale en calcium pour les différentes solutions modèles

Solution de β -lg (% p/p)	Teneur en calcium dans la poudre de WPI (ppm)	Teneur en CaCl_2 ajouté (ppm)	Teneur en calcium total (ppm)	Ratio molaire calcium / β -lg
0,25	10	90	100	22,9
0,5	20	80	100	11,5
1	40	60	100	5,7
2	80	20	100	2,9
2,5	100	0	100	2,3
1	40	80	120	6,9

Pour éviter toute prolifération microbienne, chacune des solutions est préparée le jour même de l'essai d'encrassement. Le pH des différentes solutions modèles de WPI a été mesuré à chaque essai. Il est de l'ordre de 6,8 pour l'ensemble des solutions encrassantes.

Chapitre 2 : Essais d'encrassement en pilote

Plusieurs essais d'encrassement à l'échelle pilote avec des solutions protéiques modèles de WPI ont été réalisés. Pour se faire, deux plateformes expérimentales comportant deux zones (préchauffage et chauffage) ont dû être mises en œuvre, ainsi qu'une instrumentation apte à détecter les phénomènes de dépôt encrassant dans la zone de chauffage.

Dans ce chapitre, nous décrirons brièvement les plateformes expérimentales utilisées lors des essais d'encrassement. En particulier, nous donnerons des précisions sur les deux configurations d'ECP étudiées (toutes les deux placées en zone de chauffage) : à 5 et à 10 canaux. Nous détaillerons ensuite les tests de caractérisation effectués pour quantifier la masse de dépôt, suivre la dynamique d'encrassement et sonder la structure du dépôt.

1. Plateformes expérimentales et conditions opératoires imposées dans l'ECP

1.1. Configuration d'ECP à 5 canaux

Les essais d'encrassement ont été effectués sur une installation pilote (figure 2.1). Cette plateforme est constituée de deux zones distinctes :

- Une zone de préchauffage contenant un ECP constitué de 19 plaques de type V7 (Alfa Laval Vicarb, Fontanil-Cornillon, France), soit 9 passes avec un canal par passe. Cette zone est nécessaire pour préchauffer le fluide modèle ;
- Une zone de chauffage renfermant un ECP. Les plaques utilisées sont également de type V7 (figure 2.2). Ces plaques, couramment rencontrées dans l'industrie, sont des plaques à cannelures droites (cannelures perpendiculaires à la direction moyenne de l'écoulement). Les caractéristiques géométriques de ces plaques sont données dans le tableau 2.3.

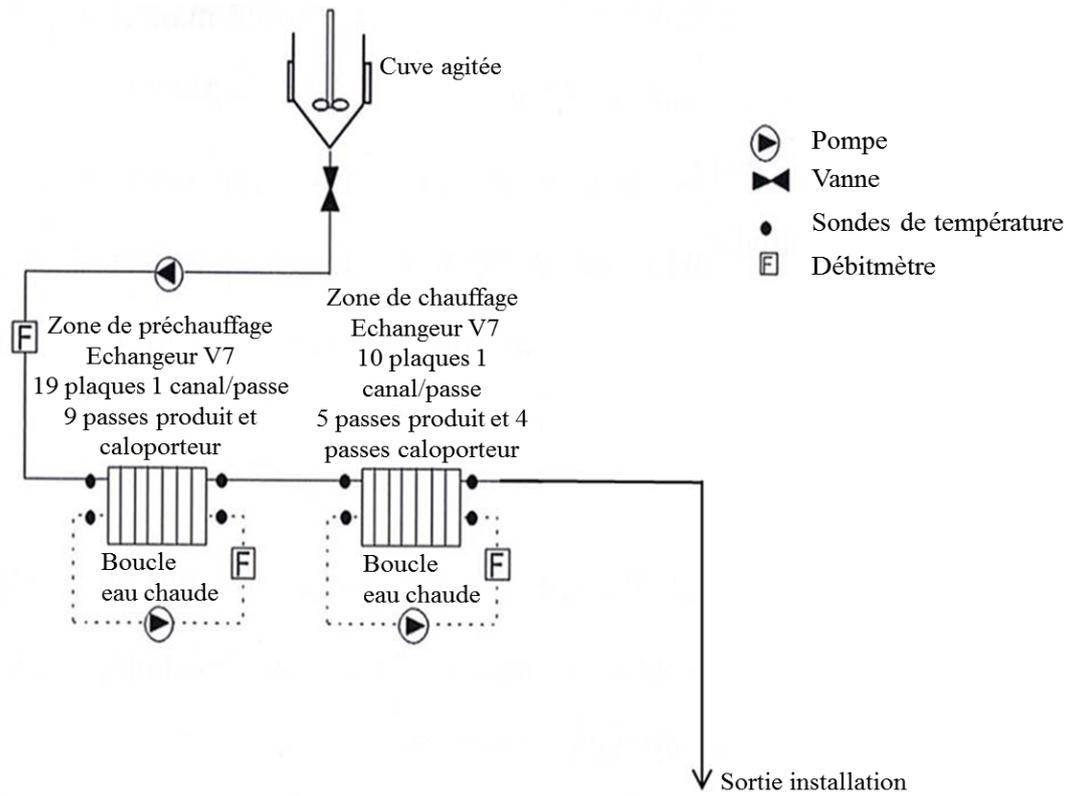


Figure 2.1. Schéma de l'installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement (configuration de l'ECP à 5 canaux).

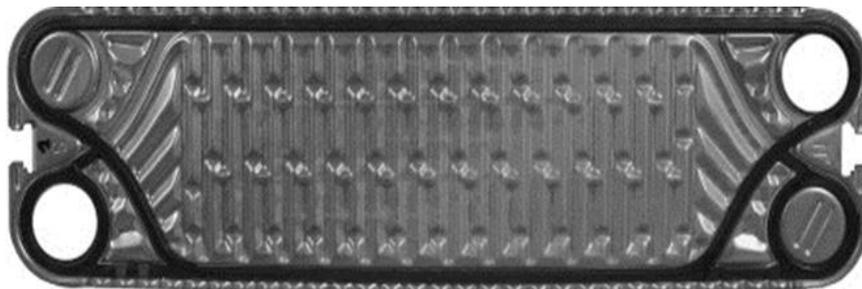


Figure 2.2. Plaque utilisée pour les essais d'encrassement.

Tableau 2.3. Caractéristiques géométriques des plaques V7 (Leuliet, 1988).

Matériau	Acier inoxydable 316Ti
Conductivité thermique de la plaque	16,3 w.m ⁻¹ .°C ⁻¹
Longueur	0,495 m
Largeur	0,15 m
Epaisseur	0,8 mm
Surface d'échange	0,075 m ²
Espace inter-plaques	4,0 mm
Section de passage	6.10 ⁻⁴ m ²
Angle de cannelure par rapport à l'axe longitudinal de la plaque	90°
Angle de base de la cannelure	35°
Pas de la cannelure	15 mm

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes uniquement intéressés à la zone de chauffage. L'échangeur thermique utilisé est composé de 10 plaques, soit 5 passes avec un canal par passe, dans lesquelles circulent à contre-courant le produit à traiter et l'eau chaude (figure 2.3).

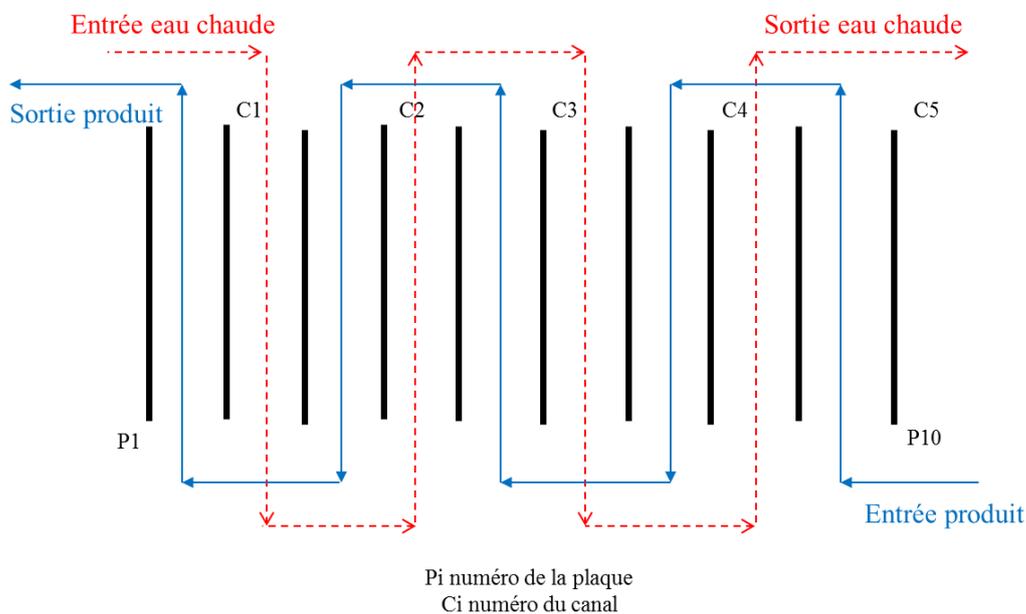


Figure 2.3. Représentation de la configuration de l'ECP à 5 canaux utilisée pour les essais d'encrassement.

L'ECP a été utilisé pour chauffer les solutions protéiques modèles encrassantes de WPI à des températures supérieures à la température de dénaturation de la β -lg. La température d'entrée de l'eau chaude a été ajustée durant les essais d'encrassement, afin d'assurer une température constante de sortie du produit encrassant à l'issue de la zone de chauffage et un profil thermique constant de la solution modèle de WPI le long de l'ECP.

L'ECP a été alimenté d'une solution modèle de WPI à traiter thermiquement pendant une durée de 2 heures à un débit du produit maintenu à 300 L.h⁻¹ tandis que le débit de l'eau chaude varie de 150, 300 ou 900 L.h⁻¹ selon le type d'expérimentation, ce qui permet d'accroître rapidement la température du produit. Pour ce débit du produit étudié, le temps de séjour moyen dans l'ECP est de 14 s et le nombre de Reynolds moyen (Re), calculé pour chaque essai à partir de la distribution moyenne du Re dans l'ECP, varie entre 2610 et 2950 pour les différents profils thermiques imposés (équation 2.1). Ces valeurs du Re correspondent à un régime d'écoulement turbulent (la limite de la turbulence se situe à $Re = 776$ pour cette configuration d'ECP) et ont été déterminées à partir de la connaissance des profils thermiques et des propriétés physiques de l'eau (plutôt que le lait puisque les différentes concentrations en β -lg des solutions modèles de WPI étudiées sont très faible allant de 0,25 à 2,5% p/p). Cette méthode de calcul a également été utilisée par Delplace et Leuliet (1995) et plus récemment par Petit et al. (2013) :

$$Re = \frac{2 \cdot \rho \cdot Q_p}{\mu L} = \frac{\rho v D_h}{\mu} \quad (2.1)$$

avec Q_p le débit du produit, ρ la masse volumique de la solution protéique modèle, μ la viscosité dynamique du produit, L la largeur de la plaque, v la vitesse moyenne de circulation du fluide entre 2 plaques de l'ECP et D_h le diamètre hydraulique entre 2 plaques de l'ECP qui est égal à $2 \cdot e$ (e est l'espace inter-plaques).

La préparation de la solution à traiter débute une heure avant la mise en route du traitement thermique afin de permettre une solubilisation complète du produit. L'agitation du mélange eau osmosée et poudre de WPI est effectuée dans une cuve de 600 L à température ambiante. Les paramètres de l'échangeur thermique (débits et températures du fluide à traiter et de l'eau chaude) sont ensuite ajustés en faisant circuler de l'eau dans le système aux températures voulues pour l'expérimentation. Une fois ces paramètres stabilisés, l'expérimentation peut commencer en faisant circuler le produit à traiter dans l'installation. Le produit, initialement à température ambiante, est préchauffé dans un premier échangeur pour

atteindre 60 ou 65°C (selon l'essai expérimental) à la sortie du préchauffeur, et c'est à cette même température qu'il rentre dans la zone de chauffage correspondant au deuxième ECP. Quatre différents profils thermiques ont été imposés dans l'ECP. Ces profils de température ont été choisis pour permettre la formation significative de dépôt, tout en s'assurant que l'ECP puisse fonctionner pendant 2 heures avant que la perte de charge due à l'encrassement ne devienne trop élevée (valeur supérieure à 1 bar).

Les profils de température dans l'ECP ont été simulés avec le logiciel Sphère issu de la méthode numérique proposé par René et al. (1991) permettant de calculer les températures en solution des fluides chaud et froid dans chaque canal de l'ECP. Une fois les performances hydrauliques et thermiques de l'ECP introduites dans le logiciel, les températures en solution des deux fluides peuvent être calculées le long de l'ECP. Chaque profil de température est contrôlé par les paramètres d'entrée de l'ECP, à savoir les températures d'entrée du produit et du fluide chaud (notées respectivement T_{ep} et T_{eec}) et les débits du produit et de l'eau chaude (respectivement Q_p et Q_{ec}). Le tableau 2.4 représente pour chaque profil de température, les valeurs moyennes des températures et des débits simulés du fluide chaud et de la solution modèle de WPI à traiter. La simulation des profils thermiques par le logiciel Sphère a été validé par la passé par Delplace et Leuliet (1995), Delplace et al. (1997), Petit et al., (2013) et Bouvier et al. (2014).

Tableau 2.4. Conditions opératoires étudiées à l'échelle pilote avec l'ECP à 5 canaux : débits et températures moyennes d'entrée et de sortie de la solution de WPI et de l'eau chaude.

N° du profil thermique	T_{ep} (°C)	T_{sp} (°C)	Q_p (L.h ⁻¹)	T_{eec} (°C)	T_{sec} (°C)	Q_{ec} (L.h ⁻¹)
#1	67	84	300	87	72	300
#2	68	84	300	85	81	900
#3	66	83	300	97	69	150
#4	61	74	300	77	66	300

Notons que les profils thermiques simulés prédisent avec succès les températures expérimentales de sortie du produit et de l'eau chaude (notées respectivement T_{sp} et T_{sec}) enregistrées durant les essais d'encrassement.

Les profils de température représentés dans la figure 2.4 sont obtenus suite à des simulations avec le logiciel Sphère et l'utilisation des conditions opératoires résumées dans le tableau 2.4.

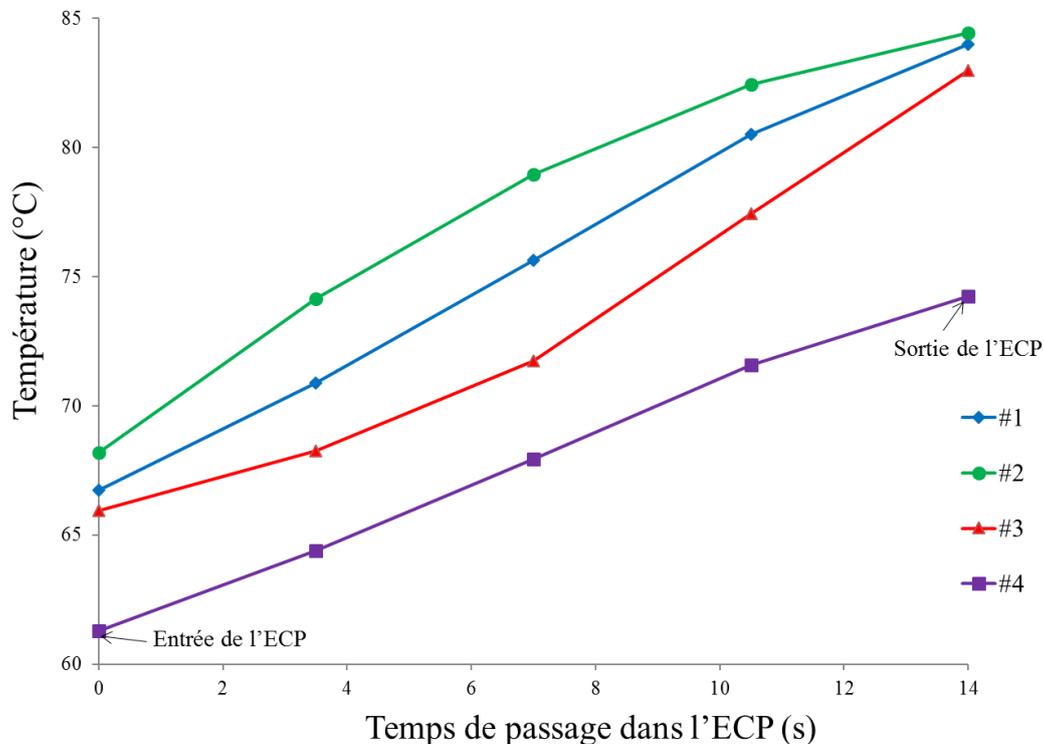


Figure 2.3. Les profils thermiques imposés dans l'ECP de 5 canaux.

Les débits volumiques des différents fluides sont mesurés sur la plateforme expérimentale à l'aide de débitmètres électromagnétiques à induction (Krohne type DN10). La pleine échelle de ces capteurs est réglable et permet de mesurer des débits allant jusqu'à $10 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Les températures expérimentales d'entrée et de sortie du produit et de l'eau chaude sont mesurées à l'aide de sondes à résistance de platine (100Ω à 0°C). Quant à la mesure de la perte de charge, elle a été effectuée à l'aide d'un capteur pleine échelle de 300 hPa (Bailey Sereg type 8D). Les différentes mesures de ces capteurs (débit, température et pression) sont relevées à l'aide d'un système d'acquisition (Burr Brown MCS 100) composé essentiellement d'un convertisseur analogique-digital et d'organes d'entrée-sortie reliés à un ordinateur par l'intermédiaire d'une liaison série (RS 232).

1.2. Configuration d'ECP à 10 canaux

Une deuxième configuration de l'ECP à 10 canaux a été utilisée, pour le traitement thermique d'une durée de 2 heures d'une solution modèle de WPI, afin de comparer les résultats d'encrassement avec ceux obtenus avec la configuration de l'ECP à 5 canaux en imposant les mêmes conditions de procédé. A cet effet, le système utilisé dans cette deuxième configuration est présenté dans la figure 2.5.

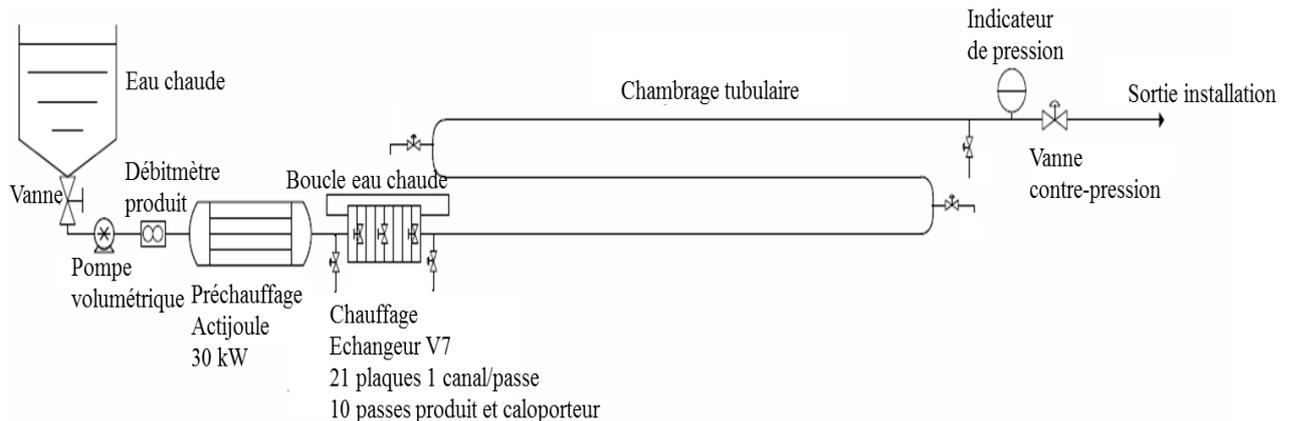


Figure 2.4. Montage de l'installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement (configuration de l'ECP à 10 canaux).

Il est composé de :

- une cuve de 600 L contenant la solution modèle à traiter ;
- un système Actijoule (Actini, Evian, France) de 30kW constitué de tubes en acier inoxydable (20,7 m de longueur et 23 mm de diamètre) et alimenté en basse tension, préchauffant la solution modèle par effet Joule ;
- un tuyau en acier inoxydable (15,7 m de longueur et 23 mm de diamètre) portant le produit préchauffé du système Actijoule à l'ECP ;
- un ECP constitué de 10 canaux (un canal par passe) avec une configuration à contre-courant (figure 2.6), composé de 21 plaques de type de V7 (Alfa Laval Vicarb, Fontanil-Cornillon, France) ;
- un chambrage constitué d'un ensemble de 20 m de conduites tubulaires en acier inoxydable (de 36 mm de diamètre intérieur).

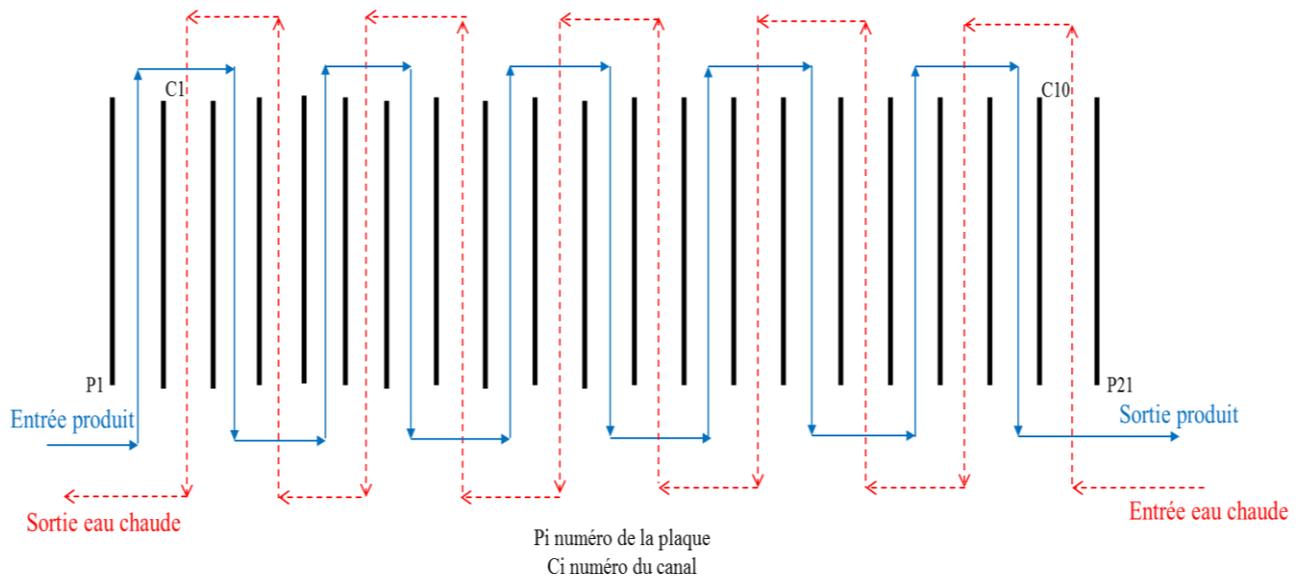


Figure 2.5. Représentation de la configuration de l'ECP à 10 canaux utilisée pour les essais d'encrassement.

Des conditions de procédé stables sont assurées en contrôlant les températures à l'entrée et la sortie de l'ECP, les débits, la chute de pression et le coefficient de transfert de chaleur. De plus, les mêmes conditions de procédé que celles présentées dans le tableau 3.4 ont été imposées dans l'ECP à 10 canaux, comme le montre la figure 2.7.

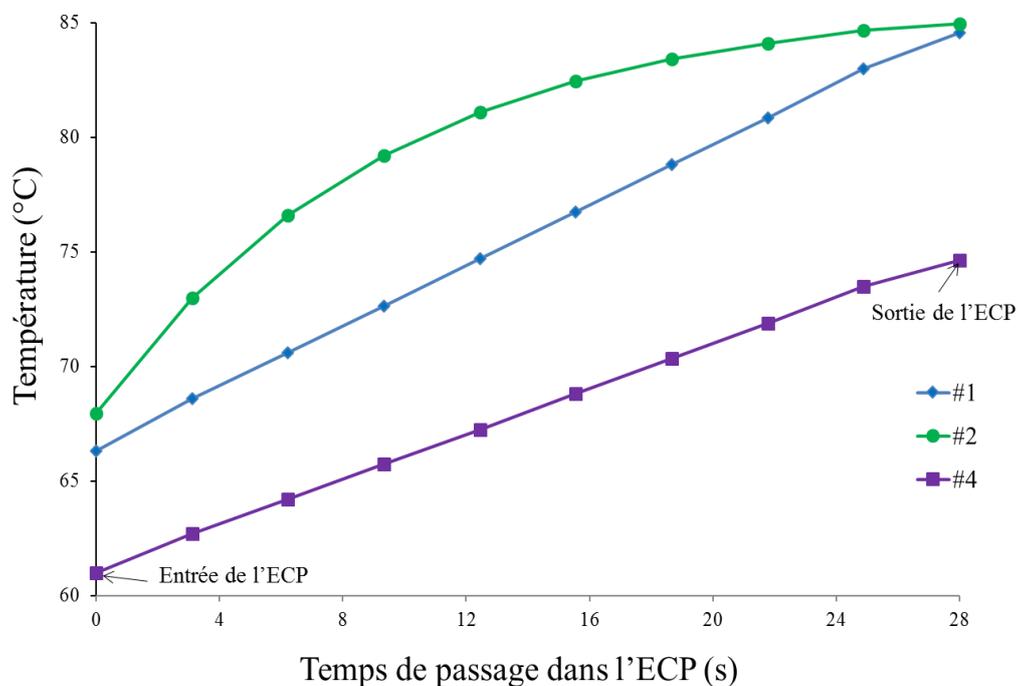


Figure 2.6. Les profils thermiques imposés dans l'ECP à 10 canaux.

Pour cette configuration d'ECP, le temps de séjour moyen dans la zone de chauffage pour un $Q_p = 300 \text{ L.h}^{-1}$ est de 28 s et le Re moyen pour les différents profils thermiques étudiés (#1, #2 et #4) varie entre 2614 et 3024. Le profil thermique #3 n'a pas été testé avec cette configuration d'ECP.

Des conditions de procédé répétables sont obtenues avec cet équipement. En effet, chaque expérimentation a été doublée et des écarts inférieurs à 2°C pour les températures d'entrée de l'ECP et de 10 L.h⁻¹ pour les débits ont été notés. Cette observation montre une très faible variabilité des résultats de dénaturation de la β -lg et de l'encrassement de l'ECP, résultats acceptables pour des essais à l'échelle pilote.

Pour les deux configurations d'ECP étudiées (à 5 et à 10 canaux), des échantillons ont été prélevés dans la cuve de lancement et à la sortie du préchauffeur et de l'ECP et ont été aussitôt refroidis dans un bain d'eau à 4°C afin de stopper la réaction de dénaturation chaude de la β -lg. Ces prélèvements permettent à la fois de : (i) comprendre l'effet du traitement thermique sur la dénaturation chaude de la β -lg et les mécanismes d'encrassement et (ii) vérifier que les solutions modèles de WPI ne sont pas significativement dénaturées et agrégées dans la zone de préchauffage.

2. Quantification des encrassements

2.1. Par pesée des masses de dépôt sec

Suite à l'encrassement des plaques de l'ECP après un traitement thermique de la solution modèle de WPI, celles-ci sont démontées permettant ainsi à une partie de l'eau du dépôt de s'écouler. La séparation des plaques d'un canal encrassé n'est pas évidente. En effet, les plaques sont collées entre elles par le dépôt encrassant et au moment de les séparer, des quantités de dépôt protéique peuvent rester collées sur l'une ou l'autre des plaques. Il serait alors hasardeux d'essayer d'interpréter des différences de masses de dépôt entre deux plaques d'un même canal. Nous avons de ce fait interprété les résultats en termes de masse de dépôt par canal et non par plaque.

Les plaques recouvertes de dépôt humide sont séchées dans une étuve à 50°C pendant 2 heures, ce qui permet de minimiser la teneur en eau des dépôts et peser ainsi avec précision la quantité de dépôt dans chaque canal de l'ECP. La masse de dépôt sec sur chaque plaque s'obtient en soustrayant à la masse de la plaque encrassée celle de la plaque propre. La masse de dépôt sec par canal est obtenue en calculant la moyenne des masses de dépôt sec mesurées

sur deux plaques constituant une passe. Cette méthode permet donc de tracer l'évolution de la quantité de dépôt en fonction de la position dans l'échangeur (par numéro de canal) et de relier ainsi la masse de dépôt formé (après un temps de fonctionnement fixé) au temps de séjour moyen dans l'ECP ou à la température moyenne dans chaque canal.

Une fois les plaques pesées, elles sont remontées dans l'ECP et un nettoyage, avec des solutions de soude à 2% (v/v) et d'acide nitrique à 2 % (v/v) chauffées à 80°C, est effectué jusqu'à atteindre les valeurs initiales de perte de charge et de coefficient de transfert thermique de l'installation (indiquant que les plaques sont propres). Cette dernière étape permet de s'assurer que les expérimentations se déroulent toujours dans les mêmes conditions initiales.

La figure 2.8 représente un exemple de la reproductibilité des résultats d'encrassement à partir de la mesure des masses de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP à 5 canaux, pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. La numérotation des canaux de 1 à 5 correspond à celle de la figure 2.3.

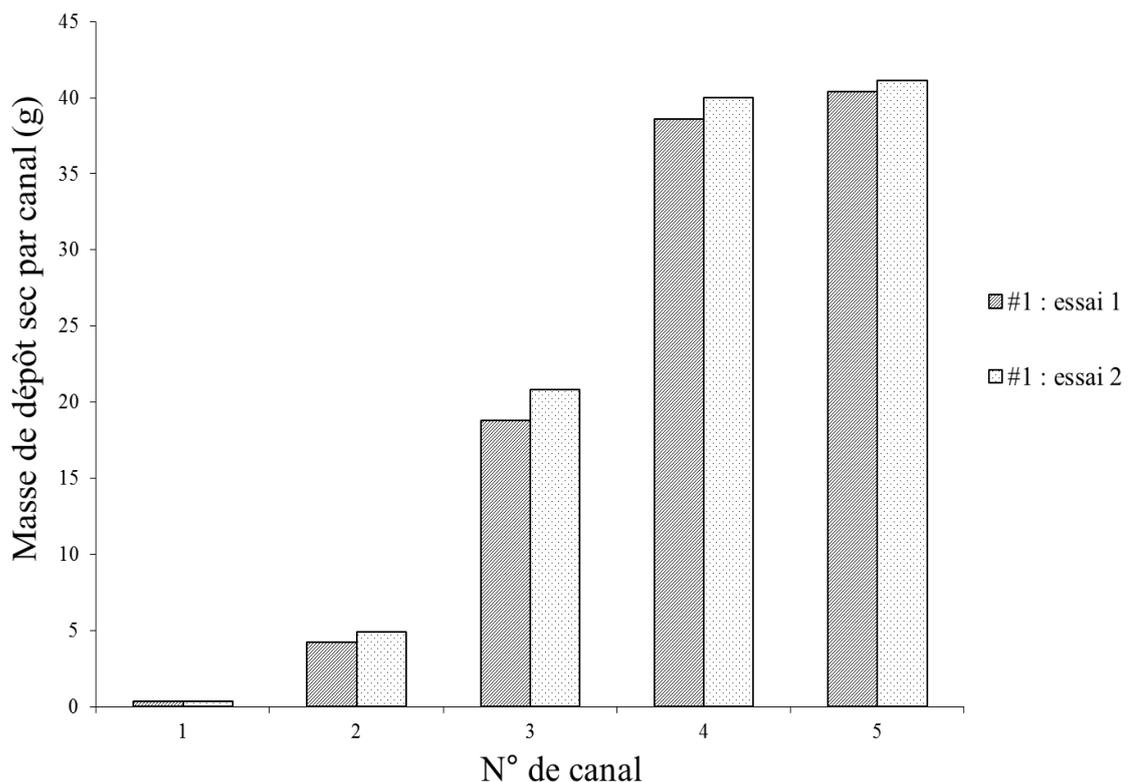


Figure 2.7. Essais de reproductibilité des masses de dépôt sec mesurées sur les plaques de l'ECP.

La figure 2.8 montre que la reproductibilité des essais d'encrassement (essai 1 et essai 2) réalisés dans des conditions identiques (profil thermique imposé #1) est satisfaisante. En effet, à titre d'exemple, la masse de dépôt sec mesurée dans le 5^{ème} canal de l'ECP est de 40,4 g pour l'essai 1 contre 41,1 g pour l'essai 2.

2.2. Par la mesure du coefficient de transfert de chaleur global et de la perte de charge

Au cours des essais d'encrassement, le coefficient de transfert de chaleur global (U_g) est mesuré au travers de l'augmentation de la température d'entrée de l'eau chaude, nécessaire au maintien de la température de sortie du produit. La figure 2.9 représente un exemple de l'évolution des températures d'entrée et de sortie des fluides chaud et froid au cours du temps pour un essai donné (solution modèle de WPI à 1% p/p contenant 100 ppm de calcium total, profil thermique imposé #1).

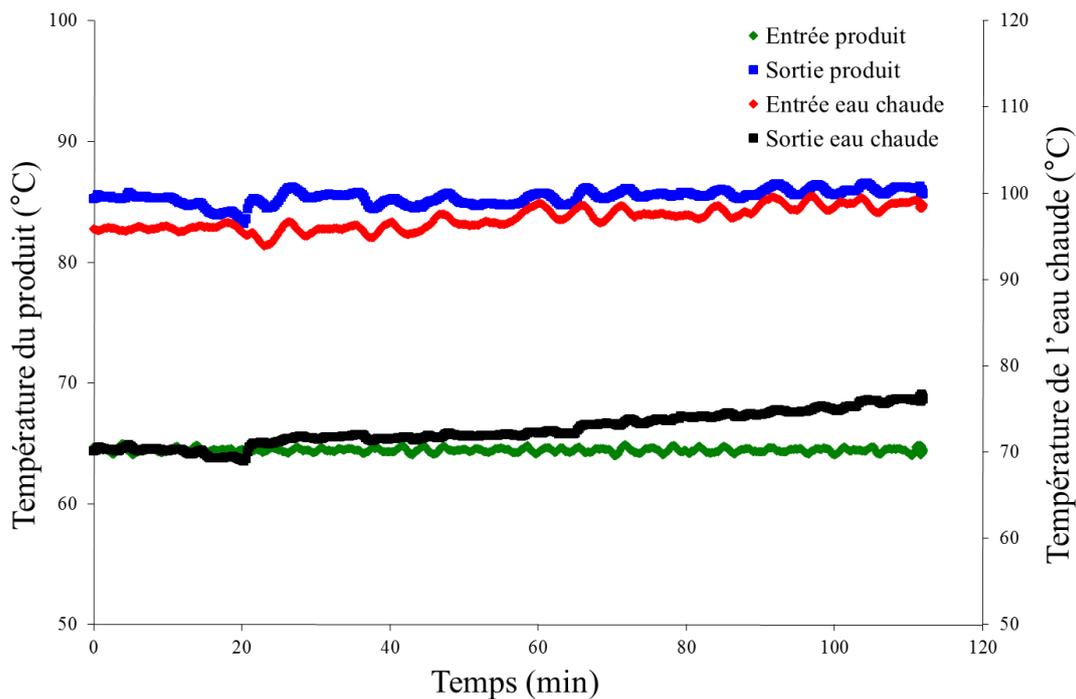


Figure 2.8. Exemple de l'évolution des températures d'entrée et de sortie du produit et de l'eau chaude durant un traitement thermique de 2 heures (profil thermique #1).

Le suivi du coefficient U_g permet de représenter l'état d'encrassement de l'ECP durant le traitement thermique d'une solution modèle de WPI (figure 2.10) et de connaître l'évolution de la résistance thermique de transfert de chaleur en fonction du temps ($1/U_g$). Le tableau 2.5 reporte les coefficients de transfert de chaleur globaux au démarrage des essais d'encrassement. La perte de charge est également enregistrée au cours des essais expérimentaux afin de suivre la progression de l'encrassement des plaques de l'ECP (figure 2.11). Elle est de l'ordre de 0,2 bars.

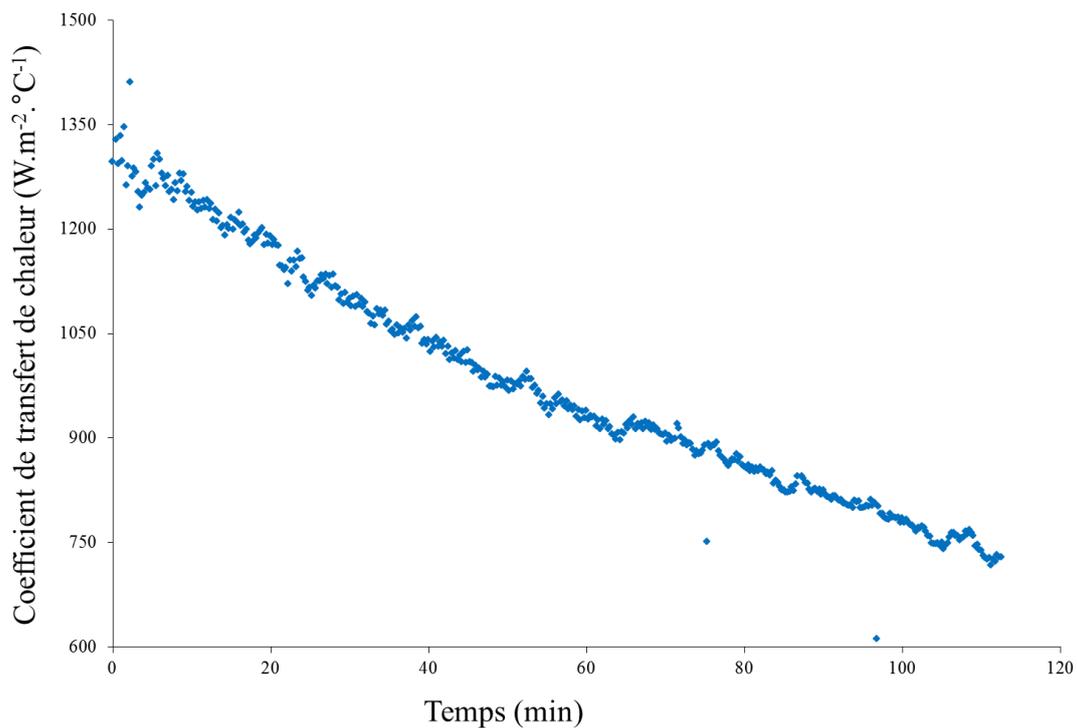


Figure 2.9. Exemple de l'évolution du coefficient de transfert de chaleur global durant le traitement thermique dans l'ECP (profil thermique #1) d'une solution modèle de WPI.

Tableau 2.5. Coefficients de transfert de chaleur globaux calculés au démarrage des essais d'encrassement d'une solution modèle de WPI (1% p/p contenant 100 ppm de calcium total) pour différents profils thermiques imposés dans l'ECP.

N° du profil thermique	U_g (W.m ⁻² .°C ⁻¹)
#1	1337
#2	1540
#3	1020
#4	1255

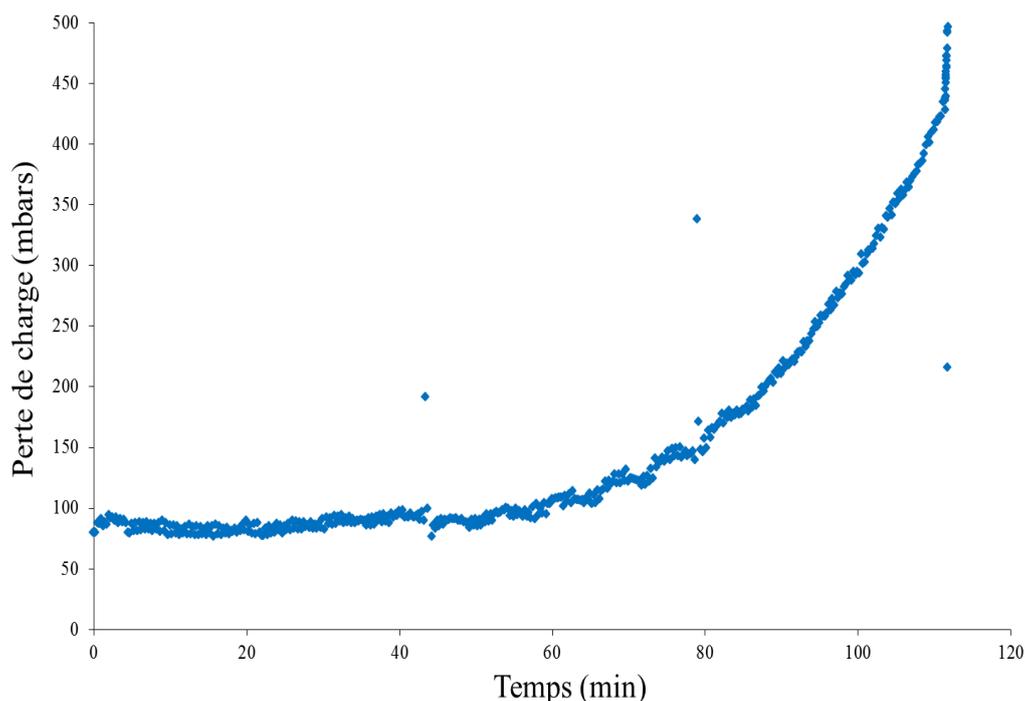


Figure 2.10. Exemple de l'évolution de la perte de charge durant le traitement thermique dans l'ECP (profil thermique #1) d'une solution modèle de WPI.

3. Caractérisation de la composition et de la structure des premières couches de dépôt en surface

Des analyses Electron Probe MicroAnalysis (EPMA) et par Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS) ont été réalisées pour étudier la composition et la structure des premières couches du dépôt encrassant. Les techniques de caractérisation en surface ont été effectuées à partir d'échantillons de morceaux découpés de plaques d'ECP après un essai d'encrassement. Malgré la destruction de la plaque encrassée, cette méthode destructive a été choisie pour étudier les couches réelles de dépôt. En effet, il est rare dans la littérature que la caractérisation de la couche de dépôt ait été effectuée sur un dépôt formé directement sur les plaques de l'ECP et en zone de chauffage.

Dans ce travail de thèse, le dépôt formé a été analysé dans des conditions réelles, directement sur la surface corruguée d'une plaque d'ECP situé dans la zone de chauffage de l'installation (configuration de l'ECP à 5 canaux).

Nous avons décidé d'analyser la solution modèle de WPI la plus concentrée (2,5% p/p) et la moins concentrée (0,25% p/p). Le choix de ces deux solutions n'est pas arbitraire et sera expliqué dans la partie " Résultats et discussions ". Pour les deux solutions de β -Ig étudiées, le

même traitement thermique a été imposé dans l'ECP, à savoir le profil de température #1 (T_{ep} 65°C, T_{sp} 85°C, Q_p 300 L.h⁻¹ et Q_{ec} 300 L.h⁻¹).

3.1. Par microanalyse par sonde électronique (EPMA)

Les morceaux de plaque ont été enrobés dans de la résine époxy, polis avec une polisseuse manuelle à plateau rotatif (ESC 200 GT) en utilisant différents disques (d'une suspension diamantée de taille de particules allant jusqu'à ¼ µm) et recouverts d'un film de carbone en utilisant le dispositif de pulvérisation Bal-Tec SCD005. Ce mode opératoire permet la stabilisation de l'échantillon et l'accès à une surface très plate indispensable pour ces analyses. En effet, le dépôt protéique sec adhère mal à la surface de la plaque. Il est donc susceptible de se détacher lors de l'émission du faisceau d'électrons. L'utilisation de la résine époxy permet par conséquent d'immobiliser l'échantillon dans une position stable. En outre, l'application d'une couche de carbone de quelques nanomètres est nécessaire afin de rendre la surface de l'échantillon conductrice.

L'EPMA est une technique d'analyse in situ non destructive permettant de détecter tous les éléments à partir du Béryllium dans un volume de l'ordre du micromètre cube avec une sensibilité d'environ 100 ppm. La microsonde électronique analyse l'émission X produite par l'interaction entre des électrons incidents et les éléments constituant l'échantillon à analyser. L'émission X issue de l'échantillon a été analysée dans le cas de l'EPMA Cameca SX-100 par des spectromètres à dispersion de longueur d'onde, à 15 kV 15 nA pour les images en électrons rétrodiffusés et à 15 kV 40 nA pour les cartographies X. Pour ces cartographies, un cristal PET a été utilisé pour détecter les rayonnements K α du soufre (élément caractéristique de la molécule de β -lg), du calcium et du chlore (élément caractéristique du CaCl₂ utilisé) et un cristal LiF pour détecter le rayonnement K α du fer (élément caractéristique de la plaque de l'ECP). Les cartographies sont codées par couleur du noir au rouge : le noir indiquant l'absence de l'élément et le rouge étant la plus forte concentration détectée.

3.2. Par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie XPS est une technique d'analyse de l'extrême surface de l'échantillon, de profondeur d'analyse inférieure à 10 nm. Le principe de cette technique consiste à mesurer le nombre d'électrons émis dans un intervalle d'énergie en fonction de l'énergie de liaison des électrons. Chaque élément chimique étant caractérisé par un spectre unique, cette méthode spectroscopique permet d'analyser précisément la nature chimique des échantillons. Des

analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur la hauteur et la surface des pics. L'identification de l'état chimique d'un élément peut donc être obtenue à partir de la mesure exacte de la position des pics et de leurs séparations en énergie.

Les analyses ont été effectuées sur un Axis Ultra DLD (Kratos Analytical), utilisant une source de rayons X monochromatique Al K α (1486,6 eV) dans les conditions suivantes : une tension d'émission de 15 kV, un courant de 10 mA, une pression de 10⁻⁷ Pa à l'intérieur de la chambre et une surface de la zone analysée de 300 × 700 μm^2 sur une profondeur de 10 nm. Un spectre général est acquis sur une gamme d'énergies de liaison comprises entre 0 et 1300 eV. Une énergie de passage de 160 eV avec un pas de 1 eV est utilisée pour l'enregistrement des spectres haute résolution des pics du carbone (C1s). Le traitement des données expérimentales se fait à l'aide du logiciel Casa XPS (Casa Software, Ltd). Pour cela, une remise à l'échelle est d'abord réalisée en plaçant le pic C-C du C1s à 285 eV. Les pics Ca2p ont été décomposés selon la forme des pics entre les limites gaussienne et lorentzienne.

Chapitre 3 : Identification des cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord la méthode et les techniques utilisées pour évaluer les cinétiques de dénaturation des solutions protéiques modèles encrassantes et déterminer les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg.

1. Essais de dénaturation chaude de la β -lg en conditions statiques

L'identification des cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg des solutions protéiques modèles encrassantes a été majoritairement effectuée par le biais de tests à l'échelle laboratoire en conditions statiques.

Pour ce faire, nous avons placé des échantillons de solutions modèles de WPI à caractériser dans des tubes à essai en inox et leur avons fait subir une montée en température jusqu'à atteindre une température de plateau final allant de 68°C à 93°C. Cette température de plateau final est appelée température de dénaturation de la β -lg et présentée à la figure 3.12.

Pour obtenir la montée en température (de 20°C à la température de dénaturation souhaitée), les tubes à essai ont été introduits dans 3 bains-marie successifs de températures connues et contrôlées.

Pour chaque température de dénaturation de la β -lg, 12 tubes en inox contenant chacun 2 mL de la solution protéique modèle ont été utilisés. Ces tubes à essais ont été retirés au fur et à mesure du troisième bain-marie, après avoir passé un temps connu à la température de dénaturation.

Une fois extraits du troisième bain-marie, ces tubes à essais ont été immédiatement refroidis à 4°C pour figer la cinétique de dénaturation et permettre un dosage non biaisé par HPLC des β -lg solubles.

Plus précisément, le protocole opératoire multi étapes suivant a été adopté :

- les échantillons sont placés dans un premier bain-marie à 60°C (pour les essais de dénaturation dont les températures désirées sont inférieures à 80°C) ou à 65°C (pour les essais de dénaturation dont les températures désirées sont supérieures à 80°C). Ce premier bain-marie sert à préchauffer les échantillons sans dénaturer les protéines en solution. En effet, la température de dénaturation de la β -lg est d'environ 74–77°C (Nielsen et al., 1995 ; Linmark-Mansson et al., 2005 ; Guérin et al., 2007) ;

- lorsque la température du premier bain-marie est atteinte, les échantillons sont placés dans un second bain-marie à des températures allant de 90°C (pour les essais de dénaturation dont les températures désirées sont inférieures à 80°C) à 100°C (pour les essais de dénaturation dont les températures désirées sont supérieures à 80°C). Ce deuxième bain-marie sert à chauffer l'échantillon très rapidement à la température désirée de l'essai afin de limiter la dénaturation de la β -lg ;
- dès lors que la température de dénaturation de la β -lg (ou encore appelée température de plateau) est atteinte, le premier échantillon est prélevé à $t = 0$ min, lorsque la température de l'échantillon est à la température désirée, et aussitôt plongé dans un bain à 4°C (eau glacée) pour stopper la réaction. Les 11 autres échantillons sont maintenus pendant un temps suffisant dans un troisième bain-marie (fixé à 1°C au-dessus de la température désirée de l'essai), prélevés à différents instants (correspondant à un intervalle de temps fixe) et refroidis aussitôt à 4°C.

Le profil de température des échantillons a été mesuré en plaçant une sonde de température (reliée à un système d'acquisition de température) dans un tube témoin en inox rempli d'eau. Un exemple d'un profil de température de dénaturation chaude de la β -lg pour une solution de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total est présenté dans la figure 2.12.

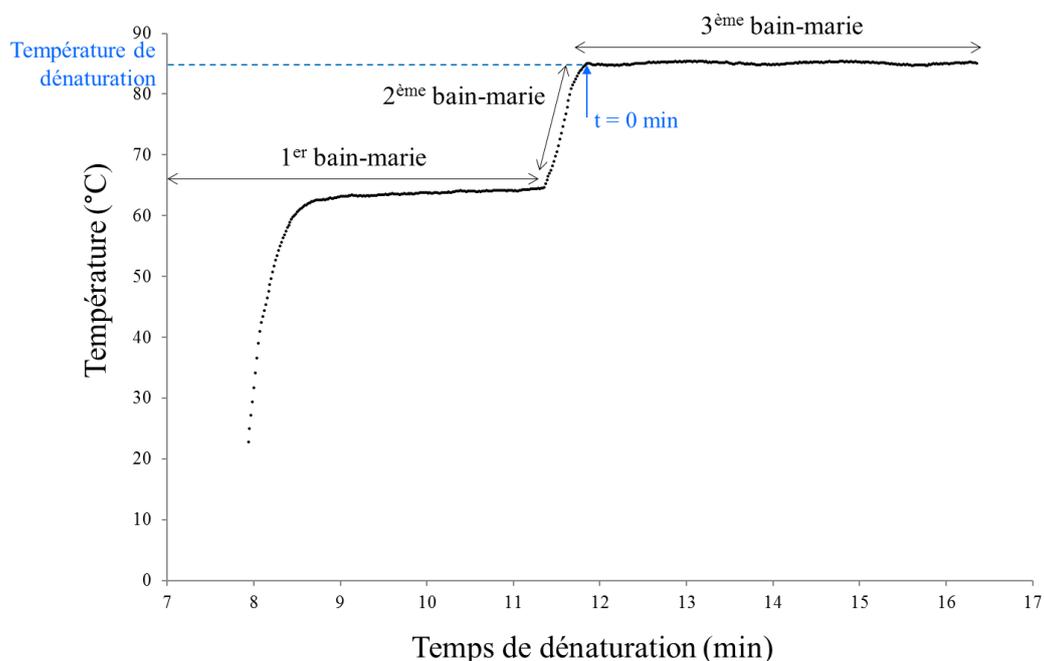


Figure 2.11. Exemple d'un profil de température de dénaturation chaude de la β -lg pour une solution de WPI à une teneur en calcium fixe.

2. Essais de dénaturation chaude de la β -lg en conditions dynamiques

Des essais de dénaturation chaude de la β -lg ont également été effectués à l'échelle pilote en conditions dynamiques afin de comparer les paramètres cinétiques obtenus dans ces conditions avec ceux en conditions statiques.

L'appareil utilisé pour le traitement thermique de la solution modèle de WPI (1% p/p contenant 100 ppm de calcium total) est composé de deux ECP et d'un chambreur tubulaire (utilisé pour la prise des échantillons). Le premier ECP est utilisé pour le préchauffage de la solution protéique modèle et le deuxième pour le chauffage de celle-ci jusqu'à la température de dénaturation de la β -lg. Le chambreur tubulaire permet la prise d'échantillons pour analyse en HPLC. Les mêmes montées en températures ont été imposées à l'échelle pilote et laboratoire (il faut par exemple 14 s pour monter de 65 à 85°C). De plus, les mêmes temps de prise des échantillons ont été fixés. Par exemple, les temps de prélèvement d'un essai à 85°C sont de : 0 min, 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 1 min 30 s, 2 min, 2 min 30 s, 3 min, 5 min, 7 min et 10 min).

Le dispositif expérimental utilisé est représenté dans la figure 2.13. Il est constitué de :

- deux cuves à double-enveloppe d'environ 6 L chacune, contenant la solution protéique modèle à traiter, raccordées sur une pompe à lobes (GM137) ;
- deux ECP de type V2 (Alfa Laval Vicarb, Fontanil-Cornillon, France) utilisés pour le préchauffage et le chauffage et montés en série dans le même bâti. Chacun de ces ECP sont constitués de 11 plaques, soit 5 passes avec un canal par passe avec une configuration à contre-courant (figure 2.14) ;
- un chambreur tubulaire double enveloppe (40 m de longueur et 12 mm de diamètre intérieur) équipé de 12 prises d'échantillons ;
- un premier circuit d'eau chaude constitué d'un échangeur Actijoule de 30 kW utilisé pour le chauffage de la solution protéique modèle étudiée ;
- un deuxième circuit d'eau chaude constitué également d'un échangeur Actijoule de 15kW utilisé pour le préchauffage de la solution protéique modèle étudiée ;
- un troisième circuit d'eau chaude constitué d'une petite boucle d'eau chaude à injection directe de vapeur permettant de maintenir la température du fluide modèle dans le chambreur.

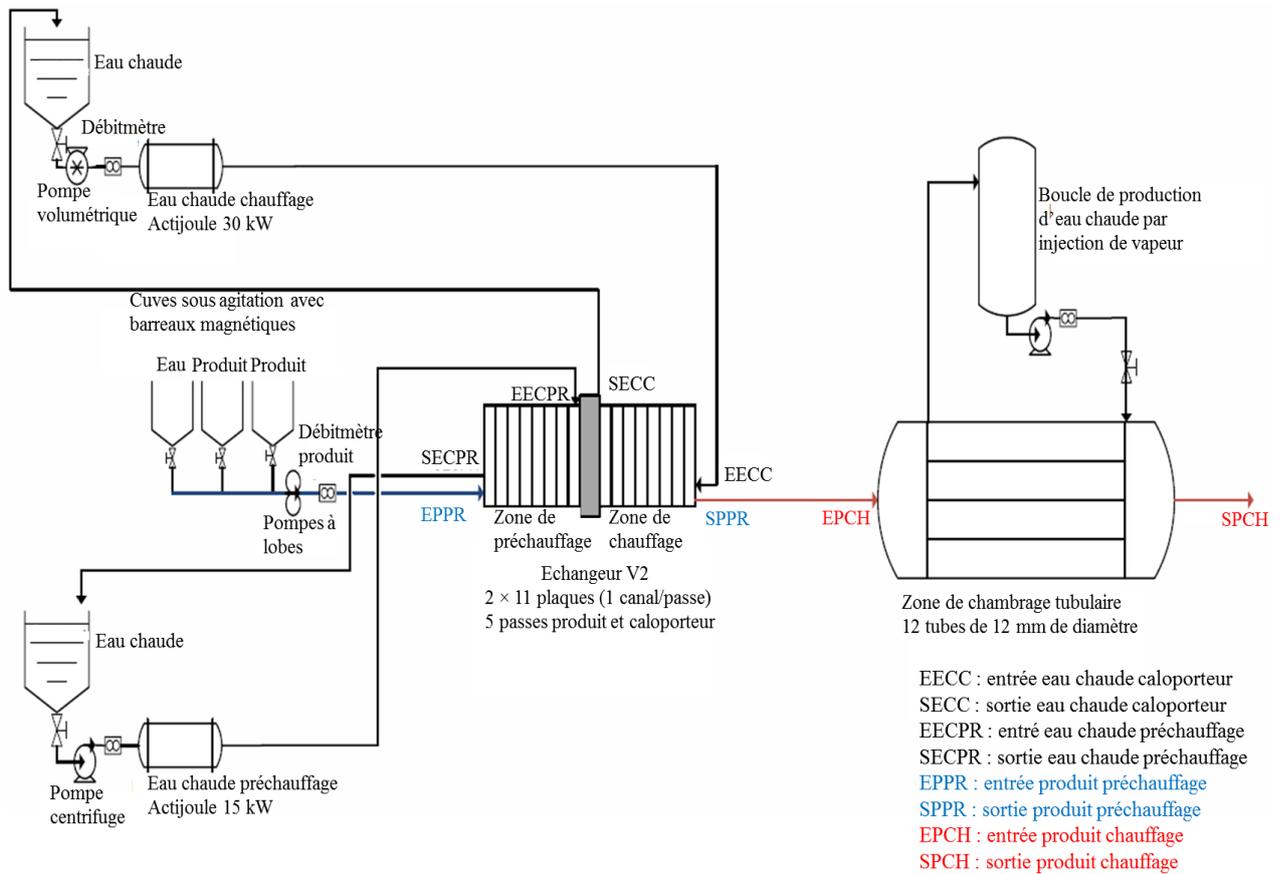


Figure 2.12. Dispositif expérimental utilisé à l'échelle pilote pour les essais de dénaturation chaude de la β -lg (solution modèle de WPI à 1% p/p contenant 100 ppm de calcium total).

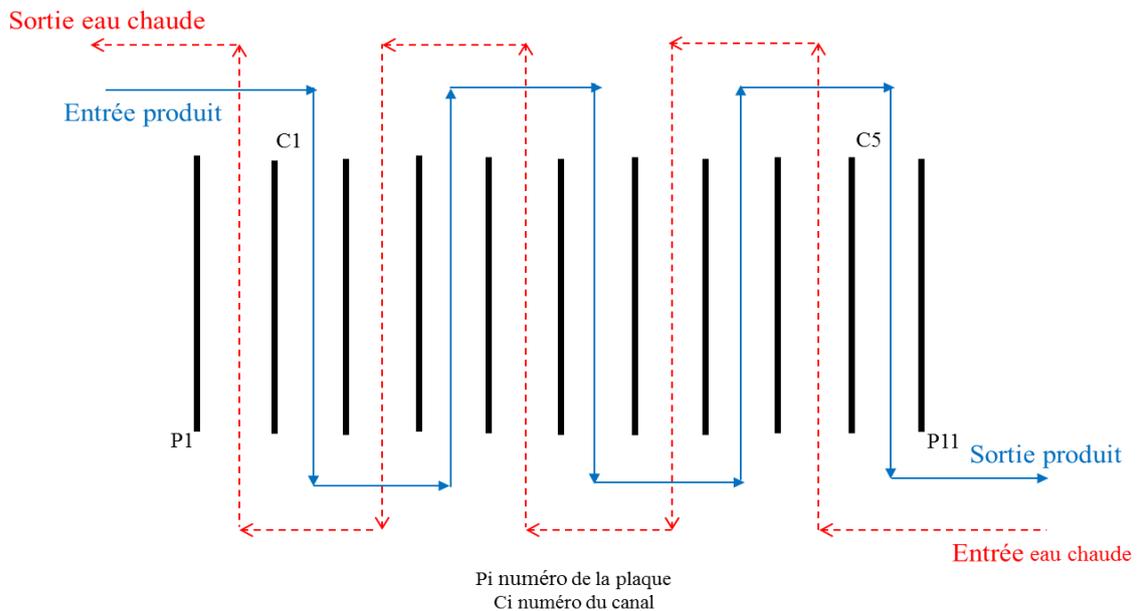


Figure 2.13. Représentation de la configuration de l'ECP utilisée pour les essais de dénaturation chaude en conditions dynamiques.

3. Détermination de la concentration en β -lg soluble

Les concentrations en β -lg solubles (β -lg native + β -lg dépliée) des différents échantillons, dénaturés à une température donnée, sont obtenues par analyse HPLC (chromatographie liquide à haute performance) après dilution, ajustement du pH à 4,6 avec de l'acide acétique et centrifugation afin de précipiter les agrégats à 9000 tr.min⁻¹ pendant 30 min à 4°C.

Le système chromatographique complet de Waters (Milford, Massachusetts, USA) a été utilisé pour ces analyses. Ce système comporte une pompe quadratique (modèle 616), un injecteur automatique (modèle 717 Plus), un spectrophotomètre UV-visible utilisé comme détecteur (modèle 486), un four à colonne (chromatographie de Jones, modèle 7971), une colonne séparatrice à phase inverse (CLHP ACE 300 Å C4 : 250 × 4,6 mm) et un logiciel d'acquisition (Millenium 3.2).

Les analyses ont été effectuées dans les conditions suivantes : un débit de 1 mL.min⁻¹, un volume d'injection de 20 μ L, une température de la colonne de 40°C, une longueur d'onde de détection de 214 nm et un gradient d'éluion de 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique (99 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) dans de l'eau milli-Q (Millipore, Bedford, MA) vers 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique dans un mélange de 80% (v/v) d'acétonitrile (HPLC gradient grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) et 20% (v/v) d'eau milli-Q. Un rinçage quotidien de la colonne a été effectué avant chaque lancement des échantillons avec 100% (v/v) d'acétonitrile pendant 60 min à 0,5 mL.min⁻¹. Une gamme étalon a été préparée à différentes concentrations de 0,5, 1, 2, 3 et 4 g.L⁻¹ à partir d'une solution de β -lg quasi-pure (β -lg : 88,85% p/p, Biopure, Ingredia, Arras, France) dissoute dans de l'eau milli-Q.

Chaque échantillon, dénaturé à une température donnée, a été analysé trois fois et sa concentration a été calculée à partir de la moyenne des trois surfaces des pics chromatographiques mesurées. La concentration de chaque échantillon permet ainsi de connaître la concentration en β -lg soluble en fonction du temps à la température de dénaturation (figure 2.15).

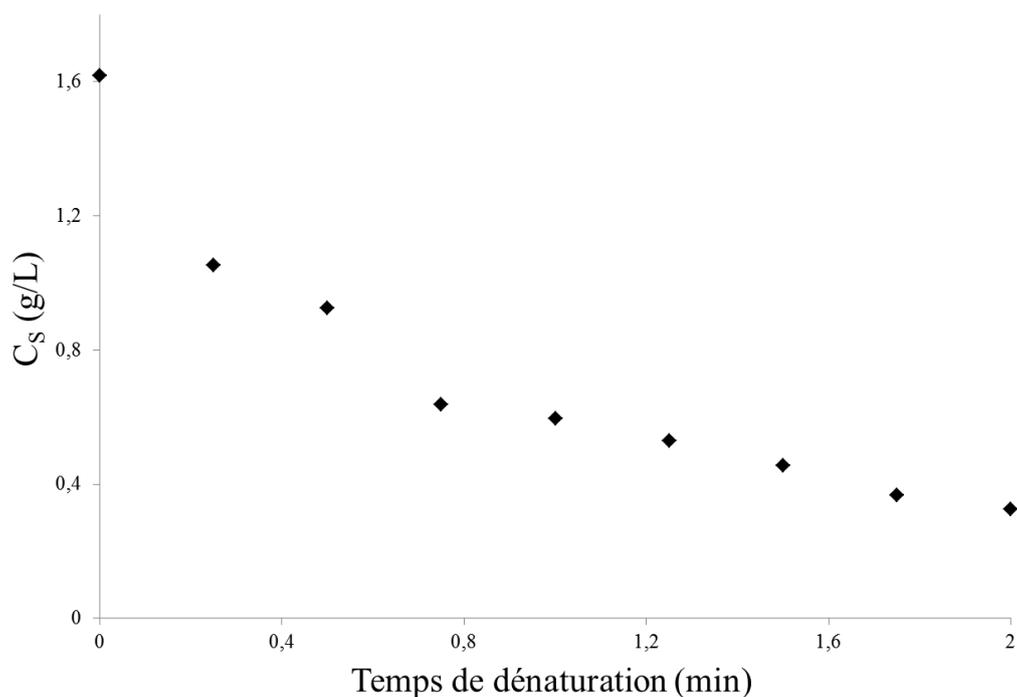


Figure 2.14. Exemple d'une cinétique de dénaturation de la β -lg soluble à 85°C pour une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.

4. Détermination des paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg

Ce paragraphe présente les méthodes utilisées pour déterminer : (i) dans un premier temps l'ordre de réaction et la constante cinétique de dénaturation à chaque température de dénaturation, à partir de la connaissance de la concentration en β -lg soluble et son évolution dans le temps, (ii) puis, les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg (énergies d'activation et facteurs de fréquence et constantes cinétiques des réactions de dépliement et d'agrégation) pour chaque solution protéique modèle, dans la plage de températures étudiée (68-93°C).

Deux méthodes différentes, basées respectivement sur le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) et celui avec deux réactions successives, conduisant à différents paramètres cinétiques de dénaturation chaudes de la β -lg sont décrites.

4.1. Modèle de Tolkach et Kulozik (2007)

La réaction de dénaturation chaude de la β -lg concerne la transformation de l'espèce soluble (notée S) en agrégats (notés A). La dénaturation de la β -lg est décrite par l'équation chimique :



et définie par l'équation cinétique :

$$-\frac{dC_S}{dt} = k_n C_S^n \quad (2.3)$$

où C_S désigne la concentration en β -lg soluble, k_n la constante de la réaction de dénaturation à identifier et n l'ordre de réaction généralement compris entre 1 et 2 (Mulvihill et Donovan, 1987 ; Dannenberg et Kessler, 1988 ; Relkin, 1996 ; Petit et al., 2011).

L'intégration de l'équation 2.3 conduit à l'expression suivante :

$$k_n t = \frac{1}{n-1} (C_S^{1-n} - C_S^0{}^{1-n}) = Y_n \quad (2.4)$$

avec C_S^0 désignant la concentration en β -lg soluble du premier échantillon (c'est-à-dire le premier prélèvement à $t = 0$ min à la température de dénaturation).

Identification de l'ordre de réaction, (n).

Dans ce travail de thèse, nous avons fait varier l'ordre de réaction, n entre 1 et 2 (avec un pas de 0,1) pour déterminer le meilleur ajustement des données expérimentales. Les expressions de Y_n correspondantes aux ordres de réaction 1,5 et 2 apparaissent dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6. Expression de Y_n pour $n = 1,5$ et $n = 2$.

N	1,5	2
Y_n	$2 \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{C_S}} - \frac{1}{\sqrt{C_S^0}} \right)$	$\frac{1}{C_S} - \frac{1}{C_S^0}$

Un exemple typique d'une régression linéaire des points expérimentaux en fonction du temps de prélèvement obtenue pour les ordres de réaction $n = 1,5$ et $n = 2$ suite à un essai de dénaturation chaude de la β -lg d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total est présenté sur la figure 2.16. Cette figure montre que quel que soit l'ordre de réaction (1,5 ou 2), le tracé de Y_n en fonction du temps conduit à une droite de pente k_n .

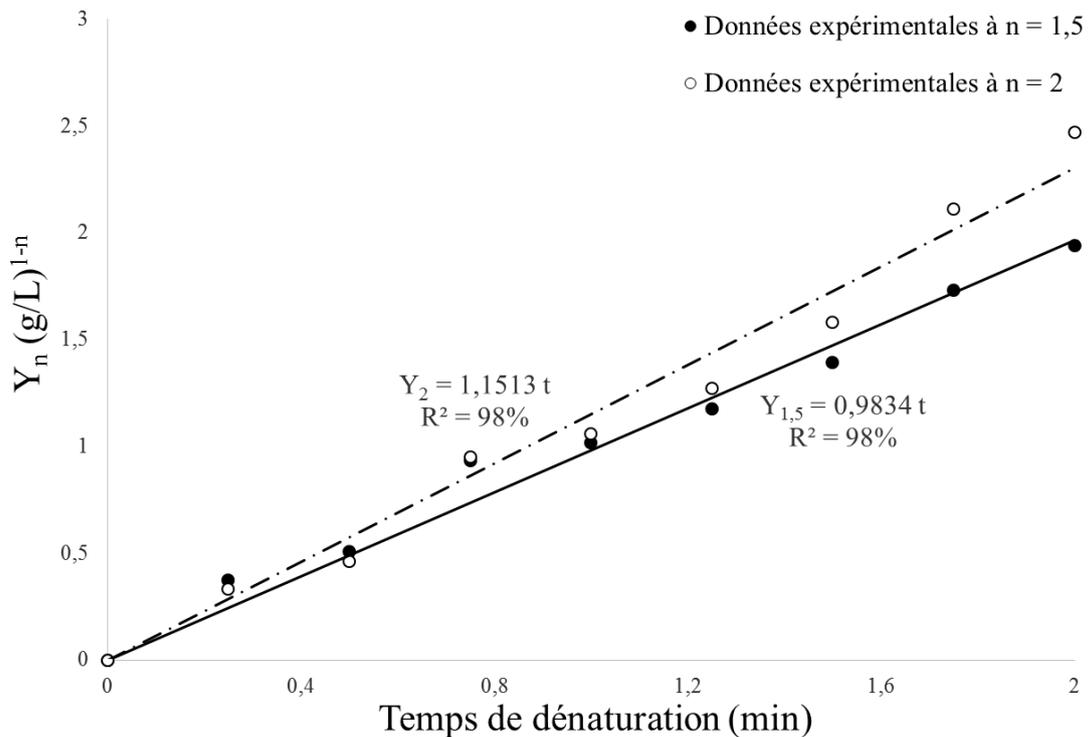


Figure 2.15. Exemple d'une régression linéaire pour $n = 1,5$ et $n = 2$ permettant de déterminer la constante cinétique de dénaturation à 85°C d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.

Ceci illustre que les deux ordres de réaction 1,5 et 2 conviennent pour ajuster les données expérimentales. Nous avons néanmoins choisi de fixer n à 1,5, pour l'ensemble des essais de dénaturation chaude de la β -lg des différentes solutions modèles de WPI et la plage de températures étudiée allant de 68 à 93°C , puisque l'ordre de réaction généralement admis dans la littérature est de 1,5 (Anema, 2000 ; Tolkach et Kulozik, 2005 ; Anema et al., 2006 ; Tolkach et Kulozik, 2007 ; Zúñiga et al., 2010 ; Petit et al., 2011 ; Wolz et Kulozik, 2015 ; Akkerman et al., 2016 ; Loveday, 2016 ; Kerche et al., 2016).

Identification de la constante cinétique de dénaturation, (k_n).

Il a été établi à maintes reprises que les constantes cinétiques de dénaturation sont dépendantes de la température (Tolkach et Kulozik, 2007 ; Petit et. al, 2011). Cette thermo-dépendance est traditionnellement décrite par une loi d'Arrhenius du type :

$$\ln(k_n) = \ln(k_n^\circ) - \frac{E_{A_n}}{R T} \quad (2.5)$$

avec k_n° le facteur de fréquence, E_{A_n} l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits et T la température.

La figure 2.17 représente un exemple de l'évolution de la constante k_n avec la température pour une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. Cette figure confirme les prévisions attendues, à savoir la dépendance de la température de la constante k_n .

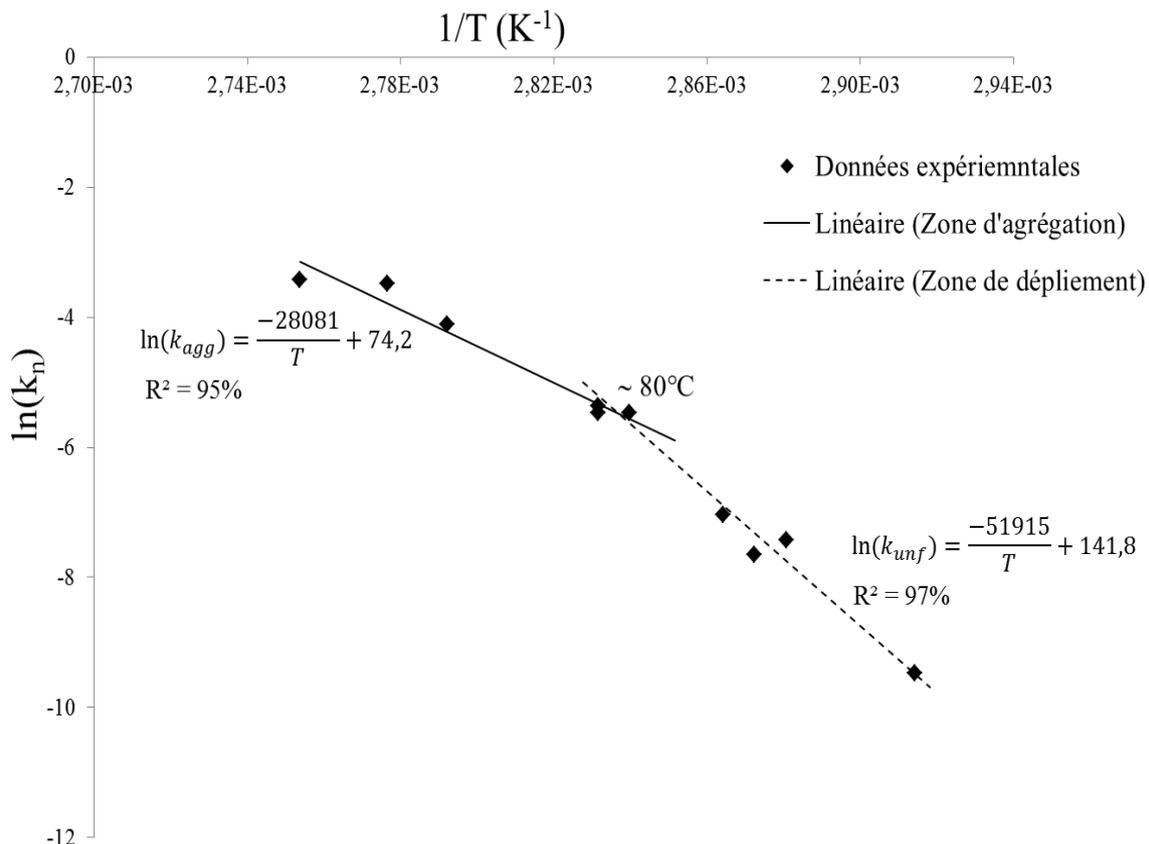


Figure 2.16. Evolution des constantes cinétiques k_n avec la température selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) : Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg où des ajustements par plage de températures ont été réalisés sur les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation (k_{unf} et k_{agg}).

L'observation de la figure 2.17 montre clairement qu'il n'est pas possible de décrire la thermo-dépendance de k_n par une loi d'Arrhenius unique pour la plage de températures allant de 70 à 90°C. Ce résultat laisse présager qu'il existe deux mécanismes superposés qui deviennent tout à tour prépondérant selon la plage de températures considérée (de 70 à 80°C et de 80°C à 90°C) et qu'un ajustement différent par plage de températures doit être réalisé.

La figure 3.17 montre également que la rupture de pente est observée à $T = 80$ °C. Cette rupture de pente a déjà été observée par d'autres auteurs (Tolkach et Kulozik, 2007 ; Petit et al., 2011 ; Wolz et Kulozik, 2015) et expliquée par un changement d'étape limitante : la réaction de dépliement de la β -lg est limitante en-dessous de 80°C et au-delà, c'est la réaction d'agrégation qui devient limitante. En effet, lorsque la température est inférieure à la température critique (80°C), la protéine est partiellement dépliée entraînant une diminution de la vitesse de réaction mesurée tandis que pour des températures supérieures, la protéine est totalement dépliée.

Les deux régressions linéaires obtenues à partir des valeurs expérimentales dans les deux plages de températures permettent donc de déterminer les paramètres cinétiques (facteurs de fréquence et énergies d'activation) relatifs aux phénomènes de dépliement et d'agrégation :

Si $T < 80^\circ\text{C}$, $k_n = k_{unf}$:

$$\ln(k_{unf}) = \ln(k_{unf}^\circ) - \frac{E_{A,unf}}{RT} \quad (2.6)$$

avec k_{unf} la constante cinétique de dépliement, k_{unf}° le facteur de fréquence de dépliement et $E_{A,unf}$ l'énergie d'activation de dépliement.

Si $T > 80^\circ\text{C}$, $k_n = k_{agg}$:

$$\ln(k_{agg}) = \ln(k_{agg}^\circ) - \frac{E_{A,agg}}{RT} \quad (2.7)$$

avec k_{agg} la constante cinétique d'agrégation, k_{agg}° le facteur de fréquence d'agrégation et $E_{A,agg}$ l'énergie d'activation d'agrégation.

Ainsi, les constantes cinétiques (k_{unf} et k_{agg}) spécifiques aux deux mécanismes de dénaturation de la β -lg (dépliement et agrégation) peuvent être déterminées.

Tolkach et Kulozik (2007) ont introduit une grandeur α nommée degré de dépliement. α régit l'équilibre réversible instantané entre l'espèce N et l'espèce U , à une température donnée. α est défini comme le ratio de la concentration de l'espèce U sur la concentration de l'espèce S :

$$\alpha = \frac{C_U}{C_N + C_U} = \frac{C_U}{C_S} \quad (2.8)$$

Tolkach et Kulozik (2007) ont relié α aux constantes cinétiques de dénaturation à partir de l'exploitation de la rupture de pente observée sur le graphe d'Arrhenius (figure 3.18).

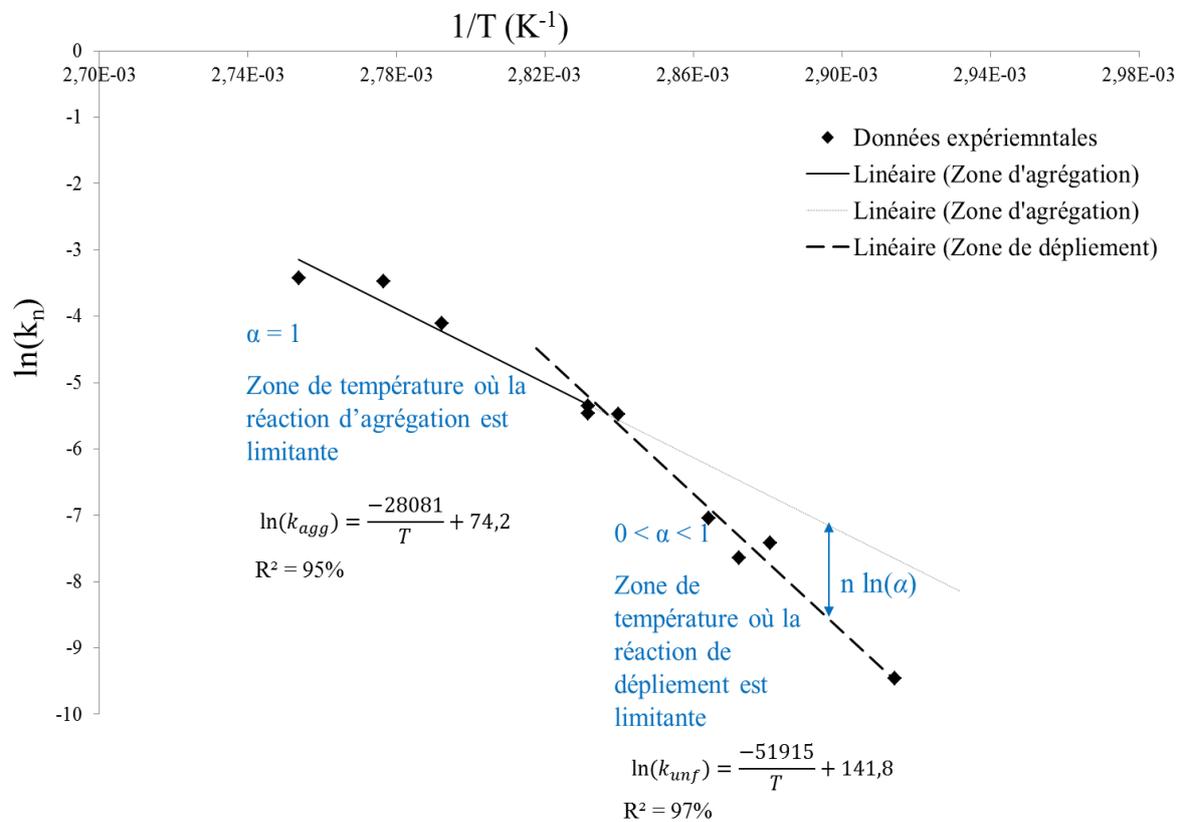


Figure 2.17. Degré de dépliement selon Tolkach et Kulozik (2007) défini à partir du graphe d'Arrhenius d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.

L'expression liant α aux constantes cinétiques de dénaturation k_{unf} et k_{agg} proposée par Tolkach et Kulozik (2007) est la suivante :

$$\alpha = \exp\left(\frac{\ln(k_n) - \ln(k_{agg})}{n}\right) \quad (2.9)$$

avec $k_n = k_{unf}$ si $T < 80^\circ C$ ou $k_n = k_{agg}$ si $T > 80^\circ C$.

Au final, on constate que la connaissance à chaque instant de C_S et de α (à une température donnée) permet donc de calculer les concentrations des espèces dépliée, native et agrégée (respectivement C_U , C_N et C_A) :

$$C_U = \alpha \cdot C_S \quad (2.10)$$

$$C_N = (1 - \alpha) \cdot C_S \quad (2.11)$$

$$C_A = C_S^0 - C_S \quad (2.12)$$

Pour une cinétique de dénaturation établie en condition statique (à température de dénaturation constante), l'évolution de C_S au cours du temps est mesurée. Il est donc très aisé de simuler l'apparition de l'espèce A (équation 2.12) et la disparition des espèces N (équation 2.11) et U (équation 2.12) et par conséquent de l'espèce S. Nous donnons à titre d'exemple un de ces graphes à la figure 2.19 (pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium traitée thermiquement à 75°C).

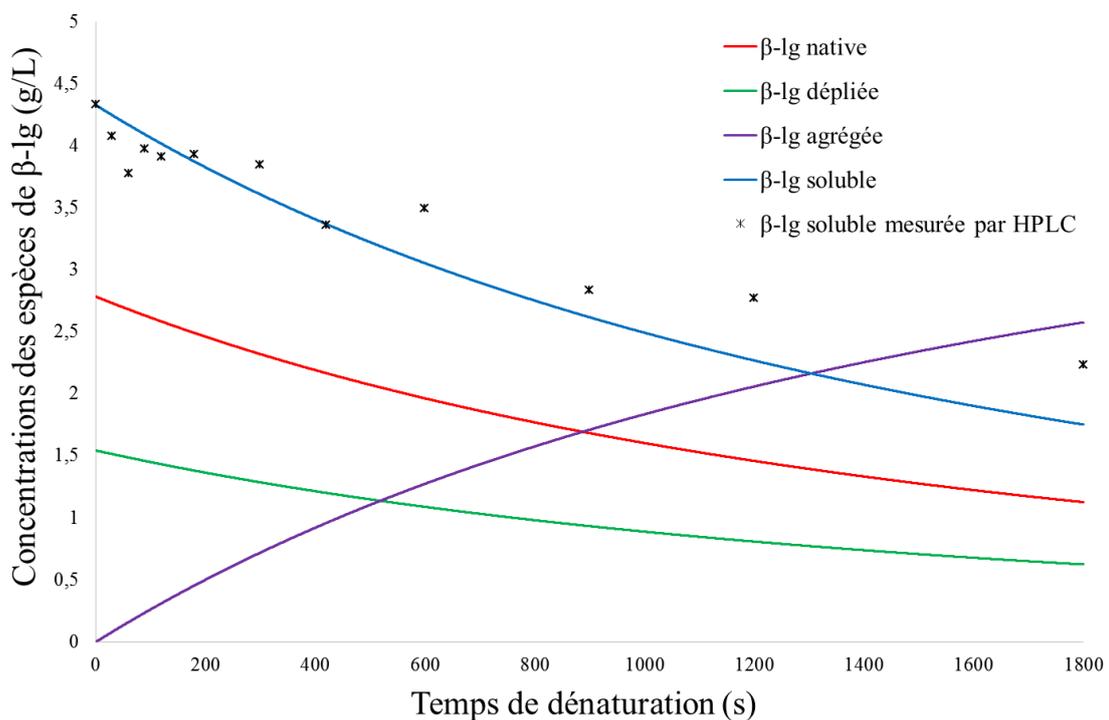


Figure 2.18. Evolution au cours du temps des concentrations des différentes espèces de β -Ig selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007).

Les valeurs simulées correspondent à celles obtenues lors d'une dénaturation à 75°C d'une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. Les valeurs de l'espèce soluble mesurée au cours de cette expérience de dénaturation ont également été reportées.

4.2. Modèle avec deux réactions successives

La méthodologie proposée par Tolkach et Kulozik (2007) est couramment admise et pratiquée dans le secteur laitier pour identifier des constantes de dépliement et de d'agrégation. Ce modèle présente l'avantage de ne faire intervenir qu'une seule constante de vitesse k_n . Cependant, cette méthodologie d'un point de vue conceptuel se distingue des modèles de génie chimique classique. En effet, en génie de la réaction chimique, on n'a pas l'habitude de déduire a posteriori deux constantes réactionnelles (constantes de dépliement et d'agrégation) à partir d'un schéma réactionnel comportant initialement une seule réaction ($S \rightarrow A$).

Afin d'avoir une approche plus conforme aux mécanismes proposés dans la littérature, un modèle avec deux réactions successives a été proposé pour rendre compte de la transformation des espèces protéiques suite à la dénaturation chaude de la β -lg.

Le modèle avec deux réactions successives consiste en la succession de deux mécanismes successifs à contrôle cinétique :

- Le dépliement de la β -lg native (notée N) pour former l'espèce dépliée (notée U) ;
- L'espèce U , réactive, forme des agrégats (notés A) suite à l'association de deux β -lg dépliées via leurs thiols libres.

Les équations 3.13 et 3.14 résument le mécanisme de dénaturation tel que décrit ci-dessus :



où k_1 et k_2 sont respectivement les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation.

Avec, ce modèle à deux réactions successives, les évolutions des concentrations des espèces N et U (respectivement C_N et C_U) sont régies par les équations suivantes :

$$\frac{dC_N}{dt} = -r_1 \quad (2.15)$$

$$\frac{dC_U}{dt} = r_1 - r_2 \quad (2.16)$$

avec :

$$r_1 = k_1 \cdot C_N^{n_1} \quad (2.17)$$

$$r_2 = k_2 \cdot C_U^{n_2} \quad (2.18)$$

Identification des ordres de réaction, (n_1 et n_2).

Dans un premier temps, afin de garder quelques similarités avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007), nous avons fixé l'ordre de réaction à 1,5 pour à la fois les réactions de dépliement et d'agrégation ($n_1 = n_2 = 1,5$). Puis, l'ordre de réaction a été fixé à 1 pour la réaction de dépliement ($n_1 = 1$) et à 2 pour l'agrégation ($n_2 = 2$). Là encore, le choix de ces ordres de réaction, à savoir 1 et 2, n'a pas été subjectif. En effet, la réaction de dépliement a souvent été considérée par certains comme étant une réaction de premier ordre (Verheul et al., 1998) : $N \rightarrow U^*$ (U^* est la β -lg partiellement dépliée). L'agrégation étant une réaction bimoléculaire, il est donc logique de supposer une réaction du second ordre (Verheul et al., 1998) : $U^* + U^* \rightarrow U_2^*$.

Identification des constantes cinétiques de dénaturation, (k_1 et k_2).

Les paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg (k_1 et k_2) ont été identifiés grâce à l'algorithme présenté à la figure 2.20. La chronologie de cet algorithme est la suivante :

- Initialisation de k_1 et k_2 ;
- Calcul de concentrations C_N , C_U , C_A , à chaque instant t_i pour i allant de 0 à N . Pour cela, un bilan de population a été réalisé s'appuyant sur l'apparition/disparition des espèces entre deux instants consécutifs t_{i+1} et t_i tels que $t_{i+1} - t_i = \Delta t$. Les calculs sont basés sur le fait que : i) l'équation (2.15) traduisant la disparition de l'espèce N admet une solution analytique, ii) l'équation (2.16) régissant l'évolution en concentration de l'espèce U peut être résolue de façon discrète par la méthode d'Euler avec un pas de temps $\Delta t = 0,05$ s, iii) et que la concentration en agrégat correspond à la concentration de l'espèce soluble initiale à laquelle la concentration en soluble restant ($C_S = C_N + C_U$) a été retranchée ;
- Comparaison des C_S calculée et C_S mesurée. Comme la C_S mesurée n'a pas été sondée à chaque instant (12 prélèvements), la C_S mesurée a été prise égale aux valeurs obtenues en utilisant le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) servant de référence ;
- Optimisation des valeurs de k_1 et k_2 afin d'obtenir un profil de concentration C_S calculée identique au profil de concentration de C_S mesurée. La méthode des moindres carrées

a été utilisée grâce au solveur d'Excel : variations de k_1 et k_2 afin de minimiser la fonction objectif (f_{ob}) définie par la somme des carrés de la différence entre C_S calculée et C_S mesurée.

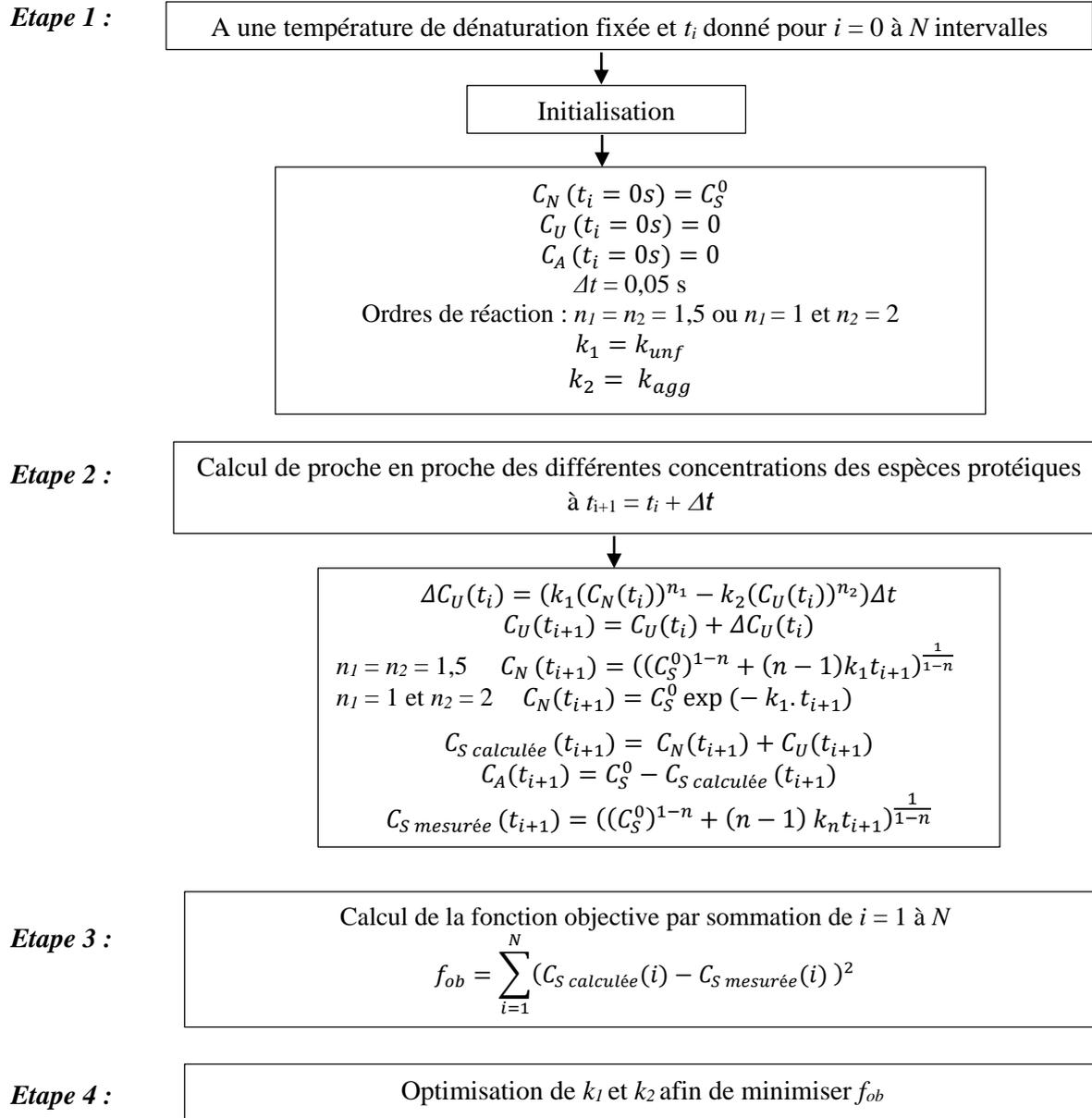


Figure 2.19. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg.

La figure 2.21 représente un exemple d'ajustement de k_1 et k_2 par la méthode des moindres carrés permettant d'obtenir un profil de concentration C_S calculée identique à celui de C_S mesurée.

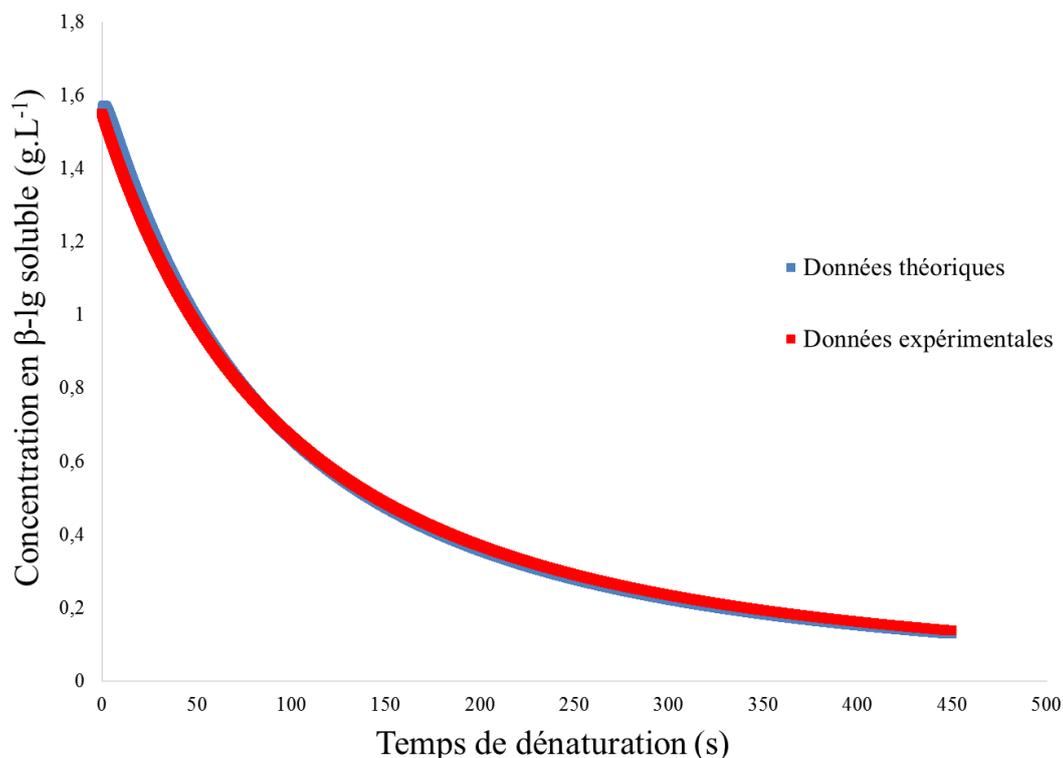


Figure 2.20. Exemple d'un ajustement des constantes cinétiques de déplieement et d'agrégation à 85°C pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.

A l'issue de l'étape d'optimisation, on obtient les constantes de dénaturation k_1 et k_2 mais aussi l'évolution de la concentration des différentes espèces de β -Ig pour la température de dénaturation imposée. La figure 2.22 représente l'apparition de l'espèce A et la disparition des espèces N et U (et par conséquent l'espèce S) à 75°C, pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium.

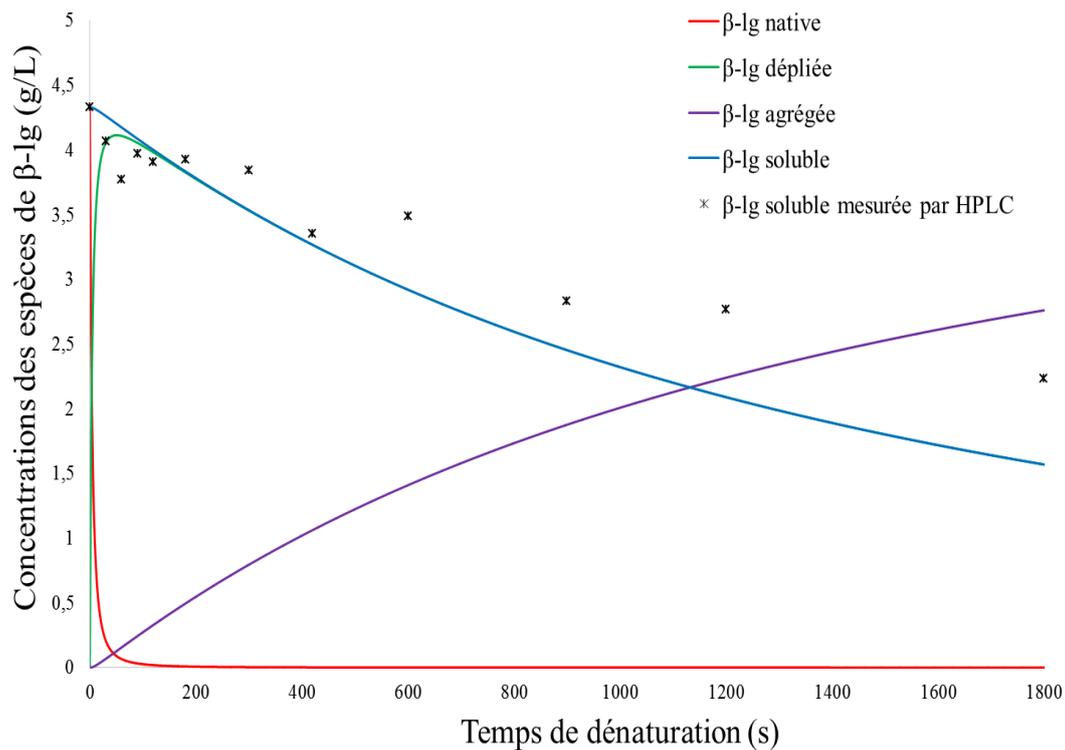


Figure 2.21. Evolution au cours du temps des concentrations des différentes espèces de β -Ig selon le modèle de deux réactions successives.

Les valeurs simulées correspondent à celles obtenues lors d'une dénaturation à 75°C d'une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. Les valeurs d'espèce soluble mesurées au cours de cette expérience de dénaturation ont également été reportées.

La détermination de k_1 et k_2 pour chaque température de dénaturation permet le tracé du graphe d'Arrhenius (figure 2.23).

A partir du graphe d'Arrhenius, l'expression des constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation (k_1 et k_2) est définie par les équations 2.19 et 2.20, pour l'ensemble des températures étudiées :

$$k_1 = k_1^{\circ} \exp\left(\frac{-E_{A1}}{RT}\right) \quad (2.19)$$

avec k_1 la constante cinétique de dépliement, k_1° le facteur de fréquence de dépliement et E_{A1} l'énergie d'activation de dépliement.

$$k_2 = k_2^{\circ} \exp\left(\frac{-E_{A2}}{RT}\right) \quad (2.20)$$

avec k_2 la constante cinétique d'agrégation, k_2° le facteur de fréquence d'agrégation et E_{A2} l'énergie d'activation d'agrégation.

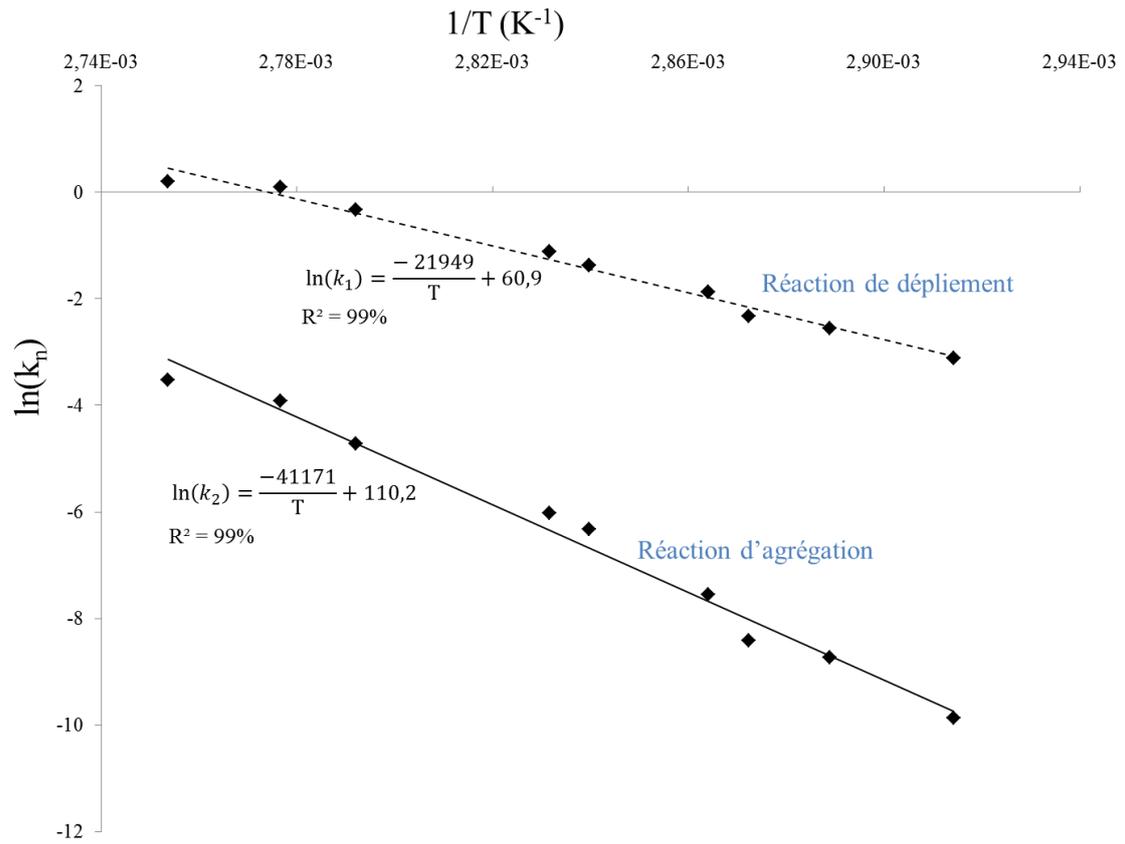


Figure 2.22. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg d'une solution modèle de WPI à 0,5% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total obtenu en utilisant le modèle de deux réactions successives.

Chapitre 4 : Détermination des concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP

Nous présentons, dans ce dernier chapitre de la partie Matériels et Méthodes, la méthodologie utilisée pour déterminer les concentrations des différentes espèces protéiques (native, dépliée et agrégée) dans l'ECP en se basant sur les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg (dépliection et agrégation) et la connaissance des profils thermiques subis par les solutions protéiques modèles dans l'échangeur. La simulation de ces profils de concentrations le long de l'ECP sera effectuée avec les deux modèles étudiés : (i) le modèle de Tolkach et Kulozik (2007), (ii) et le modèle avec deux réactions successives en fixant dans un premier temps, l'ordre de réaction à 1,5 pour à la fois les réactions de dépliection et d'agrégation ($n_1 = n_2 = 1,5$) puis, à 1 pour la réaction de dépliection ($n_1 = 1$) et 2 pour l'agrégation ($n_2 = 2$).

Pour les deux modèles étudiés, la résolution des différentes équations, permettant de simuler les concentrations des espèces protéiques, a été effectuée par la méthode d'Euler. La discrétisation réalisée avec un pas de temps de 0,05 secondes a été réalisée sur les profils de températures imposés le long de l'ECP

Plusieurs hypothèses simplifiant le calcul de C_N , C_U et C_A ont été considérées, à savoir :

- L'histoire thermique du produit depuis l'entrée de l'installation (à $\tau = 0$ s) est calculée par le logiciel Sphère, conduisant à la connaissance de la loi : $T_i = f(\tau(i))$;
- L'écoulement dans l'ECP lors des traitements thermiques des solutions modèles de WPI est unidimensionnel et stationnaire ;
- La disparition de la β -lg dépliée le long de l'ECP, lors de la formation du dépôt encrassant, n'est pas prise en compte.

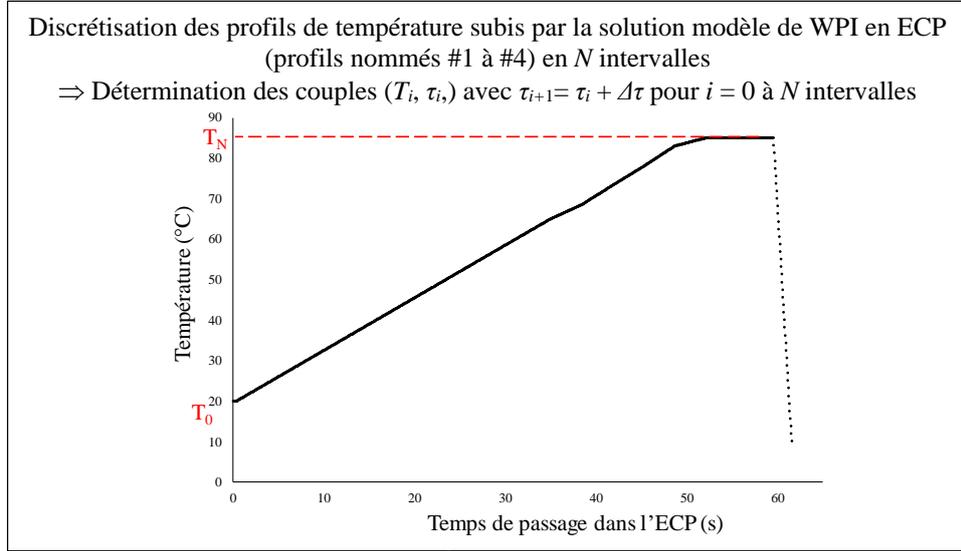
1. Simulation des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)

Dans l'hypothèse d'un écoulement piston, les équations d'évolution des concentrations des espèces protéiques sont identiques à celles d'un système fermé (substitution du temps de réaction par le temps de passage τ) :

$$\frac{dC_S}{d\tau} = -k_n C_S^{1,5} \quad (2.21)$$

Le graphe 2.24 résume la méthodologie utilisée pour simuler les concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP, pour chaque profil thermique imposé, suite à la détermination des constantes k_n , k_{unf} et k_{agg} et de α .

Etape 1 :



Connaissance de $T_i = f(\tau(i))$

Etape 2 :

Initialisation

$$\begin{aligned} C_N(\tau_i = 0s) &= C_S^0 \\ C_U(\tau_i = 0s) &= 0 \\ C_A(\tau_i = 0s) &= 0 \\ \Delta\tau_i &= 0,05 \text{ s} \\ \text{Ordre de réaction } n &= 1,5 \end{aligned}$$

Etape 3 :

Calcul des valeurs de k_{unf} et k_{agg} et du degré de dépliement (α) sur chaque intervalle de temps de passage τ_i

$$\begin{aligned} k_{unf}(T_i) &= k_{unf}^{\circ} \exp\left(\frac{-E_{A,unf}}{R T_i}\right) \\ k_{agg}(T_i) &= k_{agg}^{\circ} \exp\left(\frac{-E_{A,agg}}{R T_i}\right) \\ \alpha(T_i) &= \exp\left(\frac{\ln(k_n(T_i)) - \ln(k_{agg}(T_i))}{n}\right) \\ \text{avec } k_n(T_i) &= k_{unf}(T_i) \text{ si } T_i < 80^{\circ}\text{C} \\ &\text{ou } k_n(T_i) = k_{agg}(T_i) \text{ si } T_i > 80^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

Etape 4 :

Calcul des concentrations des espèces protéiques à $\tau_{i+1} = \tau_i + \Delta\tau$

$$\begin{aligned} \Delta C_S(\tau_i) &= -k_n(T_i) (C_S(\tau_i))^{1,5} \Delta\tau \\ C_S(\tau_{i+1}) &= C_S(\tau_i) + \Delta C_S(\tau_i) \\ C_N(\tau_{i+1}) &= (1 - \alpha(T_i)) C_S(\tau_{i+1}) \\ C_U(\tau_{i+1}) &= C_S(\tau_{i+1}) - C_N(\tau_{i+1}) \\ C_A(\tau_{i+1}) &= C_S^0 - C_S(\tau_{i+1}) \end{aligned}$$

Figure 2.23. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les profils de concentrations des différentes espèces de β -Ig dans l'ECP avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007).

2. Simulation des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de deux réactions successives

Les profils de concentrations des espèces de β -lg ont également été simulés avec le modèle de deux réactions successives. Dans l'hypothèse d'un écoulement piston, les équations d'évolution des concentrations des espèces protéiques sont :

$$\frac{dC_N}{d\tau} = -r_1 \quad (2.22)$$

$$\frac{dC_Y}{d\tau} = r_1 - r_2 \quad (2.23)$$

Le graphe 2.25 décrit la méthodologie utilisée pour simuler l'apparition et la disparition des différentes espèces de β -lg le long de l'ECP à partir du modèle de deux réactions successives, pour chaque profil thermique imposé, suite à la détermination des constantes k_1 et k_2 (avec $n_1 = n_2 = 1,5$ ou $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$).

Etape 1 :

Discrétisation des profils de température subis par la solution modèle de WPI en ECP (profils nommés #1 à #4) en N intervalles
⇒ Détermination des couples (τ_i, T_i) avec $\tau_{i+1} = \tau_i + \Delta\tau$ pour $i=0$ à N

Connaissance de $T_i = f(\tau(i))$

Etape 2 :

Initialisation

$C_N(\tau_i = 0s) = C_S^0$
 $C_U(\tau_i = 0s) = 0$
 $C_A(\tau_i = 0s) = 0$
 $\Delta\tau_i = 0,05$ s
 n_1 et $n_2 = 1,5$ (pour à la fois le dépliement et l'agrégation)
et $n_1 = 1$ (pour le dépliement) et $n_2 = 2$ (pour l'agrégation)

Etape 3 :

Calcul de k_1 et k_2 sur chaque intervalle de temps de passage τ_i

$$k_1(T_i) = k_1^0 \exp\left(\frac{-E_{A1}}{R T_i}\right)$$
$$k_2(T_i) = k_2^0 \exp\left(\frac{-E_{A2}}{R T_i}\right)$$

Etape 4 :

Calcul des concentrations des espèces protéiques à $\tau_{i+1} = \tau_i + \Delta\tau$

$$\Delta C_N(\tau_i) = -k_1(T_i) \cdot (C_N(\tau_i))^{n_1} \cdot \Delta\tau$$
$$\Delta C_U(\tau_i) = (k_1(T_i) \cdot (C_N(\tau_i))^{n_1} - k_2(T_i) \cdot (C_U(\tau_i))^{n_2}) \cdot \Delta\tau$$
$$C_N(\tau_{i+1}) = C_N(\tau_i) + \Delta C_N(\tau_i)$$
$$C_U(\tau_{i+1}) = C_U(\tau_i) + \Delta C_U(\tau_i)$$
$$C_A(\tau_{i+1}) = C_S^0 - (C_N(\tau_{i+1}) + C_U(\tau_{i+1}))$$

Figure 2.24. Représentation schématique de la méthode de calcul conduisant à déterminer les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans l'ECP avec le modèle de deux réactions successives.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1 : Etude de l'influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt dans un échangeur de chaleur à plaques

Dans ce chapitre, nous avons exploité une base de données existante d'essais d'encrassement avec des solutions à base de concentrats de protéines sériques (WPC à 1% p/p) ayant différentes teneurs en calcium (comprise entre 70 et 87,4 ppm) dans le but d'évaluer l'existence de corrélations positives entre les phénomènes d'encrassement et la teneur en calcium des solutions protéiques.

Dans un premier temps, nous discuterons l'effet de la teneur en calcium sur la distribution de la masse de dépôt dans un ECP et sur la masse totale de dépôt pour une condition de marche (profil thermique et vitesse de circulation du produit fixés).

Dans un second temps, nous montrerons comment l'évolution de la résistance thermique d'encrassement avec le temps est impactée par la teneur en calcium et par la vitesse de circulation des solutions protéiques.

Dans un troisième temps, nous utiliserons les données sur les résistances thermiques d'encrassement et les masses de dépôt pour tenter d'évaluer la conductivité thermique et l'épaisseur des dépôts protéiques contenant du calcium. Nous discuterons ces valeurs avec celles obtenues dans la littérature.

Enfin, nous montrerons qu'une corrélation simple peut être établie pour traduire quantitativement la relation de cause à effet entre les masses de dépôt collectées vs les teneurs en calcium et les vitesses de circulation des solutions protéiques le long de la paroi de l'ECP.

1. Dispositif expérimental utilisé pour les essais d'encrassement en pilote

1.1. Solutions modèles encrassantes étudiées pour les essais d'encrassement

Les solutions encrassantes étudiées sont reconstituées à partir d'une poudre de WPC 75 (Armor Protéines, France) dissoute dans de l'eau afin d'obtenir une solution modèle à 1% (p/p). La poudre de WPC est constituée principalement de protéines (75% p/p) où la β -lg et l' α -la représentent respectivement 63% et 11% (p/p), de 10% (p/p) de lactose et d'une faible teneur en minéraux (< 4% p/p).

La teneur en calcium initiale dans la poudre est de 45 ppm. L'eau utilisée est un mélange d'eau dure et d'eau adoucie obtenue à l'aide d'un adoucisseur d'eau (HI-FLO 1, Culligan, Purolite C100E resin, France). Les teneurs en calcium de l'eau dure et de l'eau adoucie,

déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Philips, Pye Unicam), varient entre 170 et 200 ppm et entre 1 et 3 ppm, respectivement. La teneur en calcium totale des solutions modèles, comprise entre 70 et 87,4 ppm, est obtenue en mélangeant une quantité fixe de poudre de WPC avec de l'eau dure et de l'eau adoucie. Nous n'avons pas trouvé dans cette base de données des essais effectués avec des concentrations en calcium totales plus importantes.

Les solutions modèles sont préparées la veille de chaque essai d'encrassement et stockées à 4°C pendant 15 heures afin d'éviter les risques de prolifération bactérienne. Le pH des solutions modèles de WPC a été mesuré pour chaque essai. Il varie entre 7,3 et 7,7 pour l'ensemble des solutions testées.

1.2. Installation pilote utilisée pour les essais d'encrassement

La plateforme expérimentale utilisée pour les essais d'encrassement est présentée dans la figure 3.1. Elle est constituée de deux ECP (Model V7, Alfa-Laval Vicarb, France) équipés chacun de plaques planes corruguées (0,15 m de largeur, 0,5 m de longueur).

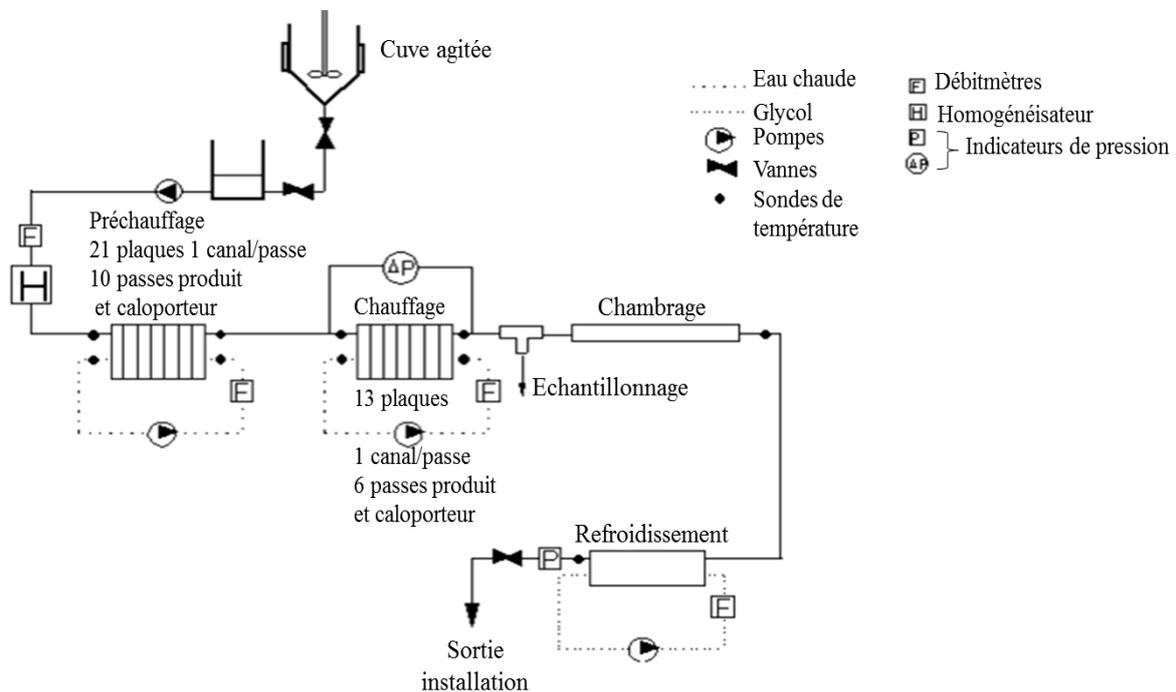


Figure 3.1. Plateforme expérimentale utilisée pour les essais d'encrassement d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p).

Le premier ECP (21 plaques, 10 canaux, 1 canal par passe) est utilisé pour préchauffer la solution modèle de 4 à 60°C. Le deuxième ECP est composé de 13 plaques, soit 6 canaux avec un canal par passe, dans lesquelles circulent à contre-courant l'eau chaude et le fluide modèle à traiter (figure 3.2). Ce deuxième ECP permet de chauffer la solution encrassante de WPC au-delà de la température de dénaturation et d'étudier par conséquent le dépôt formé sur les différentes plaques de l'ECP. Les pesées des dépôts encrassants ont été effectuées uniquement sur ce deuxième ECP.

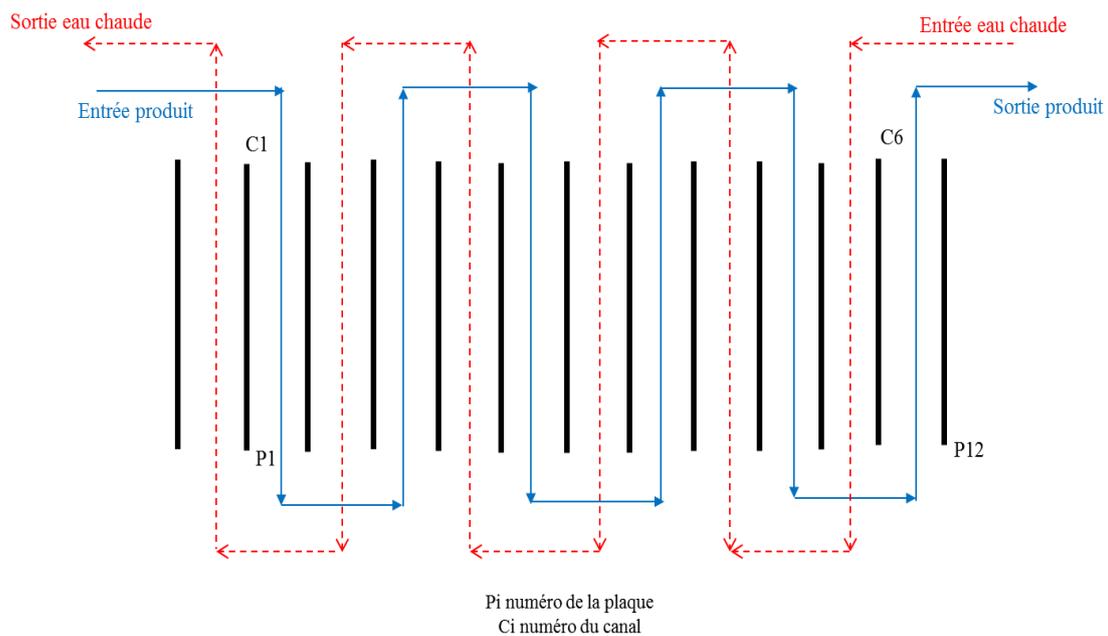


Figure 3.2. Représentation de la configuration de l'ECP utilisée pour les essais d'encrassement.

1.3. Conditions de procédé imposées

Le tableau 3.1 représente les paramètres de procédé imposés pour les 12 essais d'encrassement effectués avec les solutions modèles de WPC à 1% (p/p) à différentes teneurs en calcium (allant de 70 à 87,4 ppm).

Un seul profil thermique a été imposé dans l'ECP pour l'ensemble des essais d'encrassement (figure 3.3). En effet, la température d'entrée de l'eau chaude a été ajustée durant les essais afin d'assurer une température constante de sortie du produit (T_{sp}) proche de 96°C. Ce profil thermique a été simulé avec le logiciel Sphère développé par Leuliet (1988) et René et al. (1991) à partir de la connaissance des débits et de la température d'entrée du produit à traiter ($T_{ep} \approx 60^\circ\text{C}$) et celle de l'eau chaude.

Tableau 3.1. Paramètres de procédé (mesurés et calculés) imposés dans l'ECP des différents essais d'encrassement.

(T_{ep} : température d'entrée du produit à traiter ; T_{sp} : température de sortie du produit).

Essai	Nombre de Reynolds moyen	Teneur en calcium (ppm)	T_{ep} (°C)		T_{sp} (°C)		Masse de dépôt totale (g)
			$t = 0$ min	$t = 330$ min	$t = 0$ min	$t = 330$ min	
A	2000	72,9	62,3	60,0	96,8	97,2	214,2
B	2003	79,8	60,0	59,7	96,5	96,6	360,0
C	2040	82,2	61,5	61,3	97,1	96,3	509,0
D	2040	85,6	60,4	61,5	95,8	96,9	594,2
E	3394	70,0	63,8	63,9	95,5	95,7	367,3
F	3220	76,3	61,3	61,3	95,7	95,5	686,1
G	3214	78,0	62,6	62,2	95,0	95,0	697,6
H	3232	86,5	62,7	63,6	94,6	94,6	921,8
I	4938	74,6	60,8	61,4	95,4	95,2	324,2
J	4920	77,4	61,3	60,8	96,2	96,0	368,2
K	4942	77,8	63,2	63,9	95,4	95,1	426,1
L	4926	87,4	61,2	61,4	95,9	95,7	714,1

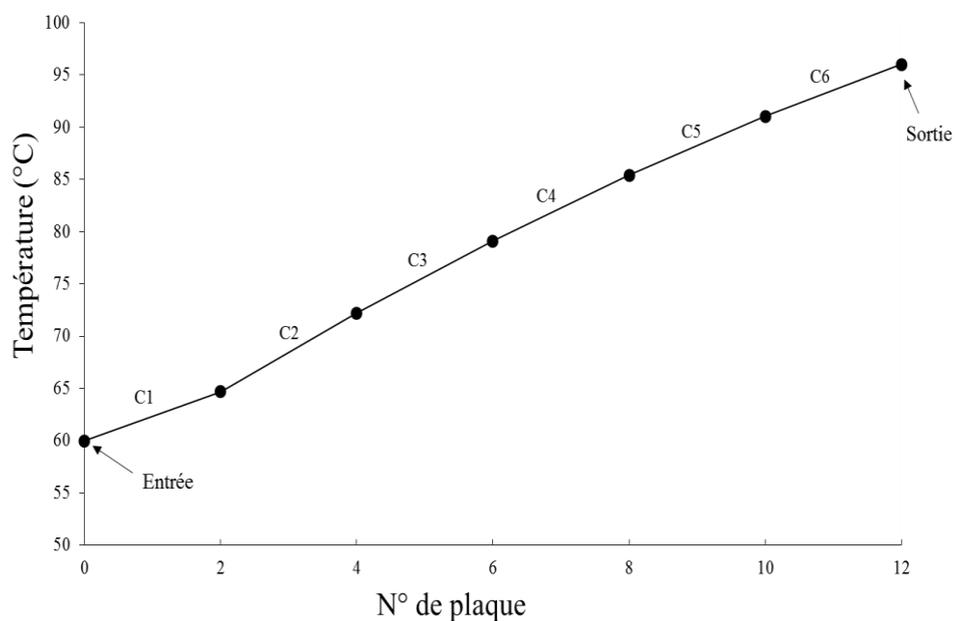


Figure 3.3. Profil thermique en solution déterminé numériquement et imposé le long de l'ECP.

Les nombres de Reynolds (Re), allant de 2000 à 5000, rapportés dans le tableau 3.1 ont été calculés pour chaque essai à partir de la distribution du nombre de Reynolds moyen dans l'ECP. Plus la valeur du Reynolds est élevée, plus la vitesse de circulation du produit est importante (et par conséquent, plus le temps de séjour dans l'ECP est faible).

La viscosité des solutions est déterminée à partir des propriétés physiques de l'eau (cette viscosité correspond plus ou moins à la viscosité de la solution de WPC puisque la concentration en β -lg de la solution modèle étudiée est très faible) à la température moyenne de l'ECP.

2. Discussions des résultats obtenus

2.1. Distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP à $Re = 2000$

La figure 3.4 représente la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP pour une solution modèle de WPC à 1% (p/p) contenant différents teneurs en calcium (72,9–85,6 ppm), à $Re = 2000$. Les profils des quantités de dépôt sec le long de l'ECP à $Re = 3200$ et $Re = 5000$ donnant lieu à des résultats similaires, seul le profil de la masse de dépôt sec par canal à $Re = 2000$ a été tracé.

La figure 3.4 montre que la masse de dépôt par canal augmente linéairement le long de l'ECP et qu'elle dépend notamment de la teneur en calcium dans la gamme étudiée (72,9–85,6 ppm).

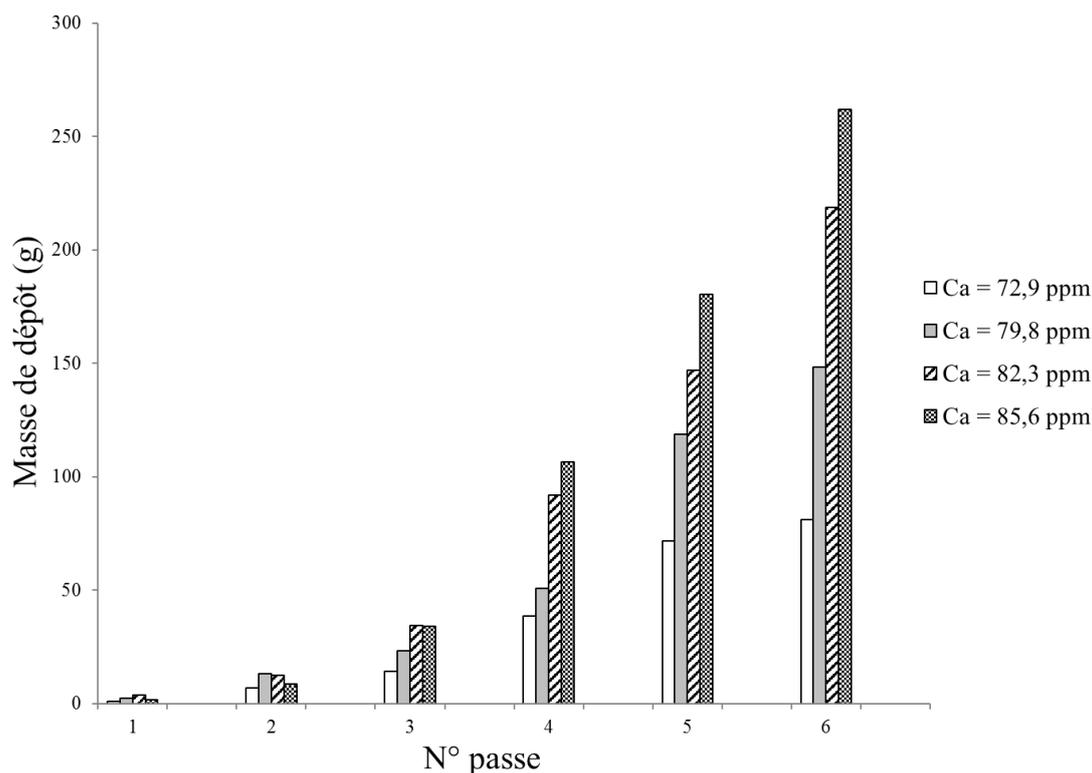


Figure 2.4. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP pour différentes teneurs en calcium allant de 72,9 à 85,6 ppm à $Re = 2000$.

Pour l'ensemble des concentrations en calcium étudiées, très peu de dépôt est reporté dans le 1^{er} canal de l'ECP. Ce résultat est attendu puisque la molécule de β -lg n'est pas dénaturée à 62,8°C (température du 1^{er} canal de l'ECP), entraînant ainsi une faible quantité du dépôt. Ces résultats sont en accord avec les observations de Lyster (1970), Dannenberg (1986), Bradley et al. (1989) et Delplace et al. (1994) confirmant que la dénaturation chaude de la β -lg ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures à 70°C. Dans les autres canaux de l'ECP, les températures de sortie du produit sont suffisamment élevées (68,5–93,1°C) pour engendrer la dénaturation chaude de la β -lg et conduire par conséquent à des masses de dépôt sec plus importantes. Par ailleurs, le dépôt encrassant atteint sa valeur maximale à la sortie de l'ECP à une température de 93,1°C. Ces observations montrent que la distribution de la masse de dépôt protéique est fortement influencée par la température. Ce résultat était attendu puisqu'il a été démontré que la réaction de dénaturation chaude de la β -lg de solutions de protéines sériques contenant du calcium dépend significativement de la température (Petit et al., 2013).

L'effet de la variation de la teneur en calcium (70–87,4 ppm) sur la quantité totale de dépôt sec mesurée après un traitement thermique dans l'ECP de 330 minutes à différents nombres de Reynolds (2000, 3200 et 5000) sera commenté dans le paragraphe suivant.

2.2. Influence de la teneur en calcium sur la quantité de dépôt totale

La figure 2.5 représente l'évolution de la masse de dépôt totale dans l'ECP en fonction de la concentration en calcium de solutions modèles de WPC à 1% (p/p). Chaque symbole correspond à un essai d'encrassement. La forme des symboles rend compte de la valeur du Reynolds moyen pour l'essai d'encrassement.

La figure 2.5 montre que pour chaque nombre de Reynolds, la masse de dépôt totale augmente linéairement avec la concentration en calcium. Une augmentation de la concentration de calcium de 20% conduit à un doublement de la masse totale de dépôt le long de l'ECP. Ces résultats montrent que le calcium est un catalyseur de l'encrassement comme l'ont suggéré Daufin et al. (1987) et Xiong (1992). D'après Xiong (1992), les ions calcium pourraient interagir avec les groupements carboxyliques de l'acide aspartique et glutamique de la β -lg et favoriseraient ainsi la fixation des espèces protéiques, entraînant ainsi une masse de dépôt plus importante.

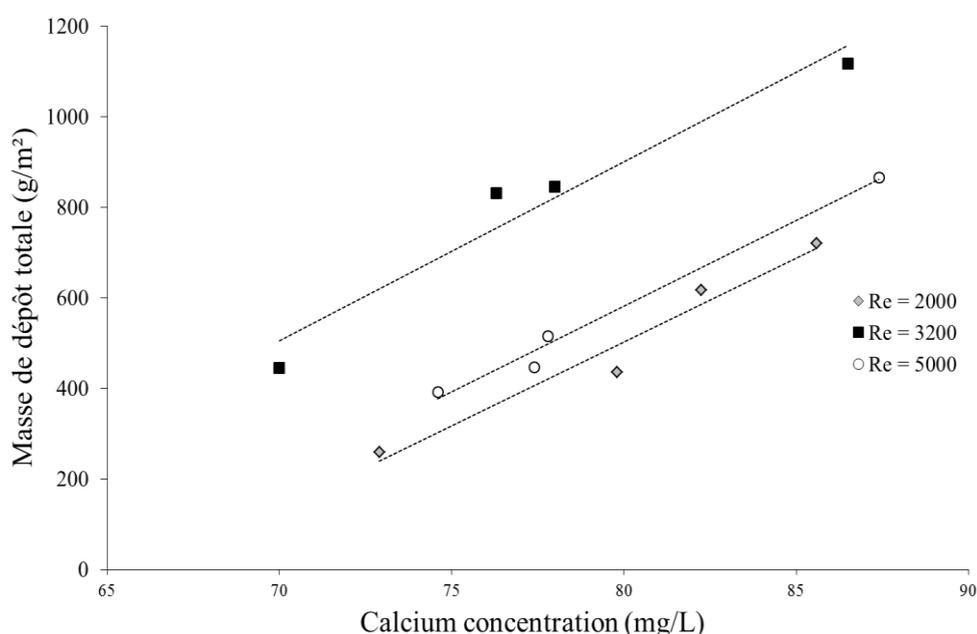


Figure 2.5. Comparaison de la masse de dépôt totale en fonction de la teneur en calcium (70–87,4 ppm) d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p) pour différents nombres de Reynolds (2000, 3200 et 5000) après 330 min d'encrassement.

Il faut noter que la croissance du dépôt ne peut pas être ici attribuée aux interactions entre les ions calcium et les micelles de caséines (Visser et Jeurink, 1997) puisque ces dernières sont absentes dans la campagne d'essais menée.

La figure 2.5 montre également que la masse de dépôt totale à $Re = 3200$ dans la gamme de concentration étudiée (70–86,5 ppm) est nettement supérieure à celle observée à $Re = 2000$ ou $Re = 5000$. En effet, la quantité de dépôt à $Re = 2000$ est la plus faible enregistrée, tandis qu'un pic de la masse de dépôt totale est observé à $Re = 3200$ et ce, pour l'ensemble des concentrations étudiées. Ceci prouve que la vitesse de circulation du produit est un facteur intervenant dans la dynamique de dépôt, sans pour autant que l'augmentation de la masse de dépôt soit une fonction monotone du Reynolds. Il est fort probable que des valeurs élevées du nombre de Reynolds entraînent une augmentation concomitante de la vitesse de formation de dépôt (due à un meilleur transport des espèces précurseurs du dépôt) et de la vitesse d'arrachement du dépôt (par érosion des couches supérieures du dépôt à l'interface avec la solution protéique en circulation). De ce fait, un optimum semble exister. Il est difficile cependant d'émettre plus hypothèse à partir de cette analyse a posteriori de la base de données.

2.3. Influence de la teneur en calcium sur la cinétique d'encrassement de l'ECP

Les figures 2.6.a et b représentent l'évolution de la résistance thermique d'encrassement en fonction du temps pour différentes teneur en calcium de solutions modèles de WPC à 1% (p/p). Chaque figure correspond à un nombre de Reynolds (2000 et 3200).

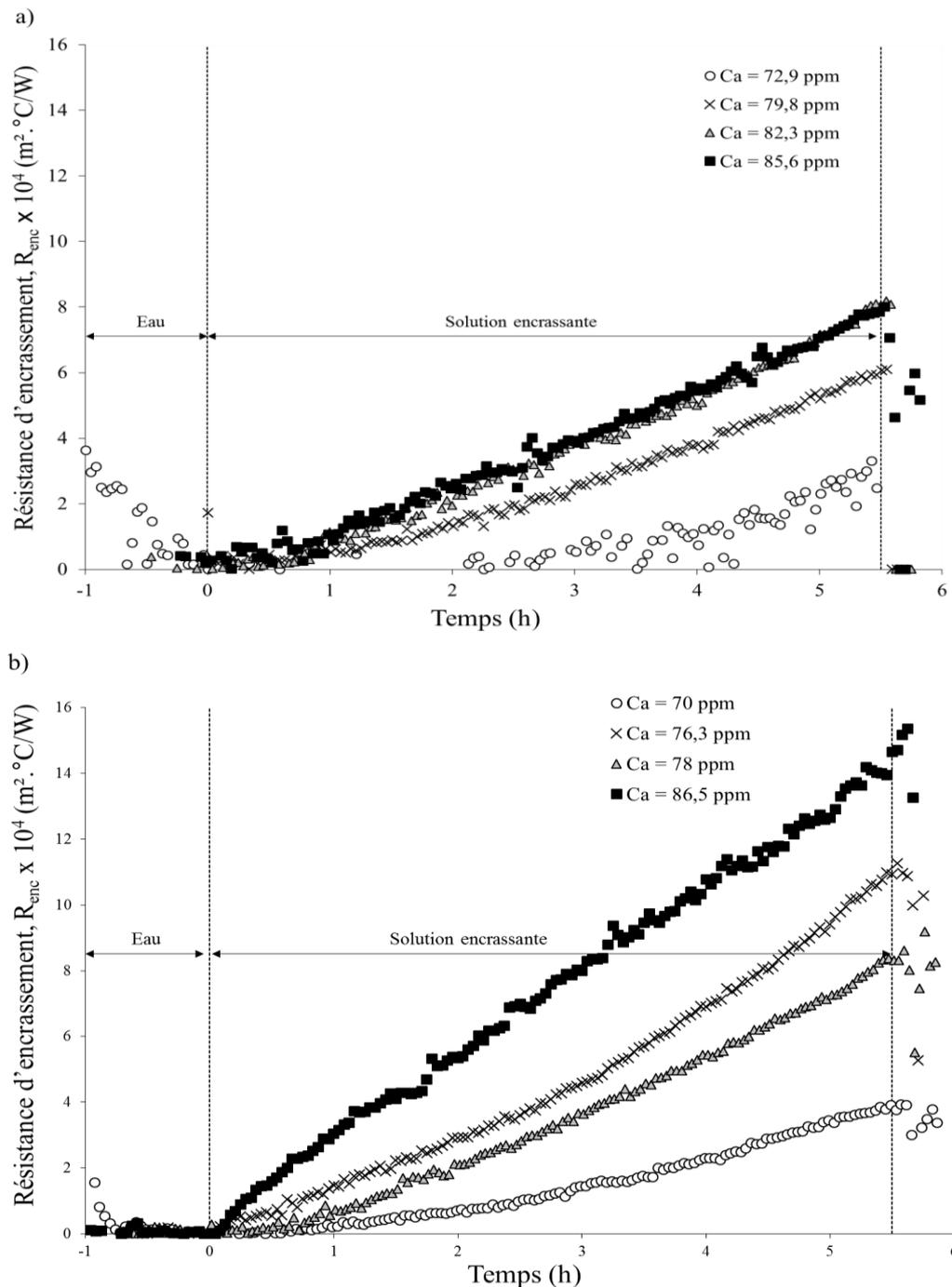


Figure 2.6. Comparaison de la résistance thermique d'encrassement en fonction de la teneur en calcium d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p) pour différents nombres de Reynolds : a) 2000 et (b) 3200.

Ces figures confirment que la dynamique de dépôt dépend fortement de la teneur en calcium et de la vitesse de passage du produit le long de la paroi de l'ECP. Il est probable que l'augmentation de la concentration en calcium des solutions protéiques permet de fixer un plus grand nombre d'espèces protéiques et d'accélérer ainsi la formation du dépôt protéique.

2.4. Conductivité thermique et masse volumique des dépôts protéiques contenant du calcium

La figure 2.7 représente, pour les différentes teneurs en calcium étudiées, la relation entre la résistance thermique d'encrassement d'une solution modèle de WPC à 1% (p/p) et la masse de dépôt totale calculée par rapport à la surface d'échange totale de l'ECP.

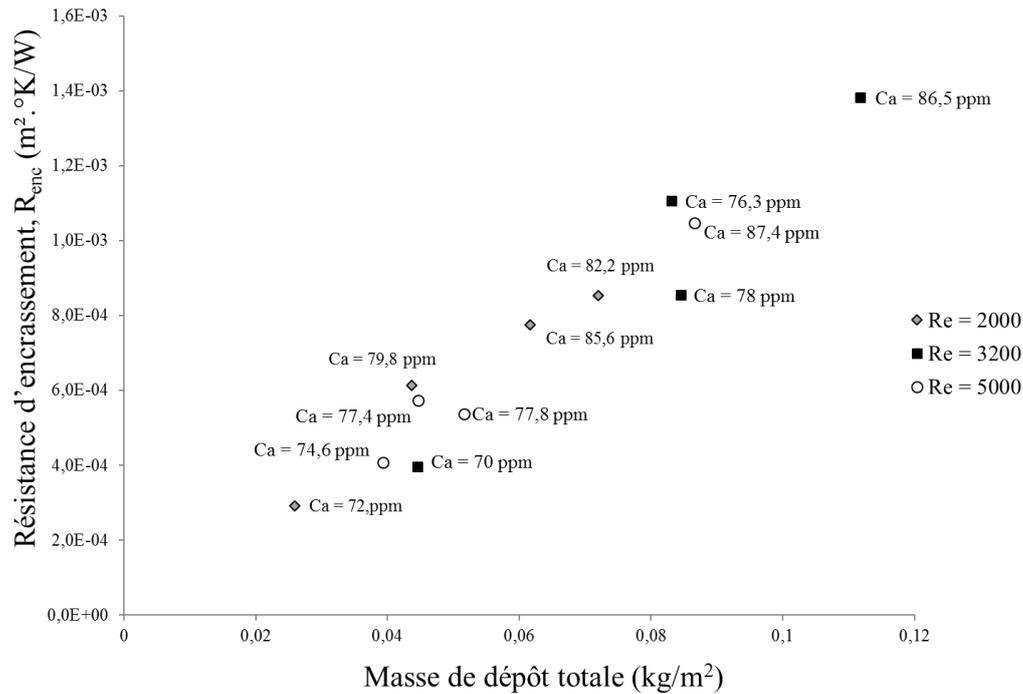


Figure 2.7. Relation entre la résistance thermique d'encrassement et la masse de dépôt totale pour différentes teneurs de calcium (70–87,4 ppm).

La figure 2.7 montre que pour les différentes teneurs en calcium, l'ensemble des points expérimentaux sont rassemblés sur une seule courbe maîtresse et ce, quel que soit le nombre de Reynolds imposé. En effet, une augmentation linéaire de la résistance thermique d'encrassement avec la masse de dépôt totale est observée.

Ces résultats indiquent clairement que la résistance d'encrassement est fortement dépendante de la masse de dépôt protéique par unité de surface.

La pente de la courbe de la figure 2.7 permet de calculer le produit $\rho_d \lambda_d$. Nous avons évoqué dans la partie bibliographique qu'il n'était pas simple d'obtenir des valeurs de λ_d . Pour autant, nous avons mené le calcul à terme même si nos distributions de dépôts (et donc l'épaisseur des dépôts) sont loin d'être homogènes dans les canaux de l'ECP.

Le produit $\rho_d \lambda_d$ est égal à $84 \text{ W.kg.m}^{-4}.\text{K}^{-1}$. Par ailleurs, Delplace et Leuliet (1995) ont calculé la conductivité thermique apparente lors de l'encrassement d'un ECP par une solution protéique modèle à 1% (p/p). Elle est de $0,27 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ alors que la valeur trouvée dans cette étude est de $0,084 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ en considérant que la masse volumique de la solution de WPI (ρ_d) est celle de l'eau. Cet écart important entre nos résultats et ceux de Delplace et Leuliet (1995) pourrait être expliqué par la variation de la teneur en calcium rendant le dépôt moins dense et entraînant ainsi une diminution de la conductivité thermique. Compte tenu de la non-uniformité de l'épaisseur de dépôt, il est difficile d'aller plus loin dans la discussion de l'influence du calcium sur la conductivité thermique des dépôts. Néanmoins, ces résultats sont aussi en adéquation avec les travaux de Guérin et al. (2007) qui ont souligné que la structure et l'apparence du dépôt encrassant dépendent fortement des concentrations en calcium pour des dépôts protéiques contenant du calcium, correspondant à des températures de paroi allant de 74 à 102°C. Pour des températures de paroi supérieures à 85°C, Davies et al. (1997) ont obtenu une valeur de $\rho_d \lambda_d$ de $470 \text{ W.kg.m}^{-4}.\text{K}^{-1}$ (contre $84 \text{ W.kg.m}^{-4}.\text{K}^{-1}$ dans cette étude). Une telle différence pourrait être expliquée par le fait que les concentrations en protéine et en calcium des solutions encrassantes sont différentes. En effet, la teneur en protéine dans cette étude est de 1% (p/p) contre 3,5% (p/p) pour la solution modèle de Davies et al. (1997). Par ailleurs, la teneur en calcium n'est pas mentionnée dans les travaux de Davies al. (1997).

2.5. Corrélation entre la masse de dépôt, les conditions de procédé et la teneur en calcium des solutions encrassantes

Nous avons montré dans ce chapitre que pour un profil thermique donné, la quantité et la dynamique de dépôt sont fortement impactées par les quantités de calcium et les vitesses de circulation des fluides. Dans ce qui suit, nous allons évaluer si une corrélation simple peut être établie et traduire quantitativement cette relation de cause à effet.

La variable cible dont nous souhaitons prédire l'évolution est la masse de dépôt locale ($M_{d,i}$) formée dans chaque canal i de l'ECP (après un traitement thermique de 330 min d'une solution encrassante de WPC).

Nous avons utilisé la méthode de modélisation par analyse dimensionnelle décrite par Delaplace et al. (2014) pour élaborer ce modèle.

- La 1^{ère} étape consiste à dresser le listing des variables influençant $M_{d,i}$. $M_{d,i}$ dépend de trois grands types de variables d'entrée, à savoir :

- (i) celles liées à la géométrie : l'espace entre 2 plaques consécutives de l'ECP (e) ;

- (ii) celles liées aux propriétés physiques des solutions encrassantes : la teneur en calcium (C_{Ca}), la viscosité (μ) et la densité (ρ) du fluide ;
- (iii) celles liées aux paramètres de procédé : la température d'entrée du produit (T_{ep}), la température de sortie du produit dans le canal i ($T_{sp,i}$) et la vitesse moyenne d'écoulement du fluide (v).

Nous avons donc : $\{M_{d,i}, C_{Ca}, v, e, \rho, \mu, T_{ep}, T_{sp,i}\}$.

L'ensemble des 8 variables est décrit par 4 dimensions (masse, longueur, temps, température). Selon le théorème Vaschy-Buckingham, une relation entre 4 nombres sans dimension suffit pour traduire l'évolution du système :

$$\frac{M_{d,i}}{\rho e^3} = f\left(Re, \frac{C_{Ca}}{\rho}, \frac{T_{sp,i}}{T_{ep}}\right) \quad (2.1)$$

- La deuxième étape consiste à proposer une forme mathématique pour la relation de procédé qui pourrait capter la physique des phénomènes et décrire précisément cette relation de cause à effet entre ces nombres sans dimensions.

Le phénomène d'encrassement est le résultat d'un équilibre entre l'accumulation de matières protéiques (les espèces en solution participant au dépôt) et leur disparition de la couche encrassante (détachement par bloc ou érosion). Nous pouvons donc nous attendre à ce que l'équation ci-dessous puisse corrélérer l'évolution de la masse de dépôt locale $M_{d,i}$ aux conditions opératoires :

$$\frac{M_{d,i}}{\rho \cdot e^3} = k_d \cdot A - k_r \quad (2.2)$$

avec A une constante dépendante de la concentration en calcium et des températures dans

$$l'ECP : A = g\left(\frac{C_{Ca}}{\rho}, \frac{T_{sp,i}}{T_{ep}}\right);$$

et k_d et k_r deux paramètres respectivement liés à l'accumulation et à l'élimination du dépôt à la surface. k_d et k_r sont fonction de la vitesse de circulation et donc du nombre de Reynolds ($Re = \frac{\rho \cdot v \cdot 2e}{\mu}$ avec $e = D_h/2$ et D_h est le diamètre hydraulique).

En réalisant des ajustements sur les points expérimentaux, nous pouvons montrer que le jeu de coefficients empirique ci-dessous, permet de prédire les masses de dépôt le long de l'ECP (pour une solution de WPC fixée et un profil de température dans l'échangeur donné).

$$A = \left(\frac{c_{Ca}}{\rho}\right)^{1,5} \left(\frac{T_{sp,i}}{T_{ep}}\right)^{5,9} \quad (2.3)$$

$$k_d = 9,14 Re^2 - 7,62 \cdot 10^4 Re + 2,4 \cdot 10^8 \quad (2.4)$$

$$k_r = 1,23 \cdot 10^{-3} Re^2 - 8,85 Re + 2,16 \cdot 10^4 \quad (2.5)$$

La Figure 2.8 compare la masse de dépôt simulée et expérimentale. Une concordance étroite entre le modèle et les expériences d'encrassement est observée. Ce résultat est logique puisque le nombre de paramètres du modèle (8 coefficients) est élevé.

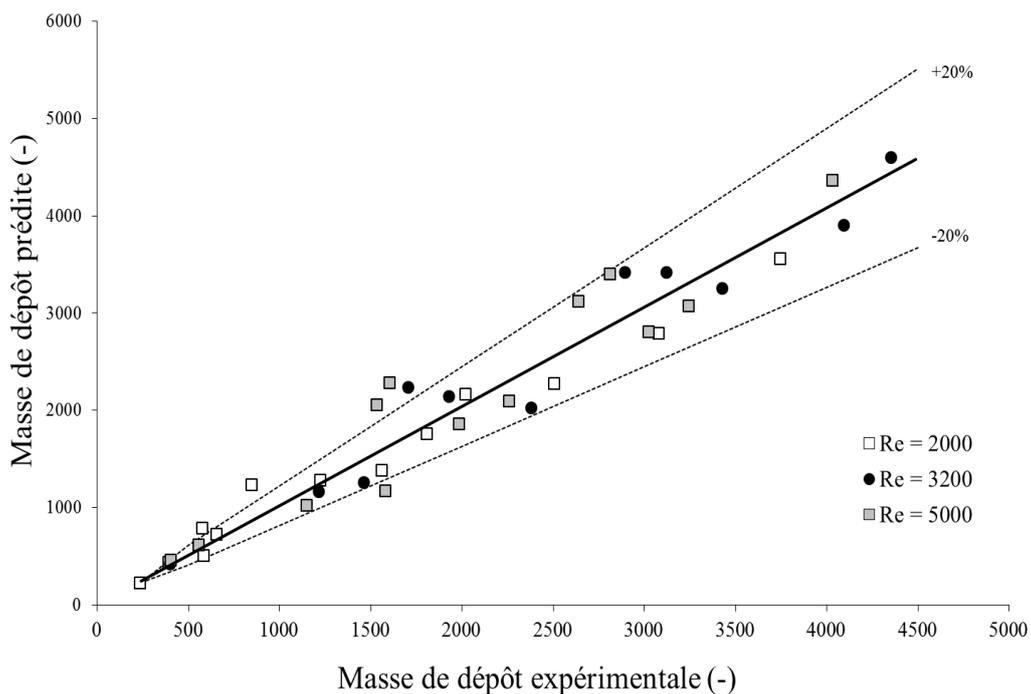


Figure 2.8. Comparaison entre les masses de dépôt par canal ($M_{d,i}/\rho \cdot e^3$) expérimentales et prédites.

Cette comparaison montre que :

- la masse de dépôt est très dépendante de la température moyenne au sein du canal (liée à la dépendance de la réaction de dénaturation avec la température) ;
- la teneur en calcium des solutions protéiques a une influence significative sur le pouvoir encrassant des solutions et une relation quantitative masse de dépôt-concentration en calcium peut être établie.

Ce modèle a néanmoins une portée limitée en termes de prédiction d'encrassement puisqu'il n'est valable que pour un temps d'essai d'encrassement donné et n'a été testé que pour un seul profil de température. Cependant, la démarche de modélisation menée est un démonstrateur qui prouve que le calcium est loin d'avoir un rôle mineur dans le phénomène d'encrassement et met en lumière qu'il est important d'intégrer cette donnée dans les modèles prédictifs.

3. Conclusion

L'exploitation de cette base de données a permis de certifier sans ambiguïté la forte influence de la teneur en calcium sur le comportement encrassant d'une solution modèle de WPC durant un traitement thermique dans un ECP.

Cependant, nous sommes toujours aveugles au terme de cette exploitation sur la relation entre les réactions chimiques en solution à l'échelle moléculaire et la formation de dépôt protéique en surface à l'échelle macroscopique.

Les cinétiques de dénaturation de ces solutions modèles (solutions de WPC à 1% p/p à différentes teneurs en calcium) n'ont pas été établies. Il est donc impossible :

- de savoir si le calcium est un élément qui affecte uniquement la réaction de dénaturation ou qui est impliqué dans la formation du dépôt par liaison des espèces protéiques constituant le dépôt. Dans cette hypothèse, existe-t-il des ratios calcium/protéine qui permettraient de diminuer les cinétiques d'encrassement ? ;
- d'établir le lien entre les résultats des masses de dépôt mesurées et la cinétique de dénaturation chaude de la β -lg.

C'est dans ce contexte que vont s'inscrire nos travaux visant à étudier les réactions chimiques de dénaturation chaude de différentes solutions modèles de β -lg et à observer leurs comportements encrassants dans des ECP à l'échelle pilote (distribution des dépôts, caractérisation de la structure des dépôts). Cependant, les essais expérimentaux de ce travail

de thèse ne seront pas réalisés avec la même référence de WPC, qui n'est plus fabriquée aujourd'hui.

Dans la base de données utilisée, un seul profil thermique a été imposé le long de l'ECP pour l'ensemble des essais d'encrassement. Nous ne sommes donc pas en capacité d'analyser le lien existant entre les profils thermiques imposées, la cinétique d'encrassement d'une solution modèle dans l'ECP et la distribution de la masse de dépôt protéique.

Partant des lacunes générales sur la compréhension du phénomène d'encrassement, nous nous sommes fixés, dans ce travail, quatre objectifs :

- 1) Identifier les cinétiques de dénaturation de solutions de β -lg contenant différentes concentrations en protéine et en calcium, à partir de la détermination des paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg (ordres de réaction, énergies d'activation, facteurs de fréquence) par des tests en laboratoire et des validations pilote. Ces essais permettront de mieux comprendre le rôle de la nature des assemblages protéiques et des teneurs en protéine et en calcium sur la réactivité chimique et de mieux identifier les mécanismes prédominants de la dénaturation chaude de la β -lg (dépliage et agrégation) et les limites de certains schémas réactionnels simplifiés et des méthodes de détermination de ces paramètres cinétiques en fonction des plages de températures étudiées. Au terme de cette analyse, nous tenterons de proposer les paramètres physico-chimiques clés à considérer (réflexion sur le rôle des ratios calcium/protéiques) pour prédire a priori la réactivité d'une solution de β -lg en présence de calcium ;
- 2) Mieux comprendre comment le profil thermique et la composition en protéine et calcium impactent les phénomènes d'encrassement. Il s'agira notamment de réaliser pour l'ensemble des solutions modèles protéiques étudiées des encrassements à l'échelle pilote pour différents profils thermiques et de mettre en relation les masses de dépôt sec obtenues avec ces paramètres de procédé ou la composition des solutions encrassantes. Quelques analyses de caractérisation des dépôts seront réalisées en appui de ces essais d'encrassement pour mieux comprendre le rôle du calcium ;
- 3) Identifier parmi les différentes espèces de β -lg générées lors du traitement thermique, celles qui sont impliquées dans la formation du dépôt, c'est à dire celles en capacité de souiller les surfaces de l'ECP et pouvant servir de marqueur du dépôt. Pour cela, nous tenterons de développer un modèle simplifié de génie de la réaction chimique simulant les concentrations des espèces protéiques présentes au sein de l'ECP et les mettrons en relation avec la distribution des masses de dépôt sec mesurées pour l'ensemble des profils thermiques imposés ;

- 4) Proposer un mode de représentation permettant de corréler la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg.

Chapitre 2 : Cinétiques de dénaturation thermique de la β -lactoglobuline des différentes solutions protéiques modèles

Dans ce chapitre, nous présentons les cinétiques de dénaturation thermique de la β -lg pour l'ensemble des solutions protéiques modèles encrassantes étudiées (chapitre 1 de la partie Matériels et Méthodes). Ce premier chapitre sur nos résultats expérimentaux a pour objectif de mieux comprendre et quantifier le rôle de la température et de la teneur en calcium sur ces cinétiques de dénaturation.

Dans un premier temps, nous appliquerons la méthode de Tolkach et Kulozik (2007) pour obtenir l'évolution de la constante k_n avec la température. Nous tracerons d'abord les graphes d'Arrhenius d'une solution modèle de WPI à 1% (p/p) à teneur en calcium total fixée (100 ppm). Nous analyserons la forme des courbes obtenues et discuterons l'impact des plages de températures sur les mécanismes réactionnels élémentaires qui apparaissent lors de la dénaturation (dépliement et agrégation). Ceci nous permettra d'obtenir un premier jeu de paramètres cinétiques (ordre de réaction, énergies d'activation et facteurs de fréquence) pour les mécanismes élémentaires de dépliement et agrégation. Nous vérifierons également sur cette solution protéique modèle que ces cinétiques de dénaturation, établies à l'échelle laboratoire (en conditions statiques) sont conformes à celles déterminées à l'échelle pilote (en conditions dynamiques).

Dans un deuxième temps, nous illustrerons le rôle de la teneur en calcium sur les cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg. Pour ce faire, nous comparerons les graphes d'Arrhenius des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) à 100 et 120 ppm de calcium total en utilisant l'approche de Tolkach et Kulozik (2007).

Afin d'illustrer que le ratio molaire calcium/protéine est un paramètre clé des cinétiques de dénaturation de la β -lg, des expériences supplémentaires en laboratoires seront menées avec des solutions protéiques à ratios molaires calcium/protéine variables (variant de 2,3 à 22,9). Les paramètres cinétiques (ordre de réaction, énergie d'activations et facteurs de fréquence) de ces expériences complémentaires de dénaturation à des ratios molaires calcium/protéine variables seront déterminés et discutés en utilisant une nouvelle fois l'approche de Tolkach et Kulozik (2007).

Enfin, une méthode, basée sur un modèle à deux réactions successives, sera également appliquée pour obtenir un deuxième jeu de paramètres cinétiques de dénaturation pour la solution protéique modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. Ce

deuxième jeu de paramètres cinétiques, différent de celui obtenu via l'approche de Tolkach et Kulozik (2007), nous sera utile un peu plus tard (dans le chapitre 3 de la partie Résultats et Discussions) pour calculer l'apparition et la disparition des espèces protéiques (native, dépliée et agrégée) le long de l'ECP étudié et comparer ces profils de concentration à ceux obtenus via le premier jeu de paramètres cinétiques.

1. Paramètres cinétiques de dénaturation thermique de la β -lg pour les différentes solutions protéiques selon le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)

Comme nous l'avons souligné dans le chapitre 3 de la partie Matériels et Méthodes, des essais de dénaturation thermique de la β -lg ont été effectués en laboratoire (conditions statiques) et au pilote (conditions dynamiques) dans le but de déterminer l'ordre de la réaction de dénaturation et l'évolution de la constante k_n avec la température.

Nous avons précédemment établi (dans le chapitre 3 de la partie Matériels et Méthodes) que l'ordre de réaction de la dénaturation chaude de la β -lg est de 1,5 pour l'ensemble des solutions modèles de WPI étudiées et ce, quelle que soit la température de dénaturation dans la plage allant de 68 à 93°C. Par conséquent, nous discuterons uniquement dans ce qui suit l'allure des graphes d'Arrhenius décrivant l'évolution de la constante k_n avec l'inverse de la température absolue.

1.1. Influence des conditions expérimentales (conditions statiques vs conditions dynamiques) sur la dénaturation de la β -lg et allure des courbes de dénaturation

La figure 4.1 représente le graphe d'Arrhenius obtenu pour un ordre de réaction de 1,5, suite à la dénaturation thermique de la β -lg de la solution protéique modèle avec 1% (p/p) de WPI et une teneur en calcium total de 100 ppm.

Sur cette figure, les dénaturations obtenues à l'échelle laboratoire (conditions statiques) et à l'échelle pilote (conditions dynamiques) sont reportées.

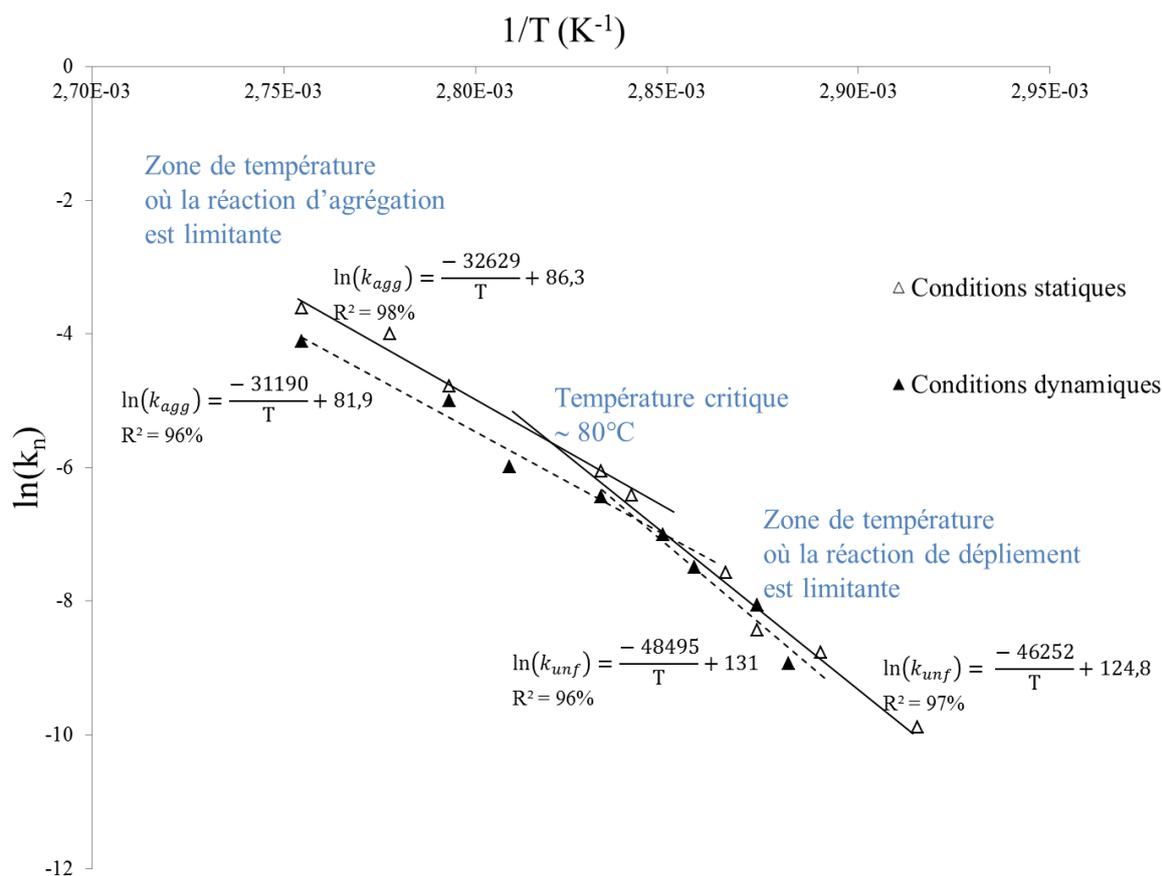


Figure 4.1. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de la solution protéique modèle de WPI à 1% (p/p) et 100 ppm de calcium total.

Les tests de dénaturation ont été réalisés à l'échelle pilote (conditions dynamiques) et à l'échelle laboratoire (conditions statiques).

La figure 4.1 confirme nos prévisions, à savoir la dépendance de la température de la constante k_n . Cette figure montre également que les courbes de dénaturation déterminées dans les conditions statiques et dynamiques sont assez proches. Cette tendance est confirmée par le calcul des paramètres cinétiques, dans les zones de dépliement et d'agrégation, reportés au tableau 4.1. Ce tableau sera commenté ultérieurement.

La figure 4.2 représente le graphe d'Arrhenius obtenu suite à la dénaturation thermique de la β -lg de la solution protéique modèle avec 1% (p/p) de WPI et une teneur en calcium total de 100 ppm. Seuls les résultats expérimentaux obtenus en conditions statiques ont été conservés. Sur cette figure, le graphe d'Arrhenius de Petit et al. (2011), obtenu pour un ordre de réaction de 1,5 suite à la dénaturation thermique d'une solution de β -lg quasi-pure (6% p/p et 264 ppm de calcium total) en conditions statiques, a également été tracé.

L'analyse de la figure 4.2 montre clairement que pour notre solution protéique et celle de Petit et al. (2011), il n'est pas possible de décrire la thermo-dépendance de k_n par une loi d'Arrhenius unique pour la plage de températures allant de 68 à 93°C.

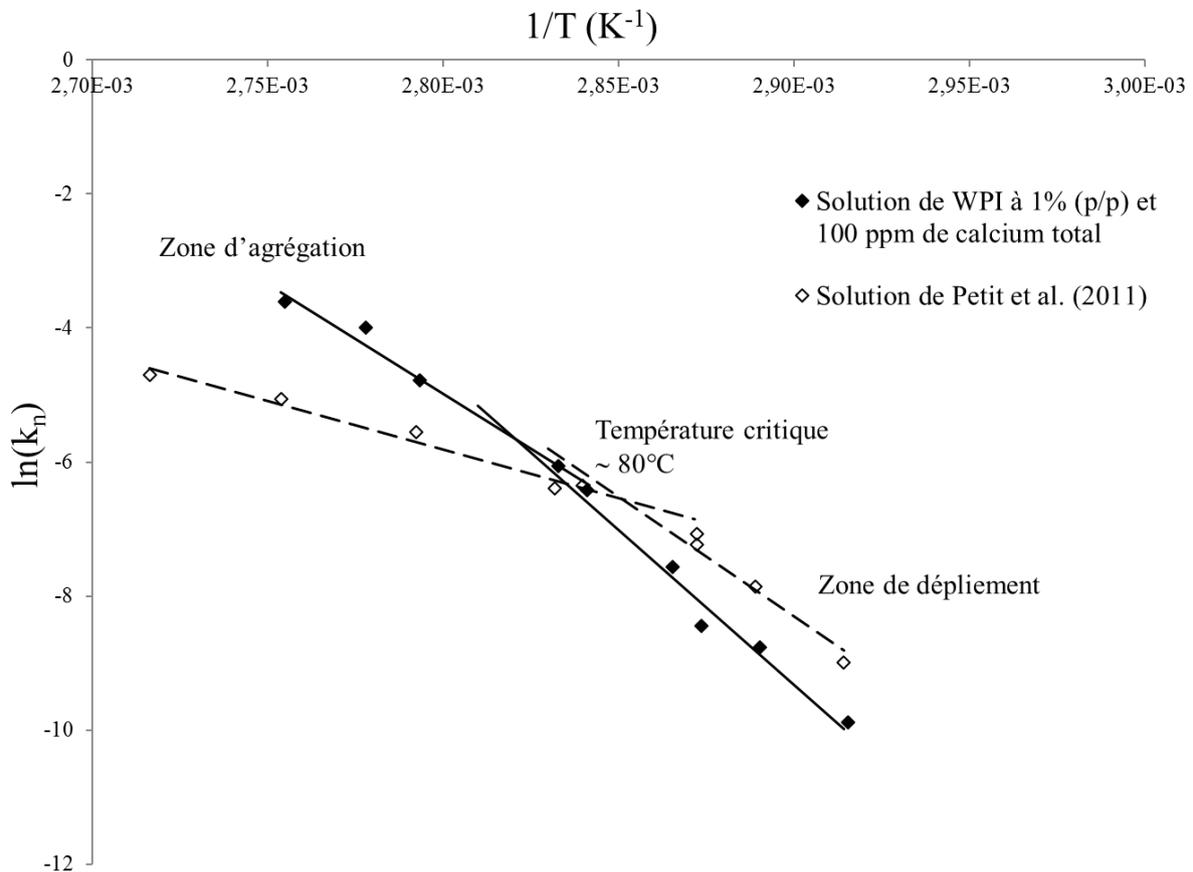


Figure 4.2. Comparaison du graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -Ig (avec un ordre de réaction de 1,5) de la solution protéique modèle de WPI à 1% (p/p) et 100 ppm de calcium total et de celui de Petit et al. (2011).

Les tests de dénaturation ont été réalisés selon des protocoles similaires en laboratoire (conditions statiques).

La figure 4.2 illustre qu'il existe deux mécanismes simultanés dans la dénaturation thermique de la β -Ig pour notre solution protéique modèle. Chacun des deux mécanismes devient tout à tour prépondérant selon la plage de températures considérée (en dessous de 80°C et au-dessus de 80°C). De ce fait, un ajustement selon la plage de températures, en dessous ou au-dessus de la température critique de 80°C, doit être réalisé pour décrire l'évolution de k_n avec la température.

On constate que si on prolonge virtuellement le segment de droite relatif au dépliement (situé sur le côté droit de la figure 4.2) dans la zone d'agrégation (située sur le côté gauche de la figure 4.2 car la zone d'agrégation se situe pour des températures au-dessus de 80°C), ce segment de droite (non représenté sur la figure 4.2) est au-dessus du segment de droite relatif à l'agrégation. Ceci signifie qu'au-dessus de la température critique de 80°C, la réaction d'agrégation est limitante car plus lente que celle de dépliement.

Par un raisonnement similaire, on constate qu'au-dessous de la température critique de 80°C, le dépliement de la β -lg est limitant ce qui signifie que cette réaction est plus lente que la réaction d'agrégation.

Ces premiers résultats sont en accord avec les travaux avec Wolz et Kulozik (2015) qui ont observé la coexistence de deux mécanismes (dépliement et agrégation) et ont signalé que leurs prédominances sont liées à l'intervalle de température. Nos résultats sont également en accord avec les travaux de Petit et al. (2011) démontrant, pour le cas d'une solution modèle de β -lg quasi-pure, que la température critique qui partage le graphe d'Arrhenius en deux parties linéaires est située aussi aux alentours de 80°C.

Cependant, la rupture de pente de $\ln(k_n)$ en fonction de $1/T$ est moins abrupte avec notre solution protéique modèle que dans le cas de Petit et al. (2011). Ceci est probablement dû à la composition différente de nos solutions protéiques : celle de Petit et al. (2011) est constituée quasi exclusivement de β -lg (à 88%) alors que l'assemblage protéique de notre solution protéique modèle est plus complexe (constituée de 66% de β -lg et de 13% d' α -la). Il est fort probable que la présence d' α -la dans la composition de la solution modèle induit des cinétiques d'agrégation radicalement différente. En effet, l' α -la est susceptible de se dénaturer dans l'intervalle de températures étudié (de 68 à 93°C) et il est établi que cette protéine peut former des liaisons covalentes (disulfure) avec la β -lg dépliée via leurs groupements thiols. De ce fait, il n'est pas surprenant d'observer un accroissement de la cinétique d'agrégation de la β -lg en présence de l' α -la, engendrant également une rupture de pente moins marquée.

D'autre part, la concentration protéique de notre solution et celle de Petit et al. (2011) sont très différentes (respectivement 1% p/p et 6% p/p). D'autres facteurs comme la teneur en calcium (respectivement 100 ppm et 264 ppm) peuvent également expliquer ces différences de comportement à la dénaturation des deux solutions protéiques. Il est établi que le calcium peut également influencer les mécanismes de dénaturation de la β -lg, comme nous l'avons montré dans le chapitre 0 (Analyse d'une base de données existante d'essais d'encrassement), soit en modifiant la force ionique et par conséquent la conformation des protéines, ou bien en développant des interactions spécifiques avec les protéines via des groupements d'acides

aminés (Petit et al., 2011). En effet, le calcium forme non seulement des complexes avec la protéine de β -lg mais aussi des ponts entre deux sous-unités protéiques (Anema et MC Kenna, 1996) favorisant ainsi l'agrégation de la β -lg (Xiong, 1992).

Le tableau 4.1 reporte les paramètres cinétiques de dénaturation (facteurs de fréquence $\ln k^\circ$ et les énergies d'activation E_A) calculés pour la solution protéique modèle étudiée aussi bien dans la zone de dépliement que dans la zone d'agrégation (notés respectivement *unf* et *agg*). Ces paramètres cinétiques de dénaturation ont été obtenus par régression linéaire suite à l'ajustement des courbes d'Arrhenius présentées à la figure 4.1. Il a été choisi ici de ne pas commenter les valeurs des facteurs de fréquence puisqu'il existe peu d'explication dans la littérature sur leur signification physique, notamment pour des réactions se produisant en milieu aqueux comme notre étude.

L'analyse du tableau montre que les paramètres cinétiques de dénaturation dans les zones de dépliement et d'agrégation sont significativement différents confirmant ainsi l'existence d'un double mécanisme (dépliement et agrégation).

Tableau 4.1. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg des essais pilote et laboratoire (avec un ordre de réaction de 1,5) et comparaison avec les valeurs rapportées dans la littérature.

Paramètre de dénaturation	Solutions modèles de WPI à 1% (p/p) et 100 ppm de calcium total				Tolkach et Kulozik (2007)
	Dannenberg et Kessler (1986)		de Jong et al. (2002)		
	Conditions statiques	Conditions dynamiques			
Dépliement					
$\ln(k_{unf}^\circ)$	124,8	131,0	86,7	86,4	98,9
$E_{A,unf}$ (kJ.mol ⁻¹)	384,5	403,2	272,5	261,4	313,9
Agrégation					
$\ln(k_{agg}^\circ)$	86,4	81,9	13,5	14,0	21,7
$E_{A,agg}$ (kJ.mol ⁻¹)	271,3	259,3	51,0	91,3	80,8

Le tableau 4.1 indique également que la valeur de $E_{A,unf}$ est plus élevée que celle de $E_{A,agg}$. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats de Dannenberg et Kessler (1986), de Jong et al. (2002), Tolkach et Kulozik (2007) et Petit et al. (2011) pour leurs solutions de protéines sériques à différents teneurs en calcium (teneurs non répertoriées excepté dans les travaux de

Petit et al. (2011)). Ces auteurs ont indiqué que la barrière d'énergie à franchir pour la réaction de dépliement est plus importante que celle nécessaire à l'agrégation, ce qui expliquerait le fait que $E_{A,unf} > E_{A,agg}$.

Etant donné que les paramètres cinétiques déterminés en conditions dynamiques et statiques sont très proches, nous avons choisi de réaliser uniquement des essais statiques pour déterminer les paramètres cinétiques de dénaturation des autres solutions protéiques modèles. Ceci se justifie car cette méthode est plus facile à mettre en œuvre. Dans ce qui suit, nous allons analyser l'influence du calcium sur les cinétiques de dénaturation pour d'autres solutions protéiques modèles. Nous commençons par la solution protéique modèle ayant la même concentration en β -lg, à savoir : 1% (p/p).

1.2. Influence de la teneur en calcium sur la dénaturation thermique de la β -lg

La figure 4.3 compare les graphes d'Arrhenius (obtenus pour un ordre de réaction de 1,5), suite à la dénaturation thermique de la β -lg de solutions protéiques modèles avec 1% (p/p) de WPI et des teneurs en calcium total égales à 100 et 120 ppm.

L'analyse de la figure 4.3 montre que, pour la solution protéique à 1% (p/p) contenant 120 ppm de calcium total, le graphe d'Arrhenius est décalé en ordonnées vers des valeurs plus élevées de k_n . Ce résultat illustre que l'évaluation de la teneur exacte en calcium total des solutions protéiques modèles est loin d'être sans importance car elle impacte grandement la réaction de dénaturation chaude de la β -lg. Cette augmentation d'aptitude à la dénaturation de la β -lg avec l'augmentation de la teneur en calcium des solutions protéiques est en adéquation avec les travaux (Simons et al., 2002 ; O'Kennedy et Mounsey, 2009). En effet, ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la teneur en calcium de solutions de protéines sériques entraînait des changements conformationnels dans la structure de la β -lg ou un écrantage des charges des protéines, favorisant ainsi les réactions de dépliement et d'agrégation.

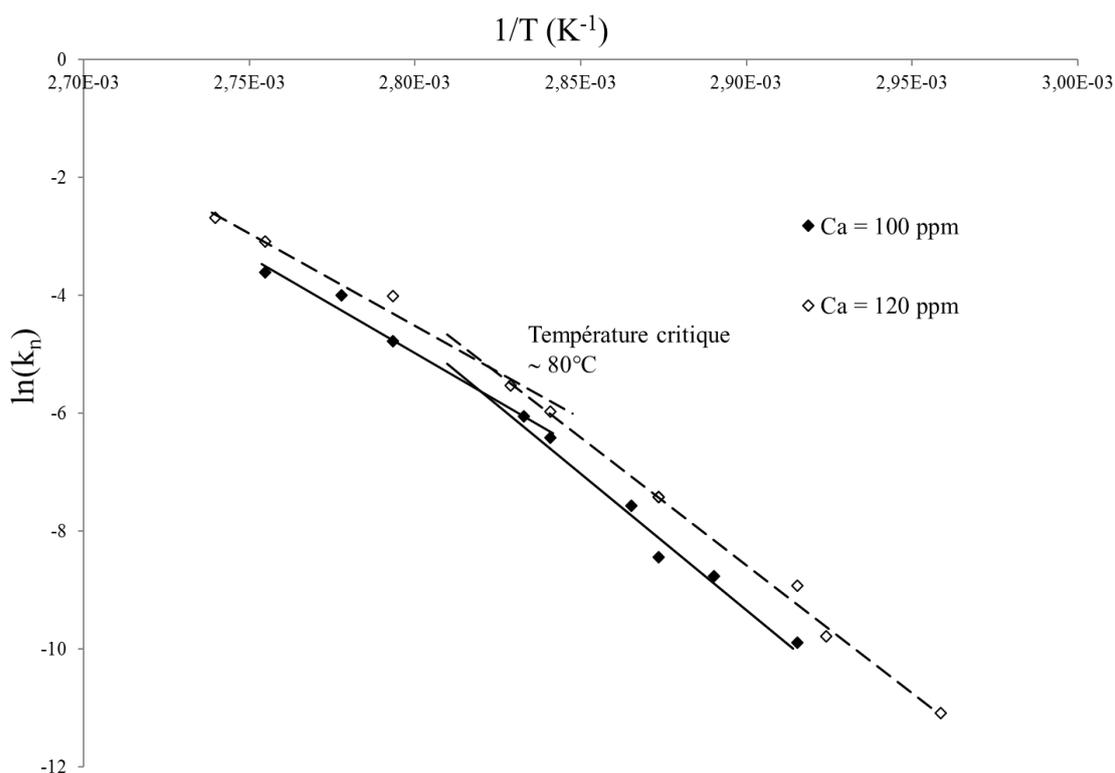


Figure 4.3. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de solutions modèles de WPI à 1% (p/p) et à différentes teneurs en calcium total (100 et 120 ppm).

Le tableau 4.2 représente les énergies d'activation et les facteurs de fréquence calculés à partir de la figure 4.3 en appliquant la méthode décrite dans le chapitre 3 de la partie Matériels et Méthodes.

Tableau 4.2. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg de solutions modèles de WPI à 1% (p/p) et à différentes teneurs en calcium total (100 et 120 ppm) (avec un ordre de réaction de 1,5).

Paramètre de dénaturation	100 ppm de calcium total	120 ppm de calcium total
Déplieiment		
$\ln(k_{unf}^{\circ})$	124,8	117,3
$E_{A,unf}$ (kJ.mol ⁻¹)	384,5	360,8
Agrégation		
$\ln(k_{agg}^{\circ})$	86,4	83,2
$E_{A,agg}$ (kJ.mol ⁻¹)	271,3	260,4

L'analyse du tableau 4.2 montre clairement que les énergies d'activation des étapes de dépliage et d'agrégation diminuent significativement lorsque la teneur en calcium de la solution protéique modèle augmente. Ce résultat illustre que les barrières énergétiques nécessaires à l'initiation de ces deux étapes de la réaction de dénaturation sont plus simples à franchir dès lors que la teneur en calcium de la solution protéique augmente.

La diminution de la valeur de $E_{A,unf}$ de 384,5 à 360,8 kJ.mol⁻¹, à respectivement 100 et 120 ppm de calcium total, pourrait être expliquée par l'action protectrice du calcium envers les molécules de β -lg dépliées (Verheul et al., 1998). En effet, selon ces auteurs, les molécules de β -lg présentent une stabilité thermique maximale à 100 ppm de calcium total en raison de la répulsion intramoléculaire réduite entre les acides aminés chargés, ainsi qu'à la formation de liaisons hydrogènes supplémentaires (Tolkach et Kulozik, 2005). A 120 ppm de calcium total, une forte dissociation des acides aminés chargés entraîne un accroissement des répulsions intramoléculaires, conduisant ainsi à la déstabilisation de la molécule de β -lg et une baisse de l'énergie d'activation.

Dans la zone où l'agrégation est limitante, la valeur de l'énergie d'activation $E_{A,agg}$ semble diminuer plus faiblement avec l'augmentation de la teneur en calcium (passant respectivement de 271,3 à 260,4 kJ.mol⁻¹ de 100 à 120 ppm de calcium total). Simons et al., (2002) et O'Kennedy et Mounsey (2009) ont proposé des hypothèses pour expliquer l'agrégation favorisée de la β -lg en présence de calcium dans la solution modèle de WPI. Selon ces auteurs, le calcium se ponte aux molécules de β -lg dépliées, neutralisant ainsi la charge de surface et modifiant les interactions ioniques entre les molécules de β -lg dépliées.

Les effets de l'augmentation de la teneur en calcium sur la dénaturation chaude de la β -lg reportés à la figure 4.3 et au tableau 4.2 pour nos deux solutions modèles de WPI à 1% (p/p) avec 100 et 120 ppm de calcium total (constituée de 66% de β -lg et de 13% d' α -la) sont également conformes à ceux de Petit et al. (2011) établis avec une solution de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) et 264 ppm de calcium total (constituée de 88% de β -lg). En effet, la figure 4.4 et le tableau 4.3, extraits de la publication de Petit et al. (2011), montrent que les tendances observées lors de nos expériences de dénaturation concernant l'effet du calcium sont également présentes pour cette solution protéique plus simple.

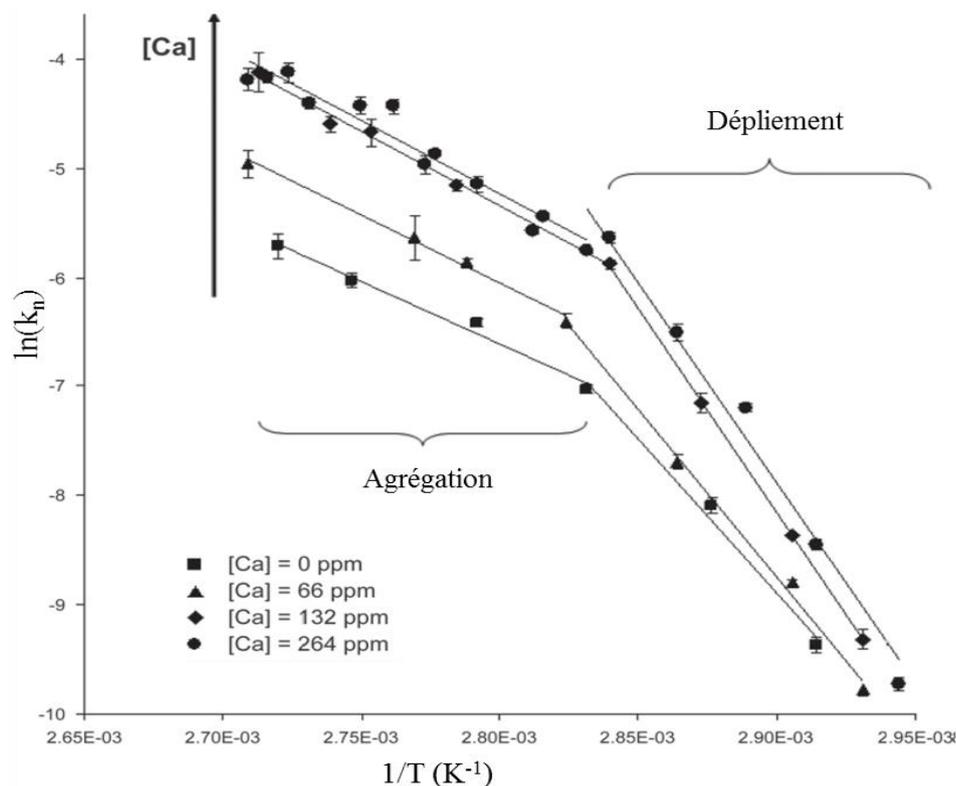


Figure 4.4. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) d'une solution de β -lg quasi-pure contenant différentes teneurs en calcium (Petit et al., 2011).

Tableau 4.3. Paramètres cinétiques de dénaturation d'une solution de β -lg quasi-pure contenant différentes teneurs en calcium total (Petit et al., 2011).

Paramètre de dénaturation	Teneur en calcium (ppm)			
	0	66	132	264
Déploiement				
$\ln(k_{unf}^{\circ})$	72,9	79,9	100,3	98,4
$E_{A,unf}$ (kJ.mol ⁻¹)	234,5	254,0	311,1	304,7
Agrégation				
$\ln(k_{agg}^{\circ})$	25,4	28,8	32,8	32,1
$E_{A,agg}$ (kJ.mol ⁻¹)	95,0	103,5	113,2	111,0

Nos résultats expérimentaux sur l'étude de la dénaturation thermique de la β -lg, croisés avec les travaux de la communauté scientifique, nous permettent d'affirmer que pour les solutions protéiques modèles étudiées, le calcium est un constituant en capacité d'accroître la cinétique des deux étapes de dénaturation protéique (déploiement, agrégation).

D'après la littérature, le calcium est un agent qui modifie les répulsions intramoléculaires et favorise le pontage des molécules de β -lg dépliées selon l'histoire en température subie par la solution protéique. Cependant, pour de faibles concentrations en β -lg ou de fortes concentrations en calcium, il pourrait avoir un rôle négligeable. Il est fort probable par exemple que les interactions calcium- β -lg soient dépendantes du ratio molaire calcium/protéine.

Si tel est le cas, le ratio molaire calcium/protéine devrait être considéré plutôt que la concentration seule en protéine des solutions pour évaluer l'aptitude à la dénaturation d'une solution protéique modèle. Nous allons tenter d'infirmer ou de confirmer ces hypothèses en analysant l'influence du ratio molaire calcium/protéine sur la dénaturation thermique de la β -lg en réalisant d'autres expériences de dénaturation (en conditions statiques). Pour ce faire, des solutions protéiques modèles avec des ratios calcium/protéine variables seront élaborées. Ces solutions seront obtenues en variant la teneur en protéine des solutions et en gardant la concentration de calcium total inchangée.

1.3. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la dénaturation thermique de la β -lg

La figure 4.5 représente les graphes d'Arrhenius de dénaturation de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) pour les solutions modèles à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 2,5% (p/p) contenant une teneur en calcium total de 100 ppm. La plage de températures couverte par les graphes d'Arrhenius varie de 68 à 93°C.

Pour l'ensemble des solutions protéiques modèles testées, la figure 4.5 confirme certaines prévisions attendues pour les courbes d'Arrhenius de dénaturation chaude de la β -lg, à savoir :

- l'existence de deux mécanismes simultanés (dépliage et agrégation) pour la dénaturation ;
- une température critique de 80°C, délimitant les zones de prédominance des deux mécanismes.

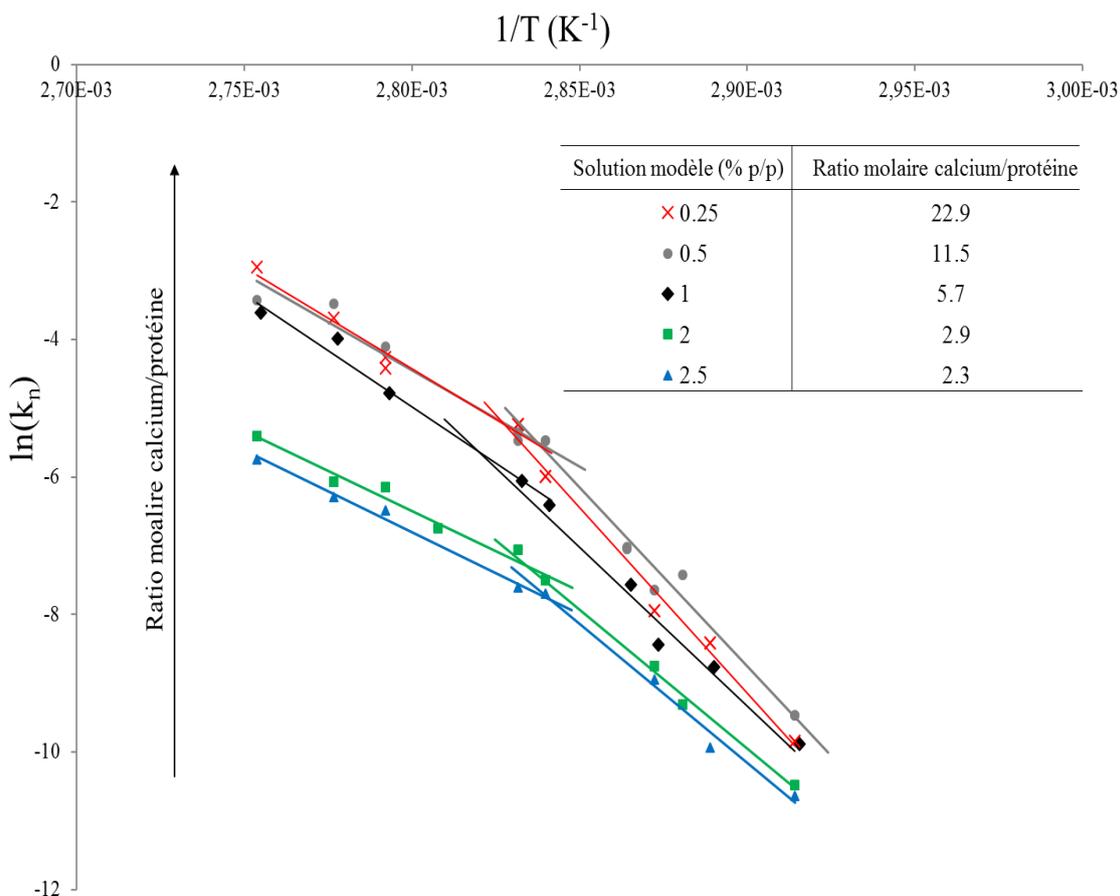


Figure 4.5. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation thermique de la β -lg de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et différentes teneurs en WPI (allant de 0,25 à 2,5% p/p).

Ces solutions protéiques modèles ont ainsi des ratios molaires calcium/protéine variant de 2,3 à 22,9.

L'analyse des différentes courbes d'Arrhenius en fonction de la concentration en protéine des solutions modèles de WPI (variant de 0,25 à 2,5% p/p) montre que la cinétique de dénaturation de la β -lg diminue considérablement lorsque la concentration en protéine de la solution modèle augmente (passant de 0,25% p/p à 2,5% p/p). Ce résultat est plutôt inattendu et en contradiction avec les travaux de Wolz et Kulozik (2015) rapportant que plus la concentration en β -lg de la solution est élevée, plus la réactivité chimique de la solution est importante.

Cette analyse montre clairement que la réactivité (en termes de dénaturation) d'une solution protéique ne se prédit pas seulement à partir de la connaissance de la concentration en β -lg. D'autres facteurs de composition comme l'environnement physico-chimique (pH, force ionique, etc.) et la teneur en calcium doivent être plus systématiquement précisés dans

les bases de données de dénaturation pour espérer hiérarchiser les solutions protéiques en termes de réactivité.

L'analyse des graphes d'Arrhenius en fonction du ratio molaire calcium/protéine des solutions modèles (variant de 2,3 à 22,9) montre en revanche que le ratio molaire calcium/protéine semble être un paramètre plus adéquat pour classer les solutions protéiques en termes de réactivité. En effet, les évolutions $\ln(k_n)$ versus $1/T$ sont presque parallèles à la fois dans les zones limitantes de dépliement et d'agrégation. Les courbes apparaissent simplement décalées en ordonnée en fonction de la valeur du ratio molaire calcium/protéine. Précisément, les cinétiques de dénaturation de la β -lg augmentent significativement lors de l'augmentation du ratio molaire calcium/protéine. Ainsi, on constate que la dénaturation de la solution modèle de WPI à 0,25% (p/p) est très élevée en raison de son fort ratio molaire calcium/protéine, comparé à celui de la solution modèle à 2,5% (p/p).

Ces résultats montrant que le ratio molaire calcium/protéine influence significativement le niveau de réactivité d'une solution protéique. Ceci est en accord avec les travaux de Sherwin et Foegeding (1997), qui ont démontré que l'agrégation est influencée par le rapport $\text{CaCl}_2/\text{protéine}$ stœchiométrie, plutôt que les concentrations en Ca^{2+} et en protéine séparément.

Bien que les graphes d'Arrhenius des solutions modèles de WPI soient classés en fonction du rapport molaire calcium/protéine, on constate sur la figure 4.5 que l'accroissement de k_n (observé sur les cinétiques de dénaturation) n'est pas proportionnel au rapport molaire calcium/protéine. En effet, l'analyse de la figure 4.5 semble indiquer l'existence d'un seuil au-delà duquel une augmentation du ratio molaire calcium/protéine a peu d'effet sur l'augmentation de la dénaturation. Ce seuil est visible pour les valeurs élevées de ratios molaires calcium/protéine. On constate que pour les deux solutions modèles de WPI ayant le ratio molaire le plus élevé (11,5 et 22,9 correspondant aux solutions protéiques à 0,5 et 0,25% p/p), les courbes de dénaturation sont quasiment confondues. Ceci est particulièrement vrai dans la zone limitante d'agrégation. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Simons et al. (2002) suggérant que les ions de calcium peuvent se lier à des carboxylates avec un certain seuil d'affinité.

L'analyse approfondie des graphes d'Arrhenius en fonction du ratio molaire calcium/protéine des solutions protéiques modèles, montre que les courbes ne subissent pas rigoureusement et systématiquement un simple décalage en valeur sur l'axe des ordonnées et ne peuvent pas être considérées comme une famille de courbes parallèles sur l'ensemble de

la plage de températures. En effet, pour certaines solutions modèles de WPI à forts ratios molaires calcium/protéine, telle que la solution à 0,25% (p/p), le décalage observé sur l'axe des ordonnées de la zone limitante de dépliement est légèrement différent de celui de la zone limitante d'agrégation. Malheureusement, aucune explication ne peut être avancée en l'état des travaux pour expliquer ce changement de pente dans la phase de dépliement.

Pour l'ensemble des solutions protéiques modèles testées (à teneur en calcium total fixe égale à 100 ppm et à teneur en protéine variable de 0,25% à 2,5% p/p), les paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg (facteurs de fréquence $\ln k^\circ$ et énergies d'activation E_A des réactions de dépliement et d'agrégation) sont résumés dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg (avec un ordre de réaction de 1,5) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et à différentes teneurs en WPI (allant de 0,25 à 2,5% p/p).

Paramètres de dénaturation	Solutions modèles de WPI étudiées (% p/p)				
	0,25	0,5	1	2	2,5
	Ratio molaire calcium/protéine				
	22,9	11,5	5,7	2,9	2,3
Dépliement					
$\ln(k_{unf}^\circ)$	147,8	141,8	124,8	107,1	107,5
$E_{A,unf}$ (kJ.mol ⁻¹)	449,8	431,6	384,5	335,7	337,2
Agrégation					
$\ln(k_{agg}^\circ)$	78,2	74,2	86,4	58,6	59,7
$E_{A,agg}$ (kJ.mol ⁻¹)	245,5	233,5	271,3	193,3	197,6

Pour ces solutions à différentes teneurs en protéine (de 0,25% à 2,5% p/p), l'analyse du tableau 4.4 traduit quantitativement que les paramètres cinétiques de dénaturation dans les zones limitantes de dépliement et d'agrégation sont significativement différents, confirmant la généralité du double mécanisme proposé lors de la dénaturation de la β -lg. Le tableau 4.4 confirme aussi que pour ces solutions à teneur en protéine variable, l'énergie d'activation nécessaire au dépliement reste plus élevée et plus importante que celle nécessaire à l'agrégation.

L'analyse du tableau 4.4 montre également que l'énergie d'activation nécessaire au dépliement ($E_{A,unf}$) est une fonction monotone croissante du ratio molaire calcium/protéine. L'augmentation significative de $E_{A,unf}$ (de 193,3 à 245,5 kJ.mol⁻¹) avec l'augmentation des ratios molaires calcium/protéine (de 2,3 à 22,9) indique que la réaction de dépliement a besoin de plus d'énergie pour son initiation lorsque le ratio molaire calcium/protéine augmente. Ceci s'explique par le fait que le calcium joue un rôle de protection des molécules de β -lg natives en perturbant les liaisons non covalentes de ces molécules. Par ailleurs, on constate que les énergies d'activation obtenues dans la réaction de dépliement sont très élevées (de l'ordre de 300 kJ.mol⁻¹), indiquant ainsi que la réaction de dépliement correspond à la rupture de liaisons hydrogènes ou hydrophobes (Petit et al., 2011).

Par ailleurs, l'analyse du tableau 3.3 montre que l'énergie d'activation nécessaire à l'agrégation présente un extremum en fonction du ratio molaire calcium/protéine. On observe tout d'abord une augmentation de $E_{A,agg}$ de 197,6 à 271,3 kJ.mol⁻¹ quand le ratio calcium/protéine passe de 2,3 à 5,7. Puis, une diminution de l'énergie d'activation de 271,3 à 245,5 kJ.mol⁻¹ quand le ratio molaire calcium/protéine passe de 5,7 à 22,9. Nous ne sommes pas en mesure d'émettre des hypothèses sur l'origine des interactions complexes calcium-protéine induisant ces changements d'énergie d'activation dans la phase d'agrégation. La réponse à ces questions va bien au-delà des objectifs initiaux de ce travail de thèse qui consistait à déterminer les paramètres cinétiques de dénaturation (ordre de réaction $n = 1,5$; facteurs de fréquence $\ln(k_{unf}^{\circ})$ et $\ln(k_{agg}^{\circ})$; énergies d'activation $E_{A,unf}$ et $E_{A,agg}$) des réactions de dépliement et d'agrégation pour être en mesure de :

- i) calculer la concentration des espèces protéiques (native, dépliée, agrégée) dans l'ECP en fonction du profil thermique appliqué ;
- ii) lier les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation (k_{unf} et k_{agg}) aux masses de dépôts encrassants.

2. Paramètres cinétiques de dénaturation thermique de la β -lg pour les différentes solutions protéiques modèles selon le modèle avec deux réactions successives

Dans ce qui suit, nous reportons les valeurs obtenues pour le deuxième jeu de paramètres cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg ($n_1, k_1, E_{A_1}, n_2, k_2, E_{A_2}$) pour la solution protéique modèle avec 1% (p/p) de WPI et 100 ppm de calcium total. En effet, comme nous l'avons

indiqué en préambule de ce sous-chapitre, une autre méthode que celle de Tolkach et Kulozik (2007), basée sur un modèle à deux réactions successives, a été appliquée (cf. chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes) pour obtenir un deuxième jeu de paramètres cinétiques de dénaturation.

Ce deuxième jeu de paramètres cinétiques sera mobilisé dans le chapitre 3 de la partie Résultats et Discussions pour calculer les concentrations des espèces protéiques obtenues au sein de l'ECP. Celles-ci seront comparées à celles obtenues en utilisant le jeu de paramètres cinétiques obtenus via l'approche de Tolkach et Kulozik (2007).

Bien que la méthode Tolkach et Kulozik (2007) constitue la référence quand on identifie un jeu de paramètres cinétiques de dénaturation d'une solution protéique laitière, cette comparaison a été jugée nécessaire car cette méthodologie se différencie des méthodes de génie chimique classiques lors de la réalisation des bilans de populations concernant l'apparition et la disparition des espèces protéiques. En effet, Tolkach et Kulozik (2007) identifient deux constantes de dénaturation à partir d'un mécanisme supposé mono-étape (disparition des espèces solubles) et les utilisent pour calculer la concentration des espèces N , U et A via l'introduction d'une constante de dépliement (α). Cette approche est peu commune en génie chimique, où on a l'habitude d'associer à l'apparition de chaque espèce (ici U et A), au moins une constante réactionnelle (ici k_1 et k_2 provenant du schéma réactionnel à deux réactions successives supposé en amont).

La figure 4.6 représente le graphe d'Arrhenius de la solution modèle de WPI à 1% (p/p) et une teneur en calcium total de 100 ppm dans l'intervalle de températures allant de 70 à 90°C, à partir du modèle avec deux réactions successives et en fixant $n_1 = n_2 = 1,5$ pour les deux réactions.

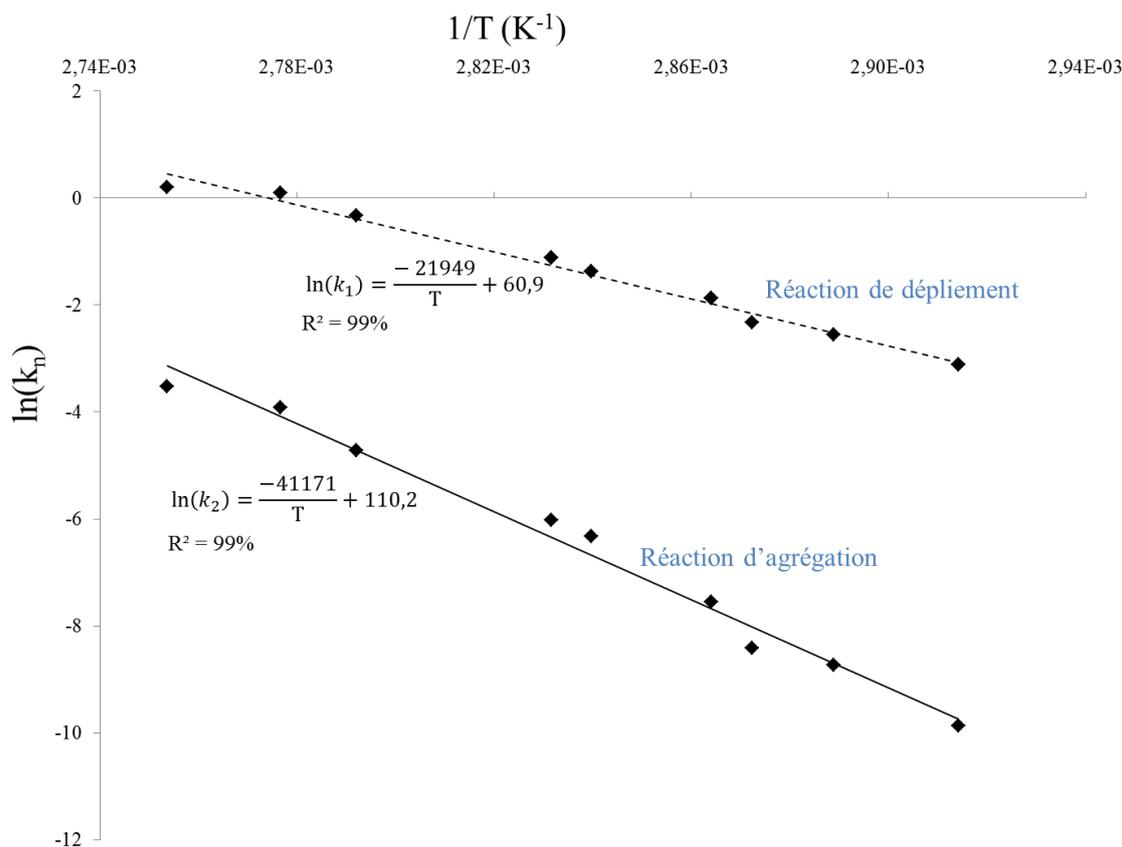


Figure 4.6. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg avec le modèle de deux réactions successives en fixant $n_1 = n_2 = 1,5$ pour à la fois la réaction de déplieement et d'agrégation.

Le modèle à deux réactions successives proposé pour décrire la réaction de dénaturation chaude de la β -lg est très différent du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) (cf. chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes). Les valeurs des paramètres cinétiques (k_1 et k_2) ne peuvent donc pas être directement comparées à k_{unf} et k_{agg} . De plus, à notre connaissance, aucune valeur de k_1 et k_2 n'est reportée dans la littérature ce qui nous empêche de comparer nos valeurs avec d'autres. L'analyse de la figure 4.6 permet néanmoins d'observer que contrairement au modèle de Tolkach et Kulozik (2007), pour chaque température de dénaturation, la constante cinétique de déplieement est toujours supérieure à la constante cinétique d'agrégation.

La figure 4.7 représente le graphe d'Arrhenius de la solution modèle de WPI à 1% (p/p) et une teneur en calcium total de 100 ppm dans l'intervalle de températures allant de 70 à 90°C, à partir du modèle de deux réactions successives et en fixant $n_1 = 1$ pour la réaction de déplieement et $n_2 = 2$ pour l'agrégation.

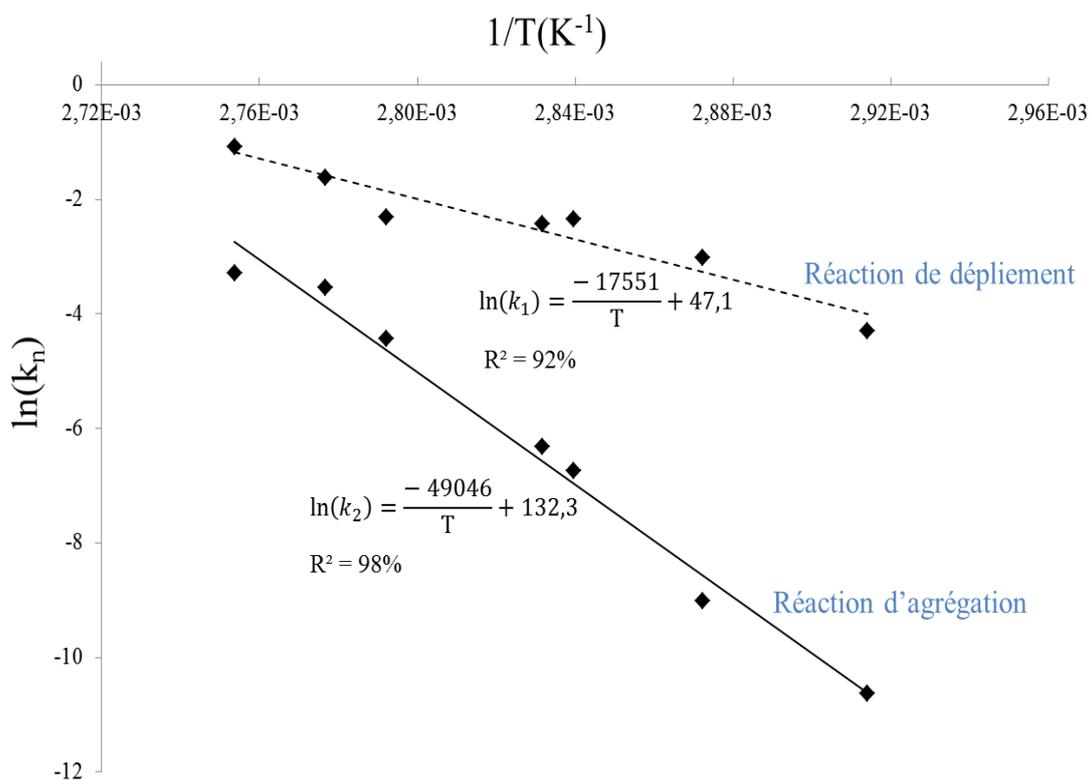


Figure 4.7. Graphe d'Arrhenius de la dénaturation chaude de la β -lg avec le modèle de deux réactions successives en fixant $n_1 = 1$ pour la réaction de dépliement et $n_2 = 2$ pour l'agrégation.

Le tableau 4.5 représente les énergies d'activation et les facteurs de fréquence des réactions de dépliement et d'agrégation avec le modèle de deux réactions successives obtenus à partir des graphes d'Arrhenius des figures 4.6 et 4.7. Les paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg sont assez proches pour les différents ordres de réaction fixés (tableau 4.5). Cependant, les valeurs des paramètres cinétiques de la réaction de dépliement sont significativement différentes de ceux de l'agrégation. C'est notamment le cas de E_A à $n_1 = n_2 = 1,5$ qui passe du simple au double de la réaction de dépliement à l'agrégation (de 182,5 à 342,3 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par le modèle de Tolkach et Kulozik (2007), pour lesquels nous avons montré que l'énergie d'activation de la réaction de dépliement est nettement supérieure à celle calculée à l'agrégation. Ceci signifie cette fois que la barrière énergétique à franchir pour créer de l'agrégation est supérieure à celle au dépliement.

Tableau 4.5. Paramètres cinétiques de dénaturation de la β -lg à partir du modèle de deux réactions successives.

Paramètre de dénaturation	Modèles de deux réactions successives	
	$n_1 = n_2 = 1,5$	$n = 1$ et $n = 2$
Déplieiment		
$\ln(k_1^\circ)$	60,9	47,1
E_{A_1} (kJ.mol ⁻¹)	182,5	145,9
Agrégation		
$\ln(k_2^\circ)$	110,2	132,3
E_{A_2} (kJ.mol ⁻¹)	342,3	407,8

Les paramètres cinétiques de dénaturation (ordres de réaction n_1 et n_2 , facteurs de fréquence $\ln(k_1^\circ)$ et $\ln(k_2^\circ)$, énergies d'activation E_{A_1} et E_{A_2}) présentés dans le Tableau 4.5 seront mobilisés dans le chapitre 3 de la partie Résultats et Discussions. Ils seront utilisés pour calculer les constantes cinétiques de dépliement et d'agrégation (k_1 et k_2) et pour évaluer la concentration des espèces protéiques dans l'ECP en fonction du profil thermique appliqué.

3. Conclusion

L'influence des conditions expérimentales (conditions statiques et dynamiques), de la teneur en calcium total (100 et 120 ppm) et du ratio molaire calcium/protéine (de 2,3 à 22,9) sur la dénaturation chaude de la β -lg de différentes solutions modèles de WPI ont été étudiées dans l'intervalle de températures allant de 68 à 93°C.

Les différents graphes d'Arrhenius obtenus à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) ont montré pour l'ensemble des solutions modèles étudiées que :

- le mécanisme général de dénaturation de la β -lg est constitué de deux réactions, à savoir : le dépliement et l'agrégation, séparées par une température critique de l'ordre de 80°C qui correspond à la transition entre l'intervalle de températures où la zone de dépliement est limitante et l'intervalle de températures où la zone d'agrégation est limitante ;
- l'augmentation de la teneur en calcium pour une teneur en protéine fixée influence fortement les mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg ;
- le ratio molaire calcium/protéine semble être un indicateur pertinent pour appréhender la réactivité en termes de dénaturation de nos solutions protéiques modèles.

Les exploitations des résultats expérimentaux de dénaturation ont permis de disposer de deux jeux de paramètres cinétiques qui seront utilisés dans la suite de ce travail de thèse pour la prédiction à la fois des différentes espèces de β -lg (native, dépliée et agrégée), à partir de la connaissance du profil thermique appliqué, mais aussi pour établir des liens entre la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP et les mécanismes de dénaturation sous-jacents des solutions protéiques testées.

Chapitre 3 : Encrassement des échangeurs de chaleur à plaques par les solutions protéiques modèles étudiées

Dans ce chapitre, nous discutons les encrassements obtenus lors de traitements thermiques en ECP pour l'ensemble des solutions protéiques modèles encrassantes formulées (chapitre 1 de la partie Matériels et Méthodes) et caractérisées en termes de dénaturation (chapitre 1 de la partie Résultats et Discussions).

Pour faciliter la lecture du document, nous ne présenterons pas systématiquement l'ensemble des essais. Un tableau de synthèse rassemblant toutes les conditions opératoires des différents essais d'encrassement et les masses de dépôts associées est cependant donné en annexe (tableau A.1).

Dans un premier temps, nous tenterons d'illustrer l'impact des paramètres de formulation (teneur en calcium des solutions protéiques) et de procédé (profils thermiques) sur la distribution de la masse de dépôt sec dans un ECP et sur l'aspect visuel du dépôt encrassant. Pour ce faire, nous analyserons les résultats bruts après 2 heures d'essai d'encrassement, pour différents profils thermiques imposés au sein de l'ECP étudié (pour une vitesse de circulation fixée des solutions encrassantes) et pour des solutions encrassantes à teneur en protéine fixée (1% p/p) contenant différentes teneurs en calcium (100 et 120 ppm).

Nous illustrerons également l'influence des paramètres de formulation et de procédé sur la dynamique de formation de dépôt (via l'observation de l'évolution de la résistance thermique d'encrassement avec le temps lors de ces essais).

Ensuite, nous montrerons l'intérêt d'utiliser le ratio molaire calcium/protéine (plutôt que la concentration seule en protéine des solutions) pour évaluer le pouvoir encrassant d'une solution modèle. Pour cela, nous analyserons des essais d'encrassement supplémentaires (réalisés avec des solutions protéiques à teneur en calcium fixée de 100 ppm et différentes concentrations en protéine allant de 0,25 à 2,5% p/p).

Enfin, nous tenterons de sonder les premières couches de dépôt de différentes solutions protéiques modèles ayant différents ratios molaires calcium/protéine afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu à fort et à faible ratio molaire calcium/protéine.

Le but de cette analyse sera d'illustrer l'évolution de la structure du dépôt en fonction du ratio molaire calcium/protéine.

1. Influence du profil thermique sur la distribution de la masse de dépôt sec dans l'échangeur de chaleur à plaques

1.1. Cas de la configuration de l'ECP de 5 canaux

La figure 4.8 représente la distribution des masses de dépôt sec obtenues expérimentalement dans l'ECP à 5 canaux (section 1.1 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes) pour les différents profils thermiques imposés (figure 3.4 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes), pour une des solutions protéiques modèles étudiées (solution de WPI à 1% p/p avec une teneur en calcium total de 100 ppm).

La numérotation des canaux de 1 à 5 traduit l'ordre de passage du fluide protéique dans l'ECP comme indiqué à la figure 3.3 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes.

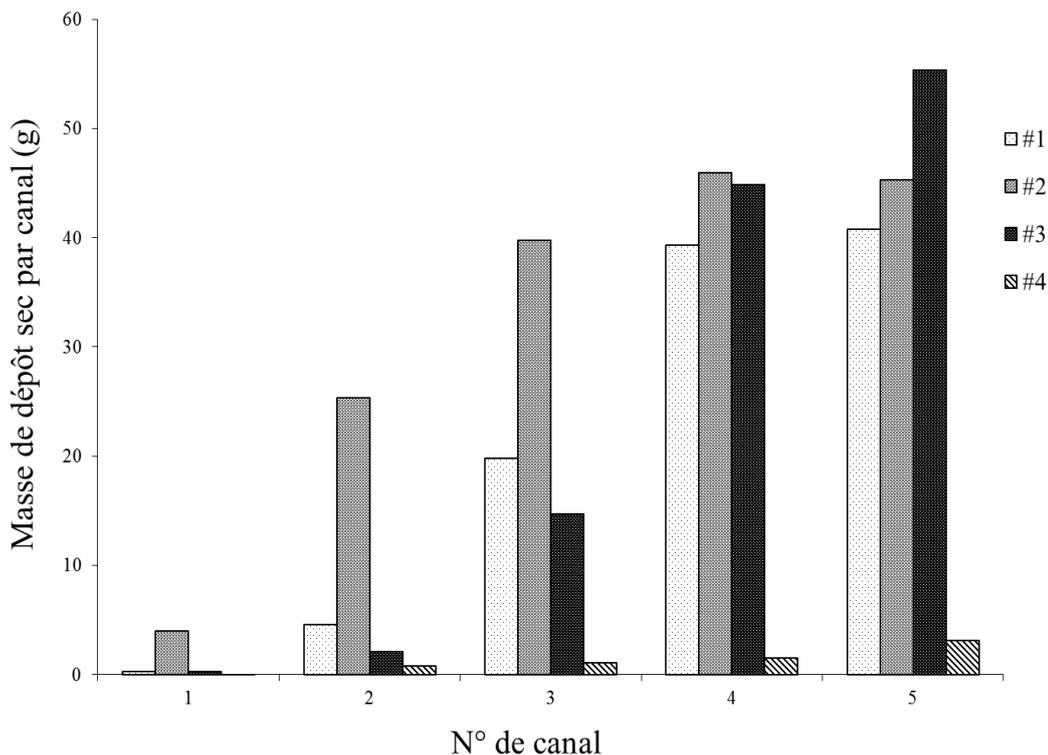


Figure 4.8. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP d'une configuration de 5 canaux pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm.

La figure 4.8 illustre que le dépôt sec formé n'est pas uniforme tout au long des canaux successifs de l'ECP. La masse de dépôt sec dans chaque canal est clairement impactée par le profil thermique imposé (#1 à #4) qui modifie la température moyenne du canal.

Pour l'ensemble des profils thermiques imposés, on constate que la masse de dépôt est une fonction croissante monotone le long des canaux de l'ECP. La masse de dépôt atteint sa valeur maximale dans le 5^{ème} canal (allant jusqu'à 55,3 g pour le profil thermique #3). Ceci illustre que la masse de dépôt par canal est fortement corrélée à la température moyenne du canal, ce qui est logique compte tenu de l'effet observé de la température sur les cinétiques de dénaturation de la solution protéique modèle étudiée (figure 4.2 chapitre 1 de la partie Résultats et Discussions). Ceci est notamment vrai pour le profil thermique #4, avec lequel la masse de dépôt sec par canal est très faible en comparaison avec celle obtenue pour les autres profils thermiques, et pour lequel la température finale en sortie de l'ECP atteinte par ce profil thermique (74°C) était plus faible par rapport aux trois autres profils thermiques étudiés ($\approx 84^\circ\text{C}$ en moyenne).

La figure 4.8 indique également que les mécanismes de dépôt sont accélérés lorsque la température dépasse une température critique, au-delà de 70°C. En effet, lorsque la température du canal est inférieure à 70°C, très peu de dépôt par canal est reporté (moins de 1 g de dépôt par canal pour 2h d'essai d'encrassement). C'est notamment le cas dans le 1^{er} canal de l'ECP pour les profils thermiques #1 et #3 où les températures moyennes de canal sont de l'ordre de 67°C et les masses de dépôt sec par canal obtenues sont de 0,3 g. Cependant, dès que la température du canal devient supérieure à 70°C, la masse de dépôt sec obtenue augmente significativement quel que soit le canal (4,5 g dans le 2^{ème} canal pour 71°C de température moyenne avec le profil thermique #1). On observe ainsi que des valeurs importantes de masses de dépôt sec peuvent être obtenues dès les trois premiers canaux de l'ECP. En effet, les masses de dépôt par canal collectées dans les trois premiers canaux de l'ECP dans le cas du profil thermique #2 sont deux à trois fois supérieures à celles obtenues pour les profils thermiques #1 et #3. Ce résultat s'explique par le fait que pour le profil thermique #2, les températures moyennes atteintes dans les premiers canaux de l'ECP (passant de 68°C dans le 1^{er} canal à 74°C dans le 2^{ème} canal pour atteindre 79°C dans le 3^{ème} canal) sont supérieures de plusieurs degrés à celles induites par les profils de température #1 et #3 (la température moyenne de l'ordre de 67°C dans le 1^{er} canal et n'atteignant qu'un maximum de 76°C dans le 3^{ème} canal).

Les photographies de dépôts formés (figures 4.9 et 4.10) dans les différents canaux successifs de l'ECP étudié (subissant une température de canal moyenne croissante) illustrent aussi qu'au-delà d'une température moyenne de canal critique de 70°C, les mécanismes de formation du dépôt sont nettement plus conséquents. On constate également que le dépôt blanc et spongieux correspond bien au dépôt de type A décrit par Burton (1968).



*Figure 4.9. Dépôt formé dans le 2^{ème} canal de l'ECP pour le profil thermique # 1
(température moyenne du canal = 71°C).*



*Figure 4.10. Dépôt formé dans le 5^{ème} canal de l'ECP pour le profil thermique # 1
(température moyenne du canal = 84°C).*

En conclusion, toutes ces observations indiquent clairement que la distribution de la masse de dépôt dans l'ECP est significativement influencée par la température et qu'une température de canal critique proche de 70°C induit une formation de dépôt nettement plus prononcée.

Ces résultats étaient néanmoins prévisibles puisque la réaction de dénaturation thermique de la β -Ig (dépliage et agrégation) d'une solution protéique (contenant du calcium) est dépendante de la température (Petit et al., 2013) et n'a lieu qu'à des températures supérieures à 70°C (Lyster, 1970 ; Dannenberg, 1986 ; Bradley et al., 1989 et Delplace et al., 1994). Ces conclusions concernant l'effet de la température moyenne du canal sur la masse de dépôt ont également été observées pour d'autres solutions protéiques modèles et ne seront pas présentées ici.

1.2. Cas de la configuration de l'ECP de 10 canaux

La figure 4.11 représente la distribution de la masse de dépôt sec dans un ECP à 10 canaux (cf. section 1.2 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes) pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm et ce, pour différents profils thermiques (représentés à la figure 3.7 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes). Seuls trois profils thermiques ont été réalisés avec cette configuration d'ECP à 10 canaux, à savoir les profils thermiques #1, #2, #4. Le profil thermique #3 exigeait une température d'entrée de l'eau chaude très élevée (supérieure à 110°C) qui était, avec cette configuration, impossible à maintenir durant les 2 heures de l'essai d'encrassement.

Dans le cas de la configuration d'ECP à 10 canaux, le temps de séjour dans l'ECP est le double de la configuration à 5 canaux.

La numérotation des canaux de 1 à 10 correspond à celle de la figure 3.6 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes.

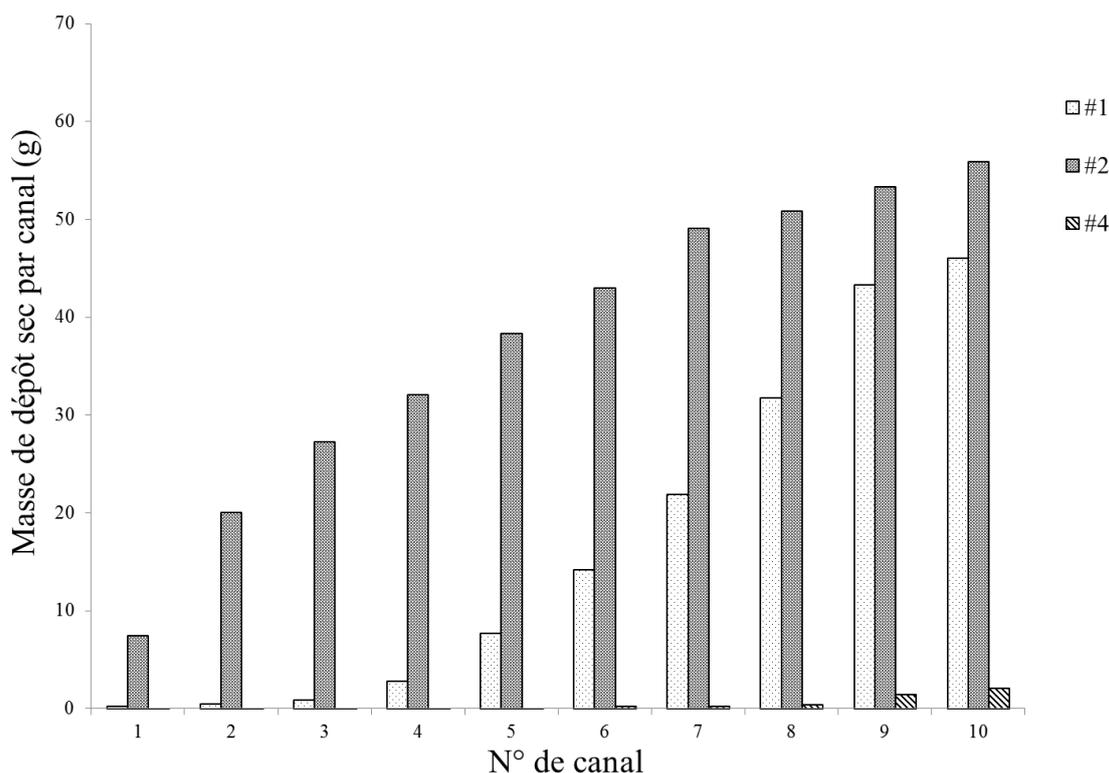


Figure 4.11. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP d'une configuration de 10 canaux pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm.

La figure 4.11 montre que, pour cette configuration d'ECP et les trois profils thermiques étudiés, la masse de dépôt sec par canal est également une fonction monotone croissante dans l'ECP pour atteindre une valeur maximale dans le 10^{ème} canal (allant jusqu'à 55,9 g pour le profil thermique #2).

Ces résultats, observés dans le cas d'une configuration d'ECP de 10 canaux, confirment l'effet de la température sur la masse de dépôt induite. Dans le cas du profil thermique #1, on observe que la masse de dépôt par canal varie de 0,2 g (1^{er} canal) à 47,7 g (10^{ème} canal). Ces masses de dépôt par canal correspondent respectivement à une température moyenne de 66 et 85°C.

Les masses de dépôt obtenues dans les différents canaux de l'ECP dans le cas du profil thermique #2 sont nettement plus importantes que celles du profil thermique #1. Ceci est conforme aux prévisions. En effet, les températures moyennes dans les 10 canaux de l'ECP sont nettement plus élevées pour le profil thermique #2, accélérant fortement la distribution de la masse de dépôt dans chaque canal de l'ECP.

La figure 4.11 montre une nouvelle fois que la masse de dépôt obtenue, dans le cas du profil thermique #4, est la plus faible enregistrée. En effet, la formation de dépôt n'est observée qu'à 74°C correspondant à la température moyenne du 9^{ème} canal de l'ECP et atteint un maximum de 2,1 g dans le 10^{ème} canal à 75°C. La température de sortie du produit étant très faible (75°C), l'encrassement de l'ECP commence donc plus tard (dans les dernières passes de l'ECP).

Toutes ces observations peuvent une nouvelle fois être reliées aux mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg. En effet, plus la température moyenne de la solution modèle est élevée, plus la β -lg est dénaturée rapidement (chapitre 1 de la partie Résultats et Discussions). De plus, plus la température est élevée, plus l'étape d'agrégation limite la réaction.

A haute température (> 74°C), la β -lg dénaturée est disponible en quantité suffisante dès les premières passes pour former une couche de dépôt sur les parois chaudes de l'ECP.

Bien que le temps de séjour dans l'ECP soit le double de celui de la configuration à 5 canaux, la distribution de la masse de dépôt dans l'ECP reste principalement influencée par la température. On constate également avec cette seconde configuration, qu'une température moyenne de canal supérieure à 70°C est nécessaire pour obtenir une masse de dépôt conséquente après 2 heures d'encrassement.

2. Influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt sec par canal et la masse totale de dépôt collectée dans l'échangeur de chaleur à plaques

2.1. Influence de la teneur en calcium sur la distribution de la masse de dépôt sec par canal pour différents profils thermiques

La figure 4.12 représente la distribution de la masse de dépôt sec obtenue expérimentalement dans l'ECP à 5 canaux (section 1.1 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes) pour deux solutions modèles de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 et 120 ppm et ce, pour les différents profils thermiques #1 à #4 (représentés à la figure 3.4 du chapitre 2 de la partie Matériels et Méthodes).

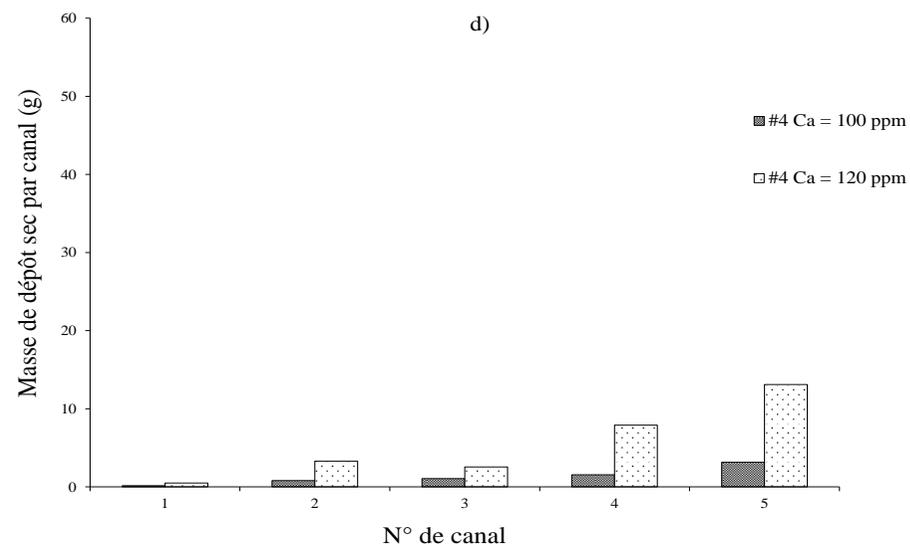
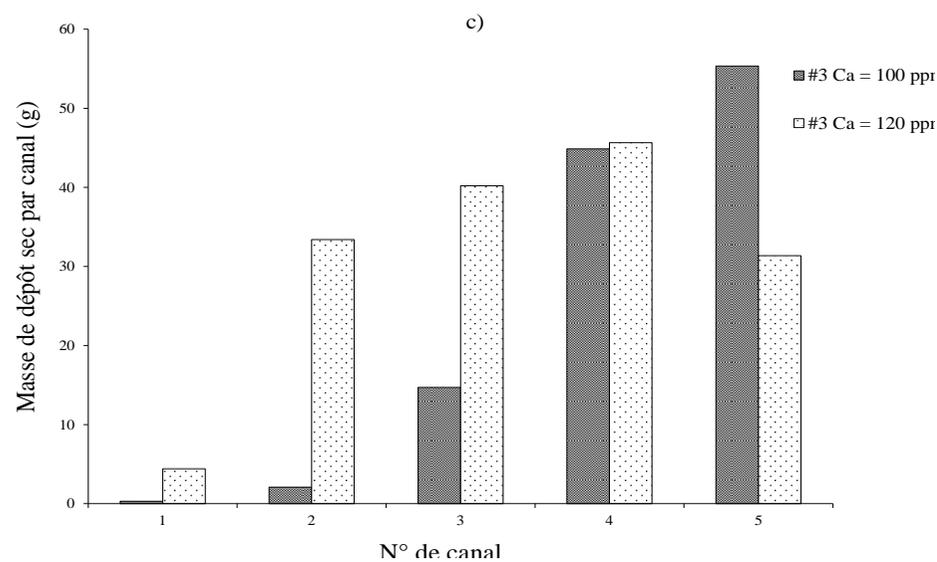
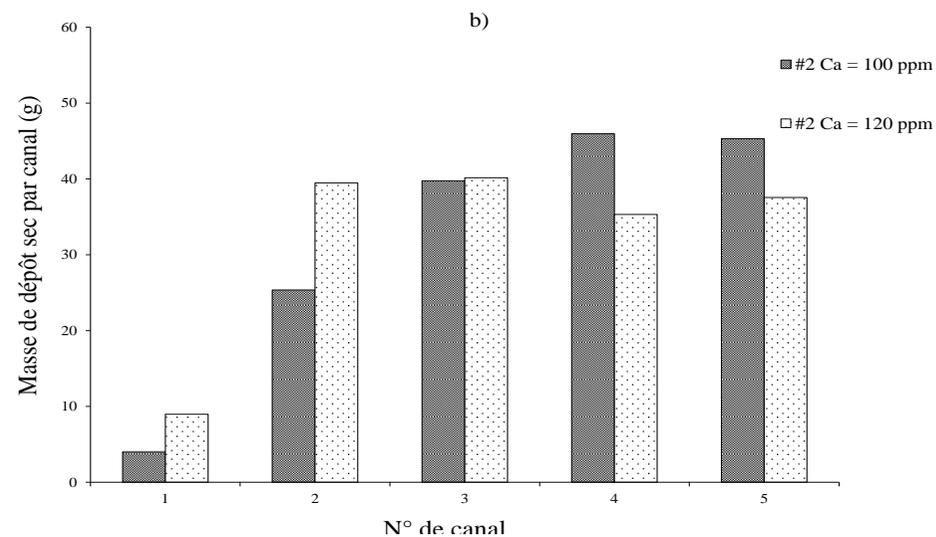
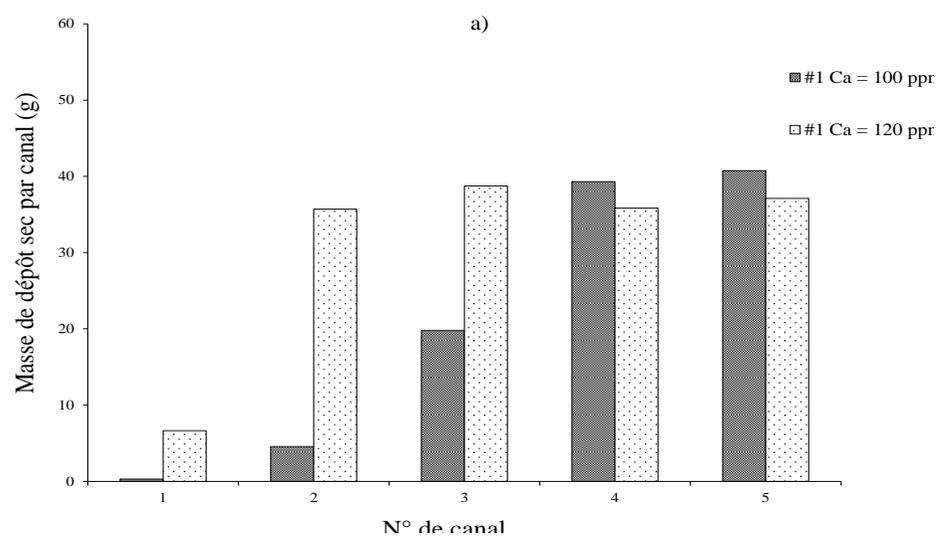


Figure 4.12. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ou 120 ppm.

Chaque vignette correspond à un profil de température différent : a) pour le profil thermique #1, b) pour le profil thermique #2, c) pour le profil thermique #3 et d) pour le profil thermique #4.

Comme pour la solution protéique modèle précédente à 100 ppm de calcium (figure 4.8), on constate sur la figure 4.12 que le profil thermique #4 génère une augmentation monotone de la masse de dépôt par canal tout au long des canaux de l'ECP pour atteindre un maximum de 13,1 g dans le 5^{ème} canal de l'ECP. Cette faible masse de dépôt par canal s'explique par la faible concentration de la β -lg dénaturée générée à ces faibles températures (d'une température moyenne de 61°C dans le 1^{er} canal à 74°C dans le dernier canal de l'ECP). Ceci suggère une nouvelle fois que la protéine se dépose sur les parois chaudes de l'ECP uniquement quand la température en solution est suffisamment élevée pour générer la dénaturation de la β -lg.

Pour cette nouvelle solution protéique à teneur en calcium plus élevée (120 ppm au lieu de 100 ppm), on constate également que la masse de dépôt par canal reste fortement influencée par le profil thermique. Cependant, contrairement à la solution protéique de 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm (figure 4.8), l'évolution de la masse de dépôt sec par canal avec la température n'est plus une fonction strictement croissante mais semble atteindre une valeur plateau d'environ 40g.

Cette valeur plateau de dépôt sec est atteinte dès que la température moyenne dépasse 68–74°C (ce qui correspond à la température moyenne atteinte dans le 2^{ème} canal de l'ECP pour les trois profils de température #1 à #3). Cette valeur plateau de masse de dépôt semble indiquer qu'il existe une limite maximale de l'encrassement avec la température au sein de l'ECP pour cette solution protéique modèle. Ceci n'était pas le cas pour la solution protéique avec une teneur plus faible en calcium (solution de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total de 100 ppm).

Cette première analyse permet donc d'affirmer que la composition en calcium des solutions protéiques induit des changements sur les mécanismes de formation de dépôt. De ce fait, selon la teneur en calcium de la solution protéique, on pourra à une température fixée atteindre plus ou moins rapidement une valeur plateau de masse de dépôt par canal au sein de l'ECP.

L'analyse de la figure 4.12 met en évidence que pour l'ensemble des profils thermiques imposés, la forte croissance du dépôt sec par canal a lieu dans une plage de température très étroite (entre 68°C et 74°C). Cette plage de températures correspond aussi à celle où on observe le démarrage de la réaction de dénaturation de la β -lg. En effet, [68°C–74°C] correspond à l'intervalle de températures où la réaction de dénaturation de la β -lg devient significative (Daufin et al., 1987 ; Linmark-Mansson et al., 2005).

2.2. Influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt totale pour différents profils thermiques

La figure 4.13 représente l'influence de la teneur en calcium sur la masse de dépôt sec totale dans l'ECP pour les solutions modèles de WPI à 1% (p/p) contenant 100 et 120 ppm de calcium total.

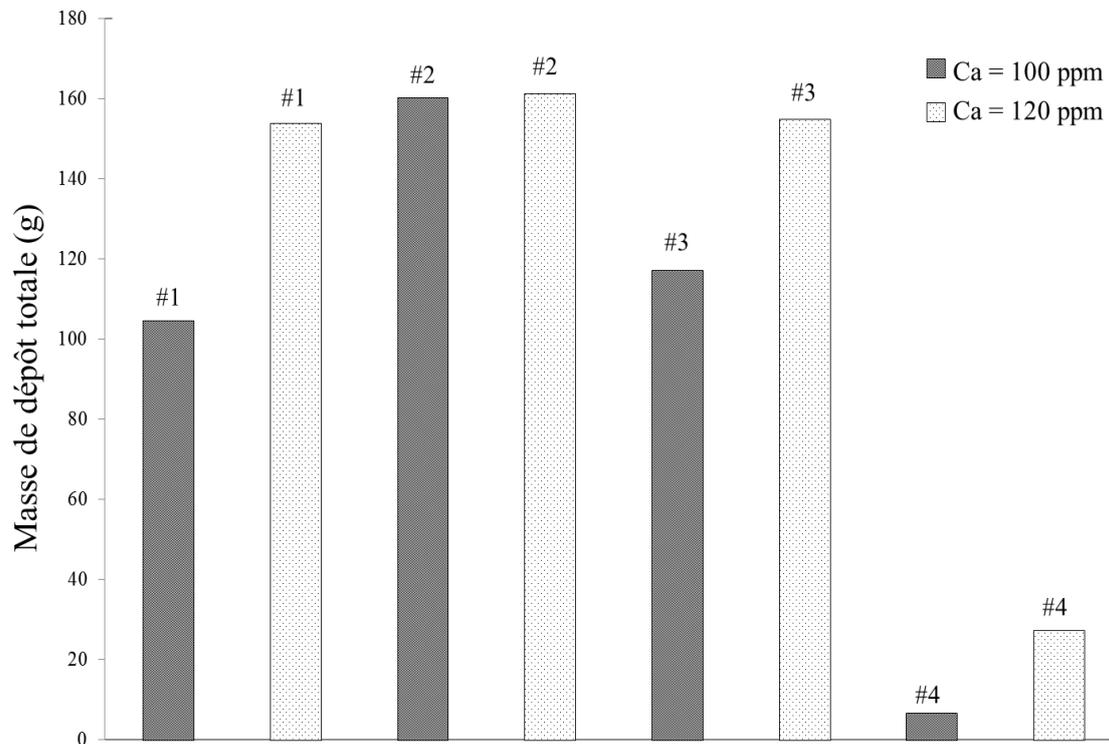


Figure 4.13. Masse de dépôt totale obtenue dans l'ECP pour des solutions modèles de WPI à différentes teneurs en calcium total (100 et 120 ppm) et différents profils thermiques.

La figure 4.13 montre que, pour les mêmes températures d'entrée et de sortie du produit (profils thermiques #1 à #4), la masse de dépôt totale est fortement impactée selon la concentration en calcium. C'est notamment le cas du profil thermique #1 dont la masse de dépôt totale passe de 104,7 g à 100 ppm de calcium total à 154,1 g à 120 ppm de calcium total. Cette tendance a également été observée pour les profils thermiques #3 et #4. Cependant, pour le profil thermique #2, les masses de dépôt totales obtenues à 100 et 120 ppm de calcium total sont très proches (respectivement 160,4 et 161,4 g).

Par ailleurs, pour les solutions protéiques à teneur en calcium plus élevée (120 ppm au lieu de 100 ppm), on constate également que la masse de dépôt par canal reste fortement influencée par le profil thermique.

3. Influence du profil thermique et de la teneur en calcium sur la résistance thermique d'encrassement

La figure 4.14 représente l'évolution de la résistance thermique d'encrassement avec le temps lors d'un traitement thermique dans l'ECP des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) avec une teneur en calcium total 100 et 120 ppm, pour les différents profils thermiques imposés (#1 à #4).

Conformément à ce qui est prévisible, cette figure montre que la résistance thermique d'encrassement augmente linéairement avec le temps de traitement pour l'ensemble des essais d'encrassement. Cependant, la pente de ces courbes est très différente selon le profil thermique appliqué (#1 à #4) et la teneur en calcium total (100 ou 120 ppm) des solutions protéiques de WPI à 1% (p/p).

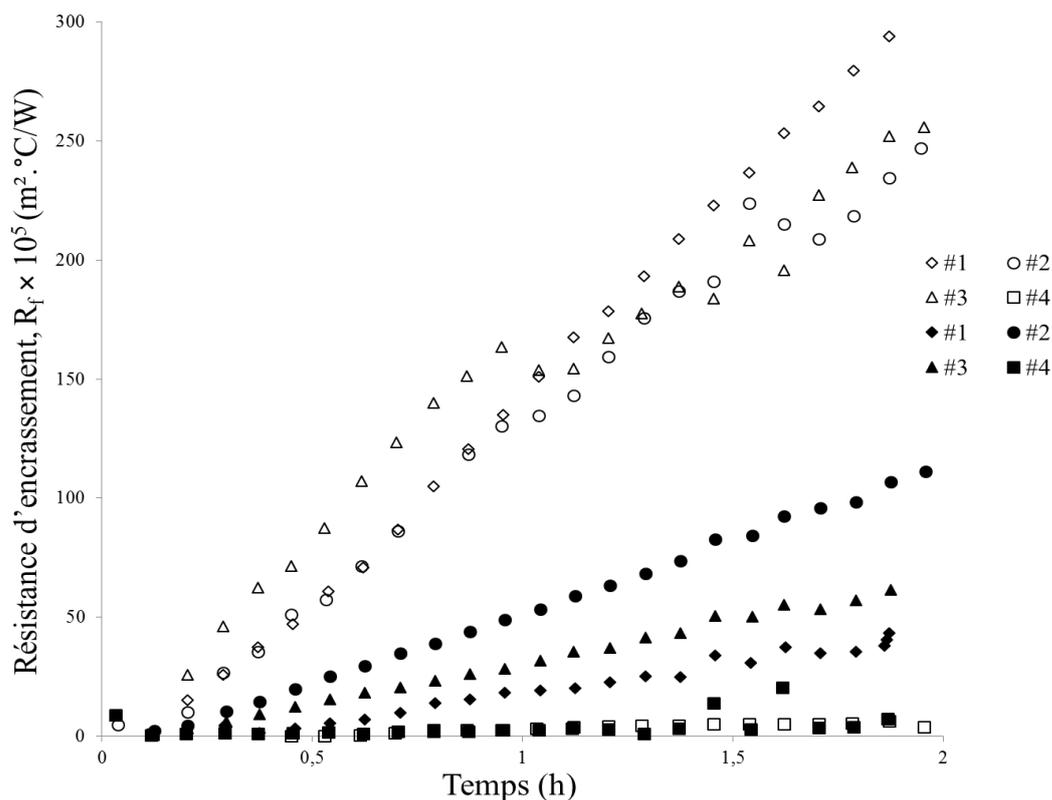


Figure 4.14. Evolution de la résistance thermique d'encrassement dans le temps au sein de l'ECP à différents profils thermiques pour des solutions de WPI à 1% (p/p) contenant différentes teneurs en calcium total (100 ppm : symboles pleins ; 120 ppm : symboles vides).

La figure 4.14 indique clairement que, la résistance d'encrassement croît quand la concentration en calcium de la solution protéique modèle augmente (cas des profils thermiques #1 à #3).

Cependant, cette augmentation de la résistance thermique n'est pas toujours significative (cas du profil thermique #4) et dépend aussi du profil thermique imposé. Par exemple, pour le profil thermique #4 (61–74°C), les courbes des résistances thermiques d'encrassement correspondant aux concentrations en calcium de 100 et 120 ppm sont superposées.

Ces observations sont conformes aux résultats observés dans le chapitre 0 (Analyse d'une base de données existante d'essais d'encrassement) soulignant que la dynamique de dépôt dépend fortement de la teneur en calcium. Ces résultats sont également en accord avec les travaux de Daufin et al. (1987), Xiong (1992) et Simons et al. (2002) qui ont montré que le calcium peut interagir avec le groupe carboxyle des acides aspartique et glutamique de la β -lg et favoriser par conséquent la croissance du dépôt en stabilisant les agrégats. Simmons et al. (2007) ont indiqué que le calcium serait à l'origine de la croissance du dépôt laitier et de la modification de l'aspect de ce dernier dans l'intervalle de températures allant de 75 à 90°C. Par ailleurs, Pappas et Rothwell (1991) ont montré que lors d'un traitement thermique (80–110°C) d'une solution de β -lg avec du calcium, la protéine s'agrège totalement pour former des structures compactes.

Nos propres résultats expérimentaux obtenus sur des solutions de protéines sériques reconstituées (Promilk 852 FB1 ; WPI 1% p/p à 100 et 120 ppm de calcium total) confortent nos résultats préliminaires obtenus à partir de l'analyse d'une base de données existantes d'essais d'encrassement réalisés avec d'autres solutions protéiques modèles (WPC 75 ; WPC 1% p/p avec 70 à 87,4 ppm de calcium).

Ces résultats montrent sans contestation que si des facteurs physiques (température moyenne dans le canal) ont bien une influence sur la formation du dépôt, certains paramètres de composition jusqu'ici très peu pris en considération dans la prédiction du potentiel encrassant de solutions protéiques (comme la teneur en calcium) jouent également un rôle clé qui ne peut être négligé.

Il est désormais clair avec ces essais d'encrassement sur des solutions protéiques modèles que la teneur en calcium : (i) impactent fortement les distributions de masses de dépôt par canal et la masse totale de dépôt collectée dans l'ECP et (ii) influencent significativement la dynamique de formation de dépôt et la structure.

Ces résultats, croisés avec les travaux rapportés dans la littérature, nous permettent d'ores et déjà d'émettre l'hypothèse que le calcium est un agent en capacité de lier les protéines constituant les couches supérieures de dépôt et les protéines dénaturées en solution, entraînant une formation accélérée d'encrassement des surfaces.

Ainsi, pour certains scénarii, le calcium facilitera la formation du dépôt. Dans certains cas cependant, le calcium pourra avoir un rôle négligeable. Il est fort probable par exemple que lorsque le taux de dénaturation est très faible (faible concentration en protéine native ou traitement thermique peu dénaturant), la concentration en protéines dénaturées limite la progression du dépôt. Ceci pourrait expliquer les très faibles valeurs de masse de dépôt sec par canal, de masse totale de dépôt et de résistance thermique d'encrassement observées pour le profil thermique #4 (traitement thermique très peu sévère).

Si tel est le cas, le ratio molaire calcium/protéine devrait être considéré plutôt que la concentration seule en protéine des solutions modèles pour évaluer le pouvoir encrassant d'une solution. Nous allons tenter d'infirmer ou confirmer ces hypothèses en analysant l'influence du ratio molaire calcium/protéine sur la distribution des dépôts en réalisant d'autres essais d'encrassement avec des solutions protéiques modèles ayant des ratios molaire calcium/protéine maîtrisés.

4. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la masse de dépôt sec par canal et la masse totale de dépôt collectée dans l'ECP

4.1. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la distribution de la masse de dépôt sec pour un profil thermique fixé

La figure 4.15 représente les masses de dépôt obtenues dans chaque canal de l'ECP pour les solutions protéiques modèles à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 2,5% (p/p) contenant une teneur en calcium total de 100 ppm et en imposant le même profil thermique #1 au sein de l'ECP.

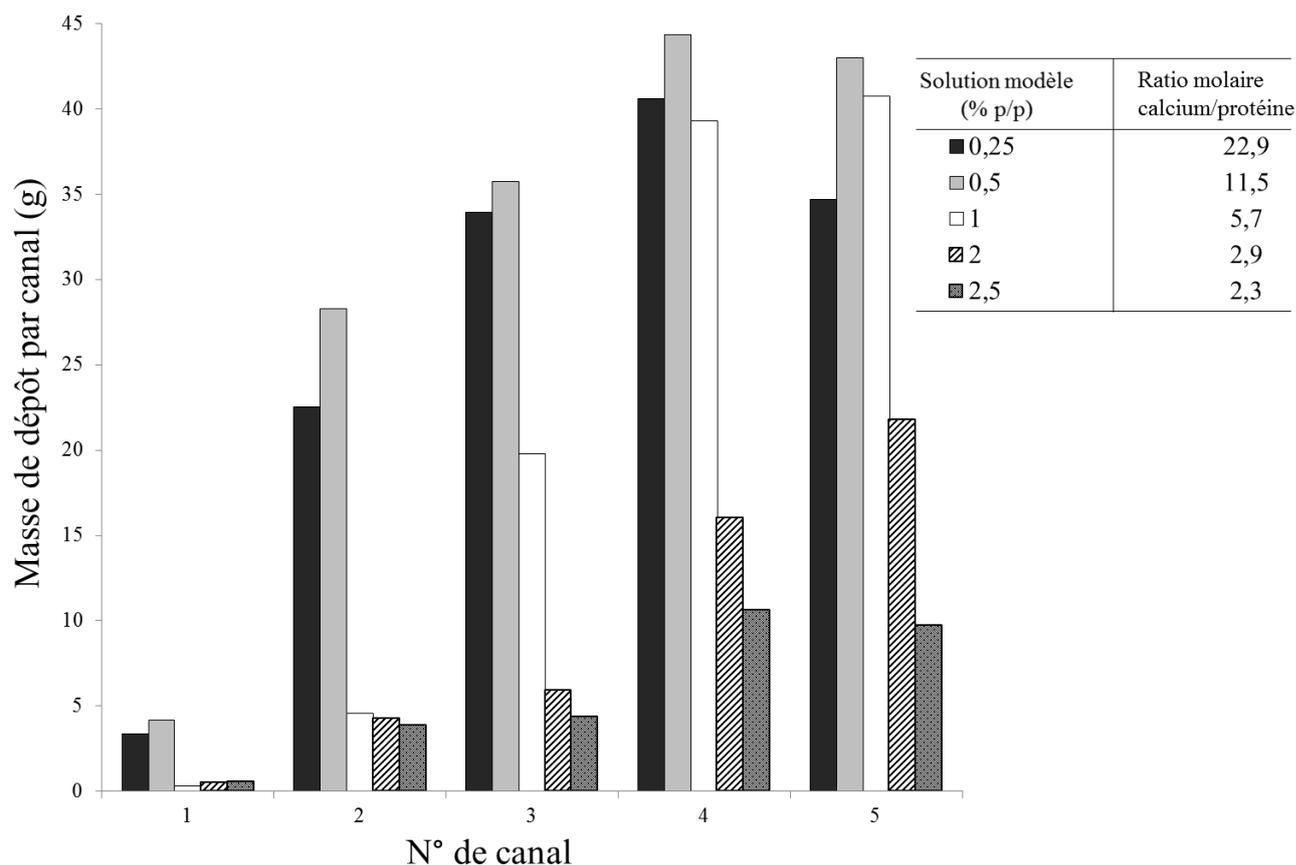


Figure 4.15. Distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP obtenue lors du traitement thermique (profil thermique #1 fixé) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium totale fixée (100 ppm) et à teneur en WPI allant de 0,25 à 2,5% (p/p). Ces solutions protéiques modèles ont ainsi des ratios molaires calcium/protéine variant de 2,3 à 22,9.

La figure 4.15 montre une nouvelle fois que pour une solution protéique modèle donnée l'encrassement de l'ECP est très fortement influencé par la température moyenne du canal.

Par ailleurs, la masse de dépôt sec n'est pas uniforme dans les 5 canaux de l'ECP et est distribuée très différemment par canal en fonction du ratio molaire calcium/protéine des solutions modèles étudiées. Selon le ratio molaire calcium/protéine des solutions protéiques modèles (de 2,3 à 22,9), l'évolution de la masse de dépôt par canal tout au long de l'ECP est décrite par différentes fonctions :

- monotone croissante (solutions protéiques avec les ratios molaires calcium/protéine de 2,3 et 2,9) ;
- monotone croissante suivi d'un plateau (solutions protéiques avec les ratios molaires calcium/protéine de 5,7 et 11,5) ;

- monotone croissante puis monotone décroissante (solution protéiques avec le ratio molaire calcium/protéine de 22,9).

Ceci prouve une nouvelle fois que la température moyenne du canal et la teneur en protéine ne sont pas les seuls indicateurs à considérer pour décrire la complexité du phénomène d'encrassement.

La figure 4.15 montre également que pour chaque solution modèle de WPI, la masse de dépôt totale augmente très fortement dans le 2^{ème} canal de l'ECP. Cette augmentation est sans doute une nouvelle fois imputable à l'initiation de la réaction de dénaturation de la β -lg (Havea et al., 2001 ; Linmark-Mansson et al., 2005) entre 67°C (température moyenne du 1^{er} canal de l'ECP) et 71°C (température moyenne du 2^{ème} canal).

On remarque d'ores et déjà que les masses de dépôt sec obtenues dans le 2^{ème} canal de l'ECP pour les solutions modèles à 0,25 et 0,5% (p/p) sont les plus importantes, ce qui est en accord avec les valeurs élevées des constantes cinétiques de dépliement de ces deux solutions. L'augmentation de la masse de dépôt pourrait donc être fortement liée à la disponibilité des espèces dépliées de la β -lg, qui agiraient comme précurseurs dans le mécanisme d'encrassement protéique. Cette hypothèse sera discutée plus longuement dans le prochain chapitre traitant de l'étude de la relation entre les espèces de β -lg en solution et la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP (chapitre 3 de la partie Résultats et Discussions).

4.2. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la masse totale de dépôt collectée dans l'ECP pour un profil thermique fixé

La figure 4.16 représente l'influence du ratio molaire calcium/protéine sur la masse de dépôt sec totale générée au sein de l'ECP pour des solutions protéiques modèles (solutions protéiques de WPI de 0,25 à 2,5% p/p avec une teneur en calcium fixée à 100ppm) subissant le profil thermique #1 au sein de l'ECP. Nous avons également reporté sur cette figure la masse de dépôt sec obtenue pour une solution protéique modèle de 1% (p/p) avec 120 ppm de calcium total (correspondant à un ratio calcium/protéine de 6,9).

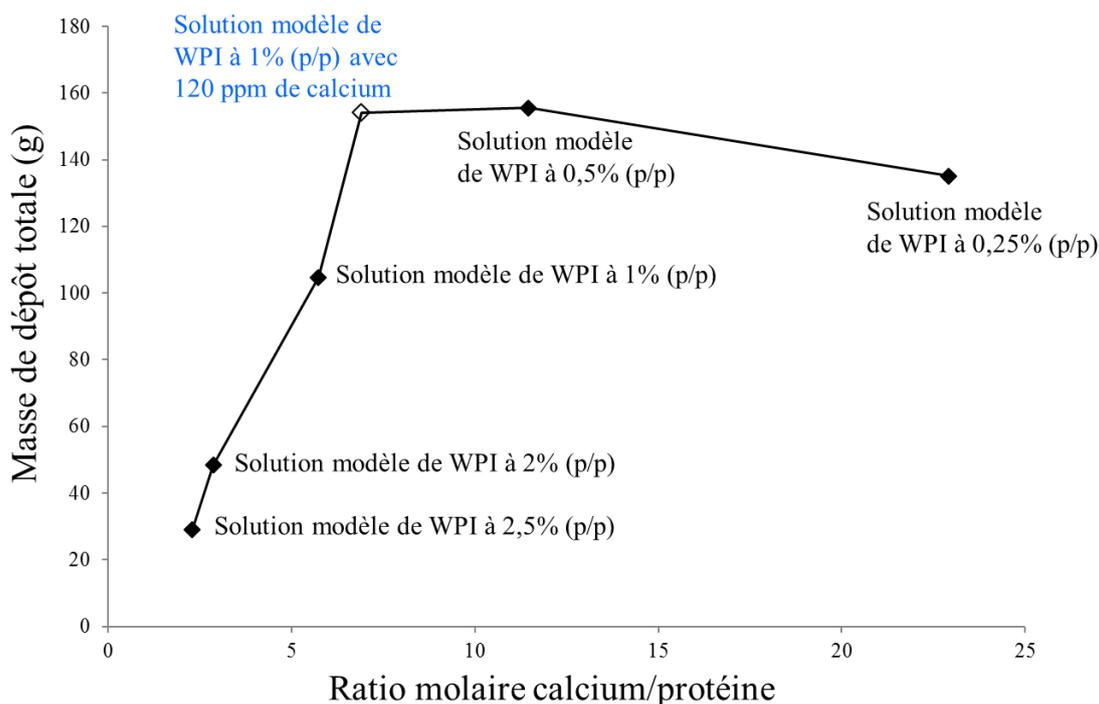


Figure 4.16. Masse de dépôt totale en fonction du ratio molaire calcium/protéine des différentes solutions de WPI étudiées.

Ces résultats sont obtenus lors du traitement thermique (profil thermique #1 fixé) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium totale fixée (100 ppm) et à teneur en WPI allant de 0,25 à 2,5% (p/p) correspondant à des ratios molaires calcium/protéine variant de 2,3 à 22,9.

La figure 4.16 montre clairement que la masse de dépôt totale augmente avec le ratio molaire calcium/protéine puis décroît légèrement.

L'augmentation de la masse totale de dépôt sec se produit jusqu'à une valeur maximale de 155,6 g ; ce maximum de masse de dépôt est obtenu pour un ratio molaire calcium/protéine compris entre 6,9 et 11,5. La masse de dépôt sec diminue ensuite pour atteindre une valeur de 135,2 g pour un ratio molaire calcium/protéine de 22,9.

Les résultats de la figure 4.16 montrent irréfutablement que la masse totale de dépôt sec n'est pas uniquement corrélée à la concentration en β -lg de la solution modèle de WPI. En effet, pour le profil thermique imposé, bien que la teneur en protéine augmente (passant de 0,25 à 2,5% p/p) la masse totale de dépôt collectée diminue.

Ce résultat non intuitif va à l'encontre des idées reçues dans le secteur industriel et montre l'importance de connaître le ratio molaire calcium/protéine pour prédire le phénomène d'encrassement.

La diminution de la masse totale de dépôt pour des ratios calcium/protéine élevés (entre 11,5 et 22,3) peut s'expliquer :

- soit par la trop faible concentration initiale en espèce native (0,25% p/p de WPI). De ce fait, le calcium en excès n'aurait plus qu'un rôle mineur puisque le phénomène d'encrassement serait limité par la faible concentration en β -lg dénaturée ;
- soit par l'effet protecteur du calcium envers la dénaturation de la β -lg à un fort ratio calcium/protéine comme suggéré par Roefs et Peppelman (2001).

5. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la résistance thermique d'encrassement

La figure 4.17 représente l'évolution de la résistance d'encrassement lors d'un traitement thermique (profil thermique #1) dans l'ECP des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) à différents ratios molaires calcium/protéine (allant de 2,3 à 22,9).

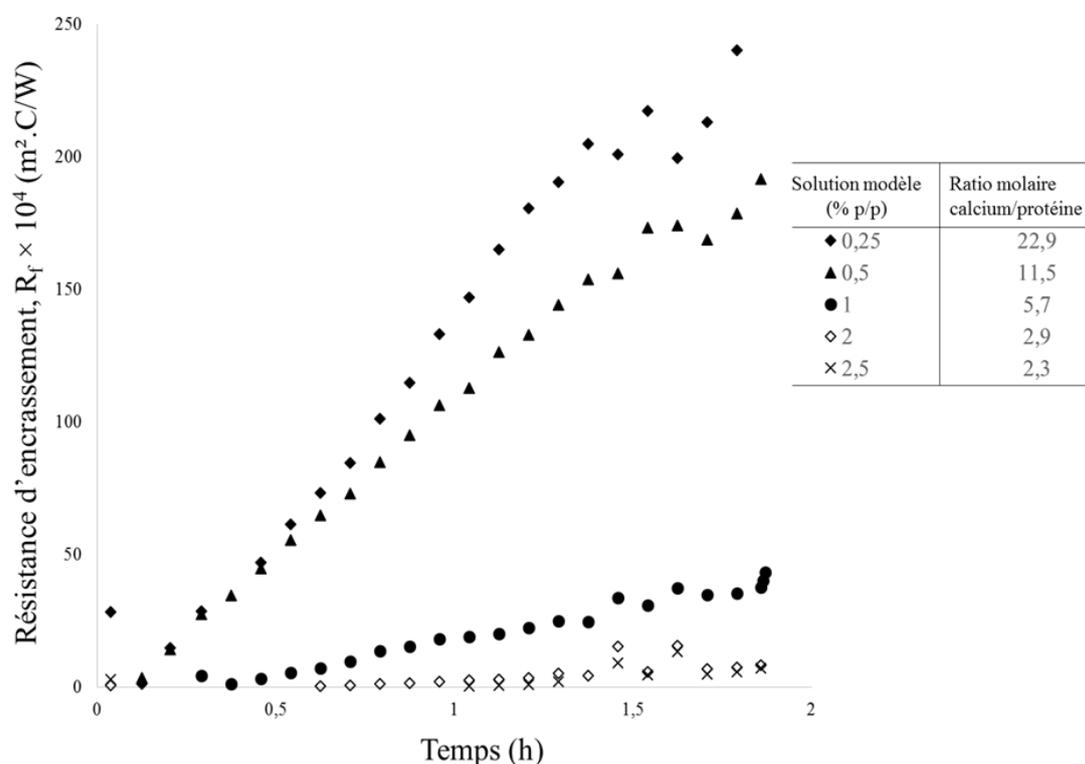


Figure 4.17. Evolution de la résistance d'encrassement dans le temps au sein de l'ECP obtenue lors du traitement thermique (profil thermique #1 fixé) de solutions protéiques modèles à teneur en calcium total fixée (100 ppm) et à teneur en WPI allant de 0,25 à 2,5% p/p).

Pour l'ensemble des solutions protéiques modèles testées et le profil thermique #1 imposé, la résistance thermique d'encrassement semble augmenter linéairement avec le temps. La pente de ces évolutions s'ordonne en fonction du ratio molaire calcium/protéine. Plus le ratio molaire calcium/protéine est important, plus la valeur de la pente de la droite est élevée. Ceci confirme les mesures des masses totales de dépôt au bout de 2 heures dans l'ECP, montrant que le phénomène d'encrassement s'intensifie avec l'augmentation du ratio molaire calcium/protéine.

Les résultats de la figure 4.17 montrent irréfutablement que l'évolution dans le temps de la résistance thermique d'encrassement n'est pas uniquement corrélée à la concentration en β -lg de la solution modèle de WPI. En effet, pour le profil thermique imposé, bien que la teneur en protéine diminue (passant de 2,5 à 0,25% p/p), la dynamique de déposition (via l'augmentation de la pente) augmente.

On constate que selon la valeur du ratio molaire calcium/protéine, la durée de la période d'induction (période située juste après le démarrage de l'essai d'encrassement et où une valeur légèrement négative ou plateau de la résistance thermique d'encrassement est constatée) varie. Les résultats de la période d'induction ne seront cependant pas commentés plus en détail ici. En effet, selon les conditions opératoires, il est difficile de distinguer cette période de celle où le régime permanent est réellement atteint. Compte tenu du mode opératoire de mise en régime de l'installation, la température de l'eau chaude et celle du produit à traiter augmentent jusqu'à atteindre des valeurs constantes au début de la période d'induction. Néanmoins, pour l'ensemble de nos essais, après 30 minutes, les températures sont constantes (régime permanent), la phase d'induction est considérée comme achevée et l'évolution de la résistance thermique d'encrassement peut être analysée.

La figure 4.17 montre également qu'à faible ratio molaire calcium/protéine (2,3 et 2,9), la résistance thermique d'encrassement évolue très peu. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le ratio molaire calcium/protéine est faible. De ce fait, peu d'ions calcium sont en capacité de jouer un rôle de médiateur pour lier des protéines dénaturées.

A environ 1 heure 30 minutes du début du traitement thermique, des perturbations sont observées. L'explication généralement avancée pour cette observation est le phénomène d'arrachement des couches de dépôt sous l'effet de la contrainte mécanique, qui augmente au fur et à mesure que se développe une épaisseur de dépôt plus conséquente dans l'échangeur (Fryer, 1989). Cependant, l'explication de ce phénomène semble peu plausible dans notre cas puisque la cohésion du dépôt encrassant formé semble forte. Ce dernier est très difficile à

enlever par une simple action mécanique. De plus, aucun amas de particules n'a été observé dans le liquide à la sortie de l'ECP ou lors du démontage de ce dernier.

Les résultats de la figure 4.17 suggèrent une nouvelle fois que le calcium participe à la structuration du dépôt et à la croissance des couches de dépôt. En effet, le calcium favoriserait la croissance du dépôt encrassant en liant et stabilisant les protéines dénaturées en solution et de la couche supérieure de dépôt. Si tel est le cas, le sondage de dépôts devrait conduire à des structures différentes selon la teneur en calcium des solutions protéiques utilisées. Nous allons tenter d'infirmer ou confirmer ces hypothèses en analysant des dépôts à faible et fort ratios molaires calcium/protéine (2,3 et 22,9 respectivement).

6. Observation visuelle du dépôt encrassant à faible et fort ratios molaires calcium/protéine

Les figures 4.18 et 4.19 représentent les dépôts formés dans les canaux de l'ECP après des essais d'encrassement de 2 heures avec des solutions de WPI modèles à 0,25 et 2,5% (p/p) contenant toutes les deux une teneur en calcium total fixe de 100 ppm.

Ces deux solutions protéiques modèles ont ainsi des ratios molaires calcium/protéine contrôlés de 2,3 (solution protéique à 2,5% p/p de WPI) et 22,9 (solution protéique à 0,25% p/p de WPI).

Les figures 4.18 et 4.19 montrent clairement que pour ces deux solutions protéiques, l'aspect des dépôts dans les canaux de l'ECP est significativement différent, alors que le profil thermique appliqué est identique.

Pour la solution modèle à 2,5% (p/p), la couche de dépôt formée, y compris dans le 5^{ème} canal de l'ECP, est très mince et à peine visible en dépit de la température élevée du canal de l'ECP (84°C). Très peu de dépôt est observé à une température bien supérieure à 80°C, température à laquelle la β -lg est supposée être dénaturée (Lyster, 1970 ; Delplace et al., 1994 ; Linmark-Mansson et al., 2005 ; Petit et al., 2011).

En revanche pour la solution modèle de WPI à 0,25% (p/p), le dépôt formé est présent dès les premiers canaux de l'ECP. On peut constater, dès le 2^{ème} canal de l'ECP, que la couche de dépôt formée est très épaisse et répartie de manière homogène sur la plaque de l'ECP. Il apparaît donc clairement que même à basse température (71°C), une importante couche de dépôt est formée.



Canal 1



Canal 2



Canal 3



Canal 4



Canal 5

Figure 4.19. Couches de dépôt formées dans les différents canaux de l'ECP après 2 h d'essais d'encrassement avec des solutions modèles de WPI à 0,25% (p/p).



Canal 1



Canal 2



Canal 3



Canal 4



Canal 5

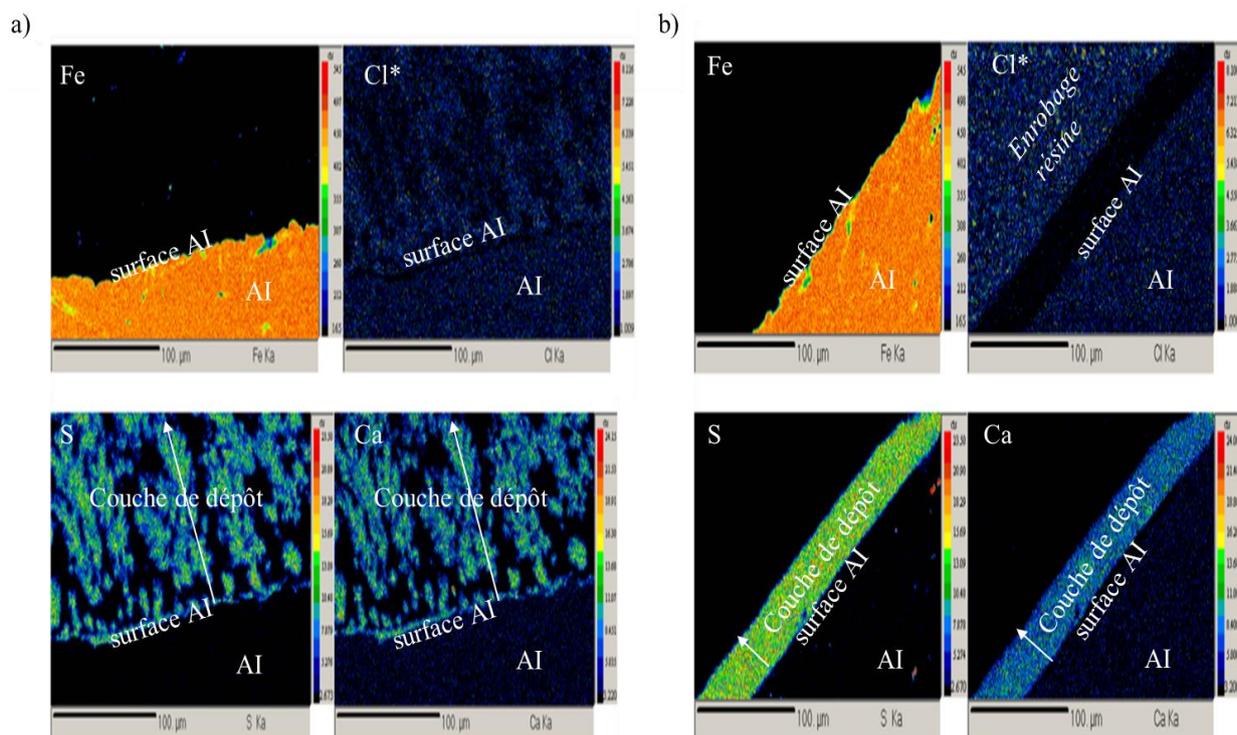
Figure 4.18. Couches de dépôt formées dans les différents canaux de l'ECP après 2 h d'essais d'encrassement avec des solutions modèles de WPI à 2,5% (p/p).

7. Influence du ratio molaire calcium/protéine sur la croissance du dépôt protéique : caractérisation des premières couches de dépôt en surface de l'ECP

Afin de caractériser l'encrassement laitier et mieux comprendre le rôle du ratio molaire calcium/protéine dans la croissance du dépôt protéique, la morphologie et la composition chimique des premières couches de dépôt formées à la surface des plaques de l'ECP ont été analysées par EPMA (microanalyse par sonde électronique) (figure 4.20) et XPS (spectroscopie de photoélectrons X) (figure 4.21). Pour ce faire, des plaques contenant du dépôt encrassant ont été découpées en différents échantillons (coupes transversales) et certains de ces échantillons ont été analysés.

Les analyses EPMA, présentées à la figure 4.20, révèlent la présence d'éléments caractéristiques de l'acier (Fe, fer), de la protéine (S, soufre), du calcium (Ca) et du chlore (Cl). Les cartographies sont codées par couleur du noir (caractérisant l'absence de l'élément) au rouge (indiquant la plus forte concentration détectée). Comme les échelles de couleur sont identiques, il est possible de comparer les concentrations d'un même élément entre les figures 4.20a et 4.20b.

La cartographie du calcium et du soufre de la solution protéique à 0,25% (p/p) (figure 4.20a) indiquent que la couche de dépôt formée est épaisse, n'est pas répartie de manière homogène et se développe suivant une croissance en arborescence. La figure 4.20a montre également que le calcium et le soufre sont répartis de manière homogène dans l'arborescence et sont situés au même endroit. Ces résultats sont en accord avec les observations de Jimenez et al. (2013) qui ont expliqué cette structure arborescente comme une co-construction de la couche de dépôt par à la fois les protéines et les particules de calcium. Ces derniers agissent comme des points d'ancrage pour favoriser la croissance du dépôt.



*La section transversale est enrobée dans de la résine époxy contenant du chlore, ce qui expliquerait pourquoi le Cl est détecté au-dessus de l'acier inoxydable (AI).

Figure 4.20. Cartographies X des éléments Fe, Cl, S et Ca de la section transversale de la couche de dépôt des solutions modèles de WPI à : a) 0,25% (p/p) et b) 2,5% (p/p).

Il est néanmoins difficile de comparer davantage nos résultats avec ceux de Jimenez et al. (2013). En effet, les couches de dépôt analysées n'ont pas été formées dans les mêmes conditions (concentrations en calcium et en protéine, profils thermiques imposés dans l'ECP) ni localisées et collectées au même endroit de l'ECP.

Dans ce travail de thèse, les dépôts protéiques ont été collectés directement dans les canaux de l'ECP sur la surface corruguée des plaques de l'ECP et par conséquent, dans la zone de chauffage. Jimenez et al. (2013) ont en revanche caractérisé les dépôts formés sur des coupons en acier inoxydable insérés dans un tube correspondant à la zone de chambrage située après l'ECP.

Jimenez et al. (2013) ont utilisé une solution de WPI à 1% (p/p) et 120 ppm de calcium, correspondant à un ratio molaire calcium/protéine de 6,9. De plus, dans les travaux de Jimenez et al. (2013), la réhydratation des solutions protéiques encrassantes a été effectuée avec de l'eau dure alors que dans notre cas, elle a été réalisée avec de l'eau osmosée.

La couche de dépôt de la solution modèle de WPI à 2,5% (p/p), représentée dans la figure 4.20b, est homogène, plus mince (~ 50 μm) et plus compacte que celle de la solution

modèle à 0,25% (p/p). La figure 4.20b montre que le calcium et le soufre sont également dans ce cas colocalisés, malgré un plus faible ratio molaire calcium/protéine comparé à celui de la solution précédente à 0,25% (p/p) (couleur bleue prédominante contre couleur verte dans la figure 4.20a).

Les résultats des analyses EPMA montre donc que le ratio molaire calcium/protéine agit non seulement sur la masse de dépôt formé sur la surface de la plaque de l'ECP mais aussi sur la structure du dépôt.

Compte tenu des résultats, il est fort probable qu'à faible ratio molaire calcium/protéine, les interactions protéine-protéine soient majoritaires (au détriment des interactions protéine-particules de calcium dans la couche de dépôt), induisant une cinétique de formation de dépôt lente. Ainsi, une structure mince, lisse et compacte de dépôt est générée au final. A l'inverse, à fort ratio molaire calcium/protéine, le calcium accélère la croissance de la couche de dépôt en favorisant la fixation des protéines dénaturées. La croissance de la couche de dépôt est dans ce cas accélérée par la présence des particules de calcium, conduisant ainsi à une structure épaisse, spongieuse et rugueuse.

Notons que 90 ppm de calcium sous forme de CaCl_2 ont été ajoutées à la solution modèle de WPI à 0,25% (p/p). De ce fait, il n'était pas exclu que le chlore pourrait être présent dans le dépôt et pourrait être un élément expliquant la formation de ses différentes structures. Cependant, le chlore n'a pas été détecté dans la couche de dépôt analysée, ce qui signifie qu'il est absent ou qu'il est présent en faible quantité dans le dépôt. Le chlore n'est donc pas un élément intervenant au développement de la couche de dépôt encrassante.

Par ailleurs, une analyse complémentaire a été effectuée par XPS afin de mieux comprendre la forme chimique du calcium constituant le dépôt de la solution protéique à 0,25% (p/p) (figure 4.21). Cette analyse a montré que pour le phosphore, un seul pic a été identifié contre deux pour le calcium à respectivement 350,8 et 347,2 eV, correspondant à $\text{Ca } 2p_{1/2}$ et $\text{Ca } 2p_{3/2}$ du phosphate de calcium. Le ratio molaire expérimental calcium/phosphate est d'environ 1,45. Cette valeur est proche de celles trouvées dans la littérature de l'ordre de 1,47 (Tissier et Lalande, 1986) et 1,5 (Chusuei et Goodman, 1999).

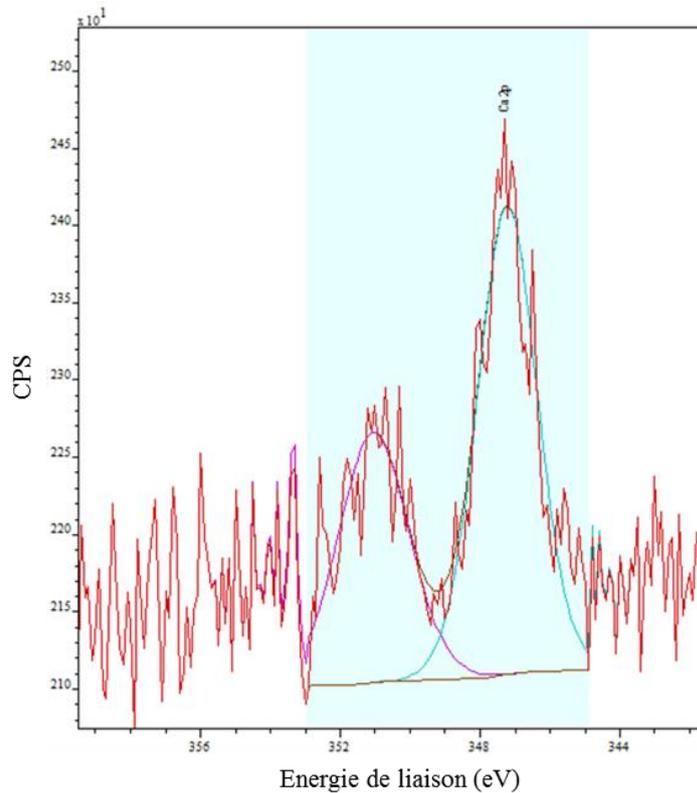


Figure 4.21. Analyse XPS des particules de calcium.

Ce résultat représente une autre grande différence avec le travail de Jimenez et al. (2013) qui ont montré, pour leur solution encrassante et leurs conditions opératoires, que le carbonate de calcium serait impliqué dans le mécanisme d'encrassement au sein de l'ECP. La présence du carbonate de calcium pourrait être expliquée par le fait que la réhydratation de la solution protéique modèle utilisée par Jimenez et al. (2013) s'est faite avec de l'eau dure. En revanche, dans le cas de ce travail de thèse, les solutions encrassantes ont été préparées avec de l'eau osmosée afin de limiter la formation de carbonate de calcium. De plus, les concentrations en minéraux (principalement le calcium et le phosphore) de ces deux solutions sont très différentes, ce qui peut conduire à un équilibre différent en sels minéraux.

8. Conclusion

Les résultats de ce chapitre ont pu mettre en évidence l'influence du ratio molaire calcium/protéine sur la distribution de la masse de dépôt sec et sur la structure des premières couches de dépôt obtenues lors de traitement thermique de différentes solutions modèles de

WPI dans l'ECP. De même, ce chapitre a fait apparaître le rôle prépondérant de l'histoire thermique subie par la solution dans le phénomène d'encrassement laitier.

Il est clair que :

- la distribution de la masse de dépôt dépend fortement des profils thermiques imposés dans l'ECP ;
- la masse totale de dépôt et l'accroissement de la dynamique d'encrassement (via le suivi de résistance thermique encrassante dans le temps) ne sont pas positivement corrélés à la concentration en β -lg des solutions modèles de WPI (à une teneur en calcium variable). Ces deux grandeurs physiques sont par contre positivement corrélées aux ratios molaires calcium/protéine des solutions encrassantes ;
- l'augmentation des ratios molaires calcium/protéine entraîne une forte augmentation des masses de dépôt et des résistances thermiques encrassantes dans l'ECP dans l'intervalle de températures allant de 65 à 85°C ;
- la structure des premières couches de dépôt en surface est influencée par le ratio molaire calcium/protéine. A faible ratio molaire calcium/protéine, la couche de dépôt est mince, lisse et compacte et à l'inverse, très épaisse, rugueuse et spongieuse à fort ratio molaire calcium/protéine ;
- les cartographies à fort ratio molaire calcium/protéine indiquent que les particules de calcium accélèrent la croissance de la couche de dépôt en exposant une plus grande surface au dépôt protéique ;
- les cartographies à faible ratio molaire calcium/protéine indiquent que les interactions protéine-protéine sont favorisées au détriment des interactions protéine-particules de calcium dans la couche de dépôt.

Ces résultats permettent d'affirmer que le calcium est un agent en capacité de lier les protéines constituant les couches supérieures de dépôt et les protéines dénaturées en solution, entraînant une formation accélérée d'encrassement des surfaces.

Nous ne savons pas encore préciser à ce stade quelles espèces dénaturées (agrégées ou dépliées) constituent le dépôt et le lien exacte entre le comportement en dénaturation des solutions protéiques modèles et la formation des dépôts. C'est pourquoi nous allons étudier dans le prochain chapitre la relation entre les espèces de la β -lg (native, dépliée et agrégée) en solution et la distribution de la masse de dépôt dans l'ECP.

Chapitre 4 : Etude de la relation entre les espèces de β -lg en solution et la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP pour différentes solutions protéiques modèles

Nous proposons dans ce chapitre de mieux cerner les espèces protéiques responsables de la formation du dépôt. Pour ce faire, nous étudierons l'influence des profils de température sur à la fois la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg au sein de l'ECP.

Cette étude sera effectuée pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total. Les profils de concentration seront simulés à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) et le modèle de deux réactions successives (chapitre 4 de la partie Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus (relation entre la β -lg dépliée et la masse de dépôt sec formé dans l'ECP) seront comparés à ceux obtenus avec une solution modèle de β -lg quasi-pure (solution modèle de Petit et al. (2013) : 6% p/p et 264 ppm de calcium total).

1. Influence du profil thermique sur à la fois la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg en solution simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007)

Les figures 4.22a, 4.22b, 4.22c et 4.22d représentent la variation à la fois des profils de concentrations simulées des différentes espèces de β -lg et des masses de dépôt sec mesurées dans les 5 canaux de l'ECP, pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et ce, pour l'ensemble des profils thermiques étudiés (#1, #2, #3 et #4).

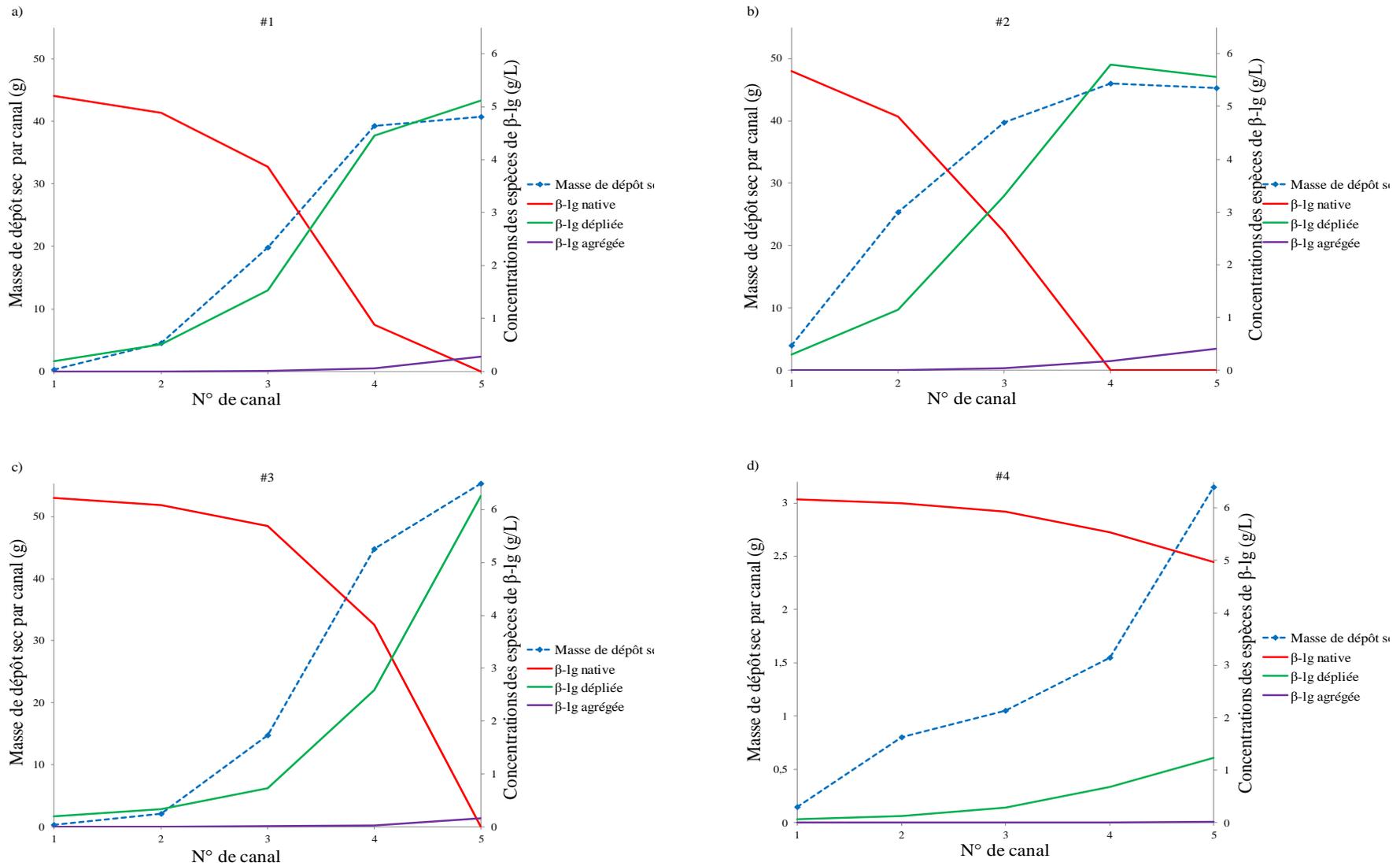


Figure 4.22. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les 5 canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β-Ig simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques imposés (#1, #2, #3 et #4).

Les figures 4.22 montrent que : (i) l'espèce *N* disparaît progressivement le long de l'ECP, à mesure que la température augmente dans les canaux, au profit de l'apparition des espèces *U* et *A*, et (ii) l'espèce *U* apparaît plus tôt que l'espèce *A*, qui enregistre la plus faible concentration dans l'ECP.

L'analyse des figures 4.22 montrent également que le traitement thermique joue un rôle important dans l'encrassement de l'ECP. En effet, l'augmentation de la température moyenne du produit dans l'ECP entraîne un fort accroissement non seulement du niveau de dénaturation chaude de la β -lg mais aussi de la masse de dépôt sec. Par ailleurs, on constate que la concentration de l'espèce *N* reste proche de sa valeur initiale (de l'ordre de 6 g.L^{-1}) à la température moyenne d'entrée du produit ($61\text{--}68^\circ\text{C}$). Ceci est logique car dans ce cas, la température est plus faible que la température de dénaturation de la β -lg allant de 74 à 76°C (Guérin et al., 2007).

Afin d'étudier le rôle des processus de dépliement et d'agrégation de la β -lg sur les mécanismes de formation de dépôt encrassant, la distribution de la masse de dépôt sec mesurée dans les différents canaux de l'ECP et les concentrations des espèces *U* et *A* ont été analysées simultanément. Les allures des différents profils de concentrations de la β -lg, présentés dans les figures 4.22, sont cohérents avec la distribution des concentrations des espèces *N*, *U* et *A* calculées à partir de la modélisation CFD d'un canal unique de l'ECP durant la pasteurisation du lait (De Bonnis et Ruocco, 2009) et d'un ECP comprenant 10 canaux (configuration 1 canal par passe) durant la pasteurisation d'une solution de WPI à 6% (p/p) (Bouvier et al., 2014).

Par ailleurs, les figures 4.22 montrent qu'en l'absence de l'espèce *A*, une faible quantité de l'espèce *U* en solution est suffisante pour observer la croissance du dépôt protéique au sein de l'ECP. Ce résultat est en accord avec les travaux de Delplace et Leuliet (1995) qui ont constaté que de très faibles quantités de β -lg dépliées sont nécessaires pour observer une augmentation de la masse de dépôt sec. Le dépôt anticipe donc la formation des agrégats. Plus généralement, l'observation des figures 4.22 montrent qu'il existe une corrélation entre la concentration de l'espèce *U* et la formation de dépôt puisque le profil de concentration de la β -lg dépliée suit la distribution de la masse de dépôt sec le long de l'ECP. Par ailleurs, le maximum du dépôt encrassant correspond au canal de l'ECP dans lequel la concentration de l'espèce *U* atteint son maximum (e.g. pour le profil thermique #1, le dépôt atteint un maximum de $40,7 \text{ g}$ et une C_U maximale de $5,1 \text{ g.L}^{-1}$ dans le 5^{ème} canal).

L'hypothèse que l'espèce dépliée serait à l'origine du dépôt protéique est en accord avec les travaux de Blanpain-Avet et al. (2012) qui ont montré à partir d'analyses Raman que les molécules de β -lg présentes dans les premières couches de dépôt ont une structure secondaire différente de celle des agrégats. Ces auteurs ont également rapporté que la protéine de β -lg "molten globule" favorise l'encrassement des ECP et que les agrégats ne sont pas impliqués dans la formation de dépôt. De même, nos résultats sont cohérents avec les conclusions de De Jong et al. (1992), Delplace et al. (1997) et van Asselt et al. (2005) qui ont affirmé que favoriser la formation des agrégats pourrait être un moyen de réduire l'encrassement laitier.

Les résultats observés dans les figures 4.22 ont été confrontés aux résultats de Blanpain et al. (2016). En effet, la configuration plus étendue de l'ECP étudié par ces auteurs a permis une observation plus complète des phénomènes. Les résultats de Blanpain et al. (2016) sont présentés dans les figures 4.23a, 4.23b, 4.23c et 4.23d. Ces figures représentent les masses de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP, pour chacun des essais d'encrassement correspondant aux conditions opératoires #1, #3, #6 et #15 (données en annexe : tableau A.2) imposées par Petit et al. (2013), ainsi que les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg (*N*, *U* et *A*) simulés au sein de l'ECP (21 plaques, 10 canaux, 1 canal par passe) pour une solution modèle de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) contenant 264 ppm de calcium.

Les figures 4.23 confirment les principales conclusions retenues lors de l'exploitation des résultats présentés dans les figures 4.22. Cependant, l'évolution de la masse de dépôt sec est plus complexe. En effet, la masse de dépôt augmente dans les premiers canaux de l'ECP, quel que soit le profil thermique imposé puis, atteint un maximum et diminue dans les derniers canaux de l'ECP, tel est le cas du profil thermique #6 (figure 4.23c) où la masse de dépôt est à son maximum dans le canal 3 avec une valeur de 82,2 g puis chute brusquement pour atteindre 21,7 g à la sortie de l'ECP (canal 10).

Si la β -lg agrégée était à l'origine du dépôt, le dépôt protéique augmenterait linéairement dans l'ECP puisque les agrégats sont censés augmenter en taille et en nombre durant le traitement thermique. Or, ceci est en contradiction avec les observations des figures 4.23 où l'on observe des évolutions de masse de dépôt sec et de concentration en *A* non corrélées. La β -lg agrégée ne semble donc pas être l'espèce précurseur du dépôt protéique.

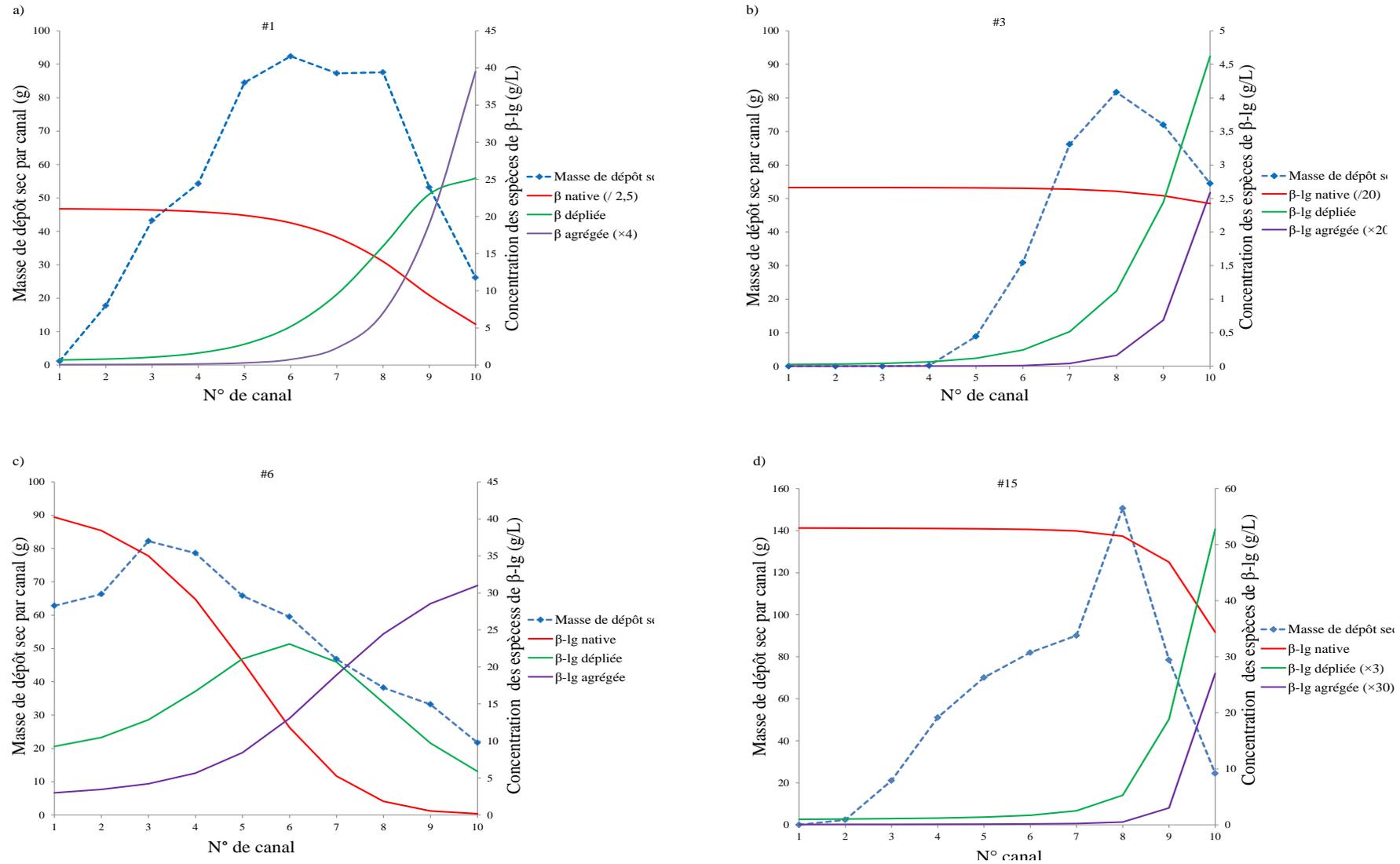


Figure 4.23. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les différents canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) pour une solution de β -lg quasi-pure et différents profils thermiques.

L'hypothèse supposant que la β -lg dépliée serait l'espèce précurseur du dépôt protéique semble donc être confirmée, comme le montre les résultats des figures 4.23. Ces hypothèses sont en accord avec les travaux de Belmar-Beiny (1992), Petermeier et al. (2002), Jun et Puri (2007) et Choi et al. (2013). Ces auteurs ont développé leurs modèles déterministes de l'encrassement selon l'approche que seule la molécule dépliée est déposée sur la surface de l'échangeur de chaleur et est l'élément essentiel dans la formation de dépôt. Jimenez et al. (2013) ont également rapporté que les mécanismes d'encrassement sont initiés par le dépôt de la β -lg dépliée sur le substrat en acier inoxydable. Par ailleurs, Petit et al. (2013) ont montré que la masse de dépôt totale collectée dans l'ECP est essentiellement gouvernée par un nombre adimensionnel ($\exp(\frac{-E_{A,unf}}{R T_{ep}})$) faisant intervenir l'énergie d'activation de dépliement ($E_{A,unf}$) et la température d'entrée du produit (T_{ep}). De même, Bouvier et al. (2014) ont souligné, à partir des analyses CFD-2D et des essais d'encrassement, que le β -lg dépliée est à l'origine du dépôt formé sur les parois de l'ECP.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats montrent clairement que la β -lg dépliée est à l'origine du dépôt encrassant et ce, indépendamment de la solution modèle protéique étudiée et des conditions de procédé imposées.

2. Influence du profil thermique sur à la fois la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP et les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg en solution simulées avec le modèle de deux réactions successives

Les figures 4.24a, 4.24b, 4.24c et 4.24d représentent la variation des distributions des masses de dépôt sec mesurées et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans chacun des 5 canaux de l'ECP simulées avec le modèle de deux réactions successives en fixant $n_1 = n_2 = 1,5$ pour les réactions de dépliement et d'agrégation, pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et en imposant différents profils thermiques au sein de l'ECP.

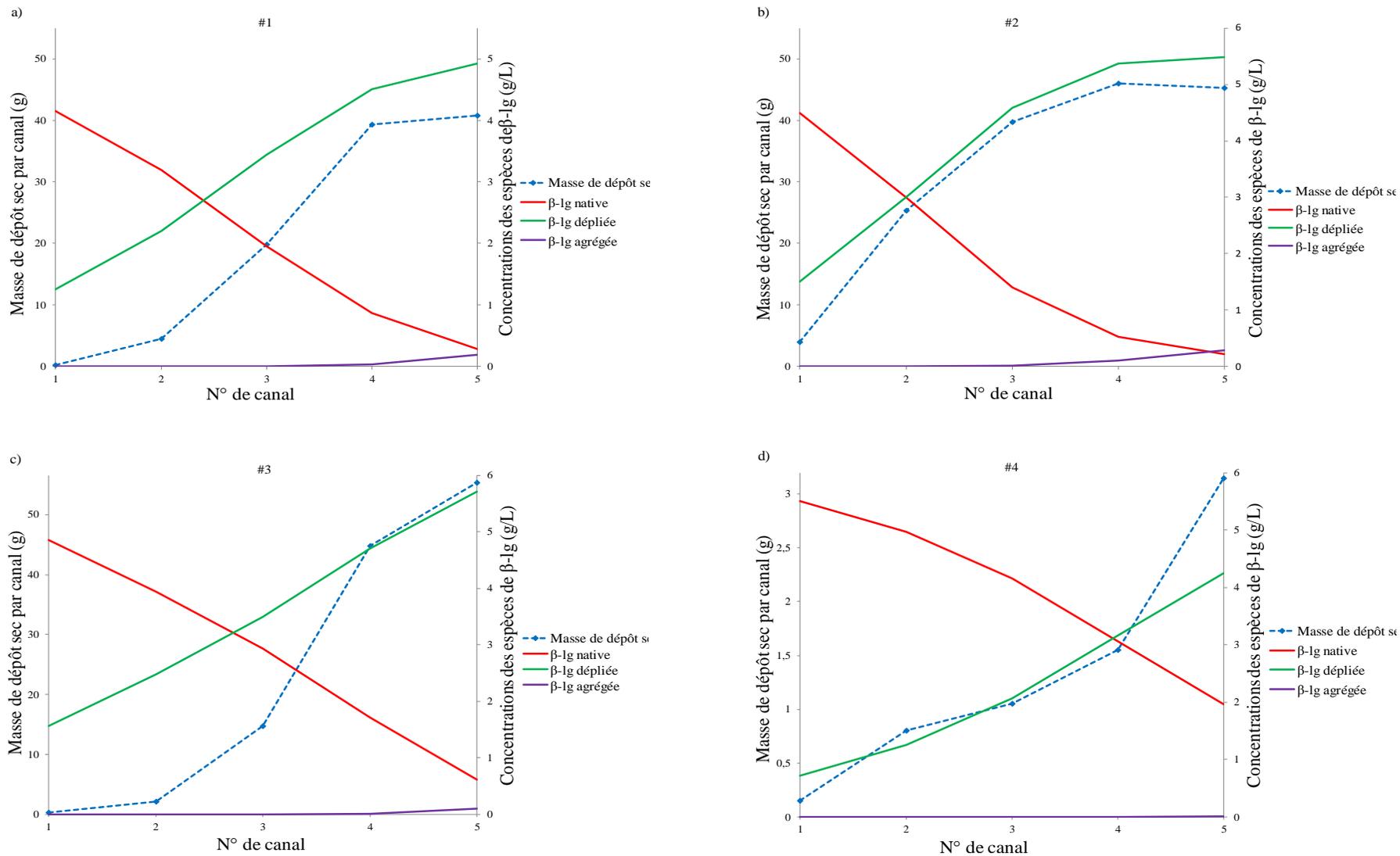


Figure 4.24. Variation à la fois des masses de dépôt sec mesurées dans les 5 canaux de l'ECP et des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées à partir du modèle de 2 réactions successives en imposant les ordres de réactions $n_1 = n_2 = 1,5$ pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques.

Les constantes de vitesse k_1 et k_2 du modèle des réactions successives ont été déterminées de façon à décrire de façon équivalente à celui de Tolkach et Kulozik (2007) l'évolution de la concentration de l'espèce A et donc du soluble total S . Les différences liées au type de modèle retenu ne peuvent donc concerner que la répartition entre les espèces N et U .

Concernant le profil de concentration de l'espèce dépliée, la figure 4.24 montre que les valeurs obtenues à l'entrée de l'ECP, pour l'ensemble des profils thermiques (#1, #2, #3 et #4), sont nettement supérieures à celles obtenues avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007), de respectivement $C_U < 1,6 \text{ g.L}^{-1}$ et $C_U < 0,3 \text{ g.L}^{-1}$.

Cette différence rendrait ce modèle plus vraisemblable que celui de Tolkach et Kulozik (2007) puisque l'espèce U est présentée comme étant à l'origine du dépôt. Le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) serait donc susceptible de sous-estimer la concentration C_U .

Les figures 4.25a, 4.25b, 4.25c et 4.25d comparent les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées à partir du modèle de deux réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$ (trait continu) et $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$ (trait discontinu) en fonction du temps de séjour dans l'ECP, et ce pour l'ensemble des paramètres de procédé étudiés.

Les figures 4.25 montrent clairement que pour l'ensemble des profils thermiques (#1, #2, #3 et #4), la décomposition de l'espèce native est plus lente dans le cas du modèle de deux réactions successives avec $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$ qu'avec celui de $n_1 = n_2 = 1,5$. En effet, à la sortie de l'ECP, la concentration de la β -lg native, simulée avec le modèle de deux réactions successives avec $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$, atteint un minimum allant de 2,5 à 5,2 g.L^{-1} pour respectivement les profils thermiques #2 et #4, contre 0,15 et 1,96 g.L^{-1} pour le modèle de deux réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$. Ces résultats sont simplement dus à une vitesse de disparition plus faible liée à un ordre de réaction inférieur (1 au lieu de 1,5).

L'analyse des figures 4.25 montre également qu'une libération de l'espèce U est plus rapide dans le cas du modèle de deux réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$. Ceci est dû au fait que l'évolution du soluble total S ne dépend pas du modèle retenu : une faible valeur de N est compensée par une valeur de U plus importante.

Les profils présentés dans les figures 4.25 sont comparables aux profils de concentrations des espèces N , U et A rapportés par de Jong (1992) considérant que la dénaturation chaude de la β -lg est une succession de deux réactions (le dépliement et l'agrégation).

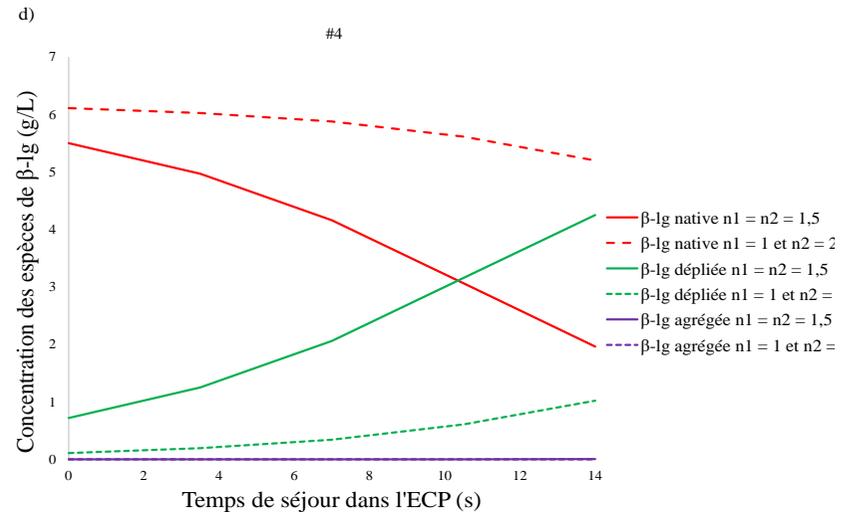
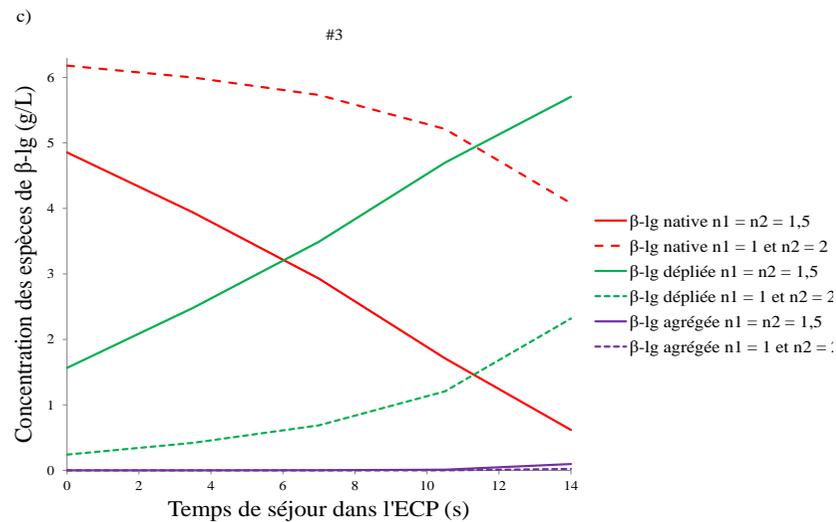
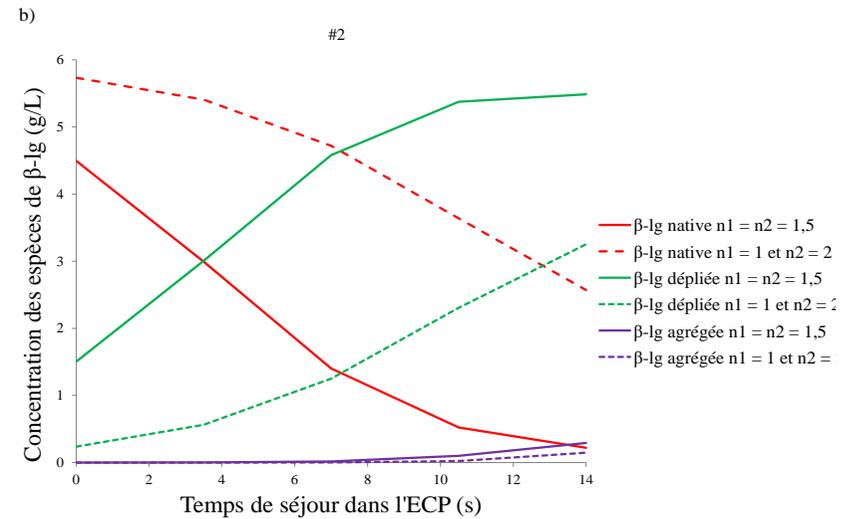
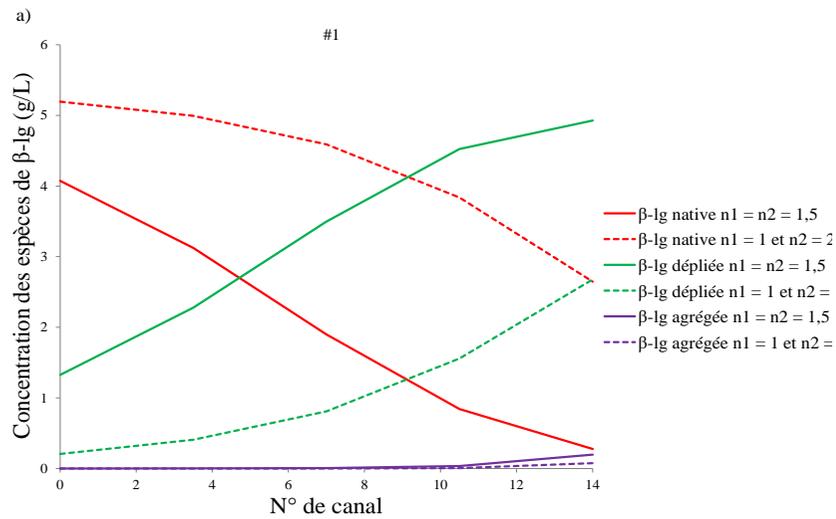


Figure 4.25. Comparaison entre les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg simulées à partir du modèle de 2 réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$ (trait continu) et $n_1 = 1$ et $n_2 = 2$ (trait discontinu) en fonction du temps de séjour dans l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) avec 100 ppm de calcium total et différents profils thermiques.

Pour conclure, les profils de concentration proposés par le modèle de deux réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$ paraissent plus vraisemblable au niveau de la répartition de l'espèce U dans l'ECP. En effet, une évolution similaire des profils de concentration en β -lg dépliée et de la masse de dépôt sec peut être observée. Le modèle avec les valeurs de $n_1 = n_2 = 1,5$ sera retenu dans la suite de ce chapitre.

3. Comparaison entre les concentrations des agrégats calculées et mesurées en sortie de l'ECP à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) et le modèle de deux réactions successives ($n_1 = n_2 = 1,5$)

Nous présentons dans ce paragraphe une comparaison entre les concentrations des agrégats en sortie de l'ECP calculées avec les différents modèles étudiés et les concentrations expérimentales.

Le tableau 4.6 représente une comparaison entre les concentrations de la β -lg agrégée calculées et mesurées à la sortie de l'ECP d'une solution de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total, pour les différents profils thermiques imposés (#1, #2, #3 et #4).

Tableau 4.6. Comparaison entre les concentrations des agrégats calculées et simulées à la sortie de l'ECP pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total et pour différents profils thermiques.

Profils thermiques	C _A calculées (g.L ⁻¹) à partir du		C _A mesurées (g.L ⁻¹)
	Modèle Tolkach et Kulozik (2007)	Modèle de 2 réactions successives $n_1 = n_2 = 1,5$	
#1	1,1	0,9	2,8
#2	1,4	1,2	3,5
#3	1,3	1,1	3,4
#4	0,06	0,04	0,08

Le tableau 4.6 montre que les valeurs simulées avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) sont très proches de celles simulées à partir du modèle de deux réactions successives avec $n_1 = n_2 = 1,5$ et ce, pour l'ensemble des conditions de procédé étudiées. Cependant, pour les profils thermiques #1, #2 et #3, la concentration des agrégats mesurée est largement supérieure à la concentration des agrégats calculée. Les deux modèles utilisés pour le calcul des concentrations des différentes espèces de la β -lg semblent donc sous-estimer la concentration des agrégats à la sortie de l'ECP.

Cet écart entre les valeurs simulées et calculées dans le tableau 4.6 pourrait être expliqué par le fait que nous ne tenons pas compte dans le cas du modèle à écoulement piston de la corrugation des plaques de l'ECP, entraînant ainsi une mauvaise distribution du flux dans les canaux de l'ECP (Jun et Puri, 2007). Une seconde hypothèse est que le système de refroidissement de descente en température des échantillons prélevés n'est pas assez efficace. De ce fait, la concentration en agrégats dans les échantillons ne correspondrait pas à celle réellement formée uniquement par le passage dans l'installation. Dans ce cas, la concentration en agrégats simulée serait forcément inférieure à la valeur expérimentale.

Par ailleurs, le calcul des concentrations des différentes espèces de β -lg a été effectué à partir de la température en solution, sans tenir compte de la température de paroi qui peut grandement influencer les paramètres cinétiques de dénaturation de la protéine (Bouvier et al., 2014).

Cette température de paroi peut être calculée à partir de l'équation du bilan thermique sur l'ECP :

$$U_g S (T_{ec} - T_p) = h_p S (T_w - T_p) \quad (4.1)$$

avec S la surface d'échange, U_g le coefficient de transfert global et h_p le coefficient de convection thermique du produit et T_w , T_p et T_{ec} respectivement les températures de paroi, du produit et de l'eau chaude.

Les coefficients de convection thermique sont déterminés à partir des équations suivantes :

$$h_p = \frac{Nu_p \lambda_p}{D_h} \quad (4.2)$$

$$h_{ec} = \frac{Nu_{ec} \lambda_{ec}}{D_h} \quad (4.3)$$

avec h_{ec} le coefficient de convection thermique de l'eau chaude, D_h le diamètre hydraulique, λ_p et λ_{ec} respectivement les conductivités thermiques à la température moyenne du produit et de l'eau chaude et Nu_p et Nu_{ec} respectivement les nombres de Nusselt du produit et de l'eau chaude.

Le nombre de Nusselt des fluides chaud et froid est déterminé à partir de la corrélation suivante (Leuliet, 1988) :

$$Nu = 0,2031 Re^{0,656} Pr^{0,33} \quad (4.4)$$

avec Re le nombre de Reynolds à la température moyenne du fluide concerné et Pr le nombre de Prandtl à la température moyenne du fluide concerné.

Les coefficients h_p et h_{ec} sont reliés par la relation suivante (la conduction à travers la plaque de l'ECP n'est pas prise en compte), permettant ainsi de déterminer U_g :

$$\frac{1}{U_g} = \frac{1}{h_{ec}} + \frac{1}{h_p} \quad (4.5)$$

La température de paroi T_w s'écrit donc :

$$T_w = T_p + \frac{U_g}{h_p} (T_{ec} - T_p) \quad (4.6)$$

La figure 4.26 compare les profils de températures de paroi et de produit pour l'essai #1.

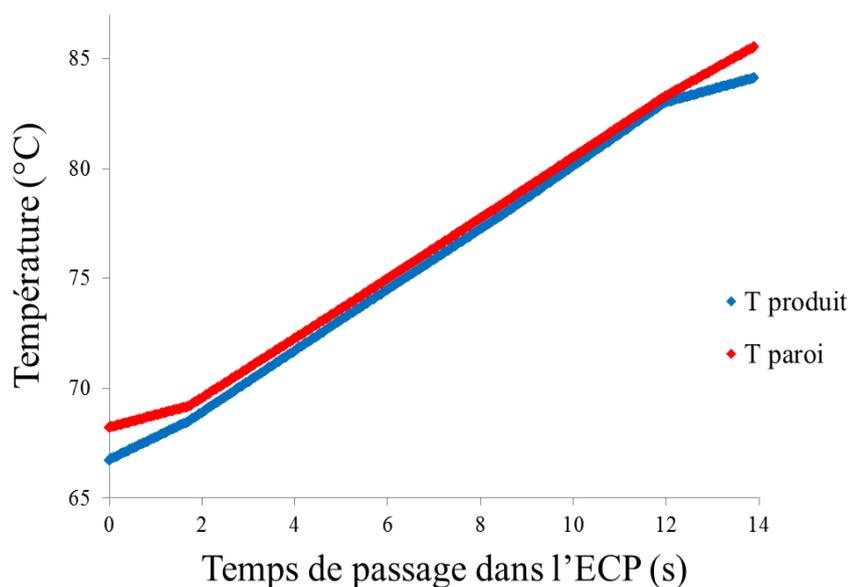


Figure 4.26. Comparaison entre les profils thermiques de paroi et de produit pour l'essai #1.

La figure 4.26 montre que les profils thermiques de paroi et de produit sont assez proches. Ceci est également le cas pour les autres essais (#2, #3 et #4) non présentés ici.

Le tableau 4.7 représente une comparaison entre les concentrations des agrégats de la β -lg mesurées et calculées (à partir du modèle de Tolkach et Kulozik (2007) et celui de deux réactions successives) à la sortie de l'ECP, en prenant en compte la température de paroi T_w .

Tableau 4.7. Simulation de la concentration de la β -lg agrégée à la sortie de l'ECP à partir des températures en proche paroi et comparaison avec la concentration des agrégats mesurée pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total.

Profils thermiques	C _A calculées (g.L ⁻¹) à partir du		C _A mesurées (g.L ⁻¹)
	Modèle Tolkach et Kulozik (2007)	Modèle de 2 réactions successives $n_1 = n_2 = 1,5$	
#1	1,5	1,3	2,8
#2	1,6	1,4	3,5
#3	3,1	3,4	3,4

Le tableau 4.7 montre que même en intégrant la température de paroi dans la simulation des concentrations des agrégats en sortie de l'ECP, les valeurs de C_A mesurées demeurent largement supérieures aux valeurs calculées, aussi bien avec le modèle de Tolkach et Kulozik (2007) que le modèle de deux réactions successives. Des erreurs expérimentales lors du figeage de la réaction de dénaturation pourraient entraîner une surestimation des C_A mesurées.

La comparaison entre les tableaux 4.6 et 4.7 montre une faible augmentation des concentrations des agrégats calculées avec les deux modèles étudiés aux températures en solution et de paroi, excepté pour le profil thermique #3. Ce résultat est prévisible car les profils de températures de produit et de paroi sont parallèles et très proches, ce qui entraîne une correction peu significative.

Par ailleurs, il est difficile d'obtenir des mesures fiables de la température de paroi avec cette configuration complexe de l'ECP (nombreux canaux, recirculation du fluide, turbulence du fluide, etc.). De plus, la formation de dépôt encrassant lors du traitement thermique de la solution protéique modèle peut influencer la distribution de la température dans l'ECP.

Il demeure néanmoins nécessaire de tenir compte de la température de paroi dans les modèles cinétiques utilisés pour décrire le dépôt protéique dans l'ECP. Des analyses plus poussées (CFD) sont donc requises afin de déterminer au mieux cette température.

4. Conclusion

Les résultats de ce chapitre ont permis de simuler non seulement les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg mais aussi d'établir une relation entre ces profils de concentrations et la distribution de la masse de dépôt sec dans les différents canaux de l'ECP.

La comparaison entre les profils de concentrations de β -lg et la distribution de la masse de dépôt sec, des différentes solutions modèles protéiques étudiées et pour l'ensemble des conditions de procédé imposées, a pu mettre en évidence que :

- l'apparition de la β -lg agrégée est postérieure à la formation de dépôt. Le rôle des agrégats dans les mécanismes d'encrassement est donc négligeable ;
- la libération de la β -lg dépliée en solution, même en faible quantité, joue un rôle clé dans la croissance du dépôt protéique et sa localisation dans l'ECP. En effet, le profil de concentration de l'espèce dépliée suit la distribution de la masse de dépôt sec le long de l'ECP.

Ces résultats suggèrent donc que la connaissance de la réactivité chimique des solutions modèles protéiques est d'une grande importance puisque l'évolution des profils de concentrations des différentes espèces de β -lg dans les canaux de l'ECP dépend fortement des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la protéine. Existerait-il par conséquent une corrélation directe entre les constantes cinétiques de dénaturation de la β -lg et la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP ? Cette question sera traitée dans le chapitre suivant.

Chapitre 5 : Etude de la relation entre le ratio des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg et la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP pour différentes solutions de WPI

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les mécanismes d'encrassement sont gouvernés par les réactions de dénaturation chaude de la β -lg. En effet, ces réactions chimiques, se produisant en solution (dépliage et agrégation de la β -lg) lors du traitement thermique de solutions protéiques modèles, sont à l'origine de l'apparition/disparition de plusieurs espèces (N , U , A) au sein de l'ECP, ce qui module la concentration de ces espèces au sein de l'ECP et par conséquent la croissance et la distribution du dépôt encrassant le long de l'ECP. Le chapitre précédent nous a aussi permis de mettre en lumière que lorsque l'agrégation devenait prépondérante par rapport à l'étape de dépliage, la formation de dépôt était limitée. Cependant, jusqu'ici nous n'avons pas cherché à établir de liens directs entre les constantes de cinétique de dénaturation et les masses de dépôt.

L'objectif principal de chapitre est de combler en partie ces lacunes en répondant directement à la question suivante : est-il possible de prédire la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP à partir de la seule connaissance des constantes cinétiques des réactions de dénaturation de la β -lg ? Cette corrélation prédictive, si elle existe, est-elle valide pour les différentes solutions modèles protéiques testées et les différents profils thermiques étudiés ?

Pour ce faire, nous avons choisi :

- de représenter l'évolution de la masse de dépôt sec par canal en fonction du ratio $r = k_{unf}/k_{agg}$ des constantes cinétiques de dépliage (k_{unf}) et d'agrégation (k_{agg}) calculées à la température moyenne de chaque canal. Compte tenu du modèle retenu ($S \rightarrow A$), le rapport k_{unf}/k_{agg} représente le rapport des vitesses des réactions de dépliage et d'agrégation. C'est un indicateur local évalué à la température moyenne du canal et sa position par rapport à 1 permet de déterminer l'étape limitante de la réaction (dépliage ou agrégation) pour chaque intervalle de températures ;
- d'analyser l'allure des courbes obtenues et leurs potentiels prédictifs vis-à-vis de l'encrassement.

Ce mode de représentation n'a jamais été adopté précédemment par d'autres auteurs à notre connaissance dans la littérature et sera discuté dans un premier temps pour des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) contenant différentes teneurs en calcium (100 et 120 ppm) puis,

pour des solutions protéiques modèles incluant différents ratios molaires calcium/protéine (de 2,3 à 22,9) et ce, pour différentes conditions opératoires imposées dans l'ECP, à savoir : différents profils thermiques (#1, #2, #3 et #4) et configurations de l'ECP (5 et 10 canaux).

Enfin, l'évolution de la masse de dépôt en fonction du ratio r sera tracée pour une solution de β -lg quasi-pure (6% p/p avec 264 ppm de calcium total) à partir de la connaissance de l'histoire thermique du produit et des constantes cinétiques de dénaturation rapportées par Petit et al. (2011) et présentées dans le tableau 4.3 (chapitre 1 de la partie Résultats et Discussions).

1. Allure des courbes masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour nos solutions protéiques modèles et différentes configurations d'ECP

La figure 4.27 représente l'évolution de la masse de dépôt dans chaque canal de l'ECP en fonction de r , pour des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) contenant 100 et 120 ppm de calcium total et différents profils thermiques imposés dans les 5 canaux de l'ECP.

L'analyse de la figure 4.27 semble indiquer que pour chaque solution protéique modèle, on obtient une courbe maîtresse (sigmoïde) rassemblant l'ensemble des données des masses de dépôt sec mesurées dans chaque canal de l'ECP en fonction de r et ce, quel que soit le profil thermique imposé. Même si on note une dispersion importante sur ces deux premières solutions protéiques modèles, l'existence de courbes en S sera confirmée ultérieurement sur les autres solutions (figures 4.28 et 4.29). Ces courbes en S peuvent être décrites, pour l'ensemble des essais d'encrassement, par la fonction suivante :

$$M_{d,i} = a + \frac{b-a}{1+(\frac{c}{r})^d} \quad (4.7)$$

avec a , b , c et d des paramètres ajustables de la régression non linéaire et $M_{d,i}$ la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP.

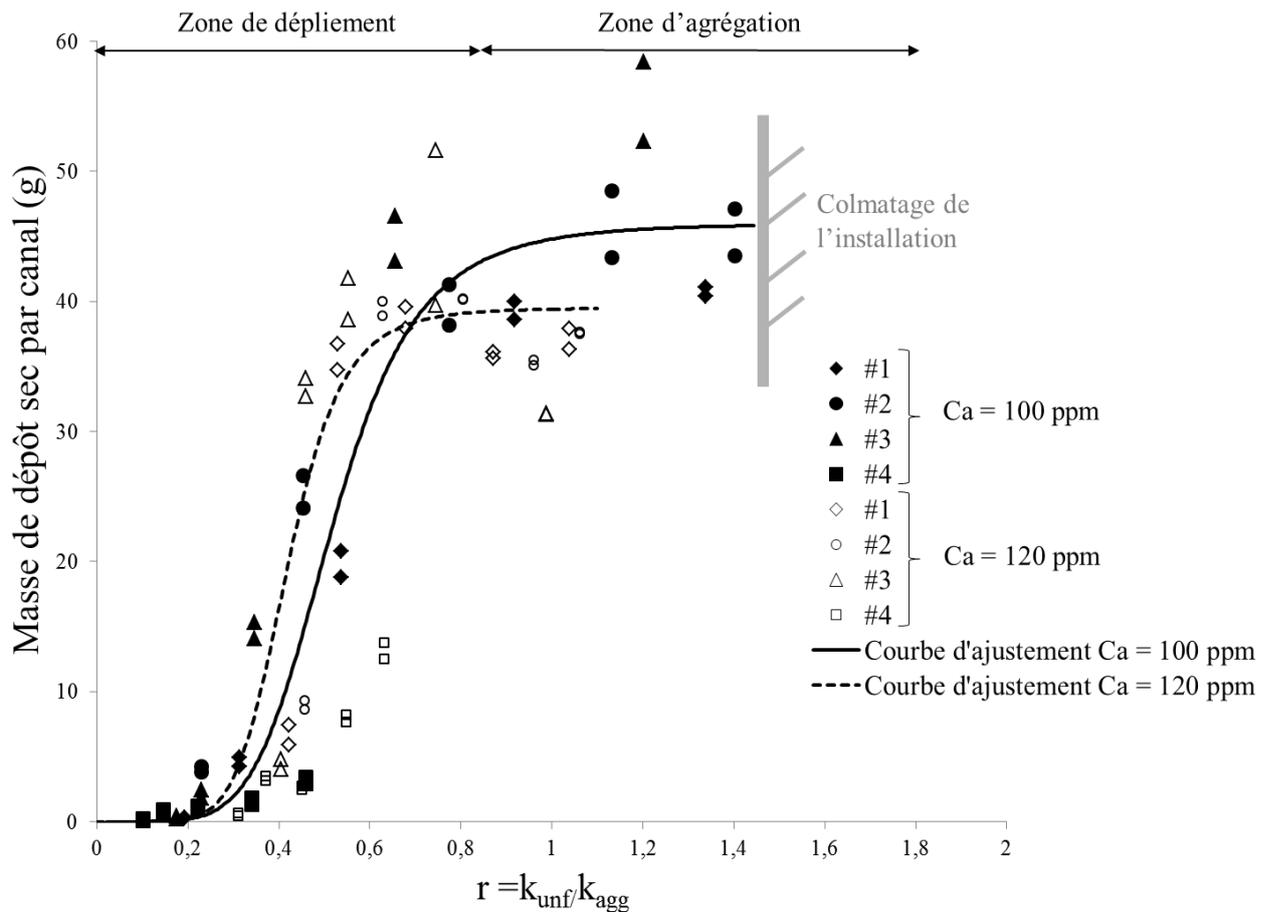


Figure 4.27. Courbes de la distribution de la masse de dépôt sec dans chaque canal en fonction de $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour des solutions modèles de WPI à 1% (p/p) contenant 100 et 120 ppm de calcium total et différents profils thermiques imposés dans l'ECP.

La dispersion observée sur ces courbes en S peut être due à la difficulté de disposer de mesures expérimentales précises (reproductibilité des essais d'encrassement) mais aussi au choix de représentation. En effet, le positionnement en abscisse des masses de dépôt sec par canal est très dépendant de la température moyenne du canal. Comme les montées en température au sein des canaux de l'ECP sont importantes, la température moyenne du canal est parfois mal discrétisée et donc mal évaluée.

Les deux courbes maîtresses, représentées dans la figure 4.27, sont constituées de deux zones distinctes : (i) une première zone caractérisée par une forte augmentation de la masse de dépôt sec par canal à des valeurs de r proches de 0, suivie d'un maximum de la quantité de dépôt à une certaine valeur de r et (ii) une deuxième zone où la masse de dépôt semble atteindre une valeur limite à une certaine valeur de r .

Pour la solution modèle à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total, la masse de dépôt sec augmente à partir de $r = 0,22$ (correspondant au début de l'encrassement de l'ECP) et atteint un plateau à $r > 0,89$.

Pour la deuxième solution modèle de WPI étudiée (1% p/p à 120 ppm de calcium total), l'augmentation de la quantité de dépôt commence à des valeurs de r proches de 0,23 et atteint un maximum à $r = 0,67$.

Pour les deux solutions modèles de WPI étudiées et l'ensemble des profils thermiques imposés, l'augmentation de la masse de dépôt est observée à des valeurs de r inférieures à 1, correspondant à une température du canal légèrement inférieure à la température critique de transition séparant les deux mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg ($\sim 80^\circ\text{C}$). Ceci confirme l'hypothèse que la réaction de dépliement contrôle la croissance de la masse de dépôt. Ce résultat est en adéquation avec les travaux de Blanpain-Avet (2012) et van-Asslet (2005) indiquant que les protéines de β -lg agrégées ne sont pas à l'origine du dépôt encrassant.

D'autres essais d'encrassement ont été menés sur un ECP avec une configuration de 10 canaux afin de vérifier la validité de l'approche utilisée (masse de dépôt par canal en fonction de r) indépendamment de la configuration de l'ECP, pour une solution modèle de WPI à 1% (p/p) contenant 100 ppm de calcium total (figure 4.28). Un seul profil thermique (#1) a été imposé dans l'ECP.

La figure 4.28 montre que la masse de dépôt dans les différents canaux de l'ECP est corrélée au ratio r . En effet, une courbe en S est à nouveau observée. Elle est caractérisée par deux zones distinctes : (i) une forte augmentation de la masse de dépôt à des valeurs de r inférieures à 1 (entre 0,5 et 0,99) correspondant à la zone de dépliement (pour des températures allant de 69 à 80°C) et (ii) une deuxième zone où la masse de dépôt sec semble atteindre son maximum à des valeurs de $r > 1$ correspondant à la zone d'agrégation (pour des températures supérieures à 80°C).

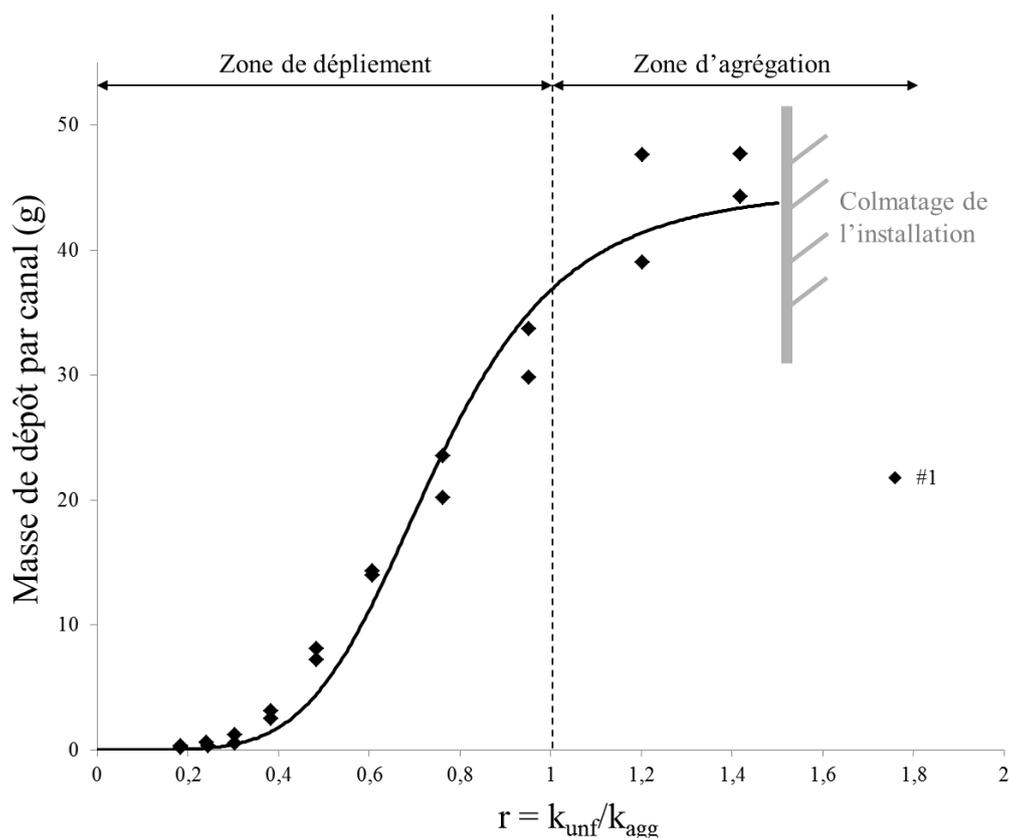


Figure 4.28. Variation de la masse de dépôt sec dans chaque canal en fonction du ratio $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour une configuration d'ECP de 10 canaux.

L'analyse de la figure 4.28 montre que la dispersion des données vis-à-vis de leur inscription sur une courbe maîtresse unique est plus faible qu'à la figure 4.27. Ceci est logique car pour cette configuration d'ECP, la montée en température par canal est faible ce qui améliore la précision sur la valeur de r . Ce résultat montre clairement que la distribution de la masse de dépôt sec dans l'ECP est contrôlée par les réactions chimiques en solution et que la variable r rend bien compte de l'avancement local de la réaction de dénaturation. En effet, quand le dépliement est important mais que l'agrégation n'est pas prépondérante ($0,5 < r < 1$), l'augmentation de la concentration en espèces dépliées est significative et on note une forte augmentation de la masse de dépôt par canal. Dès lors que l'agrégation devient prépondérante (r proche de 1), la concentration en β -lg dépliées mobilisables pour former des dépôts en paroi diminue et par voie de conséquence, la masse de dépôt formé par canal cesse d'augmenter.

La détermination du ratio r , identifié à l'échelle laboratoire à partir des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg, semble donc être un outil prédictif pour renseigner sur la croissance du dépôt encrassant et la distribution de la masse de dépôt le long de l'ECP.

Il semble en effet que la corrélation entre la masse de dépôt sec par canal et le ratio r peut être un mode de représentation intéressant pour identifier les canaux sujets à fort encrassement. De plus, on constate que ces graphes prédictifs semblent applicables à l'ensemble des solutions protéiques modèles et ce, quels que soient la teneur en calcium, la configuration de l'ECP et le profil thermique imposé. Notons qu'il était impossible d'effectuer, avec les deux types de configuration de l'ECP, des essais d'encrassement à des valeurs de r plus élevées ($r > 1,40$) correspondant à une température du canal supérieure à 84°C, en raison du colmatage de l'installation pilote.

2. Influence de ratio molaire calcium/protéine sur l'allure des courbes masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$

Nous avons établi aux chapitres 1 et 2 de la partie Résultats et Discussions que le ratio molaire calcium/protéine permettait de classer l'aptitude à l'encrassement des solutions protéiques modèles et qu'il impactait aussi les paramètres cinétiques de dénaturation. Dans ce qui suit, nous cherchons à déterminer l'influence du ratio molaire calcium/protéine de solutions protéiques modèles sur l'allure des courbes masse de dépôt par canal vs r . Les essais d'encrassements ont été réalisés avec une configuration d'ECP de 5 canaux.

La figure 4.29 représente l'évolution de la masse de dépôt dans chaque canal de l'ECP en fonction de r , pour différents ratios molaires calcium/protéine allant de 2,3 à 22,9. Le même profil thermique (#1) a été imposé dans l'ECP pour les différentes solutions modèles de WPI.

La figure 4.29 montre que pour chaque ratio molaire calcium/protéine, une courbe en S peut être observée décrivant ainsi la variation de la masse de dépôt sec dans les différents canaux de l'ECP. Ces courbes en S peuvent être décrites, pour l'ensemble des essais d'encrassement, par la fonction mathématique présentée dans l'équation 4.7.

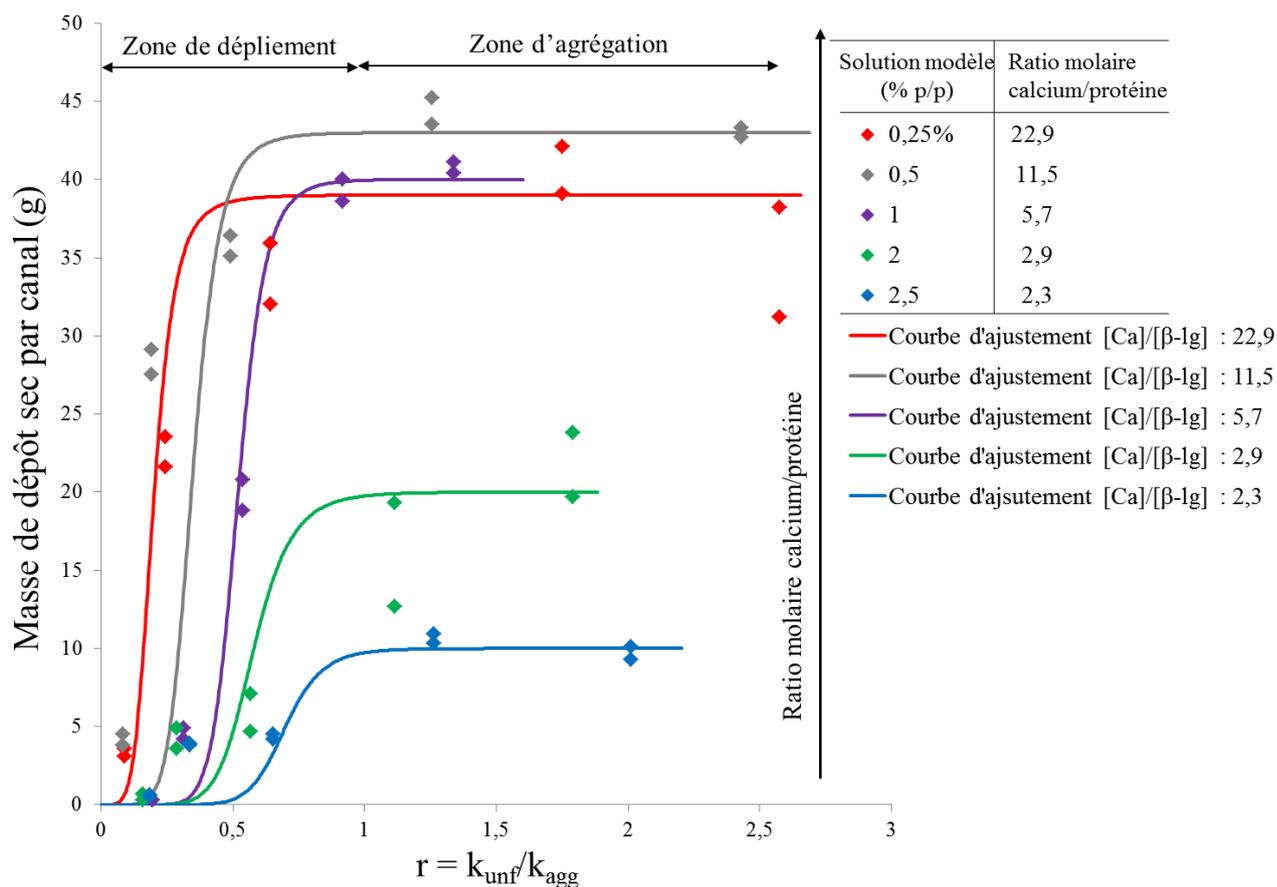


Figure 4.29. Variation de la masse de dépôt sec dans les différents canaux de l'ECP en fonction du ratio $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour différents ratios molaires calcium/protéine.

Les différentes courbes maîtresses de la figure 4.29, représentant la masse de dépôt par canal en fonction de r , sont constituées de deux zones : (i) une zone de dépliement caractérisée par une forte augmentation de la masse de dépôt sec à des valeurs de r proches de 0, suivie d'un maximum de la masse de dépôt à $r < 1$ (entre 0,6 et 0,99 correspondant à des températures allant de 76 à 80°C) et (ii) une zone d'agrégation où la masse de dépôt sec semble atteindre une valeur limite à une certaine valeur de r .

La croissance du dépôt, qui commence à des valeurs de r proches de 0, confirme l'importance d'initier le dépliement pour que le dépôt protéique se dépose sur les plaques de l'ECP. De plus, la forte augmentation de la masse de dépôt à des valeurs de r inférieures à 1 prouve encore une fois que c'est la réaction de dépliement qui gouverne la croissance du dépôt le long de l'ECP.

La figure 4.29 montre également que, pour les différents ratios molaires calcium/protéine étudiés, l'augmentation de la masse de dépôt sec par canal ne suit pas la même pente. La pente de chacune de ces courbes en S est donc influencée par le ratio molaire calcium/protéine

de la solution protéique modèle. On constate, d'une manière générale que plus le ratio molaire calcium/protéine est important, plus la pente est forte.

Par ailleurs, l'observation des différentes courbes montrent que l'intervalle de températures de la zone de dépliement diminue lorsque le ratio molaire calcium/protéine augmente. Ces tendances sont notables pour l'ensemble des solutions modèle sauf pour celle avec un ratio molaire calcium/protéine de 22,9. Ceci pourrait être expliqué par le fait que pour cette solution, on a observé que la courbe de dénaturation ne subissait pas un simple décalage en ordonnées en fonction du ratio calcium/protéine (chapitre 1 de la partie Résultats et Discussions). Ce changement de forme de la courbe de dénaturation engendre des ratios r différents des autres solutions protéiques modèles, influençant ainsi la représentation de la courbe de la variation de la masse de dépôt sec par canal en fonction du ratio r .

Dans la zone limitante d'agrégation (température du canal $> 80^{\circ}\text{C}$ et $r > 1$), un plateau est observé pour chacun des ratios molaires calcium/protéine étudié. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que la collision entre les molécules de β -lg dépliées favorise la formation des agrégats plutôt que la formation de la couche de dépôt encrassante (Delplace et al., 1997). Par ailleurs, on constate que les valeurs de ce plateau augmentent avec l'accroissement du ratio molaire calcium/protéine. Cependant, la valeur du plateau du ratio molaire calcium/protéine de 22,9 (ratio molaire calcium/protéine le plus élevé) diminue légèrement.

L'analyse de la figure 4.29 montre clairement que quel que soit le ratio molaire calcium/protéine, la masse de dépôt sec par canal atteint une valeur limite maximale lorsque la réaction d'agrégation est suffisamment élevée pour consommer les espèces dépliées de la β -lg sous forme d'agrégats. Le ratio molaire calcium/protéine traduit fidèlement les états d'avancement des réactions de dépliement et d'agrégation dans le canal de l'ECP et par conséquent, la distribution de la masse de dépôt pour un profil thermique donné.

Il est donc clair, pour les différentes solutions protéiques modèles contenant différents ratios molaires calcium/protéine, que la masse de dépôt sec par canal est fortement corrélée au ratio r . Ce résultat montre l'importance de déterminer les constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg afin de maîtriser l'encrassement.

3. Evolution de la masse de dépôt sec par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour des données expérimentales rapportées dans la littérature

Afin de confirmer que l'approche préconisée (évaluation du ratio r le long de l'échangeur) dans nos travaux est robuste pour apporter une vision de la distribution des dépôts sec au sein des ECP, quelle que soit la nature de la solution protéique encrassante à traiter, nous avons décidé de tracer l'évolution de la masse de dépôt sec par canal vs r issue de travaux d'autres auteurs. Nous avons utilisé les travaux de Petit et al. (2011, 2013) car les constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg et les masses de dépôt sec par canal obtenues pour différents traitements thermiques étaient disponibles pour sa solution de β -lg quasi-pure. De plus, ces travaux ont été menés au sein du laboratoire et la base de données nous est donc facilement accessible.

La figure 4.30 représente la variation de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP en fonction de r pour différentes conditions de procédé (T_{sp} la température de sortie du produit, ΔT_p la différence de température entre l'entrée et la sortie du produit, τ le temps de passage du produit et ε l'efficacité de l'ECP), pour une solution de β -lg quasi-pure (solution à 6% p/p contenant 264 ppm de calcium total).

L'analyse de la figure 4.30 montre que pour l'ensemble des conditions de procédé imposées, une seule et unique courbe en cloche peut être tracée. En effet, pour les 21 essais d'encrassement, la distribution de la masse de dépôt dans chaque canal de l'ECP en fonction de r peut être décrite par la fonction non linéaire suivante à 4 paramètres :

$$M_{d,i} = a + b \exp\left(-0,5 \left(\frac{\ln\left(\frac{r}{c}\right)}{d}\right)^2\right) \quad (4.8)$$

Cette fonction mathématique permet d'obtenir un bon ajustement de la courbe maîtresse des masses de dépôt sec par canal en fonction de r ($R^2 = 0,73$).

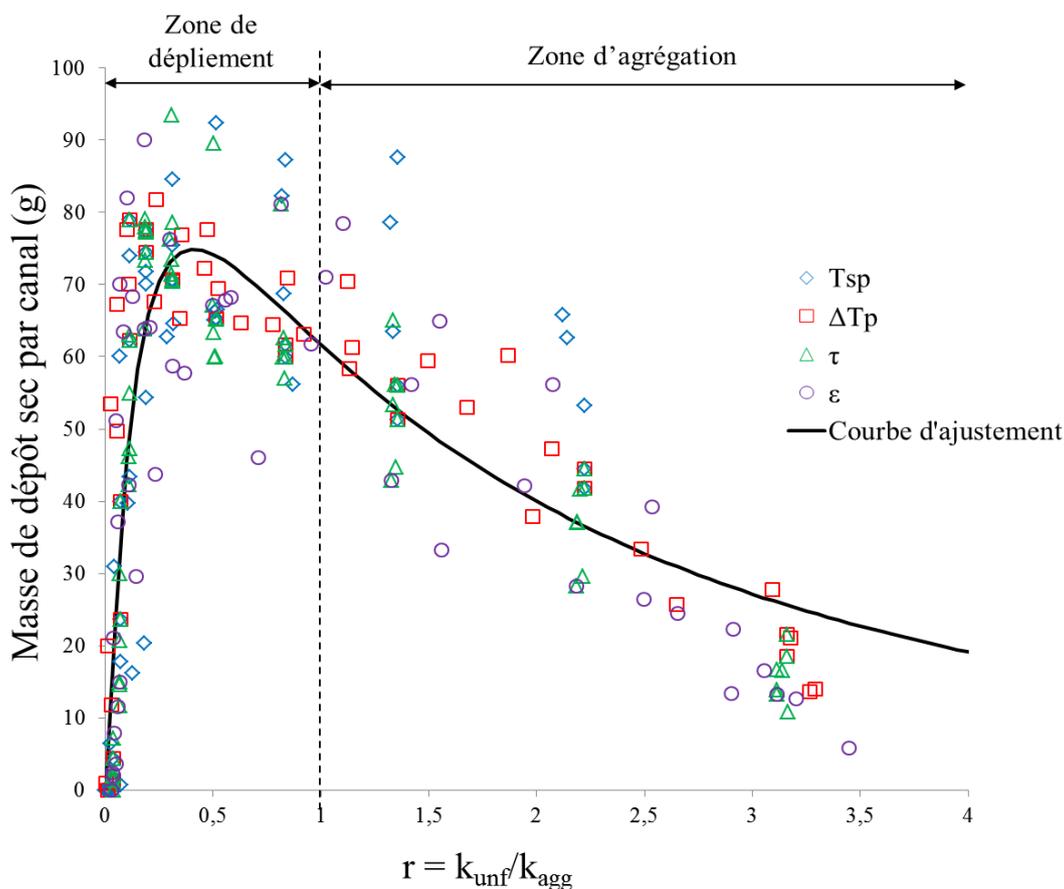


Figure 4.30. Variation de la masse de dépôt sec le long de l'ECP en fonction de $r = k_{unf}/k_{agg}$ pour une solution de β -lg quasi-pure et différentes conditions de procédé

Les symboles en légende indiquent les divers paramètres de procédé qui ont permis d'obtenir différents encrassements (T_{sp} température de sortie du produit, ΔT_p différence de température entre l'entrée et la sortie du produit, τ temps de séjour du produit et ε efficacité de l'ECP).

La comparaison des résultats de la figure 4.30 avec nos propres essais expérimentaux montre que la courbe maîtresse n'est plus une courbe en S mais une courbe présentant un optimum. Ceci dit les résultats obtenus avec cette forme de courbe ne sont pas contradictoires avec les nôtres. En effet, Petit et al. (2011, 2013) ont pu couvrir des gammes de ratios r beaucoup plus élevées car les profils de températures imposés n'étaient pas les mêmes et aucun colmatage de leurs installations n'a été constaté aux ratios de $r > 1,4$ avec leur solution protéique modèle (ratio calcium/protéine = 2,3). Il n'est pas à exclure que la masse de dépôt sec par canal diminue avec r au-delà du premier plateau pour nos solutions protéiques encrassantes. Ceci semble être le cas d'ailleurs pour la solution protéique à fort ratio calcium/protéine = 22,9 apparaissant à la figure 4.29.

La courbe maîtresse observée sur la figure 4.30 est caractérisée par deux zones distinctes : (i) un fort accroissement de la quantité de dépôt à des valeurs de r proches de 0 ($r = 0,005, 0,01, 0,02$ et $0,03$ correspondant à respectivement $\Delta T_p, T_{sp}, \varepsilon$ et τ), suivi d'un maximum de la masse de dépôt à des valeurs de r proches de 0,4 (correspondant à une température du canal de l'ordre de 75°C), puis (ii) d'une diminution progressive de la masse de dépôt au-delà d'une certaine valeur r .

Pour les 21 essais d'encrassement, l'augmentation de la masse de dépôt sec par canal dans la zone de dépliement en fonction de r pourrait être expliquée par le fait que le degré de dépliement est insuffisant pour que l'agrégation soit la réaction prédominante. En effet, la probabilité de collision entre deux molécules de β -lg est très faible dans ces conditions. La croissance et le maximum du dépôt encrassant sont donc principalement dus au dépôt de la β -lg dépliée.

Par ailleurs, malgré l'augmentation de la température le long de l'ECP, la forte diminution de la masse de dépôt pour des valeurs de r entre 0,4 et 1 pourrait être expliquée par la consommation des molécules de β -lg dépliées sous forme d'agrégats en solution. Nos propres travaux (chapitre 3 de la partie Résultats et Discussions) et ceux de de Jong et al. (1992), Delplace et al. (1997) et van Asselt et al. (2005) ont montré que la formation des agrégats réduit l'encrassement.

Les résultats de la figures 4.30 montre clairement que les réactions de dénaturation de la β -lg (dépliement et agrégation) gouvernent la croissance du dépôt et renseigne sur le comportement encrassant dans l'ECP de solutions protéiques modèles.

Cette description de l'évolution de la masse de dépôt en fonction du ratio r est un mode de représentation très instructif en termes de propositions de modèles mécanistiques. En effet, cette approche montre la défaillance de certains modèles de la littérature : bon nombre de modèles généralement admis la littérature tiennent compte uniquement de la concentration de la β -lg native à la sortie de chaque canal de l'ECP (Delplace et al., 1994 ; Delplace et al., 1997) pour la prédiction du taux d'encrassement. Cependant, ces modèles ne peuvent pas expliquer la diminution de la masse de dépôt observée dans l'échangeur de chaleur, malgré l'augmentation à la fois de la température dans les différents canaux de l'ECP et le profil de concentration de la β -lg dépliée. A contrario, la connaissance de l'histoire thermique du produit le long de l'ECP et la détermination du ratio r , identifié à l'échelle laboratoire à partir des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg, permet de renseigner sur la croissance du dépôt encrassant et la distribution de la masse de dépôt dans les différents canaux de l'ECP. De plus, on s'aperçoit que certains paramètres, tels que la contrainte de

cisaillement et la température de paroi, ne sont pas forcément nécessaires pour obtenir la tendance de la distribution de la masse de dépôt dans les différents canaux de l'ECP et une prédiction grossière mais robuste pour l'ensemble des conditions de procédé étudiées.

4. Conclusion

Les résultats de ce dernier chapitre montrent clairement que les réactions de dénaturation chaude de la β -lg gouvernent la croissance du dépôt. L'agrégation limite le dépôt alors que le dépliement (sans agrégation) favorise le dépôt.

Pour chacune des solutions protéiques modèles étudiées, on observe l'existence d'une courbe maîtresse décrivant l'évolution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP (au bout d'un temps de fonctionnement donné) en fonction des ratios des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg ($r = k_{unf}/k_{agg}$ calculé à la température moyenne du canal).

L'existence de courbe maîtresse laisse présager :

- que l'identification des constantes cinétiques de dénaturation à l'échelle laboratoire doit être entreprise pour maîtriser l'encrassement de l'ECP ;
- et quelques essais d'encrassement ciblés avec une solution protéique donnée pourraient suffire pour prédire le comportement encrassement d'une solution dans d'autres conditions de traitement thermique.

A ce stade, plus de recul et des essais complémentaires sont nécessaires pour établir la portée réelle de ces approches de génie de la réaction chimique présentées dans ce travail de thèse et évaluer dans quelle mesure ces graphes prédictifs peuvent être utilisés pour limiter l'encrassement des surfaces de l'ECP en appliquant des profils thermiques différents ou en faisant évoluer la configuration et la géométrie de l'ECP ou la formulation de la solution protéique modèle étudiée.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au-delà des conclusions évoquées dans chaque chapitre, nous synthétisons ici quelques enseignements que nous retenons de ce travail de thèse.

A travers ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les mécanismes de formation de dépôt protéique dans des ECP et ses liens avec à la fois la physico-chimie des solutions (principalement la teneur en calcium) et les paramètres de procédé (profils thermiques imposés et configurations de l'ECP).

Ce type de travaux est rare dans la littérature. Pour preuve, à l'heure actuelle, la teneur en calcium des solutions protéiques n'est que rarement reportée dans les études traitant de la dénaturation chaude de la β -lg et/ou l'encrassement des échangeurs thermiques. Par ailleurs, on constate que les études, tentant de cerner l'évolution de la réactivité avec la composition des solutions protéiques du lactosérum sont quasi-inexistantes. De même, les approches de génie de la réaction établissant des liens entre la concentration des espèces protéiques et la masse des dépôts ont rarement été menées au sein des ECP.

Dans la première partie de ce travail (chapitre 0), nous avons exploité une base de données existante d'essais d'encrassement avec des solutions de protéines sériques (WPC 1% p/p) ayant différentes teneurs en calcium (comprise entre 70 et 87,4 ppm) dans le but d'évaluer l'existence de corrélations positives entre les phénomènes d'encrassement et la teneur en calcium des solutions protéiques. L'exploitation de cette base de données a donc permis de certifier sans ambiguïté la forte influence de la teneur en calcium sur le comportement encrassant d'une solution modèle de WPC durant un traitement thermique dans un ECP. Nous avons mené une démarche modeste de modélisation par analyse dimensionnelle de ces données afin d'évaluer si une corrélation simple peut être établie et traduire quantitativement cette relation de cause à effet entre la masse de dépôt par canal et les conditions d'encrassement (teneur en calcium de la solution protéique, température du canal de l'ECP, hydrodynamique). Cette étude a été un démonstrateur qui prouve que la teneur calcium a un rôle majeur dans le phénomène d'encrassement et met en lumière la nécessité d'intégrer cette information dans les modèles pour décrire les phénomènes de formation de dépôt encrassant.

Dans la deuxième partie de ce travail (chapitre 1), nous avons procédé à des essais d'identification des cinétiques de dénaturation chaude (68 à 93°C) de la β -lg de différentes solutions modèles de WPI.

La méthodologie utilisée a permis de répondre aux objectifs scientifiques fixés : caractérisation des cinétiques de dénaturation de la β -lg dans des conditions proches des traitements thermiques en ECP.

Avec ces fluides modèles et nos conditions de pH, nous avons confirmé que le mécanisme général de dénaturation de la β -lg pouvait se résumer en deux étapes, à savoir le dépliement et l'agrégation, séparées par une température critique de l'ordre de 80°C.

Nous avons montré qu'une légère augmentation de la teneur en calcium (passant de 100 à 120 ppm de calcium total) favorise les réactions de dépliement et d'agrégation de la β -lg et modifie significativement les cinétiques de dénaturation.

L'augmentation de la teneur en calcium pour une teneur en protéine fixée (1% p/p) influence fortement les mécanismes de dénaturation chaude de la β -lg et les paramètres cinétiques de dénaturation associés (facteurs de fréquence $\ln k^\circ$ et les énergies d'activation E_A pour un ordre de réaction égal à 1.5).

Par ailleurs, nous avons montré que les cinétiques de dénaturation de la β -lg se classifient selon le ratio molaire calcium/protéine (de 2,3 à 22,9). Plus ce ratio est élevé, plus la constante de dénaturation k_n est importante. Le ratio molaire calcium/protéine semble être un indicateur pertinent pour appréhender la réactivité (en termes de dénaturation) de nos solutions protéiques modèles à contrario de la concentration en protéine (de 0,25 à 2,5% p/p), qui n'est pas un paramètre capable d'ordonner la réactivité des solutions de WPI à teneur variable en calcium.

Dans la troisième partie de ce travail (sous chapitre 2), des essais d'encrassement en ECP de différentes solutions protéiques modèles de WPI ont été effectués. Nous avons constaté que la distribution des dépôts par canal et la quantité de dépôt totale dépendent fortement des profils thermiques imposés au sein de l'ECP mais aussi de la teneur en calcium des solutions encrassantes.

Par ailleurs, nous avons montré que pour un traitement thermique donné l'aptitude à l'encrassement des solutions protéiques s'ordonne selon la valeur du ratio molaire calcium/protéine. Il a été établi qu'il n'est pas envisageable de prédire la masse de dépôt à partir de la seule connaissance de la concentration en la β -lg à teneur variable en calcium. Le

contrôle du ratio molaire calcium/protéine des solutions de lactosérum est donc un levier puissant pour la maîtrise du potentiel encrassant des solutions traitées.

Dans le chapitre 2, nous avons également effectué des analyses EPMA des premières couches de dépôt. Celles-ci ont été réalisées sur des couches de dépôt formées en zone de chauffe (analyse destructive des dépôts formés sur les plaques d'ECP). Nous avons ainsi montré que la structure de ces couches de dépôt protéique était différente selon le ratio molaire calcium/protéine. En effet, l'analyse des cartographies spatiales obtenues à fort ratio molaire calcium/protéine indiquent que les particules de calcium participent au dépôt et accélèrent la croissance des couches successives, favorisant sans doute les liaisons intermoléculaires entre les protéines dénaturées. A l'inverse, pour de faibles ratios molaires calcium/protéine, les interactions calcium-protéines sont très limitées et seules des interactions protéine-protéine peuvent avoir lieu, ce qui ralentit la cinétique du dépôt.

Dans la quatrième partie de ce travail (chapitre 3), nous avons étudié le lien entre les profils de concentrations des différentes espèces de β -lg et la distribution de la masse de dépôt sec dans les différents canaux de l'ECP. Une part importante du chapitre 3 est dédiée à la modélisation des phénomènes caractérisés expérimentalement afin de comprendre les mécanismes.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence le faible rôle des agrégats dans les mécanismes d'encrassement (l'apparition de la β -lg agrégée est postérieure à la formation de dépôt) et le rôle clé de la β -lg dépliée dans la croissance du dépôt protéique (le profil de concentration de l'espèce dépliée suit la distribution de la masse de dépôt et le dépôt se forme immédiatement après que des faibles concentrations de protéines dépliées soient libérées).

Parallèlement à ces travaux s'appuyant sur le modèle cinétique de Tolkach et Kulozich (2007) (couramment admis pour les solutions de lactosérum), une réflexion a été engagée d'un point de vue méthodologique sur le choix des modèles cinétiques à utiliser pour simuler au mieux ce bilan de population et repositionner les approches de génie de la réaction dans un contexte plus classique de génie des procédés. Ce travail conceptuel a aussi permis de mieux cerner les limites de nos approches de modélisation (importance de connaître la distribution des temps de séjours et la proportion du volume de solutions protéiques à la température de paroi via l'épaisseur de la couche limite thermique pour prédire l'agrégation).

Bien qu'elle soit empirique, la corrélation entre la masse de dépôt sec et les quantités de β -lg dénaturées dans l'ECP permet de prédire les masses de dépôt formés sur les surfaces d'échange après un certain temps de fonctionnement.

Dans la dernière partie de ce travail de thèse (chapitre 4), nous avons cherché à établir de liens directs entre les constantes de cinétique de dénaturation (celles obtenues via l'approche de Tolkach et Kulozik (2007)) et les masses de dépôt sec.

Pour chacune des solutions protéiques modèles étudiées, on a montré l'existence d'une courbe maîtresse décrivant l'évolution de la masse de dépôt sec dans chaque canal de l'ECP (au bout d'un temps de fonctionnement donné) en fonction des ratios des constantes cinétiques de dénaturation chaude de la β -lg ($r = k_{unf}/k_{agg}$ calculé à la température moyenne du canal). L'existence de telles courbes maîtresses laisse présager que quelques essais d'encrassement ciblés avec la solution protéique à traiter pourraient suffire pour prédire le comportement encrassant de cette matrice dans n'importe quelles conditions de traitements thermiques. Il apparaît d'ores et déjà à l'issue de ces travaux que la maîtrise de l'encrassement des ECP nécessite un pré-requis : l'identification des constantes cinétiques de dénaturation de la β -lg.

Ce nouvel éclairage sur les phénomènes d'encrassement laitier apporté par la représentation proposée (masse de dépôt par canal vs $r = k_{unf}/k_{agg}$) est très récent et ne peut pas être considéré à l'heure actuelle comme complètement achevé.

Il nécessiterait une prise de recul plus importante et des travaux complémentaires, aussi bien à l'échelle laboratoire (identification des paramètres cinétiques avec d'autres solutions protéiques) qu'à l'échelle pilote (essais d'encrassement avec d'autres profils thermiques, configurations d'ECP et pour d'autres temps de séjour ou volume de produit traité). L'influence de certains paramètres de procédé tels que la température de paroi et la vitesse de cisaillement mériteraient aussi d'être plus amplement étudiées.

Cependant, ce modèle mécanistique basé sur des approches de génie de la réaction semble réaliste, ce qui améliore son possible déploiement à d'autres matrices ou d'autres procédés thermiques.

Les résultats des chapitres 0 à 4 ont été valorisés dans 4 articles. 2 des articles sont édités et 2 sont en procédure de reviewing. Les contenus de ces articles sont joints en annexe.

Les objectifs scientifiques de la thèse concernant une meilleure compréhension des mécanismes de formation de dépôt ont donc été atteints ce qui n'exclut pas un nombre important de suite à donner. Quelques perspectives scientifiques à court terme sont détaillées ci-après.

1) Identifier l'action du calcium à l'échelle moléculaire dans la formation de dépôt :

L'influence du calcium total sur les cinétiques de dénaturation et la distribution de la masse de dépôt a été mise clairement en évidence. Il serait intéressant de distinguer les contributions du calcium complexé et libre dans ses phénomènes, en dosant le calcium ionique des solutions.

Le dosage du calcium ionique dans les solutions protéiques avant et après traitements sur pilote permettrait de boucler la conservation de matière sur l'élément calcium et de mieux évaluer la quantité de calcium mobilisée dans le dépôt formé en fonction des ratios calcium/protéine initiaux.

2) Complexifier les matrices et évaluer la validité de l'approche de génie de la réaction :

Pour des raisons détaillées dans le document, des solutions modèles de WPI ont été utilisées dans la thèse. Bien que le choix de ces solutions modèles soit justifié par des objectifs de compréhension des mécanismes, elles ne représentent pas la complexité d'un concentré de protéines sériques industrielles (autres assemblages protéiques, autres minéraux comme le phosphore) ou de solutions laitières (présence de caséines, lactose, lipide). Il serait intéressant d'effectuer des essais d'encrassement et d'identification des paramètres cinétiques de dénaturation pour ces matrices protéiques plus complexes. A ce stade, des essais ont été effectués en laboratoire et en pilote sur des solutions de β -lg en présence à la fois de calcium et de phosphore. Les premiers essais ouvrent la possibilité de déployer l'approche de génie de la réaction proposée à des matrices protéiques plus complexes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akkerman M., Rauh V.M., Christensen M., Johansen L.B, Hammershøj M., Larsen L.B. (2016). Effect of heating strategies on whey protein denaturation – Revisited by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 99 (1), 152–166.
- Anema S.G., McKenna A.B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 422–428.
- Andritsos N., Yiantsios S.G., Karabelas A.J. (2002). Calcium phosphate scale formation from simulated milk ultrafiltrate solutions. *Food and Bioproducts Processing*, 80, p. 223–230.
- Anema S.G. (2000). Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 4168–4175.
- Anema S.G., Lee S.K, Klostermeyer H. (2006). Effect of protein, nonprotein-soluble components, and lactose concentrations on the irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (19), 7339–7348.
- Arnebrant T., Barton K., Nylander T. (1987). Adsorption of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on metal surfaces versus temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 119 (2), 383–390.
- Ayadi M.A., Leuliet J.C., Chopard F., Berthou M., Lebouche M. (2004). Continuous ohmic heating unit under whey protein fouling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5 (4), 465–473.
- Awad M.M. (2011). Fouling of heat transfer surfaces. *Heat Transfer - Theoretical Analysis, Experimental Investigations and Industrial Systems*, 505–542.
- Bansal B., Chen X.D. (2005). Modelling of milk fouling during ohmic heating. *Chemeca Conference, Brisbane, Australia, September 25–28*.
- Bansal B., Chen X.D, Lin S.X.Q. (2005). Skim milk fouling during ohmic heating. Heat exchanger fouling and cleaning: challenges and opportunities. In: *Proceedings of 6th International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning – Challenges and Opportunities, Engineering Conferences International, Kloster Irsee, Germany, June 5–10*.

- Bansal B., Chen X.D. (2006). A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5 (2), 27–33.
- Bell R.W., Sanders C.F. (1944). Prevention of milkstone formation in a High-Temperature-Short-Time heater by preheating milk, skim milk and whey. *Journal of Dairy Science*, 27, 499–504.
- Belmar-Beiny M.T., Fryer P.J. (1992). Bulk and surface effects on the initial stages of whey fouling. *Trans. IChemE*, 70, 193–198.
- Belmar-Beiny M.T., Gotham S.M., Paterson W.R., Fryer P.J., Pritchard A.M. (1993). The effect of Reynolds number and fluid temperature in whey protein fouling. *Journal of Food Engineering*, 19 (2), 119–139.
- Benning R., Petermeier H., Delgado A., Hinrichs J., Kulozik U., Becker T. (2003). Process design for improved fouling behaviour in dairy heat exchangers using a hybrid modelling approach. *Food and Bioproducts Processing*, 81, 266–274.
- Blanpain-Avet P., Hédoux A., Guinet Y., Paccou L., Petit J., Six, T., Delaplace G. (2012). Analysis by Raman spectroscopy of the conformational structure of whey proteins constituting fouling deposits during the processing in a heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 110, 86–94.
- Bohnet M. (1987). Fouling of heat transfer surfaces. *Chemical Engineering and Technology*, 10 (2), 113–125.
- Bott T.R. (1988). Crystallisation fouling - basic science and models. In: Melo L.F., Bott T.R., Bernardo C.A. (Ed.), *Fouling Science and Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 251–260.
- Bott T.R. (1990). *Fouling Notebook*, IChemE, Rugby, UK.
- Bott T.R. (2001). Heat transfer to foul or not to foul-that is the question. *Chemical Engineering Progress*, 97, 30–37.
- Bourion F. (1998). Encrassement des surfaces : souillures minérales, organiques et microbiologiques. *Nettoyage et désinfection dans les entreprises alimentaires. Laval : ASEPT*, 4, 67–72.
- Bouvier L., Moreau A., Ronse G., Six T., Petit J., and Delaplace G. (2014). A CFD model as a tool to simulate β -lactoglobulin heat-induced denaturation and aggregation in a plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 136, 56–63.

- Boxler C., Augustin W., Scholl S. (2013). Fouling of milk components on DLC coated surfaces at pasteurization and UHT temperatures. *Food and Bioproducts Processing*, 91, 336–347.
- Boxler C. (2014). Fouling by milk constituents and cleaning of modified surfaces. Ph.D. Thesis, Technische Universität Braunschweig, Germany.
- Bradley S.E., Fryer P.J., Griffin T.A., Wilson D.I. (1989). Use of an Oscillatory Flow Heat Exchanger in Food Processing. In: *Fouling and Cleaning in Food Processing*, Institute for Dairy Science and Food Processing, Technische Universität München, München, Deutschland, 14–24.
- Burton H. (1966). A comparison between a hot-wire laboratory apparatus and a plate heat exchanger for determining the sensitivity of milk to deposit formation. *Journal of Dairy Research*, 33, 317– 324.
- Burton, H. (1967). Seasonal variation in deposit formation from whole milk on a heated surface. *Journal of Dairy Research*, 35, 137–143.
- Burton H. (1968). Deposits from whole milk in heat treatment plant – a review and discussion. *Journal of Dairy Research*, 35, 317–330.
- Burton H. (1994). *Ultra-high temperature processing of milk and milk products*. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.
- Casal H.L., Köhler U., Mantsch H.H. (1988). Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 957, 11–20.
- Casanueva-Robles T., Bott T.R. (2005). The environmental effect of heat exchangerfouling: a case study. In: *Proceedings of 6th International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning – Challenges and Opportunities*, Engineering Conferences International, Kloster Irsee, Germany, June 5–10.
- Changani S.D., Belmar-Beiny M.T., Fryer P.J. (1997). Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14 (4), 392–406.
- Chen X.D, Bala P. (1998). Investigation of the influences of surface and bulk temperatures upon fouling of milk components onto a stainless steel probe. *Proceedings fouling and cleaning in food processing*. Jesus College, Cambridge, England, April 6–8.

- Chen X.D., Chen J., Wilson D.I. (2001). Modelling whey protein based fouling of heat exchangers – further examining the deposition mechanisms. In: Proceedings of heat exchanger fouling – fundamental approaches and technical solutions. Davos, Switzerland, July 8–13.
- Chenoweth J.M. (1990). Final report of the HTRI/TEMA joint committee to review the fouling section of the TEMA standards. *Heat Transfer Engineering*, 11 (1), 73–107.
- Chobert J.-M. (2012). Milk protein tailoring to improve functional and biological properties. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1 (3), 171–197.
- Choi W., Jun S., Nguyen L.T., Rungraeng N., Yi H., Balasubramanian S., Puri V.M., Lee J. (2013). 3-D milk fouling modeling of plate heat exchangers with different surface finishes using computational fluid dynamics codes. *Journal of Food Process Engineering*, 36 (4), 439–449.
- Christian G.K, Changani S.D, Fryer P.J. (2002). The effect of adding minerals on fouling from whey protein concentrate – development of a model fouling fluid for a plate heat exchanger. *Trans. IChemE*, 80, 231–239.
- Chusuei C.C., Goodman, D.W. (1999). Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS. *Analytical Chemistry*, 71, 149–153.
- Croguennec T., O’Kennedy B.T., Mehra R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14, 399–409.
- Dannenberg F. (1986). Zur Reaktionskinetik der Molkenprotein denaturierung und der technologische bedeutung. Ph.D. Thesis, TU Munich, Germany.
- Dannenberg F., Kessler H.G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53 (1), 258–263.
- Daufin G., Labbé J.P., Quemerais A., Brulé G., Michel F., Roignant M., Priol M. (1987). Fouling of a heat exchange surface by whey, milk and model fluids: an analytical study. *Lait*, 67, 339–364.
- Davies T.J., Henstridge S.C., Gillham C.R., Wilson D.I. (1997). Investigation of whey protein deposit properties using heat flux sensors. *Chemical Engineering Research and Design*, 75, 106–110.
- De Bonis M.V., Ruocco G. (2009). Conjugate fluid flow and kinetics modeling for heat 835 exchanger fouling simulation. *International Journal of Thermal Sciences*, 48, 2006–2012.

- de Jong P., Bouman S., van der Linden H.J.L.J. (1992). Fouling of heat treatment equipment in relation to the denaturation of β -lactoglobulin. *The Journal of the Society of Dairy Technology*, 45 (1), 3–8.
- de Jong P., van der Linden H.J.L.J. (1992). Design and operation of reactors in the dairy industry. *Chemical Engineering Science*, 47, 3761–3768.
- de Jong P. (1996). Modeling and optimization of thermal treatments in dairy industry. Ph.D. Thesis, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- de Jong P. (1997). Impact and control of fouling in milk processing. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 401–405.
- de Jong P., van der Horst H.C., Waalewijn R. (1998). Reduction of protein and mineral fouling. *Fouling and Cleaning in Food Processing*; Jesus College, Cambridge, England, April 6–8.
- de Jong P., teGiffel M.C., Straatsma H., Vissers M.M.M. (2002). Reduction of fouling and contamination by predictive kinetic models. *International Dairy Journal*, 12 (2), 285–292.
- de la Fuente M.A., Singh H., Hemar Y. (2002). Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 262–274.
- De Wit J.N., Klarenbeek G. (1989). Technological and functional aspects of milk proteins. In: Barth C., Scime E. (Ed.), *Milk Proteins in Human Nutrition*, Steinkopff, Darmstadt, pp. 211–222.
- de Wit J.N. (1990). Thermal stability and functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 73, 3602–3612.
- de Wit, J.N. (2009). Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150°C. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (1), 27–34.
- Delaplace G., Loubière K., Ducept F., Jeantet R. (2014). Modélisation en génie des procédés par analyse dimensionnelle : Méthode et exemples résolus. In: *Tec & Doc: Lavoisier* (Ed.), Paris, France, 464 p.
- Delplace F., Leuliet J.C., Tissier J.P. (1994). Fouling experiments of a plate heat exchanger by whey proteins solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 72, 163–169.
- Delplace F. 1995. Identification des échangeurs de chaleur à plaques. Application à l'étude de l'encrassement par les produits laitiers. Ph.D. Thesis, Nancy I University.

- Delplace F., Leuliet J.C. (1995). Modelling fouling of a plate heat exchanger with different flow arrangements by whey protein solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 73, 112–120.
- Delplace F., Leuliet J.C., Levieux D. (1997). A reaction engineering approach to the analysis of fouling by whey proteins of a six channels-per-pass plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 34, 91–108.
- Delsing B.M.A., Hiddink J. (1983). Fouling of heat transfer surfaces by dairy fluids. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 37, 139–48.
- Donato L., Schmitt C., Bovetto L., Rouvet M. (2009). Mechanism of formation of stable heat-induced β -lactoglobulin microgels. *International Dairy Journal*, 19, 295–306.
- Dong A., Matsuura J., Allison S.D., Chrisman E., Manning M.C., Carpenter J.F. (1996). Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β -lactoglobulin A and B. *Biochemistry*, 35, 1450–1457.
- Elofsson U.M., Dejmek P., Paulsson M.A. (1996). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin studied by dynamic light scattering. *International Dairy Journal*, 6, 343–357.
- Epstein N. (1981). Fouling: Technical Aspects (Afterword to Fouling in Heat Exchangers). In: Somerscales E.F.C., Knudsen J.G. (Ed.), *Fouling of Heat-transfer Equipment*, Hemisphere, Washington D.C, pp. 31–53.
- Fink A., Kessler H.G. (1985) Changes in the fat globule membrane produced by heating. *Milchwissenschaft*, 40, 261–264.
- Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J. (2000). Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43 (4), 235–242.
- Foster C.L., Britten M., Green M.L. (1989). A model heat-exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk I: Deposition formation at 100°C. *Journal of Dairy Research*, 56, 201–209.
- Foster C.L., Green M.L. (1990). A model heat exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk II: Deposition of fouling material at 140°C, its adhesion and depth profiling. *Journal of Dairy Research*, 57, 339–348.
- Fox P.F., Kelly A.L. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – Part 1. *International Dairy Journal*, 16, 500–516.

- Fryer P.J., Slater N.K.H. (1984). Reaction fouling from food fluids. *American Society of Mechanical Engineers*, 35, 65–73.
- Fryer P.J. (1989). The uses of fouling models in the design of food process plant. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42 (1), 23–29.
- Fryer P.J., Belmar-Beiny M.T. (1991). Fouling of heat exchangers in the food industry: a chemical engineering perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 33–37.
- Fryer P.J., de Alwis A.A.P, Koury E., Stapley A.G.F., Zhang L. (1993). Ohmic processing of solid-liquid mixtures: heat generation and convection effects. *Journal of Food Engineering*, 18, 101–125.
- Fryer P.J., Robins P.T., Green C., Schreier P.J.R., Pritchard A.M., Hasting A.P.M., Royston D.G., Ritchardson, J.F. (1996). A statistical model for fouling of a plate heat exchanger by whey protein solution at UHT conditions, *Trans. IChemE*, 74, 189–199.
- Fryer P.J., Christian G.K., Liu W. (2006). How hygiene happens; the physics and chemistry of cleaning. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 76–84.
- Galani D., Apenten R.K.O. (1997). The comparative heat stability of bovine β -lactoglobulin in buffer and complex media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 89–98.
- Garrett-Price B.A., Smith S.A., Watts R.L., Knudsen J.G., Marner W.J., Sutor J.W. (1985). *Fouling of Heat Exchangers, Characteristics, Costs, Prevention, Control and Removal*, Noyes, Park Ridge, N.J., 9–19.
- Georgiadis M.C., Rotstein G.E., Macchietto S. (1998). Optimal design and operation of heat exchangers under milk fouling. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 44 (9), 2099–2111.
- Georgiadis M.C., Macchietto S. (2000). Dynamic modelling and simulation of plate heat exchangers under milk fouling. *Chemical Engineering Science*, 55, 1605–1619.
- Goode K.R., Asteriadou K., Robbins P.T., Fryer P.J. (2013). Fouling and cleaning studies in the food and beverage industry classified by cleaning type. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 121–143.
- Gotham S.M., Fryer P.J., Pritchard A.M. (1992). β -lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling deposit formation: A DSC study. *International Journal of Food Science & Technology*, 27, 313–327.
- Griffin W.C., Griffin M.C.A., Martin S.R., Price J. (1993). Molecular basis of thermal aggregation of bovine beta-lactoglobulin A. *Journal of the Chemical Society*, 89, 3395–3405.

- Grijspeerdt K., Mortier L., de Block J., van Renterghem R. (2004). Applications of modelling to optimize ultra-high temperature milk heat exchangers with respect to fouling. *Food Control*, 15, 117–130.
- Guérin R., Ronse G., Bouvier L., Debreyne P., Delaplace G. (2007). Structure and rate of growth of whey protein deposit from in situ electrical conductivity during fouling in a plate heat exchanger. *Chemical Engineering Science*, 62, 1948–1957.
- Guignard C., Verones F., Loerincik Y., Jolliet O. (2009). Environmental/Ecological impact of the dairy sector. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 436, 1–60.
- Hambling S.G., McAlpine A S., Sawyer L. (1992). β -lactoglobulin. In: Fox P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*. Elsevier Applied Science, London and New York, 1, pp. 141–190.
- Havea P., Singh H., Creamer L.K. (2001). Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. *Journal of Dairy Research*, 68, 483–497.
- Hiddink J., Lalande M., Maas A.J.R., Streuper A. (1986). Heat treatment of whipping cream. 1. Fouling of the pasteurization equipment. *Milchwissenschaft*, 41 (9), 542–546.
- Itoh H., Nagata A., Toyomasu T., Sakiyama T., Nagai T., Saeki T., Nakanishi K. (1995). Adsorption of β -lactoglobulin onto the surface of stainless particles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (9), 1648–1651.
- Iametti S., De Gregori B., Vecchio G., Bonomi F. (1996). Modifications at different structural levels occur during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 237, 106–112.
- Ikeguchi M. (2014). Transient Non-Native Helix Formation during the Folding of β -Lactoglobulin. *Biomolecules*, 4 (1), 202–216.
- Jeurnink T.J.M., de Kruif K.G. (1995). Calcium concentration in milk in relation to heat stability and fouling. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 151–165.
- Jeurnink T.J.M., Walstra P., de Kruif C.G. (1996). Mechanisms of fouling in dairy processing. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 407–426.
- Jimenez M., Delaplace G., Nuns, N., Bellayer S., Deresmes D., Ronse G., Alogaili G., Collinet-Fressancourt M., Traisnel M. (2013). Toward the understanding of the interfacial dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: a multiscale approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 404, 192–200.

- Jun S., Puri V.M., Roberts R.F. (2004). A 2D dynamic model for fouling performance of plate heat exchangers. *Journal of Food Engineering*, 47 (1), 213–222.
- Jun S., Puri V.M. (2005a). 3D milk-fouling model of plate heat exchangers using computational fluid dynamics. *International Journal of Dairy Technology*, 58 (4), 214–224.
- Jun S. Puri V.M. (2005b). Fouling Model for Heat Exchangers in Food Processing: A Review. *Journal of Food Process Engineering*, 28, 1–34.
- Jun S., Puri V.M. (2007). Plate heat exchanger: thermal and fouling analysis. In: Sun D.-W. (Ed.), *Computational fluid dynamics in food processing*, CRC Press, Taylor and Francis Group, 417–432.
- Kerche F., Weterings M., Beyrer M. (2016). The effect of temperature and shear upon technological properties of whey protein concentrate: Aggregation in a tubular heat exchanger. *International Dairy Journal*, doi:10.1016/j.idairyj.2016.02.032.
- Kessler H.-G., Beyer H.-J. (1991). Thermal denaturation of whey proteins and its effect in dairy technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 165–173.
- Kilara, A. (1994). Chapter 11 - Whey protein functionality. In: Hettiarachchy N.S., Ziegler G.R. (Ed.), *Protein functionality in food systems*, New York, USA, pp. 335–355.
- Kim J., Lund D. (1998). Kinetics of β -lactoglobulin adsorption onto stainless steel surfaces. *Biotechnology Progress*, 14, 951–958.
- Kinsella J.E. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, 197–262.
- Kuppan T. *Heat Exchanger Design Handbook*, Marcel Dekker, Inc, New York, USA, 2000.
- Labouré H., Cases E., Cayot P. (2004). Heat induced β -lactoglobulin polymerization: Role of change in medium permittivity. *Food Chemistry*, 85, 399–406.
- Lalande M., Tissier J.-P, Corrieu G. (1984). Fouling of a plate heat exchanger used in ultrahigh-temperature sterilization of milk. *Journal of Dairy Research*, 51, 557–568.
- Lalande M., Tissier J.-P, Corrieu G. (1985). Fouling of heat transfer surfaces related to β -lactoglobulin denaturation during heat processing of milk. *Biotechnology Progress*, 1, 131–139.
- Lalande M., René F. (1988). Fouling by milk and dairy product and cleaning of heat exchangers. In: Melton L., Bott T.R., Bernardo M. (Ed.), *Fouling science and technology*, Amsterdam, Kluwer, 557–573.

- Lalande M., Rene F., Tissier J.P. (1989). Fouling and its control in heat exchangers in the dairy industry. *Biofouling*, 1 (3), 233–250.
- Leuliet J.C. (1988). Comportements hydraulique et thermique des échangeurs à plaques traitant des produits non-Newtoniens, Ph.D. Thesis, Nancy I University, France.
- Lewis M., Heppell N. (2000). Continuous thermal processing of foods: pasteurization and UHT sterilization. Gaithersburg: Aspen Publication.
- Ling A.C., Lund D.B. (1978). Apparatus for studying fouling of heated surfaces by biological fluids. *Journal of Food Science*, 43 (2), 390–403.
- Linmark-Mansson H., Timgren A., Alden G., Paulsson M. (2005). Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk. *International Dairy Journal*, 15, 111–121.
- Loveday S.M. (2016). beta-lactoglobulin heat denaturation: A critical assessment of kinetic modelling. *International Dairy Journal*, 52, 92–100.
- Lund D.B., Bixby D. (1975). Fouling of heat exchange surfaces by milk. *Process Biochemistry*, 10 (9), 52–55.
- Lucey J.A., Horne D.S. (2009). Milk salts: technological significance. *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, 3, 351–389.
- Lyster R.L.J. (1965). The composition of milk deposits in an ultra-high-temperature plant. *Journal of Dairy Research*, 32, 203–208.
- Lyster R.L.J. (1970). The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *Journal of Dairy Research*, 37, 233–243.
- Mahdi Y., Mouheb A., Oufer L. (2009). A dynamic model for milk fouling in a plate heat exchanger. *Applied Mathematical Modelling*, 33, 648–662.
- Mansoori G.A. (2001). Deposition and fouling of heavy organic oils and other compounds. In: 9th International Conference on Properties and Phase Equilibria for Product and Process Design, Okayama, Japan, May 20–25.
- Maubois J.L. (1984). Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Le Lait*, 64, 485–495.
- McDonald A.G., Magande H.L. (2012). Fundamentals of Heat Exchanger Design. In: Introduction to Thermo-Fluids Systems Design. John Wiley and Sons: Chichester, UK, pp. 127–211.
- Merus. (2007). Bio Fouling at a refinery in Dubai removed and stopped. Available from: www.merusonline.com/biofouling-refinery. [Accessed 14/03/2016].

- Michalski M., Ollivon M., Briard V., Leconte N., Lopez C. (2004). Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132, 247–261.
- Monahan F.J., German J.B., Kinsella J.E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 46–52.
- Morison K.R., Tie S.-H. (2002). The development and investigation of a model milk mineral fouling solution. *Food and Bioproducts Processing*, 80 (4), 326–331.
- Mulvihill D.M., Donovan M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation - A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 11, 43-75.
- Müller-Steinhagen, H. (1993). Fouling: the ultimate challenge for heat exchanger design. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Transport Phenomena in Thermal Engineering*, Seoul, Korea, 811–823.
- Müller-Steinhagen, H.M. (2000). *Handbook of heat exchanger fouling: Mitigation and cleaning technologies*. IChemE, Rugby, UK, Publico Publications.
- Navarra G., Leone M., Militello V. (2007). Thermal aggregation of β -lactoglobulin in presence of metal ions. *Biophysical Chemistry*, 131, 52–61.
- Nielsen B. T., Singh H., Latham J.M. (1995). Aggregation of bovine β -lactoglobulin A and B on heating at 75°C. *International Dairy Journal*, 6, 519–527.
- O’Kennedy B.T., Mounsey J.S., Murphy F., Pesquera L., Mehra R. (2006). Preferential heat-induced denaturation of bovine β -lactoglobulin variants as influenced by pH. *Milchwissenschaft*, 61, 366–369.
- O’Kennedy B.T., Mounsey J.S. (2009). The dominating effect of ionic strength on the heat induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin in simulated milk ultra filtrate. *International Dairy Journal*, 19, 123–128.
- Oldfield D.J., Singh H., Taylor M.W., Pearce K.N. (2000). Heat-induced interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, 10, 509–518.
- Oldfield D.J., Singh H., Taylor M.W. (2005). Kinetics of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *Journal of Dairy Research*, 72, 369–378.
- Oliveira R., Melo L., Pinheiro M., Vieira M. J. (1993). Surface interactions and deposit growth in fouling of heat exchangers. *Corrosion Reviews*, 11, 55–95.

- Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A.C.T., Findlay J.B.C., Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E., Kraulis P.J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383–385.
- Pappas C.P., Rothwell J. (1991). The effects of heating, alone or in the presence of calcium or lactose, on calcium binding to milk proteins. *Food Chemistry*, 42 (2), 183–201.
- Patel H.A., Anema S.G., Holroyd S.E., Singh H., Creamer L.K. (2007). Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. *Dairy Science and Technology*, 87, 251–268.
- Paterson W.R., Fryer P.J. (1988). A reaction engineering approach to the analysis of fouling. *Chemical Engineering Science*, 43 (7), 1714–1717.
- Patil G. R., Reuter H. (1986). Deposit formation in UHT plants. I. Effects of forewarming in indirectly heated plants. *Milchwissenschaft* 41, 337–339.
- Paulsson M., Dejmek P. (1990). Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Dairy Science*, 73, 590–600.
- Perez O.E., Pilosof A.M.R. (2004). Pulsed electric effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Research International*, 37, 102–110.
- Petermeier H., Benning R., Delgado A., Kulozik U., Hinrichs J., Becker T. (2002). Hybrid model of the fouling process in tubular heat exchangers for the dairy industry. *Journal of Food Engineering*, 55, 9–17.
- Petit J., Herbig A.-L., Moreau A., Delaplace G. (2011). Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy Science*, 94 (12), 5794–5810.
- Petit J., Six T., Moreau A., Ronse G., Delaplace G. (2013). Beta-lactoglobulin denaturation, aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: pilot-scale experiments and dimensional analysis. *Chemical Engineering Science*, 101, 432–450.
- Phan-Xuan T., Durand D., Nicolai T., Donato L., Schmitt C., Bovetto L. (2013). Tuning the structure of protein particles and gels with calcium or sodium ions. *Biomacromolecules*, 14 (6), 1980–1989.
- Qi X.L., Brownlow S., Holt C., Sellers P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1248, 43–49.

- Qi X.L., Holt C., McNulty D., Clarke D.T., Brownlow S., Jones G.R. (1997). Effect of temperature on the secondary structure of β -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: A test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal*, 324, 341–346.
- Rakes P.A., Swartzel K.R., Jones V.A. (1986). Deposition of dairy protein-containing fluids on heat exchanger surfaces. *Biotechnology Progress*, 2 (4), 210–217.
- Relkin P. (1996). Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin: A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 565–601.
- René F., Lalande M. (1987). Échangeur de chaleur à plaques et joints. Résolution numérique des équations d'échange thermique entre les différents canaux. *Revue Générale Thermique Française*, 311, 577–583.
- René F., Lalande M. (1988). Descriptions et mesures des phénomènes d'encrassement des échangeurs de chaleur. Cas du traitement thermique du lait. *Entropie*, 139, 13–23.
- René F., Leuliet J.C., Lalande M. (1991). Heat transfer to Newtonian and non-Newtonian food fluids in plate heat exchangers: experimental and numerical approaches, *Food and Bioproducts Processing*, 69, 115–126.
- Ribadeau-Dumas B., Grappin R. (1989). Milk protein analysis. *Le Lait*, 69 (5), 357–416.
- Roefs S.P.F.M., de Kruif K.G. (1994). A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 226, 883–889.
- Roefs S.P.F.M., Peppelman, H.A. (2001). Aggregation and gelation of whey proteins: specific effect of divalent cations? In: Dickinson E., Miller R. (Ed.), *Food Colloids Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 358–368.
- Rose I.C., Watkinson A.P., Epstein N. (2000). Testing a mathematical model for initial chemical reaction fouling using a dilute protein solution. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 78, 5–11.
- Rosmaninho R., Santos O., Nylander T., Paulsson M., Beuf M., Bénézech T., Yiantsios S., Andritsos N., Karabelas A., Rizzo G., Müller-Steinhagen H., Melo L.F. (2007). Modified stainless steel surfaces targeted to reduce fouling – Evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering*, 80 (4), 1176–1187.
- Sava N., Van der Plancken I., Claeys W., Hendrickx M. (2005). The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 88, 1646–1653.

- Santos O., Nylander T., Rizzo G., Müller-Steinhagen H., Trägårdh C., Paulsson M. (2003). Study of whey protein adsorption under turbulent flow rate. In: Proceedings of heat exchanger fouling and cleaning – fundamentals and applications, Santa Fe, New Mexico, U.S.A, May 18–22.
- Santos O., Nylander T., Paulsson M., Tragardh A.C. (2006). Whey protein adsorption onto steel-surfaces – Effect of temperature, flow rate, residence time and aggregation. *Journal of Food Engineering*, 74, 468–483.
- Schreier P.J.R., Fryer P.J. (1995). Heat exchanger fouling: A model study of the scale up of laboratory data. *Chemical Engineering Science*, 50, 1311–1321.
- Sheikholeslami R. (1999). Composite Fouling – Inorganic and Biological: A Review. *Environmental Progress*, 18 (2), 113–122.
- Sherwin C., Foegeding E. (1997). The effects of CaCl₂ on aggregation of whey proteins. *Milchwissenschaft*, 52, 93–96.
- Simons J.-W.F.A., Kusters H.A. (2002). Visschers R.W., de Jongh H.H.J. Role of calcium as trigger in thermal β -lactoglobulin aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406 (2), 143–152.
- Simmons M.J.H., Jayaraman P., Fryer P.J. (2007). The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implication for milk fouling. *Journal of Food Engineering*, 79, 517–528.
- Skudder P.J., Brooker B.E., Bonsey A.D., Alvarez-Guerrero N.R. (1986). Effect of pH on the formation of deposit from milk on heated surfaces during ultra-high temperature processing. *Journal of Dairy Research*, 53, 75–87.
- Skudder P., Biss C. (1987). Aseptic processing of food products using ohmic heating. *Chemical Engineering Journal*, 26–28.
- SmartFlow. (2015). CleanFlow for milk heat exchangers. Available from: www.smartflow.eu/technology-cleanflow.php. [Accessed 14/03/2016].
- Spreer, E. (2005). *Technologie der Milchverarbeitung*, ISBN 3-89947-233-0 HC.
- Szirtes T. (1998). *Applied dimensional Analysis and Modeling*. New York: McGraw-Hill.
- Taborek J., Aoki T., Ritter R. B., Palen J.W., Knudsen J.G. (1972). Fouling: The major unresolved problem in heat transfer. *Chemical Engineering Progress*, 68, 59–68.
- Thackery P.A. (1980). The cost of fouling in heat exchanger plant. *Effluent and Water Treatment Journal*, 5 (20), 112–115.

- Tuladhar T.R., Paterson W.R., Wilson D.I. (2002). Investigation of alkaline cleaning-in-place of whey protein deposits using dynamic gauging. *Food and Bioproducts Processing*, 80, 199–214.
- Tissier J.P., Lalande, M. (1986). Experimental device and methods for studying milk deposit formation on heat exchanger surfaces. *Biotechnology Progress*, 2, 218–229.
- Tolkach A, Kulozik U. (2005). Effect of pH and temperature on the reaction kinetic parameters of the thermal denaturation of β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft - Milk Science International*, 60 (3), 248–252.
- Tolkach A., Kulozik U. (2007). Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin. *Dairy Science and Technology*, 87, 301–315.
- Toyoda I., Schreier P.J.R., Fryer P.J. (1994). A computational model for reaction fouling from whey protein solutions. *Fouling and Cleaning in Food Processing*, Jesus College, Cambridge, England, 222–229.
- Toyoda I., Fryer P.J. (1997). A computational model for reaction and mass transfer in fouling from whey protein solutions. In: Panchal C.B. (Ed.), *Fouling mitigation of industrial heat exchange equipment*. Begell House, New York, pp. 589–600.
- van Asselt A.J., Vissers M.M.M., Smit F., de Jong P. (2005). In-line control of fouling. In: *Proceedings of 6th International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning – Challenges and Opportunities*, Engineering Conferences International, Kloster Irsee, Germany, June 5–10.
- Verheul M., Roefs S.P.F.M., de Kruif K.G. (1998). Kinetics of heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 896–903.
- Verheul M., Pedersen J.S, Roefs S.P.F.M, de Kruif K.G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11–20.
- Visser J., Jeurink T.J.M. Fouling of heat exchangers in the dairy industry. (1997). *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14, 407–424.
- Walstra P., Geurts T.J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M.A.J.S. (1999). *Dairy technology, principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wahlgren M., Arnebrant T. (1991). Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in Biotechnology*, 9, 201–208.
- Wolz M., Kulozik, U. (2015). Thermal denaturation kinetics of whey proteins at high protein concentrations. *International Dairy Journal*, 49, 95–101.

- Xiong Y.L. (1992). Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 380–384.
- Xu Z.-M., Zhang Z.-B, Yang S.-R. (2007). Costs due to utility fouling in China. In: *Proceedings of 7th International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning – Challenges and Opportunities* New York, 113–118.
- Yoon J., Lund D.B. (1994). Magnetic treatment of milk and surface treatment of plate heat exchangers: effect on milk fouling. *Journal of Food Science*, 59 (5), 964–980.
- Zúñiga R.N, Tolkach A., Kulozik U., Aguilera J.M. (2010). Kinetics of formation and physicochemical characterization of thermally-induced beta-lactoglobulin aggregates. *Journal of Food Science*, 75 (5), 261–268.

ANNEXES

Tableau A 1. Récapitulatif des paramètres simulés et calculés permettant d'analyser le comportement encrassant de chacune des solutions protéiques modèles étudiées durant un traitement thermique en ECP.

Solution de β -lg (% p/p)	Teneur en calcium total (ppm)	Ratio molaire calcium/ β -lg	Profil thermique	T° moyenne dans chaque canal (°C)	Nbre de canaux de l'ECP	Masse de dépôt dans chaque canal (g)		Masse de dépôt moyenne par canal (g)	Masse de dépôt totale (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal	
						Canal	Essai				
1	100	5,7	#1	67	5	Canal 1	Essai 1 0,3 Essai 2 0,3	0,3	104,7	0,2	
				71		Canal 2	Essai 1 4,2 Essai 2 4,9				4,5
				76		Canal 3	Essai 1 18,8 Essai 2 20,8	19,8		0,5	
				81		Canal 4	Essai 1 38,6 Essai 2 40,0				39,3
				84		Canal 5	Essai 1 40,4 Essai 2 41,1	40,7		1,3	
				68		Canal 1	Essai 1 3,8 Essai 2 4,2				4,0
				74		Canal 2	Essai 1 24,1 Essai 2 26,6	25,3		0,5	
				79		Canal 3	Essai 1 38,2 Essai 2 41,3				39,7
				82		Canal 4	Essai 1 43,4 Essai 2 48,5	46,0		1,1	
				84		Canal 5	Essai 1 43,5 Essai 2 47,1				45,3
			66	Canal 1	Essai 1 0,2 Essai 2 0,4	0,3	117,3	0,2			
			68	Canal 2	Essai 1 1,8 Essai 2 2,4				2,1	0,2	
			72	Canal 3	Essai 1 14,1 Essai 2 15,3	14,7		0,3			
			77	Canal 4	Essai 1 46,6 Essai 2 43,1				44,9	0,7	
			83	Canal 5	Essai 1 58,4 Essai 2 52,3	55,3		1,2			
			61	Canal 1	Essai 1 0,2 Essai 2 0,1				0,1	6,7	0,1
			64	Canal 2	Essai 1 0,9 Essai 2 0,7	0,8		0,1			
			68	Canal 3	Essai 1 1,2 Essai 2 0,9				1,0		0,2
			72	Canal 4	Essai 1 1,3 Essai 2 1,8	1,5		0,3			
			74	Canal 5	Essai 1 3,4 Essai 2 2,9				3,1		0,5
1	100	5,7	#1	66	10	Canal 1	Essai 1 0,3 Essai 2 0,2	0,2			
				69		Canal 2	Essai 1 0,5 Essai 2 0,3		0,5		0,2

Solution de β -lg (% p/p)	Teneur en calcium total (ppm)	Ratio molaire calcium/ β -lg	Profil thermique	T° moyenne dans chaque canal (°C)	Nbre de canaux de l'ECP	Masse de dépôt dans chaque canal (g)		Masse de dépôt moyenne par canal (g)	Masse de dépôt totale (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal	
1	100	5,7	#1	71	10	Canal 3	Essai 1	0,8	1,1	173,3	0,3
				Essai 2			0,5				
				73		Canal 4	Essai 1	2,8	4,2		0,4
				Essai 2			2,5				
				75		Canal 5	Essai 1	7,6	9,8		0,5
				Essai 2			7,2				
				77		Canal 6	Essai 1	14,2	17,7		0,6
				Essai 2			14,3				
				79		Canal 7	Essai 1	21,9	27,0		0,8
				Essai 2			23,5				
				81		Canal 8	Essai 1	31,8	37,8		1,0
				Essai 2			33,7				
				83		Canal 9	Essai 1	43,3	49,9		1,2
				Essai 2			47,6				
				85		Canal 10	Essai 1	46,0	47,7		1,4
				Essai 2			47,7				
			68	Canal 1	Essai 1	8,1	7,5	0,2			
			Essai 2		6,8						
			73	Canal 2	Essai 1	26,5	20,1	0,4			
			Essai 2		13,6						
			77	Canal 3	Essai 1	34,1	27,3	0,6			
			Essai 2		20,4						
			79	Canal 4	Essai 1	37,0	32,1	0,8			
			Essai 2		27,2						
			81	Canal 5	Essai 1	42,7	38,4	1,0			
			Essai 2		34						
			82	Canal 6	Essai 1	45,2	43,0	1,1			
			Essai 2		40,8						
			83	Canal 7	Essai 1	50,5	49,1	1,3			
			Essai 2		47,6						
			84	Canal 8	Essai 1	47,2	50,8	1,4			
			Essai 2		54,4						
85	Canal 9	Essai 1	45,4	53,3	1,4						
Essai 2		61,2									
85	Canal 10	Essai 1	43,8	55,9	1,5						
Essai 2		68									
61	Canal 1	Essai 1	0,3	0,2	0,1						
Essai 2		0									
63	Canal 2	Essai 1	0,2	0,1	0,1						
Essai 2		0									
64	Canal 3	Essai 1	0,2	0,1	0,1						
Essai 2		0									
66	Canal 4	Essai 1	0,3	0,2	0,2						
Essai 2		0									
67	Canal 5	Essai 1	0,2	0,1	5,0						
Essai 2		0									
69	Canal 6	Essai 1	0,4	0,2	0,2						
Essai 2		0									
70	Canal 7	Essai 1	0,5	0,3	0,3						
Essai 2		0									
72	Canal 8	Essai 1	0,7	0,4	0,4						
Essai 2		0,1									

Solution de β -lg (% p/p)	Teneur en calcium total (ppm)	Ratio molaire calcium/ β -lg	Profil thermique	T° moyenne dans chaque canal (°C)	Nbre de canaux de l'ECP	Masse de dépôt dans chaque canal (g)		Masse de dépôt moyenne par canal (g)	Masse de dépôt totale (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal			
1	100	5,7	#4	74	10	Canal 9	Essai 1 1,6 Essai 2 1,3	1,4	5,0	0,4			
				75		Canal 10	Essai 1 2,2 Essai 2 1,9				2,1	0,5	
			#1	67	5	Canal 1	Essai 1 7,4 Essai 2 5,9	6,6	154,1	0,4			
				71		Canal 2	Essai 1 36,7 Essai 2 34,7				35,7	0,5	
				76	Canal 3	Essai 1 37,9 Essai 2 39,6	38,7	0,7					
				81	Canal 4	Essai 1 35,6 Essai 2 36,1	35,8	0,9					
				84	Canal 5	Essai 1 37,9 Essai 2 36,3	37,1	1,0					
				#2	68	5	Canal 1	Essai 1 9,3 Essai 2 8,6	8,9	161,4	0,5		
					74		Canal 2	Essai 1 40 Essai 2 38,9				39,5	0,6
					79		Canal 3	Essai 1 40,2 Essai 2 40,1				40,1	0,8
82	Canal 4	Essai 1 35,1 Essai 2 35,5			35,3		1,0						
84	Canal 5	Essai 1 37,6 Essai 2 37,5			37,6		1,1						
1	120	6,9	#3	66	5	Canal 1	Essai 1 4 Essai 2 4,8	4,4	155,0	0,4			
				68		Canal 2	Essai 1 32,7 Essai 2 34,1				33,4	0,5	
				72		Canal 3	Essai 1 38,6 Essai 2 41,8				40,2	0,6	
				77		Canal 4	Essai 1 39,7 Essai 2 51,6				45,7	0,7	
				83		Canal 5	Essai 1 31,3 Essai 2 31,4				31,3	1,0	
			#4	61	5	Canal 1	Essai 1 0,6 Essai 2 0,4	0,5	27,4	0,3			
				64		Canal 2	Essai 1 3,5 Essai 2 3,1				3,3	0,4	
				68		Canal 3	Essai 1 2,7 Essai 2 2,4				2,5	0,5	
				72		Canal 4	Essai 1 7,6 Essai 2 8,2				7,9	0,5	
				74		Canal 5	Essai 1 12,5 Essai 2 13,7				13,1	0,6	
0,25	100	22,9	#1	67	5	Canal 1	Essai 1 3,6 Essai 2 3,1	3,3	135,2	0,1			
				71		Canal 2	Essai 1 23,5 Essai 2 21,6				22,6	0,2	
				76		Canal 3	Essai 1 35,9 Essai 2 32,0				33,9	0,6	
				81		Canal 4	Essai 1 42,1 Essai 2 39,1				40,6	1,8	

Solution de β -lg (% p/p)	Teneur en calcium total (ppm)	Ratio molaire calcium/ β -lg	Profil thermique	T° moyenne dans chaque canal (°C)	Nbre de canaux de l'ECP	Masse de dépôt dans chaque canal (g)		Masse de dépôt moyenne par canal (g)	Masse de dépôt totale (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal			
0,25	100	22,9	#1	84	5	Canal 5	Essai 1	38,2	34,7	135,2	2,6		
							Essai 2	31,2					
				67		Canal 1	Essai 1	3,8				4,1	0,1
							Essai 2	4,5					
				71		Canal 2	Essai 1	27,5				28,3	
	Essai 2	29,1											
0,5	100	11,5	#1	76	5	Canal 3	Essai 1	35,1	35,7	155,6	0,5		
							Essai 2	36,4					
				81		Canal 4	Essai 1	43,5				44,4	1,3
							Essai 2	45,2					
				84		Canal 5	Essai 1	43,3				43,0	
	Essai 2	42,7											
2	100	2,9	#1	67	5	Canal 1	Essai 1	0,3	0,5	48,4	0,2		
							Essai 2	0,7					
				71		Canal 2	Essai 1	3,6				4,3	0,3
							Essai 2	4,9					
				76		Canal 3	Essai 1	4,7				5,9	
	Essai 2	7,1											
81	Canal 4	Essai 1	12,7	16,0	1,1								
		Essai 2	19,3										
84	Canal 5	Essai 1	19,7	21,7		1,8							
		Essai 2	23,8										
2,5	100	2,3	#1	67			5	Canal 1	Essai 1	0,5	0,5	29,0	0,2
					Essai 2				0,6				
				71	Canal 2			Essai 1	3,9	3,9			
						Essai 2		3,8					
				76	Canal 3	Essai 1		4,5	4,3	0,7			
	Essai 2	4,2											
81	Canal 4	Essai 1	10,9	10,6	1,3								
		Essai 2	10,3										
84	Canal 5	Essai 1	10,1	9,7		2,0							
		Essai 2	9,3										

Tableau A.2. Conditions opératoires étudiées par Petit et al. (2013) pour des essais d'encrassement en ECP d'une solution de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) avec 264 ppm de calcium total.

N° du profil thermique	T_{ep} (°C)	T_{sp} (°C)	Q_p (L.h ⁻¹)	T_{eec} (°C)	T_{sec} (°C)	Q_{ec} (L.h ⁻¹)
#1	60	85	147	89	64	159
#3	49	75	149	80	53	155
#6	70	95	149	100	74	152
#15	60	84	298	103	62	194

Tableau A.3. Masses de dépôt et ratios des constantes cinétiques de déplieement et d'agrégation des 21 essais d'encrassement d'une solution de β -lg quasi-pure à 6% (p/p) avec 264 ppm de calcium total.

Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unfl}/k_{agg}$ dans chaque canal	Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unfl}/k_{agg}$ dans chaque canal
#1 Influence de T_{sp}	1	1,2	0,0	#5 Influence de T_{sp}	1	1,9	0,0
	2	17,8	0,1		2	20,7	0,1
	3	43,3	0,1		3	54,9	0,8
	4	54,3	0,2		4	79,1	1,1
	5	84,5	0,3		5	93,5	0,3
	6	92,4	0,5		6	89,5	0,5
	7	87,3	0,8		7	119,6	0,8
	8	87,6	1,4		8	65	1,3
	9	53,2	2,2		9	37	2,2
	10	26,2	3,2		10	16,7	3,1
#2 Influence de T_{sp}	1	62,8	0,3	#6 Influence de T_{sp}	1	0	0,0
	2	66,3	0,5		2	2,4	0,0
	3	82,2	0,8		3	21,1	0,0
	4	78,6	1,3		4	51,1	0,0
	5	65,8	2,1		5	70,1	0,1
	6	59,5	3,4		6	82	0,1
	7	46,8	5,3		7	90,1	0,2
	8	38,2	8,4		8	150,7	0,4
	9	33,2	13,4		9	78,5	1,1
	10	21,7	18,6		10	24,5	2,6
#3 Influence de T_{sp}	1	0	0,0	#7 Influence du τ	1	11,6	0,1
	2	0	0,0		2	43,7	0,2
	3	0	0,0		3	67,8	0,6
	4	0,2	0,0		4	71	1,0
	5	8,9	0,0		5	64,9	1,5
	6	30,9	0,1		6	56,2	2,1
	7	66,2	0,1		7	39,2	2,5
	8	81,7	0,2		8	22,3	2,9
	9	72	0,3		9	12,64	3,2
	10	54,5	0,5		10	26,2	3,4
#4 Influence de T_{sp}	1	2	0,0	#8 Influence du τ	1	0,9	0,0
	2	15	0,1		2	20	0,0
	3	42,3	0,1		3	53,5	0,0
	4	63,8	0,2		4	67,3	0,1
	5	76,3	0,3		5	70	0,1
	6	67,1	0,5		6	67,6	0,2
	7	81,1	0,8		7	72,2	0,5
	8	42,9	1,3		8	63,1	0,9
	9	28,2	2,2		9	60,2	1,9
	10	13,3	3,1		10	27,8	3,1

Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal	Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal
#9 Influence du τ	1	49,5	0,3	#13 Influence de ΔT_p	1	2,4	0,0
	2	55	0,4		2	14,6	0,1
	3	77,6	0,5		3	46,1	0,1
	4	90,4	0,6		4	78	0,2
	5	70,9	0,8		5	73,5	0,3
	6	70,4	1,1		6	59,9	0,5
	7	59,5	1,5		7	57	0,8
	8	37,9	2,0		8	44,7	1,3
	9	25,7	2,6		9	29,6	2,2
	10	13,6	3,3		10	10,8	3,2
#10 Influence du τ	1	39,7	0,1	#14 Influence de ΔT_p	1	3,6	0,0
	2	71,7	0,2		2	29,6	0,1
	3	75,4	0,3		3	58,7	0,3
	4	65,1	0,5		4	68,2	0,6
	5	68,7	0,8		5	61,8	1,0
	6	63,5	1,3		6	56,2	1,4
	7	62,6	2,1		7	42,1	1,9
	8	43	3,4		8	26,4	2,5
	9	42,9	5,5		9	16,5	3,0
	10	26,4	7,8		10	5,8	3,4
#11 Influence de ΔT_p	1	0	0,0	#15 Influence de ε	1	-0,6	0,0
	2	6,4	0,0		2	11,8	0,0
	3	30,9	0,0		3	49,7	0,1
	4	60,1	0,1		4	77,6	0,1
	5	73,9	0,1		5	77,6	0,2
	6	70	0,2		6	65,3	0,3
	7	64,6	0,3		7	64,7	0,6
	8	66,5	0,5		8	58,4	1,1
	9	56,2	0,9		9	47,2	2,1
	10	30,8	1,2		10	21	3,2
#12 Influence de ΔT_p	1	7,1	0,0	#16 Influence de ε	1	13,3	0,1
	2	30	0,1		2	48,9	0,2
	3	63	0,1		3	81,7	0,2
	4	77,3	0,2		4	76,9	0,4
	5	78,6	0,3		5	69,5	0,5
	6	60,1	0,5		6	64,4	0,8
	7	62,6	0,8		7	61,3	1,1
	8	56,1	1,3		8	53	1,7
	9	41,6	2,2		9	33,4	2,5
	10	16,5	3,1		10	14	3,3

Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal	Profil thermique	N° de canal	Masse de dépôt moyenne par canal (g)	$r = k_{unf}/k_{agg}$ dans chaque canal
#17 Influence de ε	1	1,3	0,0	#20 Influence de ε	1	0	0,0
	2	23,6	0,1		2	7,9	0,0
	3	62,2	0,1		3	37,2	0,1
	4	77,5	0,2		4	63,5	0,1
	5	70,7	0,3		5	68,4	0,1
	6	65,2	0,5		6	64,1	0,2
	7	61,7	0,8		7	57,8	0,4
	8	51,3	1,4		8	46	0,7
	9	44,5	2,2		9	33,2	1,6
	10	21,5	3,2		10	13,4	2,9
#18 Influence de ε	1	0	0,0	#21 Influence de ε	1	4,3	0,0
	2	0	0,0		2	40	0,1
	3	0	0,0		3	78,9	0,1
	4	0	0,0		4	74,5	0,2
	5	9,8	0,0		5	70,4	0,3
	6	37,2	0,1		6	65,3	0,5
	7	70,4	0,1		7	59,9	0,8
	8	76	0,2		8	56	1,4
	9	67,3	0,3		9	41,8	2,2
	10	54,2	0,5		10	18,5	3,2
#19 Influence de ε	1	0	0,0				
	2	11,7	0,1				
	3	47,2	0,1				
	4	73,4	0,2				
	5	71,4	0,3				
	6	63,4	0,5				
	7	59,9	0,8				
	8	53,4	1,3				
	9	37,1	2,2				
	10	13,9	3,1				

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Revues internationales avec comité de lecture

Articles acceptés

[1] **Khaldi M.**, Blanpain-Avet P., Guérin R., Ronse G., Bouvier L., André C., Bornaz S., Croguennec T., Jeantet R., Delaplace G. Effect of calcium content and flow regime on whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering*, 147, (2015), 68–78.

[2] **Khaldi M.**, Ronse G., André C., Blanpain-Avet P., Bouvier L., Six T., Bornaz S., Croguennec T., Jeantet R., Delaplace G. Denaturation kinetics of whey protein isolate solutions and fouling mass distribution in a plate heat exchanger. *International Journal of Chemical Engineering*, 2015 (Article ID 139638), 10 p.

En évaluation

[3] Blanpain-Avet P., André C., **Khaldi M.**, Bouvier L., Petit J., Six T., Jeantet R., Croguennec T., Delaplace G. (2016). Predicting the distribution of a whey protein fouling in a corrugated plate heat exchanger using the kinetic parameters of the thermal unfolding/aggregation process of beta-lactoglobulin, submitted to *Journal of Dairy Science*, Manuscript IDJDS-16-10957.

[4] **Khaldi M.**, Croguennec T., André C., Ronse G., Jimenez M., Bellayer S., Blanpain-Avet P., Bouvier L., Six T., Bornaz S., Jeantet R., Delaplace G. (2016). Effect of calcium/protein molar ratio on β -lactoglobulin denaturation kinetics and fouling phenomena, submitted to *Biofouling*, Manuscript GBIF-2016-0118.

2. Communication dans un congrès international avec actes et sélection sur texte complet

[5] **Khaldi M.**, Ronse G., André C., Blanpain-Avet P., Bouvier L., Six T., Bornaz S., Croguennec T., Jeantet R., Delaplace G. (2015). Relationship between β -lactoglobulin denaturation and fouling mass distribution in a plate heat exchanger. *e-Proceedings of*

International conference on Heat Exchanger Fouling and cleaning, June 07-12, Enfield, Ireland, Editors: M.R. Malayeri, H. Muller-Steinhagen, A.P. Watkinson. Oral presentation.

3. Communication dans des colloques sans actes

[6] **Khaldi M.**, Blanpain-Avet P., André C., Ronse G., Bouvier L., Six T., Moreau A., Bornaz S., Croguennec T., Jeantet R., Delaplace G. (2014). Etude du lien entre la physico-chimie de dérivés laitiers et leurs aptitudes à l'encrassement lors du traitement thermomécanique en échangeur de chaleur à plaques. Journée des Jeunes Chercheurs GEPROC-UGéPE, October 23, Mons, Belgium. Oral presentation

[7] **Khaldi M.**, Blanpain-Avet P., André C., Ronse G., Bouvier L., Six T., Moreau A., Bornaz S., Croguennec T., Jeantet R., G. Delaplace. (2014). Etude du lien entre la physico-chimie de dérivés laitiers et leurs aptitudes à l'encrassement lors du traitement thermomécanique en échangeur à plaques. Journée Jeunes Chercheurs HEI, April 17, Lille, France. Oral presentation.



Effect of calcium content and flow regime on whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger



M. Khaldi^{a,e,*}, P. Blanpain-Avet^a, R. Guérin^a, G. Ronse^a, L. Bouvier^a, C. André^{a,d}, S. Bornaz^f, T. Croguennec^{b,c}, R. Jeantet^{b,c}, G. Delaplace^a

^aINRA, UR638, PIHM (Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux), BP 20039, 369, rue Jules Guesde, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France

^bAGROCAMPUS OUEST, UMR 1253, F-35042 Rennes, France

^cINRA, UMR1253, F-35042 Rennes, France

^dLaboratoire de Génie des procédés, HEI, F-59046 Lille, France

^eInstitut National Agronomique de Tunisie, 43, avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis-Mahrajène, Tunisia

^fEcole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis, 58, avenue Alain Savary, 1003 Tunis-Cité El Khadra, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2014

Received in revised form 9 September 2014

Accepted 11 September 2014

Available online 19 September 2014

Keywords:

Protein fouling

Cleaning

Beta-lactoglobulin

Calcium concentration

Hydrodynamics

Plate heat exchanger

Dimensional analysis

ABSTRACT

Fouling and cleaning with a whey protein concentrate solution in a plate heat exchanger were investigated with a varying calcium concentration (from 70 to 87.5 mg L⁻¹) and under a wide range of hydrodynamic conditions for a bulk fouling fluid temperature, ranging from 60 and 96 °C.

This work demonstrates that increasing the calcium concentration in whey protein concentrate contributes to the amount of fouling and affects the thermal conductivity of the deposit. It was also observed that the fluid flow regime during fouling, impacts the deposit growth, modifies the structure of fouled layers and has a significant consequence on cleaning behaviour.

Finally, a dimensional analysis together with experimental measurements, allowed a relationship to be established enabling prediction of the amount of dry mass deposited locally as a function of the known calcium content, Reynolds number and bulk fluid temperature.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the food industry, thermal treatments are often carried out to reduce the microbial load of food products and to deactivate enzymes that would otherwise cause quality loss. The fouling of heated surfaces, inherent to heat treatments, remains one of the major issues in food industry, as this compromises product quality and process efficiency (Visser and Jeurnink, 1997; Jun and Puri, 2007; Mahdi et al., 2009).

Fouling with WPC solutions has been widely investigated over the last twenty years both in PHEs, (Lalande et al., 1984; Daufin et al., 1987; Delplace et al., 1994; Jeurnink and de Kruif, 1995; Christian et al., 2002; Srichantra et al., 2006), or in tubular heat exchangers (THEs) (Delsing and Hiddink, 1983; Gotham et al., 1989; Jeurnink et al., 1989; Belmar-Beiny et al., 1993). Fouling deposits consist of a layer of protein aggregates and minerals,

which are mostly calcium phosphate (Tissier and Lalande, 1986). The protein/mineral ratio in the deposits depends on temperature (Burton, 1968).

Protein fouling is mainly due to the protein aggregation resulting from disulphide interchange reactions (–SH/SS) (Lalande et al., 1985; Shimada and Cheftel, 1989; Hoffmann and Van Mil, 1997). Beta-lactoglobulin (BLG) is recognized as the main protein responsible for fouling in milk and milk derivatives (Lalande et al., 1985; Lalande and Rene, 1988).

Lin et al. (2006) reported the effects of ionic calcium on reactions related to casein micelle stability, such as heat stability and susceptibility to sediment formation and fouling. In the case of WPC fouling, the literature also evokes calcium-dependent fouling, yet few quantitative data are available concerning the influence of calcium on the behaviour of whey protein fouling during long experiments in a PHE. It has been recognized that calcium ions substantially affect the interactions between protein molecules (Schmidt et al., 1978) and have a strong impact on the BLG denaturation/aggregation (Jeyarajah and Allen, 1994; O'Kennedy and Mounsey, 2009; Petit et al., 2011). However, the specific interaction between Ca²⁺ and BLG at molecular level are still poorly

* Corresponding author at: INRA, UR638, PIHM (Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux), BP 20039, 369, rue Jules Guesde, F-59651 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 (0)320 435 418; fax: +33 (0)320 435 426.

E-mail address: marwa.khaldi@lille.inra.fr (M. Khaldi).

Nomenclature

A	constant defined by Eq. (7) (–)	v	average crossflow velocity of the fouling solution in the fouling step between two plates of the PHE (m s^{-1})
C_{ca}	calcium concentration (kg m^{-3})	w	width of the V7 plate (m)
C_{pp}, C_{ph}	specific heat for the product and hot water ($\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$)	ΔP_0	pressure drop for clean exchanger (mbars)
d_h	hydraulic diameter (m)	ΔP	instantaneous pressure drop (mbars)
d_i	internal diameter (m)	$\Delta \theta_{\text{LMTD}}$	logarithmic mean temperature difference (K)
e	gap between two consecutive plates (m)	μ	Newtonian viscosity (Pa s)
F_T	logarithmic mean temperature difference correction factor (–)	ρ	density (kg m^{-3})
k_d, k_r	coefficients in Eq. (7) (–)	θ	temperature (K)
\dot{m}_p, \dot{m}_h	mass flow rates for the product and hot water (kg s^{-1})		
M_d	amount of deposit (kg)	<i>Subscript</i>	
Q	flow rate ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)	h	hot water
R	molar ratio within the fouling solution, equal to the calcium concentration divided by the β -lactoglobulin concentration (–)	i	inlet
Re	Reynolds number (–)	o	outlet
R_f	fouling resistance ($\text{m}^2 \text{ }^\circ\text{C W}^{-1}$)	j	channel number
S	heat transfer area (m^2)	p	product
t	time (s)		
\bar{u}	average flow velocity (m s^{-1})	<i>Abbreviations</i>	
U_g	overall heat transfer coefficient ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$)	BLG	beta-lactoglobulin
		PHE	plate heat exchanger
		WPC	whey protein concentrate

understood (Simons et al., 2002). The presence of calcium ions enhances the heat-induced aggregation of BLG (Sherwin and Foegeding, 1997), and the structure of aggregates was found to depend on a critical molar ratio of calcium to protein (Phan-Xuan et al., 2013).

It has been suggested that three parameters, or combinations of them, might be responsible for calcium-induced protein aggregation (Simons et al., 2002). The first phenomenon is related to intermolecular cross-linking of adjacent negatively-charged or carboxylic groups by the formation of protein– Ca^{2+} –protein complexes (Bryant and McClements, 1998; Hongsprabhas et al., 1999). The second is the intramolecular electrostatic shielding of negative charges on the protein, thereby favouring BLG aggregation by hydrophobic bonds (Hongsprabhas and Barbut, 1997; Roefs and Peppelman, 2001). The third is an ion-induced conformational change, which leads to altered hydrophobic interactions and aggregation at elevated temperatures (Kinsella and Whitehead, 1989; Wang and Damodaran, 1991). The latter indicates that calcium acts principally on BLG aggregation (Mulvihill and Donovan, 1987; Petit et al., 2011) by both increasing the size of aggregates (Allen and Smith, 2001; Schmitt et al., 2007) and lowering the BLG denaturation temperature, which in turn, favours aggregate formation (De Wit, 1990; Simmons et al., 2007). Its role in BLG unfolding is limited to the reinforcement of the native BLG tertiary structure (Petit et al., 2011). However, it has been demonstrated that the role of Ca^{2+} in the formation of intermolecular bridges is unlikely (Xiong et al., 1993), and its action was limited to screening BLG surface charges (Simons et al., 2002).

Interestingly, Phan-Xuan et al. (2013) reported that a critical molar ratio of calcium to protein (noted R) is needed to permit microgel formation. These are independent of the protein concentration for $\text{pH} \geq 6.9$. At $R < 1$, aggregates have the form of small curved strands, whilst at higher ratios, larger spherical particles are formed. The critical ratio increases only slightly with decreasing heating temperature from 1–1.5 at 85°C to 2–2.5 at 70°C . The microgel suspensions are stable in a narrow range of R , although aggregating at higher calcium concentrations.

Alternatively, it has been shown that the deposit consists of both protein and calcium particles aggregates. This protein is

present on the surface, as well as in steel defects and inside the grain boundaries. However, the calcium ions are mostly concentrated in the upper side of the grain boundaries (Jimenez et al., 2013).

Although the residence time within the heat exchanger would have an effect on the thermal denaturation kinetics of BLG, data concerning the effect of the flow regime upon the fouling behaviour for long duration experiments (i.e. Reynolds numbers or shear stress values) are scarce. The only work that gives detailed results on the effect of the Reynolds number on fouling by WPC in a THE is that of Belmar-Beiny et al. (1993) for a fouling run of an hour. They showed that the higher the Reynolds number (in the range 2000–7000) the smaller the deposit, which decreased steadily, even with a shear rate lower than those encountered in PHE.

There is therefore a lack of data whether confirmed or controversial concerning the dependence of the deposit fouling structure on the calcium content of the fouling fluid or on the Reynolds number in a PHE. To fill the gap, the effect of both the calcium content (70 – 87.5 mg L^{-1} corresponding to R ranging from 6.8 to 8.5) and the Reynolds number on fouling, with a WPC solution as a model fluid, was investigated. WPC was chosen because it is widely used as a functional food ingredient in food products. Consequently, it constitutes a good model for other milk-based products. The experimental fouling study was performed using a whey protein concentrate in a well-defined geometry, namely a plate heat exchanger, for 330 min. In addition, cleaning trials were performed to investigate the effect of the deposit structure on the cleaning process.

2. Materials and methods

2.1. Fouling fluid

Whey protein powder from sweet whey (WPC 75, Armor Proteines, France) dissolved in controlled-quality water (1% w/w), was used as the model fluid. The composition of the WPC powder was mainly proteins (75% w/w), in which BLG and alpha-lactalbumin represented 63% and 11% respectively, and lactose (10% w/w).

Minerals represented less than 4% (w/w) of the total dry weight. WPC 75 powder appeared to contain 50% w/w of native BLG. The native protein concentration was then 2.4 g L^{-1} , which is close to that of BLG in milk, which generally varies between 2.1 and 3.1 g L^{-1} (Bansal and Chen, 2006). The calcium content of the powder was 450 mg per 100 g of powder. Water consisted of a mixture of Lille (France) tap water and soft water using a water softener (HI-FLO 1, Culligan, Purolite C100E resin, France). The calcium and sodium contents of the tap water, determined by atomic absorption spectrophotometry (Philips, Pye Unicam), varied between $170\text{--}200 \text{ mg L}^{-1}$ and $44\text{--}64 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. The range of calcium and sodium contents of the soft water was $1.0\text{--}3.0 \text{ mg L}^{-1}$ and $304\text{--}341 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. The desired calcium content in the fouling fluid was obtained by mixing raw water, soft water and a fixed amount of powder. The addition of sodium ions could not be assessed, since they were came from the water soft-

ener. The sodium concentration in the fouling fluid was determined and reported in Table 1.

The model fluid was prepared the day before the experiment and, in order to prevent bacterial proliferation, it was stored at 4°C for 15 h. Whatever the experiment, the density of the WPC solution was 999.7 and 985.4 kg m^{-3} at 25°C and 60°C , respectively, as measured in a Anton-Paar densimeter. The viscosity, measured using a capillary rheometer (Schott Geräte, AVS 300, Germany), was 0.001 and $5.2 \cdot 10^{-4} \text{ Pa s}$ at 25°C and 60°C , respectively. The pH of the fouling product remained between 7.3 and 7.7.

2.2. Experimental pilot plant

Fouling experiments were carried out on the pilot plant presented in Fig. 1.

Table 1
Summary of measured and calculated parameters during heat transfer to study fouling behaviour of 1% WPC solution as a model fluid. (θ_{ip} and θ_{op} : inlet and outlet temperature of the product at $t = 0$ and $t_f = 330$ minutes; U_g : overall heat transfer coefficient).

Run	Mean Re (-)	Ca^{2+} (mg/l)	Na^+ (mg/l)	θ_{ip} ($^\circ\text{C}$)		θ_{op} ($^\circ\text{C}$)		U_g ($\text{W/m}^2 \cdot ^\circ\text{C}$)		Total mass deposit (g)
				$t = 0$	t_f	$t = 0$	t_f	$t = 0$	t_f	
A	2000	72.9	344.0	62.3	60.0	96.8	97.2	1221.1	900.2	214.2
B	2003	79.8	303.2	60.0	59.7	96.5	96.6	1562.4	798.4	360.0
C	2040	82.2	280.0	61.5	61.3	97.1	96.3	1618.5	718.2	509.0
D	2040	85.6	277.4	60.4	61.5	95.8	96.9	1507.0	659.4	594.2
E	3394	70.0	323.6	63.8	63.9	95.5	95.7	1985.3	1110.3	367.3
F	3220	76.3	472.0	61.3	61.3	95.7	95.5	2075.7	630.0	686.1
G	3214	78.0	364.9	62.6	62.2	95.0	95.0	2303.0	775.7	697.6
H	3232	86.5	331.2	62.7	63.6	94.6	94.6	1969.4	529.1	921.8
I	4938	74.6	329.0	60.8	61.4	95.4	95.2	2532.6	1246.1	324.2
J	4920	77.4	303.0	61.3	60.8	96.2	96.0	2961.2	1097.2	368.2
K	4942	77.8	340.0	63.2	63.9	95.4	95.1	2585.1	1081.8	426.1
L	4926	87.4	306.0	61.2	61.4	95.9	95.7	2690.7	704.7	714.1

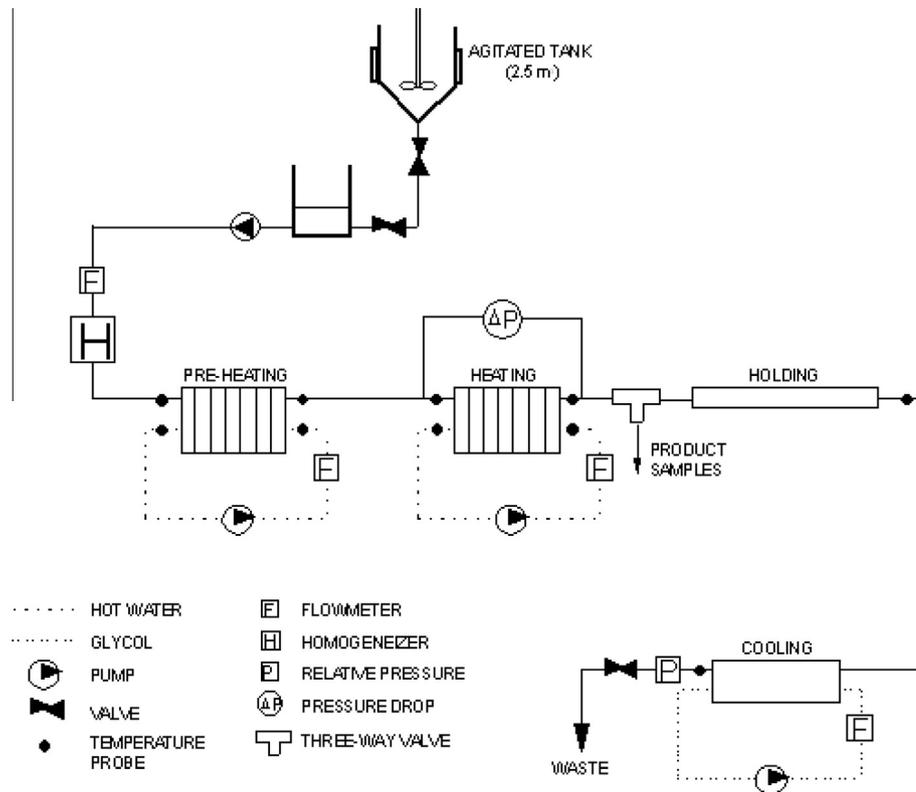


Fig. 1. Schematic diagram of experimental set-up for heat-transfer to study fouling behaviour of 1% WPC solution as a model fluid.

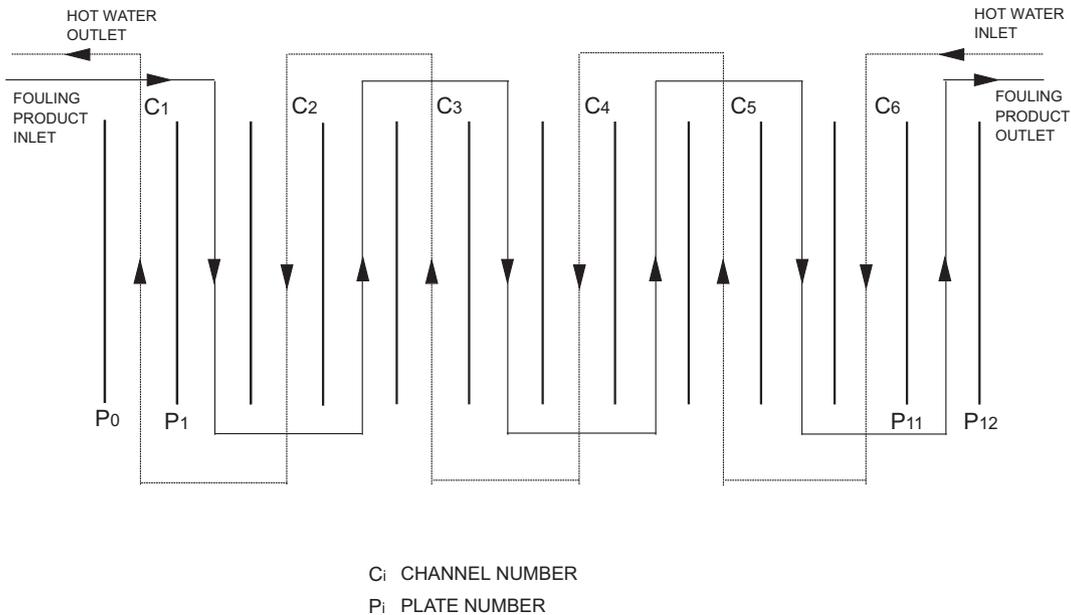


Fig. 2. Plate heat exchanger flow arrangement.

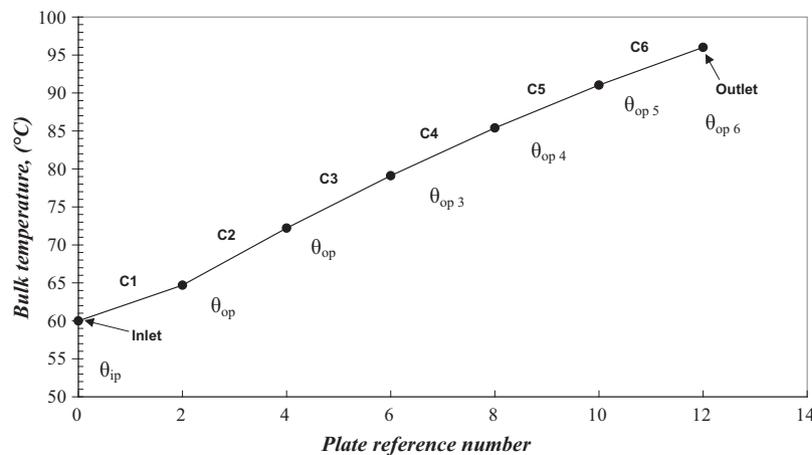


Fig. 3. Bulk temperatures profile numerically determined.

There were two PHEs (Model V7, Alfa-Laval Vicarb, France) equipped with straight corrugation plates (0.15 m wide and 0.5 m long, giving an effective exchange area of 0.825 m²). The first PHE (21 plates, 10 passes and 1 channel per pass for the two sides) was necessary to pre-heat the model fluid from 4 °C to 60 °C, and was therefore subjected to negligible fouling. Fouling observations were thus focused on the second PHE (13 plates, 6 passes and 1 channel per pass for the two sides, see Fig. 2).

During fouling experiments, the inlet hot water was adjusted to ensure a constant outlet product temperature close to 96 °C and a constant product temperature profile along the PHE as a function of time. The temperature profile for clean conditions in the PHE was determined using the numerical method developed on the Sphere software (patented by our laboratory). Once the hydraulic and thermal performances of a given PHE are identified and implemented in this software, the mass and energy balances are calculated. These balances together with known inlet temperatures and flow rates of hot and cold fluids, enables the bulk temperature profile to be assessed. The bulk temperature profile obtained by this method is presented in Fig. 3. Sphere Software has been extensively validated in the past using local temperature measurements

from sensors implemented in PHEs. However, for this work, further validations were carried out to check that the average outlet temperature of the PHE was accurately predicted from the numerical method.

The WPC flow rate varied using a volumetric pump from 5.55×10^{-5} to 1.38×10^{-4} m³ s⁻¹ to attain a range of Reynolds number from 2000 to 5000. For this flow rate range, the average residence time was comprised between 12.7 and 31.8 s.

The average Reynolds number for the clean PHE was determined from the distribution of Re along the PHE as displayed in the following equation:

$$Re = 2\rho \cdot Q/\mu \cdot w = \rho \cdot v \cdot d_h/\mu \quad (1)$$

d_h is the hydraulic diameter defined by: $d_h = 2 \times e$, where e (=0.004 m) represents the gap between two consecutive PHE plates.

The Reynolds numbers reported in this work corresponds to the Reynolds number averaged along the PHE (without fouling). These were computed from the distribution of the Reynolds number along the PHE, based on the knowledge of the bulk temperature profile and physical properties of the water. Water's (rather than milk's) physical properties were used both in the Reynolds number

averaged along the PHE calculation and for numerical simulation, due to very low concentration of the solution (1% w/w). This method has previously been adopted by Delplace et al. (1997) and more recently by Petit et al. (2013). Fouling runs were performed at three different values of Reynolds number ($Re = 2000, 3200$ and 5000) corresponding to different flow rates of protein solutions, 200 L/h, 320 and 500 L/h, respectively.

The superficial flow velocity was calculated using the average cross section between two PHE plates. This was 0.092, 0.14 and 0.23 m s^{-1} at $Re = 2000, Re = 3200$ and $Re = 5000$, respectively.

Despite this relatively narrow range of Reynolds number values, it will be shown later that a noticeable velocity effect could be observed on the fouling phenomena.

The ratio between hot water and WPC solution flow rates was kept constant at 1.2. During all fouling runs, a constant back-pressure of 2.1 bars was applied to the PHE.

Temperatures and flow rates were measured with platinum resistance probes (Pt100, Fer Constantan) and electromagnetic flowmeters (Krohne IFM, Germany), respectively. The expected precision for the measurements was $\pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ for the temperature measurements and $\pm 1\%$ of the full scale of the sensor for the flow rate measurements. All measurements were collected using a data acquisition system (Agilent Technologies 34970A, USA).

2.3. Experimental fouling runs

Twelve fouling runs were conducted with various calcium concentrations, ranging from 70.0 to 87.5 mg L^{-1} , in the WPC solutions (Table 1). The calcium content was much lower than that of normal milk. Only a small range of calcium content was investigated in order to highlight the fact that a very slight chemical variation results in a large variation in the fouling. The objective was to illustrate that it is essential to assess this chemical parameter accurately, which to date, is not commonly evaluated even in the development of a model foulant fluid.

The PHE was brought to thermal equilibrium at the desired process temperature using reverse osmosis water. Then the feed was switched from reverse osmosis water to model fluid. The protein solution was not recirculated to avoid fouling from already-treated material. The experimental run was continued for 330 min. After the experiment, the protein solution was replaced by water. The extent of fouling was determined from the total weight of moist deposits and the final fouling resistance. The system was dismantled and the deposit mass inside the PHE was weighed using Mettler apparatus with a precision of 0.1 g.

The locally deposited mass $M_{d,j}$ on each channel j ($1 < j < 6$) and the total amount of deposit inside the PHE were reported.

The amount of fouling was also monitored by calculating the fouling resistance. A linear relationship was visible between the average fouling resistance R_f , defined by Eq. (2), and the fouling thickness, assuming that the deposit layers are covered uniformly.

$$\frac{1}{U_{g(t)}} = \frac{1}{U_{g(0)}} + R_f \quad (2)$$

where $U_{g(0)}$ and $U_{g(t)}$ are the overall heat transfer coefficients at the beginning of fouling runs (i.e. the overall heat transfer coefficient before the occurrence of fouling) and at time t (i.e., the overall heat transfer coefficient including the additional contribution of fouling).

The heat transfer coefficient was computed from the energy balance equation:

$$\dot{m}_p C_{p_p} (\theta_{op} - \theta_{ip}) = \dot{m}_h C_{p_h} (\theta_{ih} - \theta_{oh}) = U_g S \Delta \theta_{LTD} F_T \quad (3)$$

F_T is a correction factor taking into account that a impure counter-current flow could exist inside the plate heat exchanger. Leuliet et al. (1988) provide equations for PHEs using analogy with the shell

and tube correction factor. Their method was used for this work to evaluate the F_T factor.

2.4. Cleaning

After being weighed, the PHE was remounted and cleaned using a single-stage cleaner which consists of a 2% (w/w) caustic soda solution at $85 \text{ }^\circ\text{C}$. The standard cleaning procedure used was as follows: (1) rinsing for 10 min with water at room temperature; (2) 35 min in NaOH 2% at $85 \text{ }^\circ\text{C}$ and (3) 15 min rinsing with water at room temperature.

Cleaning solutions were recirculated at 400 L h^{-1} until the pressure drop values reached the initial pressure drop. The extent of cleaning was monitored using a pressure drop sensor (Sitrans P 7MF4443, Siemens). In the case of the appearance of a swollen secondary deposit, the flow rate was increased to accelerate the cleaning.

2.5. Dimensional analysis

For a fixed native BLG concentration of 2.4 g L^{-1} and a fixed fouling period (330 min), the amount of deposits in the PHE due to fouling is a function of Re , temperature and mineral concentration. The locally deposited mass $M_{d,j}$ on a plate, after 330 min of fouling, was chosen as target variable depending on three sets of parameters: (i) geometry (e_0), (ii) physical properties (C_{ca}, μ, ρ) and (iii) process parameter ($\theta_{op,j}, \theta_{ip}, \bar{u}$). $\theta_{op,j}$ refers to the temperature of the product at the outlet of the channel j . θ_{ip} refers to the temperature of the product at the inlet of the first channel. Therefore we obtain the following relevance list:

$$\{M_{d,j}, C_{ca}, \bar{u}, e_0, \rho, \mu, \theta_{op,j}, \theta_{ip}\} \quad (4)$$

The above list reports 8 parametric dimensional variables and four dimensions. Therefore there are $8 - 4 = 4$ dimensionless pi-numbers given by the transformation of the dimensional set matrix as described by Szirtes (1998):

$$\left\{ \frac{M_{d,j}}{\rho e_0^3}, Re, \frac{C_{ca}}{\rho}, \frac{\theta_{op,j}}{\theta_{ip}} \right\} \quad (5)$$

Thus, dimensional analysis of the deposited mass characteristics in a PHE leads to a process relationship between the four pi-numbers:

$$\frac{M_{d,j}}{\rho e_0^3} = f \left(Re, \frac{C_{ca}}{\rho}, \frac{\theta_{op,j}}{\theta_{ip}} \right) \quad (6)$$

where f is an unknown function. Experimental results, concerning the amount of deposit in the last four channels for various Reynolds numbers (2000, 3200 and 5000), temperatures ($77\text{--}97.1 \text{ }^\circ\text{C}$) and calcium content ($70.0\text{--}87.5 \text{ mg L}^{-1}$), were used to identify the unknown function f . A set of 44 experimental points was obtained to identify the process relationship.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the build-up of the protein fouling

Fig. 4 represents dry weights of deposit measurements in each PHE channel (at the end of the experiment) at $Re = 2000$ for different calcium contents. Deposit distribution profiles at $Re = 3200$ and $Re = 5000$ being similar, only that of $Re = 2000$ has been displayed.

Low deposit amounts were observed in the first PHE channel. This could be explained by stating that sparse BLG denaturation occurred in the first channel at $62.8 \text{ }^\circ\text{C}$ and then very little fouling took place. This result is in agreement with observations made by Lyster (1970), Dannenberg (1986), Bradley et al. (1989) and

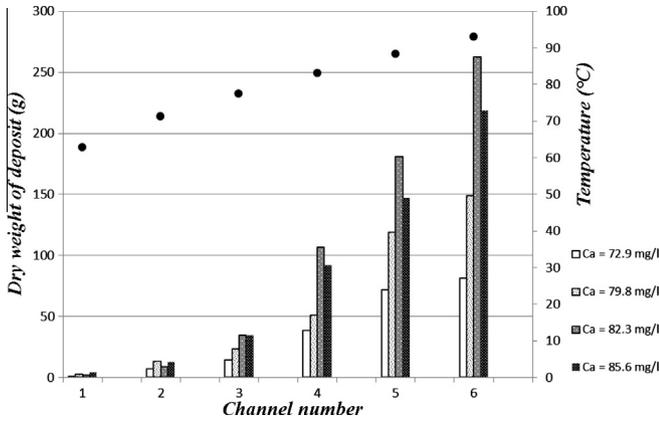


Fig. 4. Dry weights of deposit in the PHE with varying calcium content for $Re = 2000$.

Delplace et al. (1994) confirming that denaturation of BLG begins when temperatures are greater than $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. In the other channels, the outlet temperatures were sufficient to result in heat denaturation of BLG and therefore a higher deposit quantity was measured here. Fouling reached its highest value at the PHE outlet at $93.1\text{ }^{\circ}\text{C}$. These observations indicate that the BLG fouling distribution in the PHE is significantly affected by temperature. This was expected since the thermal denaturation reaction (unfolding plus aggregation) for BLG solutions in the presence of calcium has been shown to be temperature dependent (Petit et al., 2013).

In this work, fouling of the PHE by WPC with various calcium concentrations from 70.0 to 87.5 mg L^{-1} at three Reynolds values (2000, 3200 and 5000) during 330 min was carried out. The measured deposit mass as well as the fouling resistance evolution with time, were both monitored.

3.2. Effect of calcium content on fouling

Fig. 5 represents the evolution of the total amount of deposit mass in the PHE with the calcium concentration. Each symbol represents different fouling process parameters (WPC solution flow rate).

For each Reynolds number, the amount of deposit mass increased linearly with calcium concentration. It can be observed that the trends obtained at different Reynolds numbers are similar and consequently the curves are parallel.

An average increase of twenty per cent in calcium content resulted in more than doubling the amount of deposit.

Alternatively, fouling resistance data confirmed the observed results concerning the amount of deposit as a function of calcium concentration (Fig. 6).

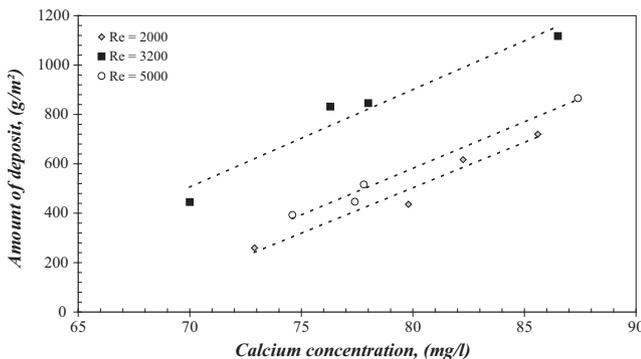


Fig. 5. Total amount of deposited mass after 5.5 h of heat transfer in PHE with varying calcium concentration in WPC solution for $Re = 2000, 3200$ and 5000 .

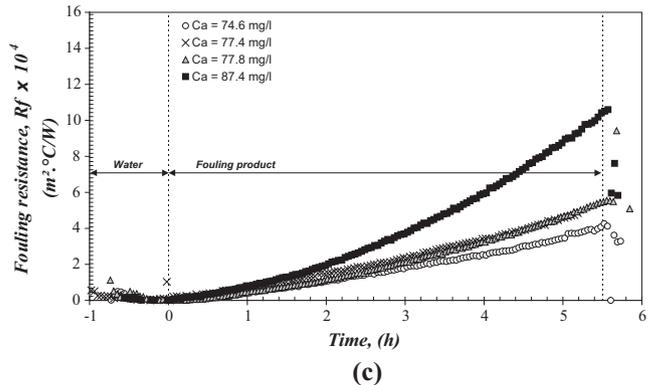
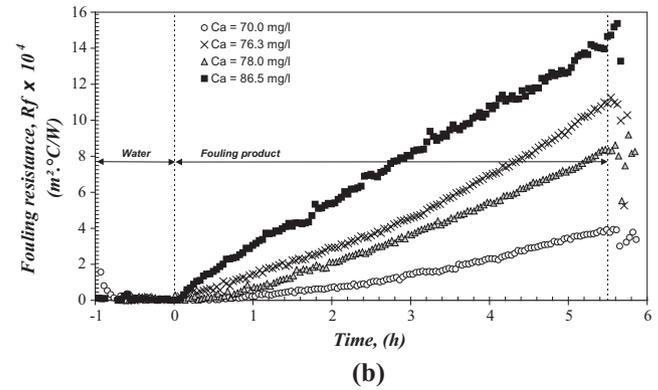
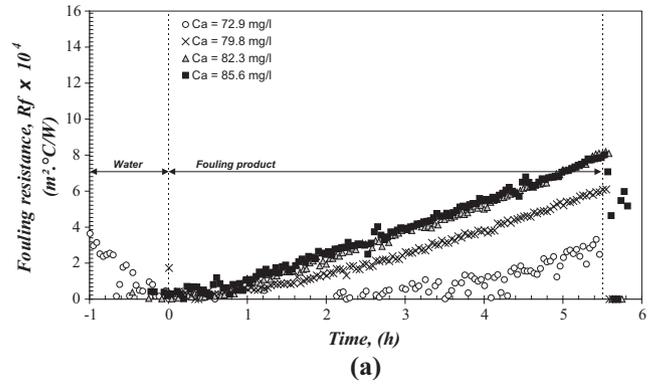


Fig. 6. Fouling resistances during heat transfer experiments with varying calcium concentration in WPC model fluid at three Reynolds numbers: (a) 2000, (b) 3200 and (c) 5000.

However, it can be noted that at $Re = 2000$, fouling resistance curves for calcium content of 82.3 and 85.6 mg L^{-1} were superposed. This phenomenon was not observed with the amount of deposit data since between 82.3 and 85.6 mg L^{-1} , a difference of 18% was obtained. The fouling resistance curve obtained at $Re = 3200$ for 76.3 mg L^{-1} is located above the curve at 78.0 mg L^{-1} while the amount of deposit at 78.0 mg L^{-1} is slightly higher than at 76.3 mg L^{-1} . This may indicate that the varying structures of the different deposits may affect heat transfer coefficients, as was suggested by Christian et al. (2002).

The results show that the fouling potential of WPC in the PHE for temperature range $60\text{--}96\text{ }^{\circ}\text{C}$, is altered and favoured by an addition of calcium to the model fluid, within a range of $70.0\text{--}87.4\text{ mg L}^{-1}$. This fairly well confirms the assumption of Daufin et al. (1987), Xiong (1992) and Simons et al. (2002), who asserted that calcium can interact with the aspartic and glutamic acid carboxyl group of the BLG, and thereby favour the growth of the deposit by stabilizing protein aggregates.

Calcium ions, essentially present in the deposit solid (Tissier and Lalande, 1986), are important in the growth of fouled layers (Xiong, 1992). This is because they form bridges between adsorbed proteins and those protein aggregates occurring in the bulk, consequently modifying the protein aggregation rate and leading to a greater cohesion between the protein aggregates which in turn, change the deposit structure (Phan-Xuan et al., 2013). Simmons et al. (2007) revealed an increase in deposition upon a Couette surface due to calcium ions (920 mg L^{-1}) and a modification in the appearance of the deposit for a temperature range $75\text{--}90^\circ\text{C}$. In addition, Pappas and Rothwell (1991) showed that BLG completely aggregated to form compact structures when heated with calcium from 80°C to 110°C . The structure was less compact without calcium. Guérin et al. (2007) observed that fouled layers formed with low calcium content, after fouling runs at $Re = 3200$ using 1% WPC, had a soft spongy texture, whereas deposits formed at higher calcium contents were denser and elastic. In the presence of Ca^{2+} , the fouling layer was very thick, white, not homogenous and very rough in appearance (Jimenez et al., 2013). Simmons et al. (2007) also showed that increasing the levels of calcium had a dramatic effect on the size of the aggregates produced, which decreased with increasing mineral concentration.

In the present work, results conflicting with those of Christian et al. (2002) were obtained. Indeed, these authors showed a reduction in fouling with increasing calcium concentrations both in a PHE pasteurizer ($62\text{--}114^\circ\text{C}/9.5 \text{ s}$) and a UHT section ($126\text{--}138^\circ\text{C}/7 \text{ s}$). No evidence can be found to explain such a difference, since similar BLG concentrations of 0.3% and 0.45% w/w in WPC solutions were used. It is interesting to note that Simmons et al. (2007) showed an increase in the aggregate size with increasing temperature and this may explain the contradictory results. The larger-sized aggregates occurring at higher temperatures, may be swept along by the flow and may reduce the fouling deposit.

The difference in the results may also be explained by a discrepancy in the ionic strength, due to the calcium of the fouling solution over pH range tested. The calcium ionic strength was much greater for Christian et al. (2002), varying from 10 to 120 mmol L^{-1} than in this study ($3.5\text{--}4.4 \text{ mmol L}^{-1}$). Indeed, Twoney et al. (1997) showed that increasing the ionic strength due to calcium, leads to a lower unfolding temperature of the BLG, hence resulting in an increase in the aggregation rate of the proteins in the bulk. Moreover, for pH values > 5.1 , which would correspond to the isoelectric point of the BLG, proteins have a negative net charge. Calcium ions act as a counter-ion and neutralize the charge of the protein. Caussin and Bouhallab (2004) reported the existence of a threshold concentration of minerals for BLG gel formation. Below the concentration threshold, the protein aggregation is limited by electrostatic repulsion (Phan-Xuan et al., 2013). This results in a filamentous network forming with low-density aggregates. Above the concentration threshold, attraction is intensive, leading to the formation of gels with granular structure composed of larger and denser aggregates.

The above observations, as well as that of Twoney et al. (1997), Caussin and Bouhallab (2004) and Simmons et al. (2007) confirm the influence of the calcium ions on the fouling behaviour of WPC, i.e. the increase in the amount of deposit with increasing calcium concentration for a temperature range of $60\text{--}96^\circ\text{C}$.

3.3. Effect of Reynolds number on WPC fouling

The amount of deposit as a function of calcium content for different Reynolds number is shown in Fig. 5. The fouling resistance curves obtained for the three Reynolds numbers are reported in Fig. 6. It can be noted that the range of the ordinate axis was kept constant to permit a better comparison. From Fig. 5, it is found that the amount of deposit at $Re = 3200$ over the complete calcium con-

tent range is higher than that of $Re = 2000$ or $Re = 5000$. The lowest amount of deposit was obtained at $Re = 2000$. These fouling resistance curves confirm the previous trend with reasonable accuracy. A peak in deposit amounts and fouling resistance was observed in the PHE ($60\text{--}96^\circ\text{C}$) close to $Re = 3200$, whatever the calcium content ($70\text{--}87.5 \text{ mg L}^{-1}$) of the WPC solution.

From Fig. 6, it can be seen that the velocity of protein solutions significantly impact the fouling rate and kinetics. Indeed, Fig. 6 shows a change in R_f -time profiles from being chiefly linear at $Re = 2000$ and $Re = 3200$ to non-linear increase times at $Re = 5000$. This change in deposition kinetics provides additional evidence that a transition in deposit nature occurs when velocity increases within this range.

At this stage, it is very difficult to elucidate that mechanism responsible for higher extents of fouling at an intermediate flow rate.

Shear stress level is known to be one of the parameters affecting the kinetics of fouling mechanism, as first underlined by Kern and Seaton (1959).

Indeed, these authors hypothesized that the formation of a fouling layer is a consequence of the rate of aggregates entering and escaping. Simmons et al. (2007) joined these authors in underlining that the final aggregate size in Couette apparatus for $75\text{--}90^\circ\text{C}$, is a balance between aggregate strength, particle collision rate and breakage; the latter two being a function of the shear field. According to Simmons et al. (2007), particle growth rate is enhanced by increasing shear rate. In contrast, Erabit et al. (2014) reported that there is no significant difference between the distributions. According to the latter, at a shear rate of 100 s^{-1} and a time range of $0\text{--}240 \text{ s}$, there is no breakage of aggregates in the suspensions formed by heat treatment.

In this work, the flow regime selected was turbulent. Therefore, it is difficult to assess a shear rate range. However, it is clear that the shear stress field increases with increasing Reynolds numbers, thereby modifying aggregate breakage and the probability of particle collision.

Thus, the experimental increase in the amount of deposit between $Re = 2000$ and $Re = 3200$ may presumably be explained by a smaller aggregates size at a higher shear stress favouring the calcium bindings between adsorbed proteins and protein aggregates in the bulk upon carboxyl groups (Xiong, 1992), and consequently favouring deposit growth.

In these conditions, it is likely that a more energetic particle collision (of unfolded protein species) with the deposit layer compacts the deposit or initializes the breakage and re-entrainment of some of the fouled layer deposit, which would modify the density and appearance of the fouled layer structure. This may explain the decrease in the amount of deposit and in the fouling resistance between $Re = 3200$ and $Re = 5000$. The threshold Reynolds number for this PHE would appear to fall between 3200 and 5000.

Visual observations of the deposit structure obtained at different Reynolds numbers confirm this hypothesis. The surface of deposits at the highest Re (5000) had a smooth appearance, whereas for the two other Reynolds numbers, it the structure appeared granular.

More fouling data at intermediate flow rates and evidence of deposit removal would be very useful in confirming these hypotheses.

3.4. Fouling resistance versus wet deposit coverage: thermal conductivity of the deposit

Davies et al. (1997) investigated whey protein deposit properties (3.5% w/w WPC) using heat flux sensors in a concentric-tube device. These authors plotted fouling resistance (after a fouling run of 60 min) versus wet deposit coverage (wet deposit mass

divided per unit area), which allowed an average thermal conductivity to be estimated. To investigate whether the thermal conductivity of our deposits was significantly affected by the calcium content of the 1% (w/w) whey protein solution, this approach was adapted and carried out in this work. Wet deposit coverage was computed by dividing the total wet deposit collected by the total heat exchanger surface of the PHE. This was feasible since for all the fouling runs, a presence of mass deposit was detected in each channel (from the first to the 6th channel) and the distribution of mass deposit through each channel was observed to be uniform (visual inspection of the deposit).

Fouling resistance measured on the PHE against wet deposit coverage is reported in Fig. 7.

Whatever the experimental conditions for fouling runs (Reynolds number applied during fouling tests and calcium content), all data are gathered on a single master curve. For the whole set of deposits collected, a linear increase in the final fouling resistance with the wet deposit coverage could be observed.

These results indicate that for a given type of soil (in this work, whey protein-related deposit), the fouling resistance could be evaluated directly from a knowledge of wet deposit coverage.

A further analysis of Fig. 7 highlights that the final wet deposit coverage (at a given processing time here of 330 min) is an intermediate experimental value, depending on fouling kinetics which are governed by the physico-chemical properties of soil and process parameters (both calcium content and Reynolds number). Consequently, a shift in final wet deposit mass (and corresponding fouling resistance) is observed when these parameters vary. In particular, for a given Reynolds number, an increase in wet deposit mass is clearly and systematically observed when the calcium content of the protein solution increases.

Using the slope of the master curve in the same way as Davies et al. (1997), the product $\rho_f \lambda_f$ can be calculated. The $\rho_f \lambda_f$ value was found to be equal to $84 \text{ W kg m}^{-4} \text{ K}^{-1}$ for deposits exposed to wall temperatures between 74°C (outlet without fouling) and 102°C (inlet without fouling). By comparison, Davies et al. (1997) obtained a value of $470 \text{ W kg m}^{-4} \text{ K}^{-1}$ for deposits exposed to wall temperatures below 85°C . This great difference between the two values can be explained by the difference in device of the protein concentration for the fouling solution varying from 1% for this work to 3.5% for Davies et al. (1997) work and also of calcium contents.

Delplace and Leuliet (1995) investigated the fouling of PHE by 1% (w/w) whey protein solutions and noted an apparent thermal conductivity. Considering that for this work that the ρ_f is that of

water, the apparent thermal conductivity in this work (0.084 W m K^{-1}) is much lower than that calculated by Delplace and Leuliet (0.27 W m K^{-1}). This may be mainly due to the difference in calcium content, which makes the deposit airier, thus inducing a decrease in thermal conductivity. This is an agreement with the work of Morison and Tie (2002), who observed that in the presence of minerals (calcium phosphate for their work), the deposit grew on the surface by leaving more gaps between foulant materials. They consequently suggested that fouling is not only a result of the deposition of material precipitated within the bulk solution. Indeed, according to these authors, the presence of minerals encouraged precipitation at the surface of the PHE, provoking greater protein fouling.

This is also consistent with the work of Jimenez et al. (2013). Indeed, using various analytical techniques on a stainless steel surface, Jimenez et al. (2013) established that the microstructure of the fouling layers (Promilk 1% w/w) differs widely, depending on calcium content. They therefore illustrated that calcium elements (calcium carbonate for their work) were involved in the deposition mechanism. These observations also confirm the previous work of Guérin et al. (2007), who, using electrical conductivity measurements in the PHE and visual observations, showed that the structure and appearance of the fouling deposit is highly dependent on calcium concentrations.

3.5. Deposit structure and cleaning experiments

The link between deposit structure and cleaning was made by recording the evolution of the pressure drop during cleaning of the PHE. An example of the evolution of pressure drop as a function of time during cleaning experiments, obtained after fouling at $Re = 2000$ and $Re = 5000$, is given in Fig. 8. The ordinate stands for the pressure drop data divided by the pressure drop measured by the circulation of water at 400 L h^{-1} just after fouling and before the switch from osmosis water to the sodium hydroxide solution. The PHE was considered to be clean when the pressure drop had recovered to 90% of its maximum pressure values (Christian et al., 2002). The trends of all the cleaning runs were similar to the two cleaning experiment curves.

Black symbols indicate fouling at $Re = 2000$. Measurements were made at constant cleaning solution (water plus NaOH plus water) flow rates at 400 L h^{-1} throughout the cleaning test. The permutation instant between the cleaning solution and the associated solutions' flow rates are indicated at the top of Fig. 8. Monitoring revealed that cleaning can be said to be effective at the point

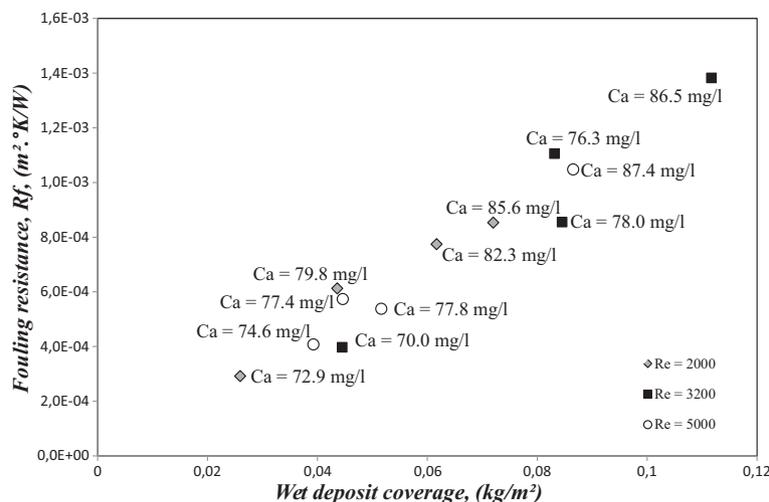


Fig. 7. Relationship between final fouling resistance and wet deposit coverage.

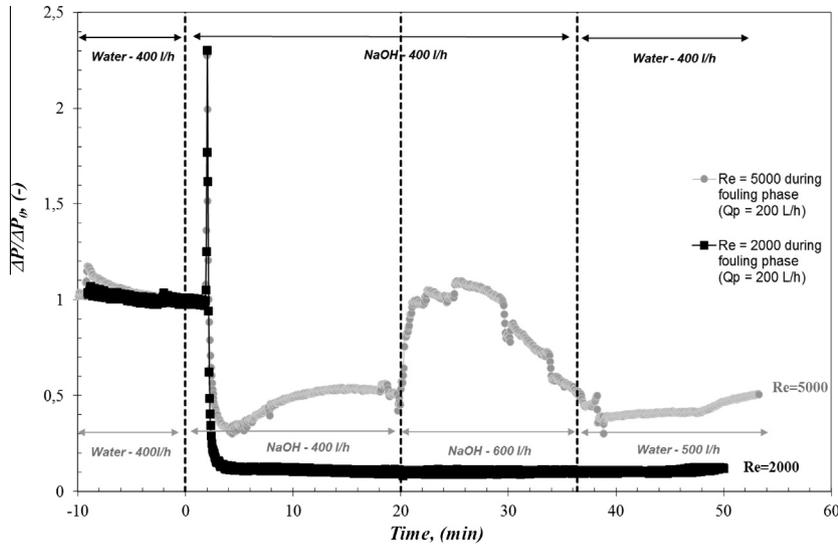


Fig. 8. Pressure drop during cleaning with 2% NaOH of PHE, for similarly fouled fluid at two Reynolds numbers: 2000 and 5000. (ΔP_0 and ΔP represent the initial pressure drop before cleaning with the NaOH solution (at $t = 0$) and the instantaneous overall pressure drop respectively).

where a significant increase in pressure drop occurs and this can be seen to happen immediately after the permutation of the NaOH solution. This sudden increase corresponds to the swelling of the fouling deposit due to the NaOH solution and is followed by a sharp pressure drop decrease corresponding to the removal of the whole swollen deposit from the surface. The cleaning time of this fouling run was close to 5.3 min.

For fouling at $Re = 5000$, grey symbols were used. For this cleaning test, the permutation point between the cleaning solution and the associated solutions' flow rates are indicated at the bottom of Fig. 8. Monitoring revealed that the cleaning process is more complex. Indeed, after the first increase and decrease steps corresponding to swelling and removal of the deposit, an additional increase in the pressure drop was observed. This second increase in the pressure drop leads us to suggest that the first deposit swelling had partly succeeded in detaching the deposit from the metal surface. However, it is impossible to remove the whole deposit by the alkaline cleaning at 400 L h^{-1} : a higher flow rate of the cleaning solution was required to complete cleaning. Consequently, it was decided to increase the NaOH solution flow rate.

Consequently, a second increase in pressure drop was observed. This second increase in pressure drop corresponds to the swelling of a novel thin layer of deposit due to an increase in the flow rate of the cleaning solution. This second increase was again followed by a sharp increase in pressure drop corresponding to the removal of a part of the deposit. This more complex cleaning behaviour requiring more severe hydrodynamic conditions, can be explained by the fact that various hydrodynamic conditions during fouling process parameters have shaped differently the structure deposit. The change in cleaning ($\Delta P - \text{time}$) profiles, where the removal of material formed at $Re = 2000$ is different to that for deposition at $Re = 5000$, provides separate evidence for the transition in deposit nature induced by protein velocity parameters.

It could be assumed that at higher flow rates during the fouling phase, the compactness of the deposit and the number of calcium bindings, due to weaker size aggregates (Simmons et al., 2007), are greater. This would reinforce the adhesion forces and limit the sodium hydroxide seepage into the deposit. Consequently, the cleaning time for this cleaning test is much longer than that obtained at $Re = 2000$. This showed that either the structure of the deposit and/or the adhesion forces of the protein are strongly dependent fouling conditions, especially on the Reynolds number.

3.6. Dimensional analysis for the mass deposit and process relationship

As fouling deposits are the result of a balance between protein deposition and their expulsion from the fouling layer, a non-mono-linear process relationship (Szirtes, 1998) is thus proposed:

$$\frac{M_{dj}}{\rho e_0^3} = k_d \cdot A - k_r \quad (7)$$

where k_d and k_r are functions of the Reynolds number, which report the extent of solid deposition and solid detachment phenomenon respectively, due to changes in the Reynolds number. A is a constant which includes the characteristic concentration of calcium in the fluid and the characteristic temperature of PHE. Using the experimental results, the coefficients (k_d and k_r) and constant A are determined, which are shown below:

$$A = \left(\frac{C_{Ca}}{\rho}\right)^{1.049} \cdot \left(\frac{\theta_{opj}}{\theta_{ip}}\right)^{5.889} \quad (8)$$

$$k_d = 9.141 \cdot Re^2 - 7.622 \cdot 10^4 \cdot Re + 2.400 \cdot 10^8$$

and

$$k_r = 1.123 \cdot 10^{-3} \cdot Re^2 - 8.851 \cdot Re + 2.158 \cdot 10^4 \quad (9)$$

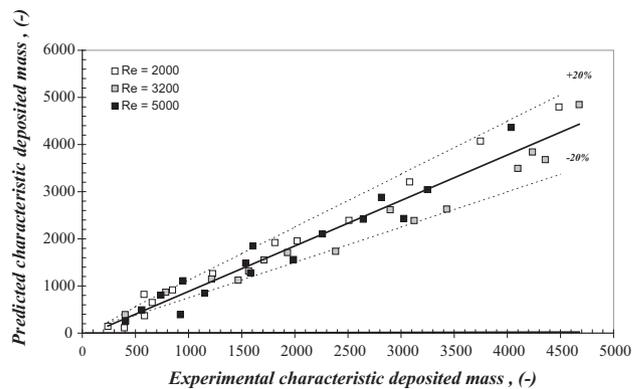


Fig. 9. Comparison between experimental and predicted characteristic locally deposited mass ($M_d/\rho \cdot e_0^3$) obtained from whey protein solution along the PHE.

As expected, a comparison between the adjusted and experimental amount of deposit shows a close agreement between the model and fouling experiments (Fig. 9). Obviously, more data will be useful in ascertaining the validity of the model for larger ranges of *Re* and calcium concentrations.

Nevertheless, the interest of this non-monomial relationship lies more in its ability to translate the existence of a balance between the deposition and the release of the fouled layer, than to provide accurate data on mass deposit, since it is limited to a given BLG concentration, a given duration of fouling experiments and a given geometry. Moreover, the model proposed underlines the role of calcium ions and temperature in the potential fouling extent of WPC fluids in the PHE for a fixed Reynolds number.

4. Conclusion

Long term fouling experiments during the heat transfer were performed to quantify the effect of the calcium concentration and of the Reynolds number upon the fouling behaviour of a WPC solution in a PHE. The extent of fouling deposit was monitored by weighing the mass of the dry fouling deposit on the plates. The fouling kinetics were monitored through pressure drop and fouling resistance measurements. The resistance of the deposit to an alkaline cleaning cycle was evaluated through cleaning sequences with water and NaOH solutions.

It was shown that:

- For a fixed Reynolds number, the fouling potential of the WPC in the PHE for a temperature ranging from 60 to 96 °C, is altered and favoured by an addition of calcium to the model fouling fluid in the range of 70–87.5 mg L⁻¹.
- The amount of deposit was also affected by the Reynolds number in the course of fouling runs. The amount of deposit increased with Reynolds numbers from *Re* = 2000 to *Re* = 3200 and decreased above *Re* = 3200. This behaviour is attributed to the shear stress field, which governs collision between adsorbed proteins and unfolded proteins, and modifies the compactness or erosion of deposit promoting deposit adhesion. The extent of fouling and the associated changes in structure and deposit kinetics due to fouling conditions (i.e. process parameters and solution chemistry) were also observed through the evolution of fouling resistance, together with time and wet deposit coverage, then confirmed by the cleaning test behaviour.

Acknowledgments

The authors are indebted to the scientific committee of Agrocampus Ouest Rennes and HEI (Hautes Etudes d'Ingénieur, Lille) for stimulating discussions and financial support for the Ph.D. Thesis of the first author.

References

- Allen, E., Smith, P., 2001. A Review of Particle Agglomeration, vol. 398. AEA Technology/Research/Public Service Enterprise Group. AEA Technology Engineering Services Inc., Sterling, VA.
- Bansal, B., Chen, X.D., 2006. A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5, 27–33.
- Belmar-Beiny, M.T., Gotham, S.M., Paterson, W.R., Fryer, P.J., 1993. The effect of Reynolds number and fluid temperature in whey protein fouling. *J. Food Eng.* 19, 119–139.
- Bradley, S.E., Fryer, P.J., Griffin, T.A., Wilson, D.I., 1989. Use of an Oscillatory Flow Heat Exchanger in Food Processing. In: *Fouling and Cleaning in Food Processing*. Institute for Dairy Science and Food Processing, Technische Universität München, München, Deutschland, pp. 14–24.
- Bryant, M.C., McClements, D.J., 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 143–151.
- Burton, H., 1968. Deposits of whole milk in treatment plants: a review and discussion. *J. Dairy Res.* 35, 317–330.
- Caussin, F., Bouhallab, S., 2004. Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. In: *Minéraux et produits laitiers*, Ed. Tec & Doc. pp. 343–390.
- Christian, G.K., Changani, S.D., Fryer, P.J., 2002. The effect of adding minerals on fouling from whey protein concentrate. Development of a model fouling fluid for a plate heat exchanger. *Trans. IChemE* 80, 231–239.
- Dannenberg, F., 1986. Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischer Bedeutung. PhD Thesis, TU Munich.
- Daufin, G., Labbé, J.P., Quemerai, A., Brulé, G., Michel, F., Roignant, M., Priol, M., 1987. Fouling of a heat exchange surface by whey, milk and model fluids: an analytical study. *Lait* 67, 339–364.
- Davies, T.J., Henstridge, S.C., Gillham, C.R., Wilson, D.I., 1997. Investigation of whey protein deposit properties using heat flux sensors. *Trans. IChemE* 75, 106–110.
- De Wit, J.N., 1990. Thermal stability and functionality of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 73, 3602–3612.
- Delplace, F., Leuliet, J.C., 1995. Modelling fouling of a plate heat exchanger with different flow arrangements by whey protein solutions. *Trans. IChemE* 73, 112–120.
- Delplace, F., Leuliet, J.C., Tissier, J.P., 1994. Fouling experiments of a plate heat exchanger by whey proteins solutions. *Trans. IChemE* 72, 163–169.
- Delplace, F., Leuliet, J.C., Levieux, D., 1997. A reaction engineering approach to the analysis of fouling by whey proteins of a six-channels-per-pass plate heat exchanger. *J. Food Eng.* 34, 91–108.
- Delsing, B.M.A., Hiddink, J., 1983. Fouling of heat transfer surfaces by dairy liquids. *Neth. Milk Dairy J.* 37, 139–148.
- Erabit, N., Flick, D., Alvarez, G., 2014. Formation of β -lactoglobulin aggregates during thermomechanical treatments under controlled shear and temperature conditions. *J. Food Eng.* 120, 57–68.
- Gotham, S.M., Fryer, P.J., Pritchard, A.M., 1989. Model studies of food fouling. In: *Kessler, H.G., Lund, D.B., (Eds.), Food and Cleaning in Food Processing*, Prien, Bavaria, Germany, 5–7 June 1989, pp. 1–13.
- Guérin, R., Ronse, G., Bouvier, L., Debreyne, P., Delaplace, G., 2007. Structure and rate of growth of whey protein deposit from *in situ* electrical conductivity during fouling in a plate heat exchanger. *Chem. Eng. Sci.* 62, 1948–1957.
- Hoffmann, M.A.M., Van Mil, P.J.J.M., 1997. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2942–2948.
- Hongsprabhas, P., Barbut, S., 1997. Structure-forming processes in Ca²⁺-induced whey protein isolate cold gelation. *Int. Dairy J.* 7, 827–834.
- Hongsprabhas, P., Barbut, S., Marangoni, A.G., 1999. The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca²⁺. *Food Sci. Technol. – Lebensm.-Wiss. Technol.* 32, 196–202.
- Jeurnink, T.J.M., de Kruif, K.G., 1995. Calcium concentration in milk in relation to heat stability and fouling. *Neth. Milk Dairy J.* 49, 151–165.
- Jeurnink, T.J.M., Brinkman, D.W., Stemerink, A.D., 1989. Distribution and composition of deposit in heat exchangers. In: *Kessler, H.G., Lund, D.B. (Eds.), Food and Cleaning in Food Processing*, Prien, Bavaria, Germany, 5–7 June 1989, pp. 25–36.
- Jeyarajah, S., Allen, J.C., 1994. Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* 42, 80–85.
- Jimenez, M., Delaplace, G., Nuns, N., Bellayer, S., Deresmes, D., Ronse, G., Alogaili, G., Collinet-Fressancourt, M., Traisnel, M., 2013. Toward the understanding of the interfacial dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: a multiscale approach. *J. Colloid Interface Sci.* 404, 192–200.
- Jun, S., Puri, V.M., 2007. Plate heat exchanger: thermal and fouling analysis. In: *Sun, D.-W. (Ed.), Computational Fluid Dynamics in Food Processing*. CRC Press, New York, pp. 417–430.
- Kern, D.Q., Seaton, R.E., 1959. A theoretical analysis of thermal surface fouling. *Britannic Chem. Sci.* 4 (5), 258–262.
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., 1989. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. Academic Press, pp. 343–437.
- Lalande, M., Rene, F., 1988. Fouling by milk and dairy product and cleaning of heat exchange surfaces. In: *Melo, L.F., Bott, T.R., Bernardo, C.A. (Eds.), Fouling Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 57–574.
- Lalande, M., Tissier, J.P., Corrieu, G., 1984. Fouling of a plate heat exchanger used in ultra-high-temperature sterilization of milk. *J. Dairy Res.* 51, 557–568.
- Lalande, M., Tissier, J.P., Corrieu, G., 1985. Fouling of heat transfer surfaces related to β -lactoglobulin denaturation during heat processing of milk. *Biotechnol. Prog.* 1, 131–139.
- Leuliet, J.C., Maingonnat, J.F., Lalande, M., 1988. Thermal behaviour of plate heat exchangers with Newtonian and non-Newtonian fluids. In: *Proceedings Congress Eurotherm 5 et 1er Colloque TIFAN*, Compiegne, pp. 1–15.
- Lin, M.J., Lewis, M.J., Grandison, S., 2006. Measurement of ionic calcium in milk. *Int. J. Dairy Technol.* 59, 192–199.
- Lyster, R.L.J., 1970. The denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in heated milk. *J. Dairy Res.* 37, 233–243.
- Mahdi, Y., Mouheb, A., Oufer, L., 2009. A dynamic model for milk fouling in a plate heat exchanger. *Appl. Math. Model.* 33, 648–662.
- Morison, K.R., Tie, S.-H., 2002. The development and investigation of a model milk mineral fouling solution. *Food Bioprod. Process.* 80 (4), 326–331.
- Mulvihill, D.M., Donovan, M., 1987. Whey proteins and their thermal denaturation. *Irish J. Food Sci. Technol.* 11, 43–77.

- O'Kennedy, B.T., Mounsey, J.S., 2009. The dominating effect of ionic strength of the heat-induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin in simulated milk ultrafiltrate. *Int. Dairy J.* 19, 123–128.
- Pappas, C.P., Rothwell, J., 1991. Mechanisms of protein fouling in heat exchangers. *Food Chem.* 42, 183–201.
- Petit, J., Herbig, A.L., Moreau, A., Delaplace, G., 2011. Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. *J. Dairy Sci.* 94 (12), 5794–5810.
- Petit, J., Six, T., Moreau, A., Ronse, G., Delaplace, G., 2013. Beta-lactoglobulin denaturation, aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: pilot-scale experiments and dimensional analysis. *Chem. Eng. Sci.* 101, 432–450.
- Phan-Xuan, T., Durand, D., Nicolai, T., 2013. Tuning the structure of protein particles and gels with calcium or sodium ions. *Biomacromolecules* 14, 1980–1989.
- Roefs, S.P.F.M., Peppelman, H.A., 2001. Aggregation and gelation of whey proteins: specific effect of divalent cations? In: Dickinson, E., Miller, R. (Eds.), *Food Colloids Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 358–368.
- Schmidt, R.H., Illingworth, B.L., Ahmed, E.M., 1978. Heat induced gelation of peanut protein/whey protein blends. *J. Food Sci.* 43, 613–621.
- Schmitt, C., Bovay, C., Rouvet, M., Shojaei-Rami, S., Kolodziejczyk, E., 2007. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: Physicochemical, interfacial and foaming properties. *Langmuir* 23, 4155–4166.
- Sherwin, C.P., Foegeding, E.A., 1997. The effects of CaCl_2 on aggregation of whey proteins. *Milchwissenschaft-Milk Sci. Int.* 52 (2), 93–96.
- Shimada, K., Cheftel, J.C., 1989. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 37, 161–168.
- Simmons, M.J.H., Jayaraman, P., Fryer, P.J., 2007. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implication for milk fouling. *J. Food Eng.* 79, 517–528.
- Simons, J.-W.F.A., Kusters, H.A., Visschers, R.W., de Jongh, H.H.J., 2002. Role of calcium as trigger in thermal beta-lactoglobulin aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 143–152.
- Srichantra, A., Newstead, D.F., McCarthy, O.J., Paterson, A.H.J., 2006. Effect of preheating on fouling of a pilot scale UHT sterilizing plant by recombined, reconstituted and fresh whole milks. *Food Bioprod. Process.* 84, 279–285.
- Szirtes, T., 1998. *Applied Dimensional Analysis and Modeling*. McGraw-Hill Education, Europe.
- Tissier, J.P., Lalande, M., 1986. Experimental device and methods for studying milk deposit formation on heat exchange surfaces. *Biotechnol. Prog.* 2, 218–229.
- Twomey, M., Keogh, M.K., Mehra, R.A.J., Okennedy, B.T., 1997. Gel characteristics of β -lactoglobulin, whey protein concentrate and whey protein isolate. *J. Texture Stud.* 28, 387–403.
- Visser, J., Jeurnink, Th.J.M., 1997. Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Exp. Therm. Fluid. Sci.* 14, 407–424.
- Wang, C.H., Damodaran, S., 1991. thermal gelation of globular-proteins – influence of protein conformation on gel strength. *J. Agric. Food Chem.* 39, 433–438.
- Xiong, Y.L., 1992. Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* 40, 380–384.
- Xiong, Y.L., Dawson, K.A., Wan, L., 1993. Thermal aggregation of β -lactoglobulin: effect of pH, ionic environment and thiol reagent. *J. Dairy Res.* 76, 71–77.

Research Article

Denaturation Kinetics of Whey Protein Isolate Solutions and Fouling Mass Distribution in a Plate Heat Exchanger

Marwa Khaldi,^{1,2,3} Gilles Ronse,^{1,2} Christophe André,^{1,2,4}
Pascal Blanpain-Avet,^{1,2} Laurent Bouvier,^{1,2} Thierry Six,^{1,2} Saloua Bornaz,⁵
Thomas Croguennec,⁶ Romain Jeantet,⁶ and Guillaume Delaplace^{1,2}

¹INRA, UR638, Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux (PIHM), BP 20039, 369 rue Jules Guesde, 59651 Villeneuve d'Ascq, France

²Unité de Matériaux et Transformations (UMET), UMR CNRS 8207, Université de Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

³Institut National Agronomique de Tunisie, 43 avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis Mahrajène, Tunisia

⁴HEI, Laboratoire de Génie des Procédés, 59046 Lille, France

⁵Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis, 58 avenue Alain Savary, 1003 Tunis El Khadra, Tunisia

⁶INRA, AGROCAMPUS OUEST, UMR 1253, 35042 Rennes, France

Correspondence should be addressed to Marwa Khaldi; marwa.khaldi@lille.inra.fr

Received 23 July 2015; Revised 9 October 2015; Accepted 11 October 2015

Academic Editor: Xijun Hu

Copyright © 2015 Marwa Khaldi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Few investigations have attempted to connect the mechanism of dairy fouling to the chemical reaction of denaturation (unfolding and aggregation) occurring in the bulk. The objective of this study is to contribute to this aspect in order to propose innovative controls to limit fouling deposit formation. Experimental investigations have been carried out to observe the relationship between the deposit mass distribution generated in plate heat exchangers (PHE) by a whey protein isolate (WPI) mainly composed of β -lactoglobulin (β -Lg) and the ratio between the unfolding and aggregation rate constants. Experiments using a PHE were carried out at a pilot scale to identify the deposit distribution of a model fouling solution with different calcium contents. In parallel, laboratory experiments were performed to determine the unfolding/aggregation rate constants. Data analysis showed that (i) β -Lg denaturation is highly dependent on the calcium content, (ii) for each fouling solution, irrespective of the imposed temperature profile, the deposit mass in each channel and the ratio between the unfolding and aggregation rate constants seem to be well correlated. This study demonstrates that both the knowledge of the thermal profile and the β -Lg denaturation rate constants are required in order to predict accurately the deposit distribution along the PHE.

1. Introduction

In the dairy industry, heat treatments are carried out in order to ensure food security and to impart several functionalities to milk and its derivatives, like thermal stability, viscosity, or gelation [1–3].

Fouling deposit formation on heat exchanger surfaces is a major industrial problem of milk processing plants, which involves frequent cleaning of the installations, thereby resulting in excessive rinsing water and harsh chemicals use. A number of studies have reported the drastic economic costs of fouling. Fouling and the resulting cleaning of the process

equipment account for about 80% of the total production costs [4]. According to Tay and Yang [5], the total heat exchanger fouling costs for highly industrialized countries are about 0.25% of the Gross National Product. In the USA, total fouling costs have been estimated as US \$ 7 billion [6].

Milk fouling deposit is complex in nature. Deposit is formed by a mixture of inorganic salts (mainly calcium) and proteins (largely whey proteins). The key role played by β -Lg has been recognized in most milk fouling studies [7–9].

The fouling mechanisms are complicated and involve chemical reactions and heat and mass transfer processes [7–10]. The deposition is a result of a number of stages

occurring at both the bulk volume and the surface [11] as follows:

- (i) unfolding and aggregation of proteins in the bulk;
- (ii) transport of the unfolded and aggregated proteins to the surface;
- (iii) surface reactions resulting in incorporation of protein into the deposit layer;
- (iv) possible reentrainment or removal of deposit toward the bulk.

At the state of the art, the possible limiting processes controlling fouling phenomena (bulk reaction regarding the temperature profiles, surface reaction concerning the flow conditions, and mass transfer of the different protein species occurring in the bulk) are not clearly elucidated and ambiguity on foulant precursor (unfolded and/or aggregated species) also exists.

Belmar-Beiny et al. [11] and Schreier and Fryer [12] proposed that fouling was dependent on the bulk and surface reactions and not on the mass transfer. Belmar-Beiny et al. [11], using a tubular heat exchanger fouled with whey protein concentrate, correlated the mass deposit with the volume of fluid hot enough to produce unfolded and aggregated proteins. This result highlighted the importance of denaturation reactions in the bulk but does not allow concluding specifically which protein species are dominant on fouling. On the other hand, van Asselt et al. [13] stated that β -Lg aggregates are not involved in the fouling reactions.

So, there is still a lack of knowledge between the chemical reactions occurring in the bulk (unfolding and aggregation of β -Lg for a given temperature profile), their consequences on foulant precursor concentrations, and the extent of fouling.

In this study, we propose to partially fill this gap by investigating the chemical reactions of β -Lg denaturation occurring in the bulk, for two WPI model fouling solutions, and their link with the fouling phenomena.

The main objective of this work is to investigate whether a relationship can be established between the distribution of the dry fouling deposit mass in each PHE channel and the β -Lg rate constants (computed at the mean channel temperature) of the model fouling solutions, for various operating conditions (processing parameters inducing various thermal profiles).

2. Materials and Methods

2.1. Fouling Model Fluids. The model fluids used in this study were reconstituted from WPI Promilk 852FB1 supplied by Ingredia (France). The composition of the powder is shown in Table 1.

In each experiment, 1% (w/w) β -Lg solutions with various calcium concentrations were prepared by mixing 10 g of WPI powder in 1 L reverse osmosis water at room temperature. Then, different quantities of a molar calcium chloride (anhydrous, 96%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) solution were added to the β -Lg solution to obtain the two model fouling solutions

TABLE 1: Composition of WPI powder.

Component	Promilk 852FB1 (% w/w)
Total proteins	80.1
β -Lg	66.0
α -lactalbumin	13.3
Fat	1
Lactose	11
Minerals	2.9

containing, respectively, (i) 1% (w/w) β -Lg and 100 ppm of total calcium and (ii) 1% (w/w) β -Lg and 120 ppm of total calcium. The pH of these fouling solutions was close to 6.8.

Only a small range of calcium content was studied because it is admitted that a very slight chemical variation results in a large variation in the fouling formation [14, 15]. The calcium concentration of the two model solutions was determined by atomic absorption spectrometry with a Spectro AA 55B apparatus (Varian, Palo Alto, CA, USA).

2.2. Thermal Denaturation Experiments at Constant Holding Temperature. All thermal denaturation experiments were conducted on twelve samples of 2 mL that were put in stainless steel tubes (350 mm length, 10 mm core diameter, 1 mm wall thickness, and 0.3 μ m surface roughness), to be closer to the actual conditions on the PHE. The investigated temperatures was ranged from 65 to 92°C.

Before submitting samples to the desired holding temperature, the samples were preheated at 60°C for the range of desired temperatures below 80°C and 65°C for the range of desired temperatures over 80°C in a first water bath. The choice of this water bath temperature is not trivial. The β -Lg denaturation temperature is estimated at about 77°C [16, 17].

The temperature increase from the preheating temperature to the desired holding temperature was performed by placing the samples in a second water bath whose temperature was maintained until 20°C higher than the holding temperature. The second water bath was used in order to reduce the heat increase time and the denaturation level before sampling. The first sample, corresponding to time zero, was taken when the sample temperature was equal to the desired holding value.

The eleven other samples were maintained during a time sufficient in a third water bath, taken off at different times, and cooled down immediately in a beaker with melting ice to stop further β -Lg denaturation. The third water bath was fixed 2°C higher than the desired temperature. From the second to the third water bath, the heating rate is ranged between 0.83 and 0.93°C·s⁻¹.

The temperature profile in samples placed in the three water baths was determined using a sensor connected to a temperature measurement acquisition system, placed in a stainless steel tube filled with water (Figure 1).

2.3. HPLC Analysis. The soluble (native and unfolded) β -Lg concentration in the samples was evaluated by HPLC

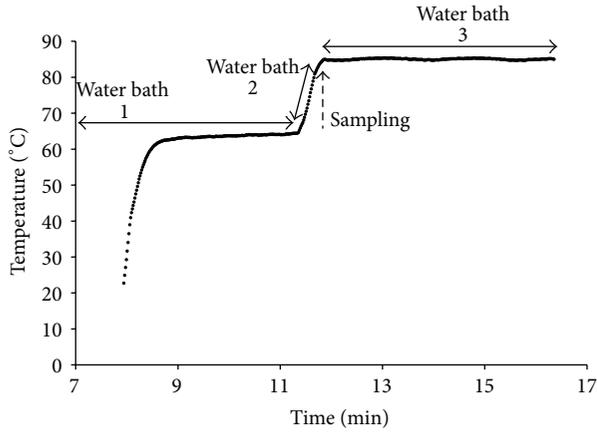


FIGURE 1: Imposed temperature profiles (in the three water baths) to carry out thermal denaturation at a constant holding temperature.

after precipitation of the aggregated protein at pH 4.6 and their removal by centrifugation (9000 rpm for 30 min at 4°C). The chromatographic system (Waters, Milford, MA, USA) included a 717 Plus autosampler, a 616 quadratic pump system, a Jones Model 7971 column oven, a CLHP ACE 300 Å C4 separation column and the associated guard column (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK), a 486 UV-visible spectrophotometer, and an acquisition software (Millennium 3.2, Waters).

The mobile phases used in HPLC were 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (99%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in Milli-Q water and 0.1% trifluoroacetic acid in a mixture of 80% acetonitrile (HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 20% Milli-Q water.

The HPLC analyses were carried out at the following conditions: flow rate $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, injection volume $20 \mu\text{L}$, temperature 40°C , elution of the proteins using a gradient of acetonitrile, and detection of the eluted proteins at wavelength 214 nm. Analyses were repeated three times for each standard or sample. Calibration standards in the range from 0.5 to $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ were prepared by dissolving β -Lg powder in Milli-Q water. For each experiment, the sample concentrations were calculated by averaging the three measured chromatographic areas and converting this area value into a β -Lg concentration using the HPLC calibration curve.

2.4. Determination of the β -Lg Rate Constants from HPLC Measurements. The reaction model used in this study is derived from the work of Tolkach and Kulozik [18]. The denaturation reaction concerns the transformation of soluble species (noted S) into aggregates (noted A) which is described by the chemical equation $S \rightarrow A$ and defined in

$$-\frac{dC_S}{dt} = k_n C_S^n, \quad (1)$$

where C_S is the soluble β -Lg concentration, k_n the denaturation rate constant for a reaction order equal to n , and t the time.

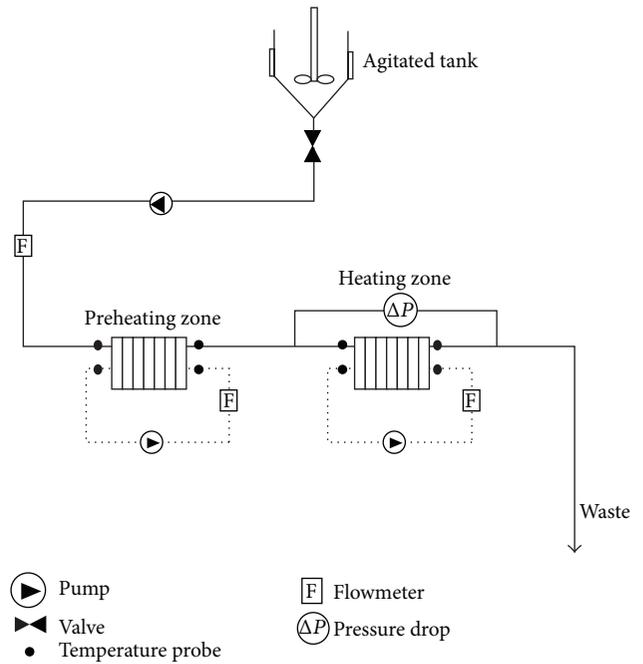


FIGURE 2: Schematic diagram of the experimental setup carried out for fouling runs with the 1% (w/w) WPI solutions.

For each temperature, the corresponding denaturation rate constant was determined from the Arrhenius plot. The relation between the denaturation kinetic rate and the heat treatment temperature is given by

$$\ln(k_n) = \ln(k_n^0) - \frac{E_A}{RT}, \quad (2)$$

where k_n^0 is the denaturation frequency factor, E_A the denaturation activation energy, R the universal gas constant, and T the temperature.

The value of n was varied from 1 to 2 (in steps of 0.1) to determine the reaction order that gives the best regression coefficient when plotting $(C_S/C_S^0)^{1-n} - 1$ as a function of time, where C_S^0 is the initial (time zero) β -Lg total soluble concentration.

The slope of this linear representation is equal to $k_n(n-1)(C_S^0)^{n-1}$ and leads to the determination of k_n . This method was also used by Petit et al. [14], Tolkach and Kulozik [18], and Dannenberg and Kessler [19].

The value of $n = 1.5$ reaction order was suitable for the whole β -Lg denaturation reaction in the investigated temperature range (from 65 to 92°C).

2.5. Fouling Runs and Determination of the Deposit Mass Distribution. Fouling experiments were carried out in a pilot plant (Figure 2). The fouling rig was composed of two distinct zones: (i) a preheating zone composed of a heat exchanger with V7 types plates (Vicar, Alfa Laval, France) and 9 passes (one channel per pass), necessary to preheat the model fluid, and (ii) a heating zone composed of a PHE (Vicar, model V7, Alfa Laval, France).

TABLE 2: Operating conditions investigated with the pilot scale experimental set: mean inlet and outlet temperatures and flow rates of β -Lg concentrate and hot water.

Thermal profile number	Total calcium content (ppm)	T_{ip} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{op} ($^{\circ}\text{C}$)	Q_p ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	Q_h ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)
#1	100	65	85	300	300
#2	100	65	85	300	900
#3	100	65	85	300	150
#4	100	60	75	300	300
#1	120	65	85	300	300
#2	120	65	85	300	900
#3	120	65	85	300	150
#4	120	60	75	300	300

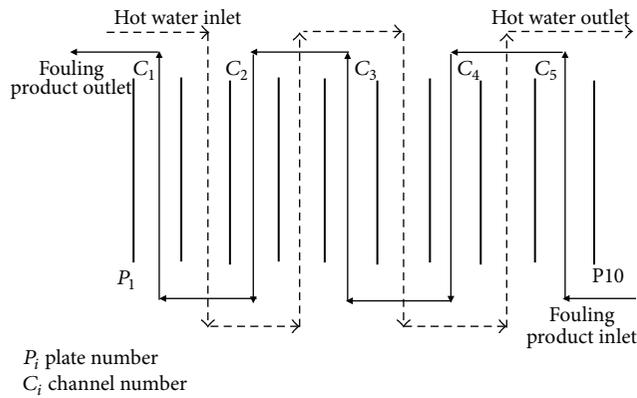


FIGURE 3: Plate heat exchanger flow arrangement.

The PHE setup consisted of 10 plates; that is, 5 passes (one channel per pass) of about 0.074 m^2 projected heat transfer area per plate (0.495 m length and 0.15 m width) were installed in a countercurrent configuration to optimize the heat transfer, as represented in Figure 3. The defined design permitted being closer to industrial heat treatment conditions.

The temperature profile inside the heat exchanger was simulated with Sphere software (previously developed at our laboratory): temperatures in all passes of hot and cold fluids were calculated from the knowledge of fluids' inlet temperature and flow rate, plate properties, and heat exchanger design. The temperature profile is controlled by the heat exchanger inlet parameters: product and hot fluid inlet temperatures (T_{ip} and T_{iw}) and product and hot water flow rates (resp., Q_p and Q_h). This was achieved with the operating conditions indicated in Table 2, displaying the average values of temperatures and flow rates recorded during each heat treatment experiment.

The temperature profiles displayed in Figure 4 were obtained by Sphere simulations by employing the operating conditions summarized in Table 2. Eight fouling runs were conducted with WPI solutions containing two calcium concentrations (100 and 120 ppm).

Heat exchanger plates were weighted before each heat treatment experiment. After being dried in an air oven at

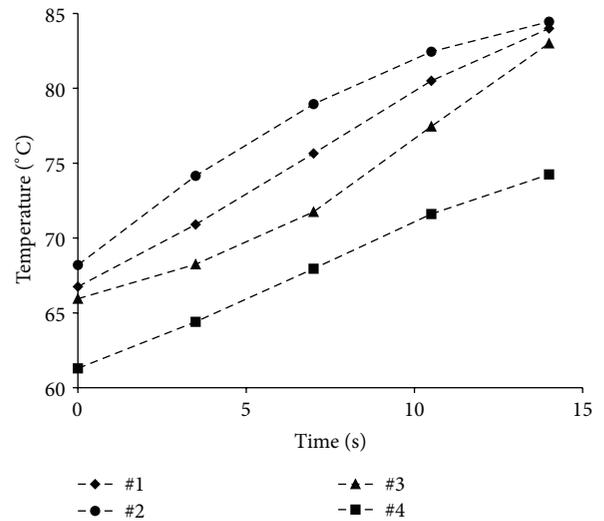


FIGURE 4: The imposed thermal profiles in the PHE (Sphere simulations).

50°C , fouled plates were weighted at ambient temperature and the dry deposit mass on each plate was deduced by subtraction.

The amount of fouling was also monitored by calculating the fouling resistance. A linear relationship was visible between the average fouling resistance R_f , defined by (3), and the fouling thickness, assuming that the deposit layers are covered uniformly:

$$\frac{1}{U_{g(t)}} = \frac{1}{U_{g(0)}} + R_f, \quad (3)$$

where $U_{g(0)}$ and $U_{g(t)}$ are the overall heat transfer coefficients at the beginning of fouling runs (i.e., the overall heat transfer coefficient before the occurrence of fouling) and at time t (i.e., the overall heat transfer coefficient including the additional contribution of fouling).

A logarithmic mean temperature difference (LMTD) method was used to relate the heat transfer rate to the overall heat transfer coefficient. In the case of a no pure

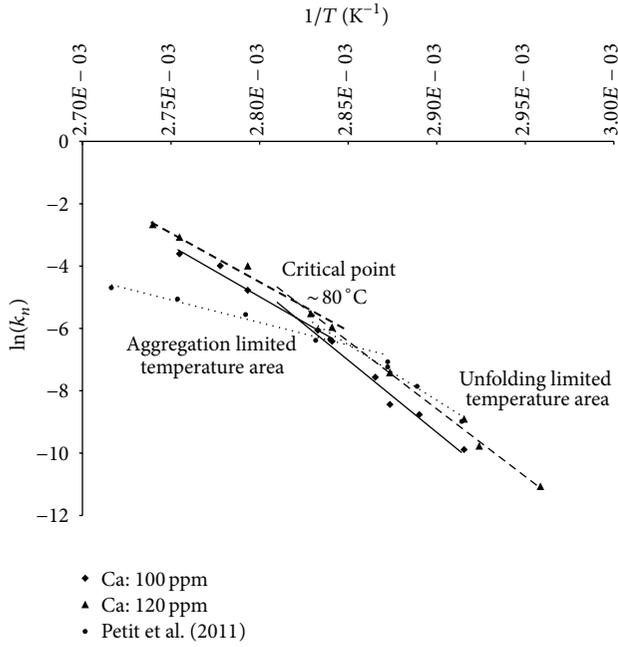


FIGURE 5: Arrhenius plot for the β -Lg denaturation of 1% (w/w) WPI fouling solutions at various calcium concentrations (100 and 120 ppm).

cross countercurrent flow inside the plate heat exchanger, the correction factor F_T is classically introduced:

$$\begin{aligned} \dot{m}_p C_{p_p} (T_{op} - T_{ip}) &= \dot{m}_h C_{p_h} (T_{ih} - T_{oh}) \\ &= U_g S \Delta T_{LMTD} F_T, \end{aligned} \quad (4)$$

where C_{p_p} and C_{p_h} are, respectively, the specific heat for the product and hot water, \dot{m}_p and \dot{m}_h are, respectively, the mass flow rates for the product and hot water, T is the temperature, and S is the heat transfer area.

Leuliet et al. [20] gave equations for PHE using analogy with shell and tube correction factor. Their method was used for this work to evaluate the F_T factor.

3. Results and Discussion

3.1. Arrhenius Plots for the β -Lg Denaturation of the Model Solutions. The Arrhenius plots for the denaturation reaction of the WPI model fouling solutions at two calcium concentrations (100 and 120 ppm) were presented in Figure 5. This figure shows the temperature influence on the β -Lg denaturation kinetic rate in the range from 65 to 92°C.

Two mechanisms appear in Figure 5, separated by an Arrhenius critical temperature of about 80°C. This slope change suggests two temperature ranges: below the critical temperature, the β -Lg denaturation reaction is unfolding limited which means that the unfolding reaction is slower than aggregation and over 80°C, β -Lg denaturation is limited by the aggregation reaction and in that case, aggregation is the slower reaction.

TABLE 3: Denaturation parameters at the two calcium concentrations.

Denaturation parameter	100 ppm total calcium	120 ppm total calcium
<i>Unfolding</i>		
$\ln(k_{unf}^0)$	124.8	117.2
$E_{A,unf}$ (kJ·mol ⁻¹)	384.5	360.7
<i>Aggregation</i>		
$\ln(k_{agg}^0)$	86.3	83.1
$E_{A,agg}$ (kJ·mol ⁻¹)	271.2	260.4

These results are in agreement with Petit et al. [14]. Even in the case of quasi-pure β -Lg model solution, the critical temperature that splits the Arrhenius plot in two linear parts was estimated at 80°C, each temperature range being related to the predominance of the unfolding or aggregation mechanisms, indicating that denaturation kinetic rates varied with temperature. However, this slope break is less clear in the case of our model fouling solution, probably due to its more complex composition (mixture of β -Lg and α -lactalbumin).

Figure 5 also shows that β -Lg denaturation kinetics increased with calcium concentration. Even if the exact contribution of calcium on the denaturation of β -Lg is still unclear, it is speculated that calcium induces protein charge shielding or conformational changes in β -Lg structure [21, 22] favouring both unfolding and aggregation reactions. This result illustrates that it is essential to know the exact content of calcium in the fouling solutions to have a clear view of the denaturation reaction. This information, not commonly evaluated nowadays in the literature, is essential to the development of accurate model of fouling based on engineering denaturation reaction.

The frequency factor logarithms ($\ln k^0$) and activation energies (E_A), obtained by fitting Arrhenius plot regression for the unfolding and aggregation denaturation mechanism (noted, resp., unf and agg), are shown in Table 3.

3.2. Fouling Mass Distribution in the PHE. Figure 6 represents the deposit layer formed in the first and last channels of the PHE, at, respectively, 65°C (inlet temperature) and 85°C (outlet temperature), after fouling run conducted with 1% (w/w) WPI solution containing 100 ppm of total calcium. At the highest temperature, the fouling layer is white, very thick, and homogeneous. It clearly appears that very low fouling is obtained in the first channel of the PHE, where the bulk temperature is lower than 70°C. Fouling is not expected to occur under 65–72°C [23, 24]. These observations are in agreement with Foster et al. [25] work, which showed that deposit increases with temperature, making fouling rougher and more adherent to hot surfaces.

Figure 7 represents the fouling results obtained with 1% (w/w) WPI model solution containing 100 and 120 ppm of total calcium at different temperature profiles. This figure shows that the dry deposit is not uniform and is distributed differently depending on the thermal profile and the calcium

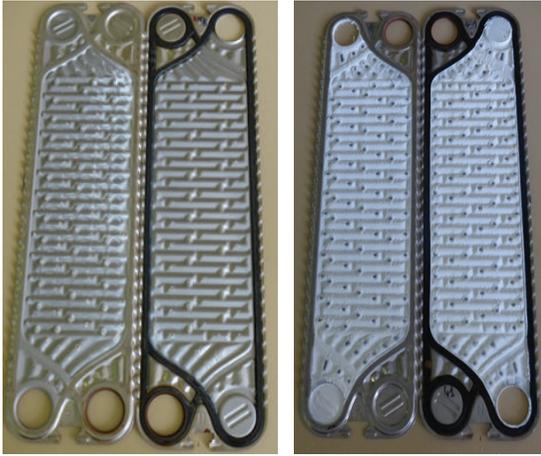


FIGURE 6: Pictures of the deposit collected on heat exchanger surface in the first and last channels of the PHE.

concentration. Indeed, for the first solution at 100 ppm calcium, the deposit mass increases linearly to reach a maximum in the 5th channel, whatever the imposed thermal profile. However, at 120 ppm calcium, the deposit mass reached a stationary value of about 260 g/m^2 over 74°C (2nd channel temperature), for the first three temperature profiles, which consisted in a fouling maximum limit. This increasing deposit mass at low temperatures resulted from the strong increase of β -Lg denaturation level between 65°C (1st channel temperature) and 74°C (2nd channel temperature), temperature range for which the β -Lg denaturation reaction becomes significant [17, 26]. The thermal profile #4 increases linearly, reaching a maximum of 84.5 g/m^2 in the 5th channel.

The deposit mass is negligible, for the thermal profile #4 at 100 and 120 ppm calcium, owing to the lack of denatured β -Lg in the bulk at such low temperatures. It is suggested that β -Lg fouled hot surfaces only when the bulk temperature was high enough to allow β -Lg denaturation.

Figure 8 represents the effect of the temperature profile on the total amount of deposit mass in the PHE for the two fouling solutions. It can be observed that, for the same inlet and outlet product temperature, the total deposit mass varied with the calcium concentration. This is the case of the thermal profile #1, for which the total deposit mass goes from 1415 g/m^2 at 100 ppm calcium to 2082 g/m^2 at 120 ppm calcium. This was also observed for the temperature profiles #3 and #4. However, for the thermal profile #2, the total amount of deposit was very close at 100 and 120 ppm calcium.

This difference of fouling distributions obtained at various calcium concentrations demonstrates the major role of the temperature profile on β -Lg fouling and its distribution in the PHE.

3.3. Effect of Thermal Profiles and Calcium Concentration on Fouling Rate. Figure 9 shows the fouling rate behaviour during heating of the WPI solution at 100 and 120 ppm calcium in the PHE, for each thermal profile. An increase in the fouling rate with time is evident. A difference between

the fouling rates can be observed for the four temperature profiles, at 100 ppm and 120 ppm calcium.

The results also show that the fouling potential of WPI in the PHE increases with the increasing temperature. Indeed, for temperature range of $65\text{--}85^\circ\text{C}$, fouling rate is altered and favoured by higher amount of calcium in the model fluid. It can be noted that, for the thermal profile #4 ($60\text{--}75^\circ\text{C}$), fouling resistance curves for calcium content of 100 and 120 ppm calcium were superposed. These results are not contradictory with the assumption of Daufin et al. [27], Xiong [28], and Simons et al. [21], who asserted that calcium can interact with the aspartic and glutamic acid carboxyl group of the β -Lg and so favour the growth of the deposit by stabilizing protein aggregates. This is because calcium ions form bridges between adsorbed proteins and the protein aggregates occurring in the bulk, consequently modifying the protein aggregation rate and leading to a greater cohesion between the protein aggregates which in turn change the deposit structure [29]. Simmons et al. [30] revealed an increase in deposition upon a Couette surface due to calcium ions and a modification in the appearance of the deposit for a temperature range $75\text{--}90^\circ\text{C}$. In addition, Pappas and Rothwell [31] showed that β -Lg completely aggregated to form compact structures when heated with calcium from 80 to 110°C .

3.4. Relationship between β -Lg Heat Denaturation Rate Constants and the Distribution of the Deposit Mass along the PHE. To study the relationship between the chemical reaction of the β -Lg denaturation and the deposit formation rate within the PHE, the deposit mass distribution in the different channel of the PHE was plotted against $r = k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ (Figure 10). The value of r was calculated at the average temperature of the channel. k_{unf} and k_{agg} represent, respectively, the reaction rate constants for the unfolding and aggregation limited zones deduced from the Arrhenius plots (Figure 5) for the two WPI model fouling solutions (at 100 and 120 ppm of calcium).

For each fouling solution, it could be observed that an S curve (plot of the deposit mass per channel versus r) consolidates the fouling data, whatever the imposed thermal profile. The S curves could be described, for all fouling runs, by the following function:

$$M_d = a + \frac{b - a}{1 + (c/r)^d}, \quad (5)$$

where M_d is the measured dry fouling deposit mass per channel along the PHE and a , b , c , and d are four constants.

The two master curves, representing the deposit mass per channel versus the ratio r , contained different characteristic zones:

- (i) an unfolding limited zone with a sharp increase of the deposit mass per channel with r ;
- (ii) an aggregation limited zone where the deposit mass per channel seems to reach a limiting value.

Indeed, the curve of the dry deposit mass at 100 ppm calcium showed a sharp increase at values of r close to 0.22 (relative

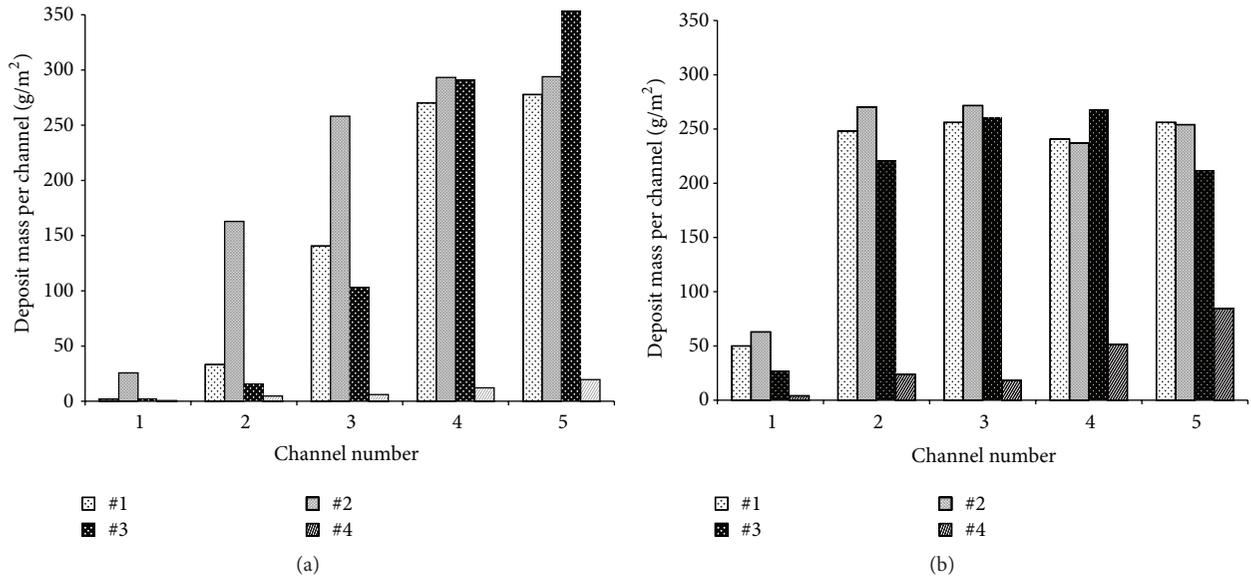


FIGURE 7: Fouling mass distribution, related to the projected heat transfer area per plaque, in each channel of the PHE for the two fouling solutions. 1% (w/w) WPI solution containing (a) 100 ppm calcium and (b) 120 ppm calcium (*#i* corresponds to the thermal profile number given in Figure 4 and Table 2).

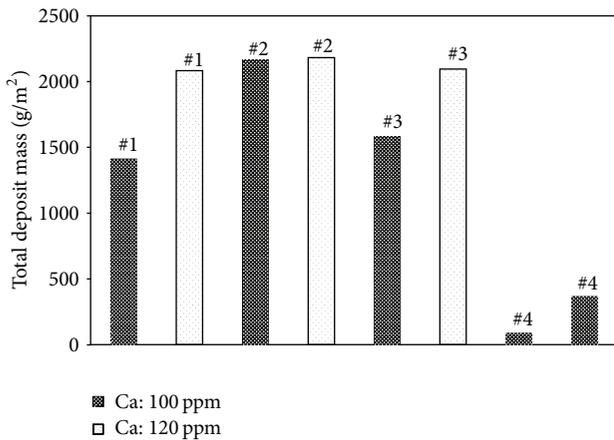


FIGURE 8: Total amount of the deposit mass in the PHE per unit area for 1% (w/w) WPI fouling solutions at various calcium concentrations (100 and 120 ppm) and for different temperature profiles (*#i* corresponds to the thermal profile number given in Figure 4 and Table 2).

to the fouling beginning), then reaching a plateau at $r = 0.91$. For the second fouling solution (WPI solution containing 120 ppm of calcium), the increase of r values starts at 0.23 and the maximum of the deposit mass is reached at $r = 0.67$.

In summary, for the two fouling model solutions and the operating conditions investigated, it can be observed that a sharp increase of deposit mass occurs, when r is located between 0.22 and 0.89 (corresponding to bulk temperatures ranging from 65 to 80.5°C). The fact that the deposit mass increases strongly, when r is below 1, shows that the unfolding limited zone controls the growth of the deposit mass. This result also shows that the deposit mass per channel decreases

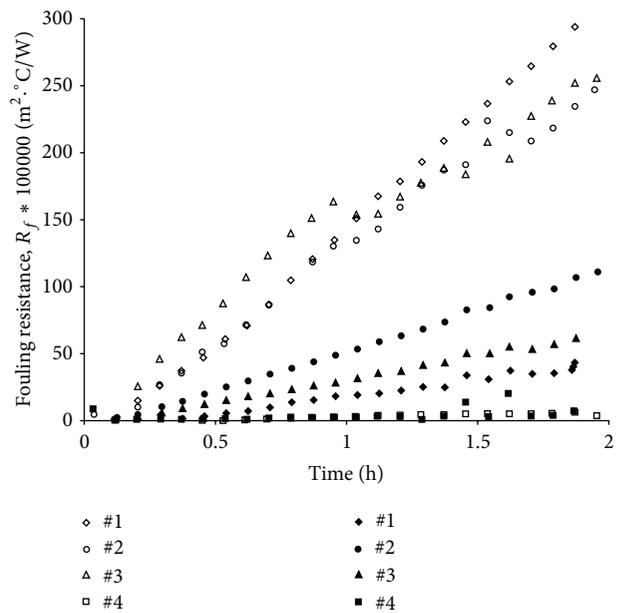


FIGURE 9: Fouling resistance evolution with time measured along the PHE. Various symbols refer to various fouling runs with varying thermal profiles and various calcium content for the 1% w/w WPI solutions (closed symbols: 100 ppm calcium; open symbols: 120 ppm calcium) (*#i* corresponds to the thermal profile number given in Figure 4 and Table 2).

when the aggregation reaction is high enough to consume the unfolded species under aggregates forms. This result is in agreement with the previous observation of van Asselt et al. [13] and consistent with the work of Blanpain-Avet et al. [32]. Indeed, these authors conclude from fouled deposit

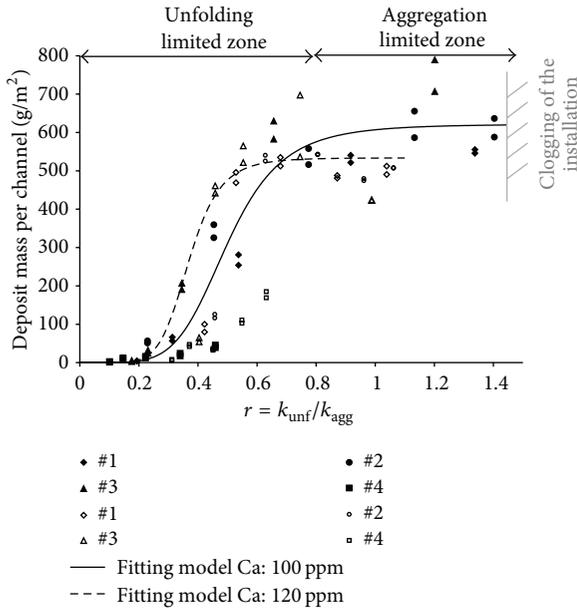


FIGURE 10: Plots of the dry deposit masses per unit area versus the ratio of unfolding and aggregation rate constants for the 1% w/w WPI solutions (closed symbols: 100 ppm calcium; open symbols: 120 ppm calcium) (*#i* corresponds to the thermal profile number given in Figure 4 and Table 2).

analysis by Raman spectroscopy that protein aggregates are not present in the deposit. This result is also supported by the recent study of Bouvier et al. [33] which showed that a correlation can be established between the unfolded β -Lg content within the PHE and the dry deposit mass distribution.

Unfortunately, it was not possible to perform pilot scale experiments at higher values of r ($r > 1.40$), corresponding to the channel temperature above 84.4°C , because of the clogging of the installation.

To ascertain validity of the master curve independently of the PHE configuration, further experiments were conducted at PHE consisting of 10 passes (one channel per pass) for a 1% (w/w) WPI model solution at 100 ppm calcium. One thermal profile (#1), out of the four tested for the five channels of the PHE, was imposed. Figure 11 represents the deposit mass per channel versus the ratio r .

Also in this case, the fouling mass is reasonably well correlated to the ratio r showing the following:

- (i) the importance of determining this indicator for predicting fouling mass distribution;
- (ii) the robustness of the approach.

4. Conclusions

Fouling experiments were performed with 1% (w/w) WPI solutions, at two different calcium concentrations, in order to investigate the effect of the operating conditions associated with the chemical denaturation reactivity of heat treatment in a PHE on the deposit formation. The extent of fouling

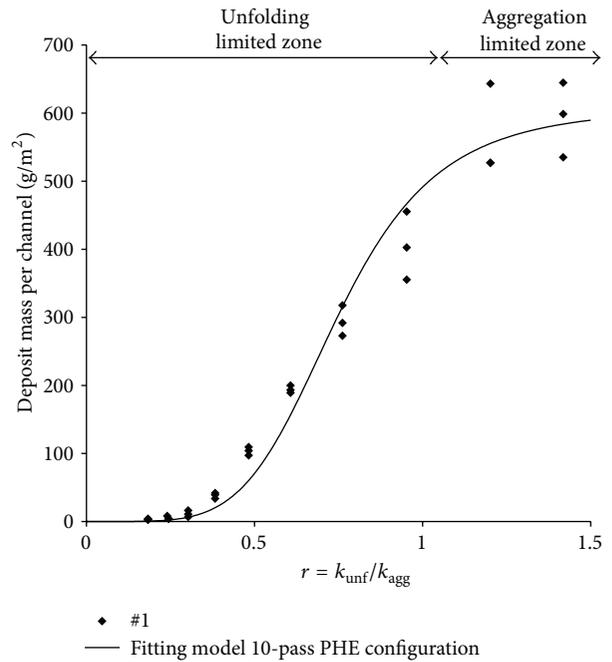


FIGURE 11: Variation of the dry deposit mass per unit area in the various channels with the ratio r for a 10-pass PHE configuration (*#1* corresponds to the thermal profile given in Figure 4 and Table 2).

deposit was monitored by weighing the mass of the dry fouling deposit on the plates.

It was shown that

- (i) β -Lg denaturation is a complex process with a two-step mechanism highly dependent on the calcium content;
- (ii) an increase of the calcium content in the fouling solution induced a strong increase in the β -Lg denaturation level and consequently in the fouling mass within the PHE at high temperatures;
- (iii) the fouling mass distribution also depends on the thermal profiles imposed on the fouling solutions;
- (iv) the dry deposit mass on each pass of the PHE seems to be correlated with $r = k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$. This observation indicates that the knowledge of this parameter is important to predict the mass distribution of the fouling deposit.

This work clearly shows that β -Lg competitive reactions (unfolding and aggregation) governing the growth of fouling for a WPI solution and the identification of the heat-induced denaturation kinetic by means of laboratory experiments are prerequisites to control fouling. We encourage strongly the fouling community to develop database on these aspects to be able to predict the distribution of fouling mass whatever the imposed temperature profile and to mitigate fouling.

Nomenclature

a :	Adjusted parameter in the nonlinear regression using (5)
b :	Adjusted parameter in the nonlinear regression using (5)
c :	Adjusted parameter in the nonlinear regression using (5)
Ca :	Calcium concentration, ppm
C_s :	Concentration of the total soluble β -Lg, $g L^{-1}$
C_{p_p} :	Specific heat for the product, $J kg^{-1} K^{-1}$
C_{p_h} :	Specific heat for the hot water, $J kg^{-1} K^{-1}$
d :	Adjusted parameter in the nonlinear regression using (5)
E_A :	Activation energy, $J mol^{-1}$
$E_{A,agg}$:	β -Lg aggregation activation energy, $J mol^{-1}$
$E_{A,unf}$:	β -Lg unfolding activation energy, $J mol^{-1}$
F_T :	Logarithmic mean temperature difference, -
k_n :	Denaturation rate constant, $g^{1-n} L^{n-1} s^{-1}$
k_n^0 :	Denaturation frequency factor, $g^{1-n} L^{n-1} s^{-1}$
k_{unf} :	Unfolding rate constant, $g^{1-n} L^{n-1} s^{-1}$
k_{agg} :	Aggregation rate constant, $g^{1-n} L^{n-1} s^{-1}$
M_d :	Measured dry fouling deposit mass in a channel along the PHE, g
\dot{m}_p :	Mass flow rates for the product, $kg s^{-1}$
\dot{m}_h :	Mass flow rates for the hot water, $kg s^{-1}$
n :	Heat-induced denaturation reaction order
Q_p :	WPI fouling solution flow rate, $L h^{-1}$
Q_h :	Hot water flow rate, $L h^{-1}$
r :	Ratio between the unfolding and aggregation rate constants, -
R :	The universal gas constant equal to 8.314, $J mol^{-1} K^{-1}$
R_f :	Fouling resistance, $m^2 C W^{-1}$
S :	Heat transfer area, m^2
T_{ih} :	Hot water temperature at the PHE inlet, K
T_{ip} :	WPI fouling solution temperature at the PHE inlet, K
T_{oh} :	Hot water temperature at the PHE outlet, K
T_{op} :	Hot water temperature at the PHE outlet, K
U_g :	Overall heat transfer coefficient, $W m^{-2} K^{-1}$
ΔT_{LMTD} :	Logarithmic mean temperature difference, K.

Subscript

agg:	Aggregation
C_i :	Channel number
h :	Hot water
p :	Product
P_i :	Plate number
PHE:	Plate heat exchanger
unf:	Unfolding
WPI:	Whey protein isolate
α -La:	α -lactalbumin
β -Lg:	β -lactoglobulin
# i :	Thermal profile number.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

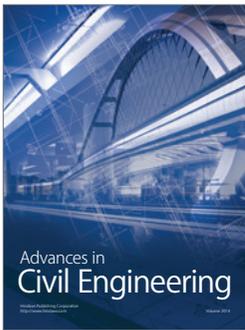
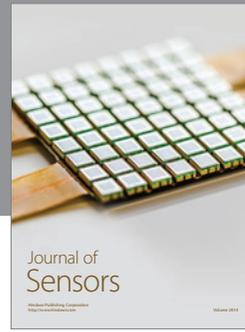
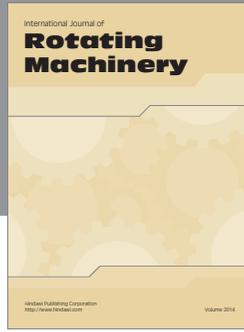
Acknowledgments

The authors are indebted to the Scientific Committee of Agro-campus Ouest Rennes and HEI (Hautes Etudes d'Ingénieur, Lille) for stimulating discussions and financial support for the Ph.D. Thesis of the first author.

References

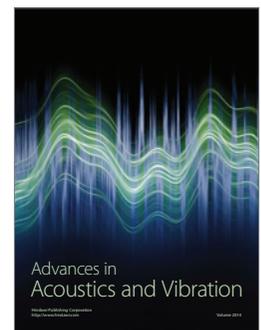
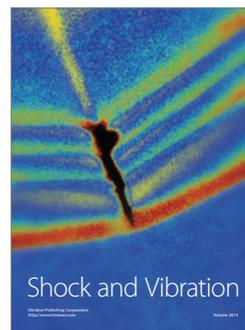
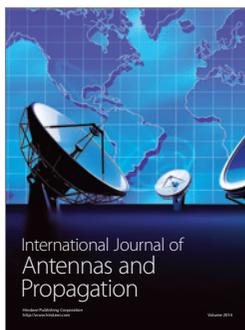
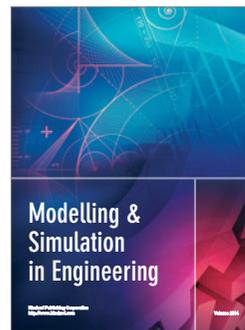
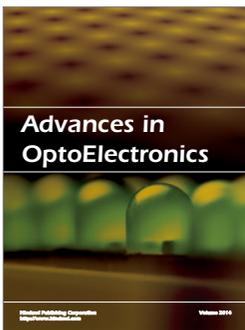
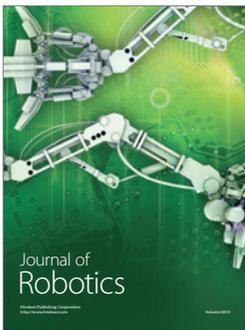
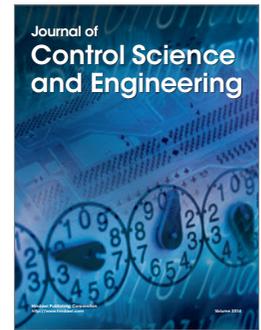
- [1] D. M. Mulvihill and M. Donovan, "Whey proteins and their thermal denaturation—a review," *Irish Journal of Food Science and Technology*, vol. 11, no. 1, pp. 43–75, 1987.
- [2] N. Sava, I. Van der Plancken, W. Claeys, and M. Hendrickx, "The kinetics of heat-induced structural changes of β -lactoglobulin," *Journal of Dairy Science*, vol. 88, no. 5, pp. 1646–1653, 2005.
- [3] C. Schmitt, C. Bovay, M. Rouvet, S. Shojaei-Rami, and E. Kolodziejczyk, "Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties," *Langmuir*, vol. 23, no. 8, pp. 4155–4166, 2007.
- [4] B. Bansal and X. D. Chen, "A critical review of milk fouling in heat exchangers," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 5, no. 2, pp. 27–33, 2006.
- [5] S. N. Tay and C. Yang, *Assessment of the Hydro-Ball Condenser Tube Cleaning System*, HydroBall Technics (SEA) Pte, Singapore, 2006.
- [6] H. M. Müller-Steinhagen, *Handbook of Heat Exchanger Fouling: Mitigation and Cleaning Technologies*, Publico Publications, Essen, Germany; Institution of Chemical Engineers, Rugby, UK, 2000.
- [7] M. Lalonde and J. P. Tissier, "Fouling of heat transfer surfaces related to β -lactoglobulin denaturation during heat processing of milk," *Biotechnology Progress*, vol. 1, no. 2, pp. 131–139, 1985.
- [8] P. De Jong, R. Waalewijn, and H. J. L. J. Van Der Linden, "Validity of a kinetic fouling model for heat-treatment of whole milk," *Le Lait*, vol. 73, no. 3, pp. 293–302, 1993.
- [9] S. D. Changani, M. T. Belmar-Beiny, and P. J. Fryer, "Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing," *Experimental Thermal and Fluid Science*, vol. 14, no. 4, pp. 392–406, 1997.
- [10] H. Burton, "Properties of UHT-processed milk," in *Ultra-High Temperature Processing of Milk and Milk Products*, pp. 254–291, Elsevier Applied Science Publishers, 1988.
- [11] M. T. Belmar-Beiny, S. M. Gotham, W. R. Paterson, P. J. Fryer, and A. M. Pritchard, "The effect of Reynolds number and fluid temperature in whey protein fouling," *Journal of Food Engineering*, vol. 19, no. 2, pp. 119–139, 1993.
- [12] P. J. R. Schreier and P. J. Fryer, "Heat exchanger fouling: a model study of the scaleup of laboratory data," *Chemical Engineering Science*, vol. 50, no. 8, pp. 1311–1321, 1995.
- [13] A. J. van Asselt, M. M. M. Vissers, F. Smit, and P. de Jong, "In-line control of fouling," in *Proceedings of the Heat Exchanger Fouling and Cleaning—Challenges and Opportunities*, Engineering Conferences International, Irsee, Germany, June 2005.
- [14] J. Petit, A.-L. Herbig, A. Moreau, and G. Delaplace, "Influence of calcium on β -lactoglobulin denaturation kinetics: implications

- in unfolding and aggregation mechanisms," *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 12, pp. 5794–5810, 2011.
- [15] M. Khaldi, P. Blanpain-Avet, R. Guérin et al., "Effect of calcium content and flow regime on whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger," *Journal of Food Engineering*, vol. 147, pp. 68–78, 2015.
- [16] B. T. Nielsen, H. Singh, and J. M. Latham, "Aggregation of bovine β -lactoglobulins A and B on heating at 75°C," *International Dairy Journal*, vol. 6, no. 5, pp. 519–527, 1996.
- [17] H. Lindmark-Månsson, A. Timgren, G. Aldén, and M. Paulsson, "Two-dimensional gel electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk," *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 2, pp. 111–121, 2005.
- [18] A. Tolkach and U. Kulozik, "Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin," *Dairy Science and Technology*, vol. 87, no. 4-5, pp. 301–315, 2007.
- [19] F. Dannenberg and H. G. Kessler, "Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk," *Journal of Food Science*, vol. 53, no. 1, pp. 258–263, 1988.
- [20] J. C. Leuliet, J. F. Maingonnat, and M. Lalande, "Thermal behaviour of plate heat exchangers with Newtonian and non-Newtonian fluids," in *Proceedings of the Congres Eurotherm 5 et 1er Colloque TIFAN*, pp. 1–15, Compiègne, France, 1988.
- [21] J.-W. F. A. Simons, H. A. Kosters, R. W. Visschers, and H. H. J. de Jongh, "Role of calcium as trigger in thermal β -lactoglobulin aggregation," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 406, no. 2, pp. 143–152, 2002.
- [22] B. T. O'Kennedy and J. S. Mounsey, "The dominating effect of ionic strength on the heat-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin in simulated milk ultrafiltrate," *International Dairy Journal*, vol. 19, no. 3, pp. 123–128, 2009.
- [23] M. Lalande, F. Rene, and J.-P. Tissier, "Fouling and its control in heat exchangers in the dairy industry," *Biofouling*, vol. 1, no. 3, pp. 233–250, 1989.
- [24] J. Visser and T. J. M. Jeurink, "Fouling of heat exchangers in the dairy industry," *Experimental Thermal and Fluid Science*, vol. 14, no. 4, pp. 407–424, 1997.
- [25] C. L. Foster, M. Britten, and M. L. Green, "A model heat-exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk. I. Deposit formation at 100°C," *Journal of Dairy Research*, vol. 56, no. 2, pp. 201–209, 1989.
- [26] P. Havea, H. Singh, and L. K. Creamer, "Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment," *Journal of Dairy Research*, vol. 68, no. 3, pp. 483–497, 2001.
- [27] G. Daufin, J. P. Labbé, A. Quemerais et al., "Fouling of a heat exchange surface by whey, milk and model fluids: an analytical study," *Le Lait*, vol. 67, no. 3, pp. 339–364, 1987.
- [28] Y. L. Xiong, "Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 40, no. 3, Article ID 91-5-154, pp. 380–384, 1992.
- [29] T. Phan-Xuan, D. Durand, T. Nicolai, L. Donato, C. Schmitt, and L. Bovetto, "Tuning the structure of protein particles and gels with calcium or sodium ions," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 6, pp. 1980–1989, 2013.
- [30] M. J. H. Simmons, P. Jayaraman, and P. J. Fryer, "The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling," *Journal of Food Engineering*, vol. 79, no. 2, pp. 517–528, 2007.
- [31] C. P. Pappas and J. Rothwell, "The effects of heating, alone or in the presence of calcium or lactose, on calcium binding to milk proteins," *Food Chemistry*, vol. 42, no. 2, pp. 183–201, 1991.
- [32] P. Blanpain-Avet, A. Hédoux, Y. Guinet et al., "Analysis by Raman spectroscopy of the conformational structure of whey proteins constituting fouling deposits during the processing in a heat exchanger," *Journal of Food Engineering*, vol. 110, no. 1, pp. 86–94, 2012.
- [33] L. Bouvier, A. Moreau, G. Ronse, T. Six, J. Petit, and G. Delaplace, "A CFD model as a tool to simulate β -lactoglobulin heat-induced denaturation and aggregation in a plate heat exchanger," *Journal of Food Engineering*, vol. 136, pp. 56–63, 2014.



Hindawi

Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>





Predicting the distribution of a whey protein fouling in plate heat exchanger using the kinetic parameters of the thermal denaturation reaction of beta-lactoglobulin and the bulk temperature profiles.

Journal:	<i>Journal of Dairy Science</i>
Manuscript ID	JDS-16-10957
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	28-Jan-2016
Complete List of Authors:	BLANPAIN-AVET, Pascal; INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), André, Christophe; HEI Khaldi, Marwa Bouvier, Laurent Petit, Jeremy Six, Thierry; INRA, UR 638-PIHM Jeantet, Romain Croguennec, Thomas; AGROCAMPUS OUEST, Food science Delaplace, Guillaume; INRA, UR638-PIHM
Key Words:	beta-lactoglobulin, plate heat exchanger, fouling mass prediction, heat-induced beta-lactoglobulin denaturation process

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Interpretive Summary :

2 Predicting the distribution of a whey protein fouling in a corrugated plate heat exchanger
3 using the kinetic parameters of the beta-lactoglobulin thermal unfolding/aggregation process

4

5 Blanpain-Avet

6

7 Experiments have been conducted at pilot scale in a corrugated plate heat exchanger (PHE)
8 and fouling deposits were generated using a model beta-lactoglobulin (BLG) fouling solution.

9 This study has shown that the dry mass distribution of fouling deposits in the PHE was
10 reasonably well correlated to the ratio $R=k_{unf}/k_{agg}$ (with k_{unf} and k_{agg} the unfolding and
11 aggregation rate constants, respectively) derived from both the thermal denaturation process
12 of BLG and the imposed bulk temperature profile. The prevalence of the concentration of
13 BLG aggregates limits fouling. This suggests that the release of the unfolded BLG within the
14 bulk fluid is a key phenomenon which controls the extent of protein fouling as well as its
15 location inside the PHE.

16

17 Running head :

18 HEAT INDUCED BETA-LACTOGLOBULIN DENATURATION

19

20

21 **Predicting the distribution of a whey protein fouling in plate heat exchanger using the**
22 **kinetic parameters of the thermal denaturation reaction of beta-lactoglobulin and the**
23 **bulk temperature profiles**

24

25 **P. Blanpain-Avet ^{*1}, C. André [†], M. Khaldi ^{*}, L. Bouvier ^{*}, J. Petit [‡], T. Six ^{*}, R. Jeantet**
26 **§, T. Croguennec [§] and G. Delaplace ^{*}**

27

28 ^{*} INRA, PIHM - UR638 (Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux), UMET (Unité
29 Matériaux Et Transformations) UMR CNRS 8207, 369, rue Jules Guesde, BP 20039, 59651
30 Villeneuve d'Ascq Cedex (France). Tel. : +33(0) 320435430 ; fax : +33(0)320435426.

31 [†] HEI (Ecole des hautes Etudes d'Ingénieur), Département Chimie, Textiles et Process
32 Innovants, 13, rue de Toul, 59046 Lille Cedex (France).

33 [‡] ENSAIA - Université de Lorraine – Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LiBio), 2
34 avenue de la Forêt de Haye – TSA 40602, 54518 Vandoeuvre-les-Nancy cedex (France)

35 [§] Agrocampus Ouest, UMR 1253, STLO (Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf), 65 rue
36 de Saint-Brieuc, CS 84215, 35042 Rennes (France)

37

38

39

40

41

42

43

44 ¹ : To whom correspondence should be addressed : blanpain-avet@lille.inra.fr

45

46 **ABSTRACT**

47

48 Fouling of plate heat exchangers (**PHEs**) is a severe problem in the dairy industry notably
49 because the relationship between the build-up of protein fouling deposits and the chemical
50 reactions taking place into the fouling solution has not yet been fully elucidated. Experiments
51 have been conducted at pilot scale in a corrugated PHE and fouling deposits were generated
52 using a model beta-lactoglobulin (**BLG**) fouling solution for which the BLG thermal
53 denaturation reaction constants had been previously determined experimentally. Then
54 eighteen different bulk temperature profiles within the PHE were imposed. Analysis of the
55 fouling runs shows that the dry deposit mass per channel versus the ratio $R=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ (with k_{unf}
56 and k_{agg} representing respectively the unfolding and aggregation rate constants computed
57 from both the identification of the BLG thermal denaturation process and knowledge of the
58 imposed bulk temperature profile into the PHE channel) is able to gather reasonably well the
59 experimental fouling mass data into a unique master curve. This type of representation of the
60 results clearly shows that the heat-induced reactions (unfolding and aggregation) of the
61 various BLG molecular species into the bulk fluid is essential to capture the trend of the
62 fouling mass distribution inside a PHE. This investigation also illustrates unambiguously that
63 the release of the unfolded BLG (also called BLG molten globule) within the bulk fluid (and
64 the absence of its consumption in the form of aggregates) is a key phenomenon which
65 controls the extent of protein fouling as well as its location inside the PHE.

66

67 **Key-words** : beta-lactoglobulin, plate heat exchanger, fouling mass prediction, heat-induced
68 beta-lactoglobulin denaturation process, unfolding and aggregation rate constants.

69

70

INTRODUCTION

71

72

73 Fouling of heat exchanger surfaces is a major industrial problem of milk processing plants,
74 which lowers the heat transfer efficiency, shortens run times, and requiring a daily cleaning
75 (Bansal et al., 2006; Sadeghinezhad et al., 2013). This has consequences for the dairy industry
76 both in terms of economics and sustainability. The reactor generally chosen to perform
77 heating of milk is a PHE which features a number of favourable aspects compared to tubular
78 heat exchangers or ohmic heaters. Fouling from milk-based fluids has been studied for a
79 number of years in a variety of experimental geometries. Only a summary focusing on the
80 topic of the most relevant fouling studies found in the literature will be presented here.

81 The key role played by BLG has been recognized in most milk fouling studies for a type A
82 (protein) fouling that takes place in the 75-110°C temperature range (Lalande et al., 1985;
83 Changani et al., 1997; De Jong, 1997), as classified by Burton (1968). The predominant role
84 of BLG has been connected to its thermal unfolding and aggregation process and thus
85 depends strongly on protein structure (Blanpain-Avet et al., 2012; Petit et al., 2013).

86 The following five steps possibly involved in the formation of fouling deposits have also been
87 suggested (Burton, 1968):

88 1. Chemical reactions in the product (i.e., thermal denaturation), which convert one or
89 more of its constituent into a form capable of being deposited on the surface.

90 Lalande et al. (1985) were the first who investigated the effect of BLG denaturation in milk
91 fouling and proposed that the heat denaturation of this globular protein results in the
92 destabilization of the milk-based product and gets rise to foulant precursors which lead further
93 to fouling on the heat transfer area. De Jong et al. (1992) applied the kinetics of the BLG
94 denaturation to analyze fouling in PHEs and found that the amount of deposit could be
95 correlated to the concentration of unfolded BLG and surface temperature. It is today well

96 established that three protein structures are involved in the course of the thermal denaturation
97 : native (N), unfolded (U) and aggregated (A) BLG. At pH > 6.8 and for bulk temperature
98 below 110°C which is our concern here, native BLG (N) unfolds to form the molten globule
99 BLG (U) exposing its reactive thiol (-SH) groups. This partially unfolded species can react in
100 the product with native or other unfolded BLG via thiol/disulphide interchange or thiol
101 oxidation to form denatured BLG (A) (Oldfield et al., 2005; De Wit, 2009), and this multistep
102 scheme of the heat-induced denaturation of BLG has been clearly illustrated in the
103 investigation of Tolkach and Kulozik (2007) and is summarized in the original publication as
104 shown by Figure 1.

- 105 2. Transportation of the product constituents (foulant or foulant precursor) to the surface
106 depending on the flow regime.
- 107 3. Adsorption of a layer of some fouling material to the surface in order to form an initial
108 fouling layer.

109 Since fouling occurs at the solid/liquid interface, surface properties play an important role, as
110 shown in the context of whey protein fouling (Boxler et al., 2014).

- 111 4. Deposition of other fouling materials or more of the same on the initial fouling layer.
112 The fouling material could stick on the initial layer and then could participate in deposit layer
113 formation or form aggregates with other constituents into the bulk.
- 114 Non-native forms of BLG (unfolded and aggregated) were suggested the molecular species
115 forming the deposit; however, findings reported in the literature were not always in agreement
116 when discussing which species are involved in fouling build up and induced more fouling
117 (Bansal et al., 2006; Sadeghinezhad et al., 2013). Blanpain-Avet et al. (2012) used recently
118 the Raman spectroscopy method to show that aggregates (characterized by an irreversibly
119 altered secondary structure) were not the cause of BLG deposits.

120 5. Build-up of the fouling layer by deposition of further material, compensated by the
121 mechanical removal of material through shearing forces caused by the flow of product
122 across the deposited-liquid interface.

123 The recent studies of Jimenez et al. (2013), Collier et al. (2015) and Khaldi et al. (2015a) have
124 shown the role of the fouling fluid composition and the flow regime in both deposit growth,
125 adhesion and modification of the structure of fouled layers.

126

127 The type and the composition of deposits were also largely investigated. For a temperature
128 below 110°C, the deposit is a type A (protein) fouling as classified by Burton (1968),
129 consisting of 50-70 wt % proteins, 30-40 wt % minerals and 4-8 wt % fat (Fickak et al.,
130 2011). Depending on the fouling solution chemistry and temperature profile, deposit can
131 contain other elements such as inorganic salts such as calcium phosphate (Rosmaninho and
132 Melo, 2006) or amorphous carbonate calcium (Jimenez et al., 2013). For a tubular heat
133 exchanger, Belmar-Beiny et al. (1992) proposed a simple fouling model in which fouling was
134 correlated with the volume of fluid hot enough to produce denatured and aggregated proteins.
135 This result highlighted the importance of bulk reactions involved in denaturation, does not
136 pinpoint the nature of the chemical reactions in the product leading to fouling (unfolding
137 and/or bulk aggregation). Developing the idea proposed by Lalande et al. (1985) and Belmar
138 and Beiny (1992), Delaplace and Leuliet (1995) established a correlation between the
139 deposited dry mass and the native BLG concentrations difference between the inlet and outlet
140 of the channels; the proposed model shows unambiguously that the fouling rate depends on
141 the concentration of the denatured BLG molecules. Unfortunately it did not provide the
142 distribution of the unfolded and aggregated BLG species along the PHE channel, and failed
143 consequently to precise on how these two competitive/temperature dependent reactions
144 govern fouling mechanisms.

145

146 In spite of such progress and although the relationship between bulk reactions and protein
147 deposition has been investigated and reasonably clarified by a few authors (see for example
148 the excellent review paper of Bansal and Chen (2006)), knowledge has to be improved to link
149 the chemical reactions in the bulk (i.e., unfolding, aggregation of BLG) and the extent of
150 fouling. The present study endeavours to address some of these issues, making it crucial to
151 collect accurate and reliable information on kinetic data related to the protein fouling solution
152 used as regards the process of BLG unfolding and aggregation. The objective of this work
153 was to show, for a given temperature profile inside the PHE, the appropriateness of using the
154 ratio $R (=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}})$ derived from the kinetic parameters determined at laboratory scale in
155 predicting the distribution within the PHE of the dry fouling deposit mass for various
156 operating conditions. For this purpose, a model whey protein isolate (**WPI**) fouling solution at
157 a concentration of 6 wt. % and at a fixed calcium content of 264 mg.l^{-1} , for which the heat-
158 induced BLG unfolding/aggregation process has been previously determined in the literature
159 via a kinetic model (Petit et al., 2011), was selected as a model fouling solution.

160

161

MATERIALS AND METHODS

162

WPI Fouling Solution

164

165 The PHE was fouled using a reconstituted industrial whey protein isolate (WPI) with an
166 unknown pretreatment. WPI powder was at a 6 wt.% concentration (pH 6.8) and at a 6.6 mM
167 ionic calcium content (anhydrous calcium chloride, CaCl_2 , 96 % min, Prolabo, VWR, USA).
168 Such an ionic calcium content (i.e., 264 mg.l^{-1} of atom calcium content considering a
169 molecular weight of 40.08 grammes per mole) was selected as the experimental program of

170 this study was part of the research program GLOBULE (ANR-08-ALIA-08). It is noticed that
171 the conformational state of BLG within the WPI powder plays a dominant role in this study; it
172 was thus measured experimentally by **RP-HPLC** (using solutions of known concentrations of
173 WPI powder) that native (non aggregated) BLG represented on average 89 percent w/w in the
174 WPI powder. WPI powder composition was the following : 89 wt. % BLG (in weight percent
175 on a dry basis), α -lactalbumin < 0.01 wt.% (BLG and α -lactalbumin were measured using
176 RP-HPLC according to a methodology described by Petit et al., 2011), 0.1 wt % fat, 1.9 wt %
177 ash, moisture 4.1 wt %.

178 The experimental procedure of preparation of the fouling solution was the following: 15 kg of
179 WPI powder was added to 250 litres of deionised water maintained at 40°C in the launching
180 tank (see Fig. 2) and dissolving occurred during two hours by gently stirring the solution
181 followed by the addition of 187 g anhydrous CaCl₂.

182

183 *Fouling Rig and Plate Heat Exchanger Configuration*

184

185 Fouling experiments were conducted using the fouling rig shown schematically in Figure 2.
186 The fouling rig was composed of three distinct zones: a pre-heating, a heating and a holding
187 zones. The pre-heating zone was composed of a tubular joule effect heater (**JEH**, Actijoule,
188 Actini, 30 kW). The role of JEH is to rise the temperature of the fouling solution from 40°C to
189 PHE inlet temperature, T_{ip} ranging from 50°C to 70°C. In the JEH zone, fouling was
190 considered negligible as the denaturation temperature of BLG is 74 - 76°C (Guérin et al.,
191 2007). The heating zone is composed of a PHE in a counter-current configuration using hot
192 water as the heating medium; a pilot-scale PHE in countercurrent configuration, supplied with
193 a holder, was used in order to mimic industrial process conditions. A PHE was used to heat
194 the fouling solution above the denaturation temperature (with a product outlet temperature,

195 T_{op} , ranging from 70 to 95°C). The PHE (VICARB, model V7, Alpha-Laval, France) involves
196 21 plates (each plate was 0.495 m long and 0.15 m wide, providing an exchange surface
197 of 0.075 m²) forming ten passes of one channel for both sides; the PHE was the investigated
198 zone for the measurement of the fouling mass distribution. The distance noted h (or flow gap)
199 between two consecutive plates was equal to $3.9 \cdot 10^{-3}$ m. The plates had 35° corrugation angle
200 and the overall exchange surface was 1.43 m². The holding zone was 20 m in length and made
201 up of an assembly of insulated stainless steel tubular pipes of $23.4 \cdot 10^{-3}$ m internal diameter.
202 The other elements consisted of a storage tank of 300 litres for the fouling solution whose
203 temperature was controlled at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ using a tubular JEH (Actijoule, Actini, 15 kW). The
204 flow rate in the fouling rig was ensured by a volumetric pump (noted FP, Fig. 2; type PL
205 20.12/40, PCM Pompes, France). The investigated zone for the deposited fouling mass was
206 the PHE heating zone.

207 Stable process conditions were ensured by monitoring the heat exchanger inlet and outlet
208 temperatures and flow rates using the following sensors i) electromagnetic flowmeters for the
209 flow rates ($\pm 1\%$ of the full scale), ii) platinum resistance probes for temperatures of all fluids
210 ($\pm 0.2^\circ\text{C}$). A differential pressure transducer (Schlumberger Type D, $\pm 0.25\%$ of the full
211 scale) was also used for the PHE pressure drop. All parameters were collected via a data
212 acquisition system (Agilent Technologies, USA) with an acquisition period of 15 s.

213

214 ***Fouling Trial Protocol and Deposit Weighing***

215

216 Each fouling trial consisted of five stages:

- 217 - initial stabilization of hydraulic and thermal parameters using reverse osmosis (**RO**) water
218 circulation as product in the pilot plant,

219 - fouling run, with a fouling solution flow rate, Q_p , varying between 150 and 300 l.h^{-1}
220 (turbulent flow regime with $500 < \text{Re} < 1000$). The Reynolds number in the PHE (Re) was
221 computed based on physical properties of water, by assuming that the presence of a 6 wt %
222 WPI in water does not modify them significantly as reported by Delplace and Leuliet (1995)
223 and Delplace et al. (1997); Reynolds number was defined by : $\text{Re} = \rho.v.D_h/\mu$, where the
224 equivalent diameter D_h is twice the average space h between two plates of the PHE ($h =$
225 0.0039 m).

226 - first RO water rinse,

227 - NaOH-HNO₃ cleaning procedure,

228 - final RO water rinse.

229 Heat exchange conditions (e.g., temperature profile, heat transfer coefficient) were totally
230 controlled by the PHE inlet parameters : product and hot fluid inlet temperatures, respectively
231 T_{ip} and T_{ih} , and flow rates, respectively Q_p and Q_h . Consequently, it was possible to impose
232 different temperature profiles (i.e., bulk temperature evolution with time). During the
233 experiments, the inlet temperature of hot water was adjusted to ensure a constant outlet
234 fouling solution temperature in the holding zone and a constant product temperature profile
235 along the PHE as a function of time.

236 In addition the temperature in the holding section was maintained equal to T_{op} in all
237 experiments. The PHE inlet parameters associated with each fouling run are reported in Table
238 1. A total volume of 250 litres of the WPI fouling solution was processed for each fouling
239 run. As the product flow rate varied, run duration ranged from 50 min at $Q_p=300 \text{ l.h}^{-1}$ to 100
240 min at $Q_p=150 \text{ l.h}^{-1}$. After reaching thermal equilibrium with RO water, the feed was
241 switched from RO water to the fouling solution and the fouling stage was continued.

242 The fouling solution was not re-circulated once it was heated through the tubular JEH and
243 PHE.

244 After the fouling experiment, fouling solution was replaced by RO water at room temperature
 245 to decrease the PHE temperature and to stop the protein deposit growth. Following the first
 246 rinse, the PHE was dismantled and each fouled plate was carefully removed and stored at
 247 70°C for 4 hours in order to measure the dry weight of deposit onto the fouled plate.
 248 Fouling mass in a single channel c (noted $m_{dep,c}$) was determined by adding up the two deposit
 249 mass values obtained for the plates constituting the pass walls. The different channels (noted
 250 c) were numbered from 1 to 10 from the right (inlet) to the left (outlet) of the PHE.

251

252 *Numerical Evaluation of the Bulk and Wall Temperature Profiles along the PHE*

253

254 For each experiment, the bulk temperature profile in the plate heat exchanger was obtained by
 255 simulation with Sphere software (Danone, Paris, France), previously developed at the
 256 laboratory applying the numerical method proposed by René et al. (1991). Once the hydraulic
 257 and thermal performances of the considered PHE were implemented in this software, the bulk
 258 temperatures of both fluids at any location of the heat exchanger can be calculated from the
 259 knowledge of the inlet temperatures and flow rates of hot and cold fluids. The set of eighteen
 260 bulk temperature profiles displayed in Figures 3a-3d were obtained by tuning the varying
 261 PHE inlet parameters gathered in Table 1.

262 In Table 1 also appear the different output variables resulting from the varying PHE inlet
 263 parameters imposed, namely :

264 - the product temperature at the PHE outlet (T_{op}),

265 - the temperature increase between the PHE inlet and outlet ($\Delta T_p = T_{op} - T_{ip}$),

266 - the heat exchange efficiency ($\varepsilon = \frac{T_{op} - T_{ip}}{T_{ih} - T_{ip}}$),

267 - the mean residence time of the product in the PHE ($\tau = \frac{V_{exch}}{Q_p}$ where $V_{exch}=3.1$ litres)

268 These variables (T_{op} , τ , ΔT_p and ε) are global output parameters which quantify how the heat
269 and momentum transport in the PHE are affected by varying PHE inlet parameters. The
270 output variables gathered in Table 1 will be used latter in the article to discuss fouling mass
271 deposit results.

272 In Figures 3a-3d, it could be observed that the temperature profiles have different shapes
273 (linear or not), inducing different denaturation rates along the PHE. Note that the nominal
274 process conditions of the reference experiment (#1, Table 1) were similar to industrial
275 conditions: temperature increase from 60 to 85°C in the PHE in 74.6 seconds and then
276 holding at 85°C for 16.6 seconds.

277 Whatever the PHE inlet parameters imposed, a good agreement between experimental and
278 simulated values was observed for the hot water and BLG concentrate outlet bulk
279 temperatures, which is an additional validation of the simulated temperature profiles provided
280 by the Sphere software.

281 In Fig. 3a, the simulated plate wall temperature profiles (noted T_{wall}) along the PHE have been
282 also presented for run #1 to run #6. The plate wall temperature of each run has been evaluated
283 according to the method described by Toyoda et al. (1994) in the absence of fouling. From
284 Figure 3a analysis, it appears that for each case, T_{wall} values are very close to the bulk fluid
285 temperature (T_b) values along the PHE (the percent variation between T_{wall} and T_b in each
286 pass does not exceed + 0.5 %, if we except the two values at the PHE inlet and outlet for
287 which percent variation can reach up to 4 %) . Similar magnitude of variation between bulk
288 and plate wall temperature profiles was obtained for the other runs. Consequently, for sake of
289 simplicity, it was decided (i) to consider, for the numerical simulation of the population
290 balance, that the totality of the volume of fluid in the channel is submitted to a bulk

291 temperature profile, and (ii) to take no account of the slight temperature gradient between the
292 surface and the bulk, which could modify the population balance (i.e., BLG species N, U and
293 A).

294

295 *Determination of the Kinetic Parameters*

296

297 *Experimental Thermal Denaturation Tests*

298

299 Thermal denaturation tests on samples of the model fouling solution in the 68 - 96°C holding
300 temperature range were conducted at laboratory scale, according to the methodology wholly
301 described by Petit et al. (2011). Briefly, this method consists in submitting samples of the
302 model fouling solutions (volume of 1.4 ml per sample) to two subsequent temperature ramps
303 by immersing polypropylene tubes (containing static samples of the model fouling solution)
304 in consecutive water baths. The first temperature ramp is at 60°C (i.e., under the denaturation
305 temperature of BLG equal to 74-76°C, Guérin et al., 2007) while the second one is tuned at
306 the desired holding temperature. Once the desired holding temperature is reached, the time is
307 set to zero and samples were progressively taken off the bath at different residence times and
308 cooled down quickly below 60°C using an ice water bath.

309

310 *HPLC Analysis*

311

312 The concentration of soluble (native) BLG species (and the resulting concentration of
313 aggregated BLG) in each sample versus time was evaluated by analyzing each sample using
314 RP-HPLC. RP-HPLC analysis is carried out after precipitation of the aggregated protein at pH
315 4.6 (using the addition of 1M acetic acid) and its removal by centrifugation (9000 rpm for 30



316 min at 4°C). The chromatographic system (Waters, Milford, Massachusetts, USA) included a
317 717 Plus autosampler, a 616 quadratic pump system, a Jones Model 7971 column oven, a
318 CLHP ACE 300 Å C4 separation column and the associated guard column (Advanced
319 Chromatography Technologies, Aberdeen, United-Kingdom), a 486 UV-visible
320 spectrophotometer and an acquisition software (Millenium 3.2, Waters). The mobile phases
321 used in HPLC were 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid (99 %, Acros Organics, Thermo Fisher
322 Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in Milli-Q water, and 0.1 % trifluoroacetic acid in
323 a mixture of 80% acetonitrile (HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham,
324 Massachusetts, USA) and 20% Milli-Q water.

325 HPLC analyses were carried out using the following conditions : flow rate 1 ml.min⁻¹,
326 injection volume 20 µl, temperature 40°C, elution of the proteins using a gradient of
327 acetonitrile and detection of the eluted proteins at a wavelength of 214 nm. Analyses were
328 repeated three times for each standard or sample. Calibration standards in the range from 0.5
329 to 4 g.l⁻¹ were prepared by dissolving a known amount of lyophilized BLG powder (purchased
330 from Sigma-Aldrich, France, purity minimum 90 % for BLG) in Milli-Q water. For each
331 experiment, sample concentrations were calculated by averaging the three measured
332 chromatographic areas and converting this area value into a native BLG concentration using a
333 HPLC calibration curve previously determined.

334

335 *Determination of the Denaturation Reaction Order (n) and the Formal Denaturation Rate*
336 *Constant (k_n)*

337

338 The reaction scheme used in this study to describe the heat-induced denaturation reaction of
339 BLG is derived from the work of Tolkach and Kulozik (2007), that is :



341 with S representing the total soluble BLG species (i.e., non-aggregated BLG as measured by
 342 HPLC in the supernatant of the heated solution assayed following the precipitation at pH 4.6)
 343 and A representing the aggregated (insoluble) BLG; k_n is the formal denaturation rate
 344 constant for an overall reaction order equal to n (k_n is expressed as $\text{g}^{1-n} \cdot \text{l}^{n-1} \cdot \text{s}^{-1}$).
 345 Consequently, the denaturation kinetics concerning the transformation of soluble species into
 346 insoluble species could be defined by the general rate equation (2) :

$$347 \quad \frac{dC_s}{dt} = -k_n C_s^n, \quad (2)$$

348 where C_s is the soluble (non-aggregated) BLG concentration ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).
 349 Resolution of equation (2) provides different C_s expressions depending on whether the
 350 reaction order value is equal to 1 or not (see Petit et al., 2011).

$$351 \quad \text{For } n \neq 1, C_s(t) = C_s^\circ (1 + (n-1)k_n C_s^{\circ n-1} t)^{1/n} \quad (3)$$

$$352 \quad \text{And for } n = 1, \ln\left(\frac{C_s(t)}{C_s^\circ}\right) = -k_n C_s^{\circ n-1} t \quad (4)$$

353 with C_s° is the initial (time zero) BLG total soluble concentration ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

354 The value of n was varied from 1 to 2 (in steps of 0.1). Then $\left(\frac{C_s(t)}{C_{s0}}\right)^{1-n}$ for $n \neq 1$ (or

355 $\ln\left(\frac{C_s(t)}{C_{s0}}\right)$ for $n = 1$) was plotted as a function of time. The reaction order that gives the

356 best fit (according to the criterium of a Pearson product moment correlation coefficient close
 357 to $r=1$) of the experimental data was retained (it was found for all experiments that $n=1.5$).

358 Finally, applying a denaturation reaction order of $n=1.5$ for the whole range of the holding
 359 temperatures investigated, the corresponding denaturation rate constant ($k_n = k_{1.5}$) for each
 360 holding temperature was deduced from the slope of a linear regression.

361

362 *Arrhenius Plot and Determination of the Reaction Rate Constants (k_{unf} and k_{agg}).*

363

364 To observe the temperature dependency of the formal denaturation rate constant, an Arrhenius
 365 plot involving the variation of the logarithm of $k_{1.5}$ with the inverse holding temperature, $1/T$,
 366 (see Figure 4) was built. The Arrhenius plot exhibited two zones separated by a critical (or
 367 bend-) temperature (noted T_{critical}) close to 78°C .

368 When the temperature dependence of the formal denaturation rate constant is described by
 369 equation (5), the slope break delimitates two temperature ranges with different values for
 370 $\ln(k_n^{\circ})$ and E_A :

$$371 \quad \ln(k_n) = \ln(k_n^{\circ}) - \frac{E_A}{R_{\text{gas}} T} \quad (5)$$

372 where k_n° is the denaturation frequency factor (also called preexponential factor), E_A the
 373 denaturation activation energy, R_{gas} the universal gas constant and T the holding temperature.

374 Considering the fact that the Arrhenius plot (k_n versus $1/T$ curve could not be described by a
 375 unique thermal dependency, it was chosen to assume (similarly to Tolkach and Kulozik
 376 (2007) and to Petit et al. (2011)) that the denaturation process of BLG is not as trivial as a
 377 two-state process (i.e., $S \rightarrow A$, see eqn (1)); it has been thus assumed here to be a three-state
 378 process (represented in Figure 5, as proposed by Tolkach and Kulozik (2007)).

379 In the reaction scheme represented in Fig. 5, consisting of a set of reversible consecutive
 380 reactions of unfolding and aggregation, k_{unf} and k_{agg} are the unfolding and aggregation rate
 381 constants, respectively, n is the reaction order of the unfolding and aggregation process (n was
 382 found to be equal to 1.5 for the WPI fouling solution used, see Petit et al. (2011)) and α is the
 383 unfolding degree defined by Tolkach and Kulozik (2007); α is related to the temperature-
 384 dependent equilibrium between the species N (folded native BLG) and U_{MG} (thermally
 385 induced BLG molten globule). The unfolding step corresponds to the reversible
 386 transformation of N to U_{MG} . This step is thus considered as a temperature-dependent

387 equilibrium between native and unfolded BLG molecules. The aggregation step corresponds
388 to the irreversible transformation of U_{MG} to A.

389 The advantage of using the kinetic model of Tolkach and Kulozik (2007) is that it takes
390 account of the existence of the BLG molten globule and gives also a mathematical
391 interpretation of the occurrence of the sharp bend on the Arrhenius plot is provided. Below
392 the critical temperature, the denaturation reaction is limited by the unfolding reaction while
393 above the critical temperature, BLG denaturation is limited by the aggregation reaction
394 (Tolkach and Kulozik, 2007; Petit et al., 2011).

395 Consequently, linear regressions of the experimental values in the two temperature ranges
396 allowed us to determine the kinetic parameters (frequency factors and activation energies)
397 related to the unfolding (equation (6)) and aggregation (equation (7)) phenomena (Petit et al.,
398 2011) :

$$399 \quad \ln(k_{unf}) = \ln(k_{0,unf}) - \frac{E_{a,unf}}{R_{gas} \cdot T} \quad (6)$$

400 where k_{unf} is the unfolding rate constant depending on n ($g^{1-n} \cdot l^{n-1} \cdot s^{-1}$), $k_{0,unf}$ the unfolding
401 frequency factor ($g^{1-n} \cdot l^{n-1} \cdot s^{-1}$), and $E_{a,unf}$ the unfolding activation energy ($J \cdot mol^{-1}$), and

$$402 \quad \ln(k_{agg}) = \ln(k_{0,agg}) - \frac{E_{a,agg}}{R_{gas} \cdot T} \quad (7)$$

403 where k_{agg} is the aggregation rate constant depending on n ($g^{1-n} \cdot l^{n-1} \cdot s^{-1}$), $k_{0,agg}$ the aggregation
404 frequency factor ($g^{1-n} \cdot l^{n-1} \cdot s^{-1}$), and $E_{a,agg}$ the aggregation activation energy ($J \cdot mol^{-1}$).

405 Table 2 presents the kinetic parameters derived from eqns (6) and (7). These kinetic
406 parameters ($k_{0,unf}$, $E_{a,unf}$, $k_{0,agg}$, $E_{a,agg}$) fully define the BLG denaturation in each temperature
407 range and were used to calculate the concentration of the different BLG species (N, U and A)
408 induced by different temperatures profile as illustrated later in this paper.

409

410 *Calculation of the BLG Unfolding Degree (α)*

411

412 The formation of the molten globule state (U) during thermal treatment of protein solution can
 413 be characterized by an equilibrium between native (N) and partially unfolded BLG which
 414 quantitatively can be described by an unfolding degree α (Tolkach and Kulozik, 2007) :

$$415 \quad \alpha = \frac{C_U}{C_N + C_U} = \frac{C_U}{C_s} \quad (8)$$

416 The value of the unfolding degree α varies between 0 (all BLG molecules are native, low
 417 temperature area) and 1 (all BLG molecules are completely unfolded, high temperature area).
 418 The concentration of unfolded BLG (C_U) and native BLG (C_N) during the heat treatment can
 419 be derived from eqn. (8) :

$$420 \quad C_U = \alpha \cdot C_s \quad (9)$$

421 and consequently,

$$422 \quad C_N = (1 - \alpha) \cdot C_s \quad (10)$$

423 In the aggregation - limited area (at low values of $1/T$), the unfolding of BLG is completed so
 424 that only the unfolded and the irreversibly denatured BLG molecules exist in the solution; α
 425 takes the value of 1 and, consequently, the term $n \cdot \ln(\alpha) = 0$. Therefore, the formal BLG
 426 denaturation rate constant is confounded with the aggregation rate constant (Tolkach and
 427 Kulozik, 2007) : $\ln(k_n) = \ln(k_{agg})$.

428 With decreasing temperature into the unfolding-limited temperature area ($1/T$ values
 429 increase), α declines and the term $n \cdot \ln(\alpha)$ takes a negative value and we have (Tolkach and
 430 Kulozik, 2007): $\ln(k_n) = \ln(k_{agg}) + n \cdot \ln(\alpha)$. This appears clearly in Figure 4 which shows a
 431 sharp edge between (k_{unf}) and (k_{agg}) in this area. Therefore, in the unfolding-limited
 432 temperature area, α can be calculated from the formal velocity constant k_n and the
 433 aggregation rate constant k_{agg} extrapolated into the unfolded limited area, as shown by
 434 Tolkach and Kulozik (2007) :

$$435 \quad \alpha = \exp\left(\frac{\ln(k_n) - \ln(k_{agg})}{n}\right) \quad (11)$$

436 Table 3 shows a calculation of the unfolding degree α according to equation (11) with $n=1.5$
 437 using the formal denaturation rate constant (i.e., $k_{1.5}$) in the 45-110°C temperature range.

438

439 ***Determination of the Concentration Profiles of the BLG Species (N, U, A)***

440

441 The numerical simulation of the concentration profiles of the different BLG species within the
 442 PHE (i.e., $C_N, C_U, C_A = f(\text{mean residence time, } \tau)$) was computed from the knowledge of :

- 443 (i) the kinetics of the heat-induced BLG unfolding and aggregation reactions
 444 (measured in the range 68-96°C), which is schematized by the set of reversible
 445 consecutive reactions presented in Fig. 5 (Tolkach and Kulozik, 2007);
- 446 (ii) the simulated profile of the bulk fluid temperature within the PHE for given PHE
 447 inlet parameters in the clean steady-state.

448 More precisely, the evaluation of the concentration profile of the various BLG species (i.e.,
 449 native N, unfolded U and aggregated A) along the PHE was obtained using the Runge-Kutta 4
 450 numerical method to solve equations (2), (6), (7), (8), (9), (10) and (11). The concentration at
 451 any mean residence time (noted τ) of the irreversibly aggregated BLG (C_A) can be calculated
 452 as the difference between the calculated concentration of the total soluble species (i.e., $C_N +$
 453 C_U) and the starting (initial) measured BLG concentration of the WPI fouling solution.

454 The temperature-dependent reaction rate constants (k_{unf} and k_{agg}) are derived from eqns (6)
 455 and (7) by using the kinetic parameters included in Table 2. Discretization was carried out
 456 with a time step equal to 0.01 second, which resulted in a sufficiently good accuracy of
 457 calculated data. The simplifying assumptions used in the calculation of the concentrations $C_N,$
 458 C_U and C_A are the following : (i) the flow in the whey protein treating PHE is considered as a

459 one-dimensional (1-D) plug flow model, (ii) the temperature profile into the bulk fluid is
460 linear in each channel c of the PHE, i.e., local temperature gradients within the thermal
461 boundary layer are not taken into account, and (iii) the loss of the unfolded BLG protein along
462 the PHE involved in the deposition process is not considered.

463

464 *Statistical Analysis*

465

466 Statistical analyses of deposit mass were performed using SigmaStat 3.1 and SigmaPlot 10.0
467 software (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA). The level of significance was p_{value}
468 <0.05 .

469

470

RESULTS AND DISCUSSION

471

472 *Influence of the Temperature Profiles on Dry Deposit Masses Measured in each PHE* 473 *Channel and on the Concentration Profiles within the PHE for the various BLG Species.*

474

475 Figures 6a, 6b, 6c, 6d and 6e present the dry deposit masses measured in each channel at the
476 end of the experiments for five representative fouling runs (corresponding to experiments
477 #1,#2, #3, #6 and #15, respectively) together with the concentration profiles of the different
478 BLG species (N, U, A) determined numerically along the PHE. For sake of clarity, scales
479 concerning some protein species concentrations have been divided by a shift factor and are
480 indicated in the legend. As expected, the distribution of dry masses of deposit within the PHE
481 channels was influenced significantly by the temperature profile. It can be observed that the
482 more severe is the thermal treatment, the more the distribution of dry masses of deposit are

483 located in the first channels of the PHE. For low temperature treatments, dry deposit masses
484 are more important close to the PHE outlet.

485 As for the dry deposit masses, the apparition and disappearance of protein species (N, U, A)
486 appear to be significantly impacted by the temperature profile. In general, species U appears
487 earlier and at a higher concentration in the PHE than species A. This confirms that unfolding
488 and aggregation reactions have a predominant area depending on the temperature range.
489 Species N disappears progressively along the PHE but at different residence times depending
490 on the temperature profile imposed. Figs. 6a to 6d show evidences of the nonlinearity of
491 population species balance : concentration C_A is not simply complementary to concentration
492 C_N .

493 Concerning the species concentration, it could be observed that :

- 494 i) when relatively low temperature ($45^{\circ}\text{C} < T_{ip} < 70^{\circ}\text{C}$) compared to the denaturation
495 temperature of BLG (circa $74\text{-}76^{\circ}\text{C}$, Guérin et al., 2007) is set at the PHE inlet, the
496 concentration of N (C_N) is close to its initial value (i.e. $\approx 53.3 \text{ g.l}^{-1}$) and U remains
497 at a low concentration level ($C_U < 8.9 \text{ g.l}^{-1}$) whereas A is either not detected or is at
498 a concentration level that is considerably lower than C_U ($C_A < 2.7 \text{ g.l}^{-1}$) (Figures
499 6a, 6c and 6e).
- 500 ii) A significant concentration of A (different of zero) occurs only for run #6 (Fig. 6d)
501 for which the inlet PHE temperature was the highest ($T_{ip}=70^{\circ}\text{C}$).
- 502 iii) The concentration profile of the unfolded BLG (C_U) is characterized by: (i) an
503 initial increase depending on the product temperature, (ii) a maximum value
504 appearing earlier in the PHE if the product temperature is high and (iii) following
505 this maximum, a decrease at the expense of C_A up to the PHE outlet.
- 506 iv) The concentration of the aggregated BLG (C_A) increased strongly from the
507 channel for which C_U reached its maximum value (Figures 6a and 6d), then

508 increased more slowly up to the PHE outlet. The concentration profile of the
509 aggregated BLG (C_A) did not exhibit a maximum contrary to what observed for
510 C_U .

511 The BLG unfolding and aggregation process was thus markedly impacted by the average
512 temperature prevailing in the PHE, which is agreement with previous studies using the same
513 WPI fouling solution (Petit et al., 2011, 2013). Indeed the aggregation level measured at the
514 PHE outlet increased from 49.8 % to 97.3 % for a T_{op} value ranging from 70 to 95°C,
515 respectively. This observation is due to the significant enhancement of the BLG unfolding and
516 aggregation kinetics with temperature as described by the Arrhenius equation.

517 The simulated concentration profiles presented in Fig. 6 are consistent with the distribution of
518 C_N , C_U and C_A calculated using CFD in the modeling of both a single-channel PHE during
519 pasteurization of milk (De Bonis and Ruocco, 2009). These concentration profiles are also in
520 good agreement with the typical concentration - time curves reported by De Jong et al.
521 (1992), who have considered however that the heat-induced denaturation of BLG could be
522 described as a consecutive reaction of unfolding and aggregation ($N \rightarrow U \rightarrow A$), which
523 differs from the set of reversible consecutive reactions used in this study (see Fig. 5).

524

525 ***Interrelation between the Bulk BLG Species Concentrations and the Dry Deposit Mass***
526 ***Distribution : Predominant Role of the Unfolded BLG (U) in the Build-up of Fouling***

527

528 In order to make the connection between the role of the bulk protein unfolding and
529 aggregation process and the mechanism of deposit formation, the experimental distribution of
530 the dry deposit mass along the PHE channels c (noted $m_{dep,c}$) and the variation of the
531 concentration of unfolded (C_U) and aggregated (C_A) BLG have been analyzed simultaneously.

532 From this analysis, it appears clearly that aggregates are not the precursor of deposit. Indeed,
533 the appearance of BLG aggregates is subsequent to fouling (Figures 6a, 6c and 6e) and one
534 can observe a decrease in the deposited mass when C_A increases sharply for all runs. This
535 confirms that aggregates are not major species involved in whey protein deposit formation.
536 This investigation also illustrates unambiguously that the release of unfolded BLG within the
537 bulk fluid (and its non-consumption in the form of BLG aggregates) is a key phenomenon
538 which controls the extent of protein fouling as well as its location inside the PHE.
539 This assumption is in agreement with previously results reported by Blanpain-Avet et al.
540 (2012) through a Raman analysis of the first deposit layer located at the *stainless steel-fouling*
541 *layer* interface; indeed Blanpain-Avet et al. (2012) clearly demonstrated that protein species
542 present in the first layer of the deposit have a secondary structure which differs significantly
543 from that of the aggregates, BLG aggregates being characterized by an irreversibly altered
544 secondary structure.
545 This result is also in coherence with authors who have argued that favouring the formation of
546 protein aggregates could be a way to reduce fouling (De Jong et al. 1992; Delplace et al.,
547 1997; Van Asselt et al., 2005). It can also be seen that the experimental deposit mass
548 continually increases up to the pass in the PHE where the aggregation rate increases
549 significantly. The same observation was made by de Jong et al. (1993) in the case of the
550 modelling of whole milk fouling in a PHE.
551 Fig. 6 also indicates that, in the absence of species A, very little U species into the bulk fluid
552 is enough for the observation of a BLG deposit. This result is in agreement with the
553 observation of Delplace and Leuliet (1995) who have noted that very low quantities of
554 denatured BLG are required to observe an increase in the dry deposit mass.
555 As shown in Figure 6, the hypothesis that species U is the precursor of a whey protein fouling
556 in the 70-95°C temperature range and that the aggregation reaction limits fouling, appears to

557 be plausible since the fouling rate, derived from the measurement of deposit masses,
558 decreases when the aggregate concentration increases.

559 This result is also in agreement with the work of Petit et al. (2013) who have led a
560 dimensional analysis to identify the dimensionless numbers governing the fouling and the
561 aggregation formation when a WPI fouling solution (of the same chemical composition) is
562 heated in a pilot scale PHE. Indeed these authors have shown that the total dry masses of
563 deposit collected in the PHE were essentially governed by the Arrhenius exponential factor of
564 the BLG unfolding reaction, that is $\exp(-E_{a,unf}/(R_{gas} \cdot T_{ip}))$, which combines in a single
565 dimensionless number the overwhelming influence of temperature and BLG reactivity as
566 regards the unfolding. This is also in agreement with the statement of Bouvier et al. (2014)
567 who have underlined, using a 2-D CFD analysis and experimental fouling trials, that the
568 unfolded BLG is a precursor of the dry deposit at the heat transfer wall.

569

570 ***Modelling the Distribution of the Dry Deposited Fouling Mass by means of the Ratio $R =$***
571 ***k_{unf}/k_{agg} derived from the Kinetic Parameters***

572

573 To consolidate the hypothesis of a direct contribution of the competitive reactions of
574 unfolding and aggregation taking place in the bulk fluid to the deposit formation rate within
575 the PHE, an attempt has been made to model the dry deposit mass per channel through the
576 ratio R between the unfolding reaction rate constant (noted k_{unf}) and the aggregation reaction
577 rate constant (noted k_{agg}).

578 For each channel of the PHE, the ratio $R = k_{unf}/k_{agg}$ was calculated at the arithmetic mean bulk
579 temperature of the channel, $T_{c,b}$ (i.e., corresponding to the approximated bulk temperature at
580 the middle point of the channel noted c , by assuming a linear temperature profile along the
581 PHE) :

$$582 \quad T_{c,b} = \frac{T_{c,in} + T_{c,out}}{2} \quad (12)$$

583 where $T_{c,in}$ and $T_{c,out}$ are the temperatures at the inlet and outlet of the channel c of the PHE,
584 respectively.

585 R is a dimensionless ratio indicating the degree of completion of the heat-induced
586 denaturation reaction, which is of course strongly affected by the temperature level and by the
587 physico-chemical environment of the fouling solution (i.e., protein concentration and
588 composition, mineral content affecting the kinetic denaturation rate constant). When we
589 transform into logarithmic scale, it is seen that the ratio R represents the difference in
590 logarithm between the unfolding rate constant and the aggregation one, i.e., $\ln(k_{unf}) - \ln(k_{agg})$.
591 R is thus equal to 1 at the critical temperature ($T_{critical}$) of the sharp edge on the Arrhenius plot
592 (Figure 4).

593 Figure 7 represents the variation of the measured dry deposit mass per channel (noted $m_{dep,c}$)
594 with the ratio R for all the PHE temperature profiles imposed. For sake of clarity, fouling
595 trials are classified in different symbols, indicating the independent process parameters which
596 have varied (T_{op} : red triangle, ΔT_p : green square, τ : black circle and ε : blue diamond) and
597 lead to a different temperature profile.

598 Analysis of Figure 7 shows that the $m_{dep,c}$ versus R representation is capable reasonably well
599 of gathering all the experimental dry deposit mass per channel data onto a unique fitting
600 master curve, independently of the temperature profile imposed. For all fouling runs, $m_{dep,c}$
601 versus R data could be described by the following four parameters nonlinear function :

$$602 \quad m_{dep,c} = a + b \cdot \exp \left[-0.5 \cdot \left(\frac{\ln(R/c)}{d} \right)^2 \right] \quad (13)$$

603 A reasonably good fit could be reached ($r^2=0.728$, $p<0.0001$). Raw residuals (i.e. $y_i - \hat{y}_i$, data
604 not shown) were found to be quite well distributed around zero indicating that no bias was
605 introduced by the model.

606 This result representation clearly shows that chemical reaction on the bulk control the dry
607 fouling mass distribution inside a PHE. This result also shows the importance of determining
608 a priori the denaturation rate constants to predict the fouling mass distribution.

609 The $m_{\text{dep,c}}$ versus R curves were characterized by different zones : (i) an initial sharp increase
610 at values of R close to zero, followed by a maximum of the deposit mass at a certain value of
611 R (noted $R^*=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$), (ii) then beyond R^* it is observed a gradual decrease in the deposit
612 mass with increasing values of R.

613 It is noticed that the R values at which fouling begins to form are very close to zero:
614 $R=0.0065$, 0.01 , 0.0305 and 0.037 respectively for the different serie ΔT_p , T_{op} , ε and τ (Table
615 4), that is, at $T_{\text{c,b}} \ll T_{\text{critical}}$ within the unfolding-limited temperature area; this confirms, as
616 shown in Figure 6, that very little U species is required into the bulk fluid for BLG fouling to
617 be deposited.

618 Interestingly, the maximum of the deposit mass derived from the fitting curve (beyond which
619 $m_{\text{dep,c}}$ decreases gradually, see Figure 7) takes place at an almost constant R^* value for the
620 investigated operating conditions : $0.339 < R^* < 0.659$ for the different series, corresponding to
621 bulk temperatures (noted T^*) ranging from 71.8 to 75.5 °C (Table 4), i.e., at a temperature
622 inferior to T_{critical} .

623 From the plot of the fitting curve of the $m_{\text{dep,c}}$ versus R data points for all experiments (Figure
624 7), several valuable insights into the BLG fouling mechanisms can be drawn.

625 Fouling first builds up and deposit mass increases sharply in the unfolding-limited
626 temperature area up to a critical value of the ratio R, i.e., $R^* \approx 0.405$ where the deposit mass is
627 the highest, as shown in Figure 7. At temperatures below 78°C (T_{critical}) corresponding to the

628 unfolding-limited temperature area, the unfolding degree is insufficient for the irreversible
629 aggregation reaction to be predominant: the probability of a collision between two unfolded
630 BLG molecules is low under these conditions so that the fouling growth until the maximum of
631 deposited fouling mass is primarily caused by the deposition of unfolded BLG.

632 Beyond $R^* \approx 0.405$ at an increasing temperature along the PHE, it is observed in Figure 7 an
633 important and significant decrease in the deposit mass up to a R value close to about 1 beyond
634 which the rate of fouling mass decrease reduces progressively within the aggregation-limited
635 temperature area. In the aggregation-limited area, BLG unfolding is completed so that only
636 the unfolded BLG molecules exist in the solution (i.e., $\alpha=1$, Fig. 4).

637 This decrease in fouling may be interpreted and explained by the consumption of the unfolded
638 BLG molecules for the formation in the bulk fluid of BLG aggregates: an increase in the
639 collision probability between unfolded BLG molecules will promote aggregate formation
640 rather than deposit layer formation as pointed out by Delplace et al. (1997).

641 From the data analysis in the sections above, the predominant role of the unfolded BLG in the
642 rise of fouling has been shown. The representation adopted (i.e., $m_{\text{dep,c}}$ versus R) gives a
643 concise and unprecedented view of the competitive reactions (unfolding and aggregation)
644 governing the growth of fouling for a WPI solution. This curve (Fig. 7) was validated when
645 T_{wall} values are very close to T_b values along the PHE (see Fig. 3a). This curve made it
646 possible to explain the decrease in the deposit mass which occurs when C_A exponentially
647 increases along the PHE. This tool gives much more information as regards the fouling
648 behaviour of a product than the difference between the inlet and outlet native BLG
649 concentrations of the channel, which is generally considered for the prediction of fouling
650 rates. Indeed, models involving the difference between the inlet and outlet native BLG
651 concentrations of the channel are not able to explain the decrease in mass deposit when the
652 average temperature of the bulk and the unfolded protein species concentration increase.

653 Thus, the determination of the ratio $R=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ that could be easily derived from the
654 identification of the heat-induced BLG denaturation kinetic by means of laboratory
655 measurements, made it possible to obtain useful guidelines on the extent of the deposited
656 fouling mass and its distribution.

657 Interestingly, it should also be stated that this approach has been successfully used by Khaldi
658 et al. (2015 b,c) for another PHE arrangement and a substantially different derivative milk-
659 based product (see Figure 8 extracted and adapted from Khaldi et al. (2015 b,c). Indeed the
660 PHE set-up consisted of 5 passes (one channel-per-pass) for Khaldi et al. (2015 b,c) instead of
661 10 passes (one channel-per-pass) in this study. In our case, the fouling solution is a BLG
662 concentrate composed almost exclusively of BLG (89 wt. % in BLG plus less than 0.01 wt. %
663 of α -lactalbumin) with 264 mg.l^{-1} of ionic calcium. On the other hand, for Khaldi et al. (2015
664 b, c), the product was a 1 wt. % reconstituted WPI solution (Promilk 852 FB1 from IDI SAS,
665 Arras, France) composed of a whey protein mixture (66 wt. % BLG plus 13 wt. % α -
666 lactalbumin) containing 100 mg.l^{-1} of ionic calcium (more details can be found in the paper of
667 Khaldi et al. (2015 b, c)). In the same way, the fouling mass per channel was reasonably well
668 correlated to the ratio R as shown by Fig. 8 and, whatever the temperature profile, a master
669 fitting curve could be determined (Khaldi et al., 2015 b,c); the shape of the fitting curve is
670 different since the kinetic denaturation parameters ($k_{0,\text{unf}}$, $k_{0,\text{agg}}$, $E_{a,\text{unf}}$, $E_{a,\text{agg}}$) are not the same.
671 These consolidated results show : (i) the robustness of the reaction engineering approach used
672 here to the analysis of fouling, (ii) that the identification of the heat-induced denaturation
673 kinetics of BLG by means of laboratory scale experiments, i.e., in static conditions in the
674 absence of fluid flow, is a prerequisite for the control of a whey protein fouling. Additionally,
675 as our reaction engineering approach to the analysis of fouling was found to be applicable and
676 appropriate for another PHE geometry (see Fig. 8), this gives some confidence that our
677 predictive model represented in Fig. 7 is likely to be broadly applicable and likely not to be

678 specific to the particular set-up (geometry) investigated. Also it would be interesting, through
679 further experiments using very different types of heat exchanger, to see to what extent the
680 predictive model is specific to the PHE type and geometry used, as the ratio R is certainly
681 closely related to the flow and heat characteristics of the PHE (characteristics comprise the
682 mixing intensity, residence time distribution, global heat transfer coefficient and so forth).

683

684

CONCLUSIONS

685

686 Deposits were generated by means of a fouling-rinsing sequence performed at pilot scale
687 using a model WPI solution for which the BLG heat-induced denaturation has been
688 previously determined via a kinetic model (Petit et al., 2011). A PHE in counter-current
689 configuration and equipped with straight corrugated plates was used in the pilot plant. The
690 experimental design used for the heat treatment consisted of the variation of PHE inlet
691 parameters, which induced various thermal profiles for the fouling solution within the PHE.
692 Four independent process parameters, that is, the product temperature at the PHE outlet (T_{op}),
693 the mean residence time (τ), the temperature increase between the PHE inlet and outlet (ΔT_p)
694 and the heat exchange efficiency (ε) could be used to describe the shape of the temperature
695 profile within the PHE and discuss separately their influence on fouling behaviour.

696 The comparison between the BLG concentration profiles and the BLG fouling deposit
697 distribution along the PHE allowed us to put forward several important fouling mechanisms:
698 i) there is a decrease in the deposited mass when the aggregation process prevails, well before
699 that C_U decreases, ii) very little U species into the bulk fluid is required for BLG to be
700 deposited onto the plates of the heat exchanger, and iii) the dry deposit mass distribution
701 depends pretty much on a single parameter, the ratio between the unfolding rate constant and
702 the aggregation rate constant (noted R). The analysis of the database of the experimental runs

703 clearly shows that the mass of dry deposit on each pass of the PHE is fairly well correlated
704 with R and that this parameter alone is able to predict the location of the fouling deposit. It is
705 observed that the amount of deposited BLG decreases when the ratio R exceeds $R^* = k_{\text{unf}}^*/k_{\text{agg}}^*$
706 ≈ 0.4 (Figure 7). Results definitely assigned the unfolded BLG (or BLG in the molten globule
707 state) as the precursor species of fouling. It could also be seen (see Fig. 3a) that T_{wall} and T_{b}
708 can be considered as being parallel and very close (the percent variation between T_{wall} and T_{b}
709 values does not exceed + 0.5 %). Therefore the type of reaction (i.e., unfolding versus
710 aggregation) is very unlikely to be changed between the bulk fluid and the plate wall surface,
711 which validates the appropriateness of the calculated concentration profiles (i.e., BLG species
712 N, U and A) presented in Figures 6a-6e.

713 This study suggests that bulk processes are important in whey protein fouling in the 45-95°C
714 range and that the prevalence of the concentration of BLG aggregates limits fouling. It also
715 appears that knowledge of the appropriate kinetic constants (for the unfolding and aggregation
716 mechanism) is of great importance as the concentration evolution of the different BLG
717 species (N, U and A) within a PHE depends strongly on kinetic constants (especially the
718 activation energy). Moreover, the distribution of protein species is strongly related to the
719 distribution of the dry fouling masses.

720 Further work is ongoing to determine to what extent the reaction engineering approach to the
721 analysis of fouling developed in this study depends upon the geometry and arrangement of the
722 PHE, and whether it can also be applied on various plate-type heat exchangers (e.g., plate-fin
723 heat exchangers).

724

725

ACKNOWLEDGEMENTS

726

727 This work was carried out within the framework of an ARCIR (“Actions de Recherche
728 Concertées d’Initiative Régionale”) program (European regional development fund
729 09 310 243 and 03 310 241), which joined non elucidated scientific issues of the Globule
730 project (ANR-08-ALIA-08).

731

732

NOMENCLATURE

733

- 734 a adjusted parameter in the nonlinear regression using eqn. (13)
- 735 b adjusted parameter in the nonlinear regression using eqn. (13)
- 736 c adjusted parameter in the nonlinear regression using eqn. (13)
- 737 C_A calculated concentration of aggregated BLG (A) along the PHE channels ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 738 C_N calculated concentration of native BLG (N) along the PHE channels ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 739 C_s concentration of total soluble (i.e. non-aggregated) BLG (noted S) (i.e., $C_s = C_N + C_U$)
740 ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 741 C_s° concentration of initial (time zero) total soluble (i.e. non-aggregated) BLG ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 742 C_U calculated concentration of unfolded BLG (U) along the PHE channels ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 743 d adjusted parameter in the nonlinear regression using eqn. (13)
- 744 D_h equivalent diameter between two plates of the PHE (=2h) (m)
- 745 E_a activation energy ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- 746 $E_{a,\text{agg}}$ BLG aggregation activation energy ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- 747 $E_{a,\text{unf}}$ BLG unfolding activation energy ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- 748 h height of the liquid stream between two plates of the PHE (=0.0039) (m)
- 749 $k_{0,\text{agg}}$ aggregation pre-exponential factor ($\text{kg}^{1-n}\cdot\text{m}^{-3(1-n)}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 750 $k_{0,\text{unf}}$ unfolding pre-exponential factor ($\text{kg}^{1-n}\cdot\text{m}^{-3(1-n)}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 751 k_{agg} aggregation reaction rate constant ($\text{kg}^{1-n}\cdot\text{m}^{-3(1-n)}\cdot\text{s}^{-1}$)

752	k_n	formal BLG denaturation rate constant for a reaction order equal to n , as defined by
753		eqn. (2) ($\text{kg}^{1-n} \cdot \text{m}^{-3(1-n)} \cdot \text{s}^{-1}$)
754	k_{unf}	unfolding reaction rate constant ($\text{kg}^{1-n} \cdot \text{m}^{-3(1-n)} \cdot \text{s}^{-1}$)
755	$m_{\text{dep,c}}$	measured dry fouling deposit mass in a channel c along the PHE (kg)
756	n	heat-induced denaturation reaction order (experimentally $n=1.5$), as defined by eqn
757		(2), dimensionless
758	Q_h	hot water flow rate in the fouling stage ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$)
759	Q_p	WPI fouling solution flow rate in the fouling stage ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$)
760	r	correlation coefficient, dimensionless
761	R	ratio between the unfolding rate constant and the aggregation rate constant, calculated
762		in the bulk solution ($=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$), as defined by eqns (6) and (7)), dimensionless
763	R^*	value of the ratio $R=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ corresponding to the maximum of the fitted $m_{\text{dep,c}}$ versus
764		R curve, i.e., $R^*=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}^*$, for which the dry deposit mass $m_{\text{dep,c}}$ is the highest,
765		dimensionless
766	R_{gas}	universal gas constant ($=8.314$) ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
767	Re	average Reynolds number of the fouling solution in the fouling step between two
768		plates of the PHE ($=\rho \cdot v \cdot D_h / \mu$), dimensionless
769	t	time (s)
770	T	temperature ($^{\circ}\text{C}$)
771	T^*	bulk temperature associated to the ratio $R^*=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}^*$ corresponding to the maximum
772		of the fitted $m_{\text{dep,c}}$ versus R curve, for which the deposit mass $m_{\text{dep,c}}$ is the highest ($^{\circ}\text{C}$)
773	T_b	bulk fluid temperature ($^{\circ}\text{C}$)
774	$T_{c,b}$	arithmetic mean of $T_{c,\text{in}}$ and $T_{c,\text{out}}$, as defined by eqn. (12), corresponding to the
775		approximated bulk temperature at the middle point of a channel c ($^{\circ}\text{C}$)

- 776 $T_{c,in}$ temperature at the inlet of the channel c of the PHE, derived from the numerical
777 method proposed by René et al. (1991) ($^{\circ}\text{C}$)
- 778 $T_{c,out}$ temperature at the outlet of the channel c of the PHE, derived from the numerical
779 method proposed by René et al. (1991) ($^{\circ}\text{C}$)
- 780 $T_{critical}$ critical temperature of the Arrhenius plot, delimiting the unfolding-limited range and
781 the aggregation-limited range ($^{\circ}\text{C}$)
- 782 T_{ih} hot water temperature at the PHE inlet ($^{\circ}\text{C}$)
- 783 T_{ip} WPI fouling solution temperature at the PHE inlet ($^{\circ}\text{C}$)
- 784 T_{oh} hot water temperature at the PHE outlet ($^{\circ}\text{C}$)
- 785 T_{op} WPI fouling solution temperature at the PHE outlet ($^{\circ}\text{C}$)
- 786 T_{wall} plate wall temperature ($^{\circ}\text{C}$)
- 787 v average crossflow velocity of the fouling solution in the fouling step between two
788 plates of the PHE ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 789 V_{exch} PHE volume (m^3)
- 790 y_i observed (experimental) value of the dry deposit mass along the various channels c of
791 the PHE (i.e., equal to $m_{dep,c}$) as a function of the ratio R , see Fig. 7 (kg)
- 792 \hat{y}_i fitted value of the measured dry deposit mass along the various channels c of the PHE
793 as a function of the ratio R , as defined by eqn. (13) (kg)
- 794
- 795 ***Symbols***
- 796
- 797 α unfolding degree of BLG, i.e., ratio between the concentration of the partially
798 unfolded BLG (C_U) and native BLG (C_N) under the conditions used, as defined by
799 eqns (8) and (11), dimensionless
- 800 μ dynamic viscosity of solution (Pa.s)

- 801 ρ specific mass of solution ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
- 802 ΔT_p WPI fouling solution temperature increase between the PHE inlet and outlet
- 803 ($=T_{op} - T_{ip}$) ($^{\circ}\text{C}$)
- 804 τ mean residence time of the WPI fouling solution in the PHE (s)
- 805 ε heat exchange efficiency on the product side, dimensionless

806

807 **Subscript**

808

- 809 agg aggregation
- 810 b bulk
- 811 c channel of the PHE
- 812 unf unfolding

813

814 **Abbreviations**

815

- 816 A aggregated BLG
- 817 BLG beta-lactoglobulin
- 818 JEH joule effect heater
- 819 N native BLG
- 820 PHE plate heat exchanger
- 821 RO reverse osmosis
- 822 RP-HPLC reverse phase - high performance liquid chromatography
- 823 S total (time dependent) soluble (i.e. non-aggregated) BLG species quantified by RP-
- 824 HPLC
- 825 U unfolded BLG, also called BLG molten globule

826 U_{MG} BLG in the molten globule state

827 WPI whey protein isolate

828

For Peer Review

REFERENCES

829

830

831 Bansal, B., and X. D. Chen. 2006. A critical review of milk fouling in heat exchangers.

832 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5: 27-33.

833

834 Belmar-Beiny, M.T., and P. J. Fryer. 1992. Bulk and surface effects on the initial stages of

835 whey fouling. *Trans. IChemE, Part C*. 70:193-198.

836

837 Blanpain-Avet, P., A. Hédoux, Y. Guinet, L. Paccou, J. Petit, T. Six, and G. Delaplace. 2012.

838 Analysis by Raman spectroscopy of the conformational structure of whey proteins

839 constituting fouling deposits during the processing in a heat exchanger. *J. Food Eng.* 110

840 (1):86-94.

841

842 Bouvier, L., A. Moreau, G. Ronse, T. Six, J. Petit, and G. Delaplace. 2014. A CFD model as a

843 tool to simulate β -lactoglobulin heat-induced denaturation and aggregation in a plate heat

844 exchanger. *J. Food Engineering*, 136:56-63.

845

846 Boxler, C., W. Augustin, and S. Scholl. 2014. Influence of surface modification on the

847 composition of a calcium phosphate-rich whey protein deposit in a plate heat exchanger.

848 *Dairy Science and Technology*, 94:17-31.

849

850 Burton, H. 1968. Deposit of whole milk in treatment plants - a review and discussion. *Journal*

851 *of Dairy Research*, 34:317-330.

852

853 Changani, S.D., M.T. Belmar-Beiny, and P.J. Fryer. 1997. Engineering and chemical factors
854 associated with fouling and cleaning in milk processing. *Experimental Thermal and Fluid*
855 *Science*, 14:2-406.

856

857 Collier, N., D. Callens, P. Campistron, B. Nongaillard, M. Jimenez, G. Alogaili, P. Debreyne,
858 and Delaplace, G., 2015. Ultrasonic adhesion measurement of whey protein fouling. *Heat*
859 *Transfer Engineering*, 36 (7):1-9.

860

861 De Bonis, M. V., and G. Ruocco. 2009. Conjugate fluid flow and kinetics modeling for heat
862 exchanger fouling simulation. *International Journal of Thermal Sciences*. 48:2006-2012.

863

864 De Jong, P., S.Bouman, and H. J. Van Der Linden. 1992. Fouling of heat treatment equipment
865 in relation to denaturation of β -lactoglobulin. *Journal of the Society of Dairy Technology*. 45
866 (1):3-8.

867

868 De Jong, P., R. Waalewijn, and H. J. L. J. Van Der Linden. 1993. Validity of a kinetic fouling
869 model for heat-treatment of whole milk. *Lait*. 73 (3):293-302.

870

871 De Jong, P. 1997. Impact and control of fouling in milk processing. *Trends in Food Science*
872 *and Technology*, 8:401-405.

873

874 De Wit, J.N. 2009. Thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 150°C.
875 A review. *Trends in Food Science and Technology*. 20:27-34.

876

- 877 Delplace, F., and J.-C. Leuliet. 1995. Modelling fouling of a plate heat exchanger with
878 different flow arrangements by whey protein solutions. *Trans. IChemE, Part C*. 73:112 - 120.
879
- 880 Delplace, F., J.-C. Leuliet, and D. Levieux. 1997. A reaction engineering approach to the
881 analysis of fouling by whey proteins of a six-channels-per-pass plate heat exchanger. *J. Food*
882 *Eng.* 34:91-108.
883
- 884 Fickak, A., A. Al-Raisi, and X. D. Chen. 2011. Effect of whey protein concentration on the
885 fouling and cleaning of a heat transfer surface. *J. Food Eng.* 104:323-331.
886
- 887 Guérin, R., G. Ronse, L. Bouvier, P. Debreyne, and G. Delaplace. 2007. Structure and rate of
888 growth of whey protein deposit from *in situ* electrical conductivity during fouling in a plate
889 heat exchanger. *Chemical Engineering Science*. 62:1948-1957.
890
- 891 Jimenez, M., G. Delaplace, N. Nuns, S. Bellayer, D. Deresmes, G. Ronse, G. Alogaili, M.
892 Collinet-Fressancourt, and M. Traisnel. 2013. Toward the understanding of the interfacial
893 dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: A multiscale
894 approach. *J. Colloid and Interface Science*. 404:192-200.
895
- 896 Khaldi, M., P. Blanpain-Avet, R. Guérin, G. Ronse, L. Bouvier, C. André, S. Bornaz, T.
897 Croguennec, R. Jeantet, and G. Delaplace. 2015a. Effect of calcium content and flow regime
898 on whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger. *J. Food Eng.* 147:68-78.
899
- 900 Khaldi M., G. Ronse, C. André, P. Blanpain-Avet, L. Bouvier, T. Six, S. Bornaz, T.
901 Croguennec, R. Jeantet, and and G. Delaplace. 2015b. Relationship between β -lactoglobulin

902 denaturation and fouling mass distribution in a plate heat exchanger, In : *Heat Exchanger*
903 *Fouling and Cleaning Conference*, Session 9 : Fouling during Food Processing, June 7-12,
904 2015, Enfield (Dublin), County Meath (Ireland).

905

906 Khaldi M., G. Ronse, C. André, P. Blanpain-Avet, L. Bouvier, T. Six, S. Bornaz, T.
907 Croguennec, R. Jeantet, and G. Delaplace. 2015c. Denaturation kinetics of whey protein
908 isolate solutions and fouling mass distribution in a plate heat exchanger. *International J.*
909 *Chemical Engineering*. Volume 2015, Article ID 139638.
910 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/139638>.

911

912 Lalande, M., J.-P. Tissier, and G. Corrieu. 1985. Fouling of heat transfer surfaces related to β -
913 lactoglobulin denaturation during heat processing of milk. *Biotechnology Progress*. 1 (2):131-
914 139.

915

916 Oldfield, D.J., H. Singh, and M. W. Taylor. 2005. Kinetics of heat induced whey protein
917 denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *J.*
918 *Dairy Research*. 72:369-378.

919

920 Petit, J., A. L. Herbig, A. Moreau, and G. Delaplace. 2011. Influence of calcium on beta-
921 lactoglobulin denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. *J.*
922 *Dairy Sci*. 94 (12):5794-5810.

923

924 Petit, J., T. Six, A. Moreau, G. Ronse, and G. Delaplace. 2013. β -lactoglobulin denaturation,
925 aggregation and fouling in a plate heat exchanger : Pilot-scale experiments and dimensional
926 analysis. *Chemical Engineering Science*, 101:432-450.

927

928 René, F., J.-C. Leuliet, and M. Lalande. 1991. Heat transfer to Newtonian and non-Newtonian
929 food fluids in plate heat exchangers : Experimental and numerical approaches. Trans.
930 IChemE, Part C. 69:115-126.

931

932 Rosmaninho, R., and L. F. Melo. 2006. Calcium phosphate deposition from simulated milk
933 ultrafiltrate on different stainless steel-based surfaces. International Dairy Journal. 16:81-87.

934

935 Sadeghinezhad, E., S. N. Kazi, A. Badarudin, M. N. M. Zubair, B.L. Dehkordi, and C. S. Oon.
936 2013. A review of milk fouling on heat exchanger surfaces. Reviews in Chemical
937 Engineering, 29 (3):169-188.

938

939 Tolkach, A., and U. Kulozik. 2007. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible
940 thermal denaturation of β -lactoglobulin. Lait. 87:301-315.

941

942 Toyoda I., P. J. R. Schreier, and P.J. Fryer. 1994. A computational model for reaction fouling
943 from whey protein solutions, In : *Fouling and Cleaning in Food Processing Congress*, Jesus
944 College, Cambridge, 23-25 March 1994, pp. 222-229.

945

946 Van Asselt, A.J., M. M. M. Vissers, F. Smit, and P. de Jong. 2005. In-line control of fouling,
947 In : *Proceedings of Heat Exchanger Fouling and Cleaning - Challenges and Opportunities*,
948 Kloster Irsee, Germany, June 5-10, New York (USA), Engineering Conferences International.

949

950 **FIGURE CAPTIONS**

951

952 **Figure 1.** Multistage process characterizing BLG thermal denaturation/aggregation (extracted
953 and adapted from Tolkach and Kulozik (2007)).

954 U_{MG}^* : Molten globule state (reversible unfolding with a more flexible tertiary structure and a
955 quasi-intact secondary structure). N_2 : native dimer; N: native monomer; N_R : R-state; U_D :
956 completely unfolded molecule; U_n , U_m : polymerised BLG molecules (aggregates).

957

958 **Figure 2.** Schematic diagram of the experimental set-up used at pilot scale for the fouling
959 experiments. ΔP : differential pressure; F: flowmeter; FP: feed pump; H: homogenizer; P:
960 pressure gauge; T: temperature probe; V1: counter-pressure regulation valve.

961

962 **Figure 3.** Calculated bulk temperature profiles inside the PHE using the Sphere software
963 (René et al., 1991) for the four independent process parameters investigated (that is, T_{op} (Fig.
964 3a), τ (Fig. 3b), ΔT_p (Fig. 3c) and ε (Fig. 3d)). Bulk temperature is plotted against the mean
965 residence time (τ) and the pass number (i -th pass of the PHE) within the PHE.

966

967 **Figure 4.** Arrhenius plot for the BLG thermal denaturation reaction with a $n=1.5$ reaction
968 order, for the 6 wt.% BLG fouling solution used at 6.6 mM calcium content (adapted from
969 Petit et al. (2011)). Solid and dashed lines correspond to the linear regressions of experimental
970 data.

971

972 **Figure 5.** Schematic diagram of the reaction scheme selected for the thermal
973 denaturation/aggregation process of BLG: a set reversible consecutive reactions (unfolding
974 and aggregation).

975

976 **Figure 6.** Typical and representative variation with the residence time within the PHE (τ) of
977 both the predicted concentration profile of the various BLG species (N, U, A) and the
978 experimental dry deposit mass in the various channels ($m_{\text{dep,c}}$) for various operating
979 conditions (i.e., experiments #1, #2, #3, #6 and #15).

980

981 **Figure 7.** Variation of the dry deposit mass in the various channels of the PHE ($m_{\text{dep,c}}$) with
982 the ratio R derived at $T_{c,b}$ using eqns (6), (7) and (12), for all experiments (from run #1 to run
983 #18). Fitting curve of experimental data was derived from eqn. (13).

984

985 **Figure 8.** Variation of the dry deposit mass in the different channels of a corrugated PHE
986 with the ratio R for a WPI fouling solution composed of Promilk 852 FB1 (IDI SAS, Arras,
987 France) at a concentration of 1 wt. % with a calcium content equal to 100 mg.l^{-1} (extracted
988 and adapted from Khaldi et al. (2015 b,c)).

989

990 **TABLE CAPTIONS**

991

992 **Table 1.** Experimental design used for the heat treatment (which consisted of the variation of
993 four independent process parameters, that is, the product temperature at the PHE outlet (T_{op}),
994 the mean residence time (τ), the temperature increase between the PHE inlet and outlet (ΔT_p)
995 and the heat exchange efficiency (ϵ)).

996

997 **Table 2.** Kinetic parameters used for the protein reaction scheme adopted in the bulk fluid
998 (unfolding and aggregation reactions of BLG, Petit et al. (2011)).

999

1000 **Table 3.** Calculation of the unfolding degree of BLG (α) as a function of temperature, on the
1001 basis of the formal kinetic parameters and according to eqn. (11).

1002

1003 **Table 4.** Values of the ratio $R=k_{unf}/k_{agg}$ corresponding to the maximum of the fitted $m_{dep,c}$
1004 versus R curve, i.e., $R^*=k_{unf}/k_{agg}^*$, for which the deposit mass $m_{dep,c}$ is the highest together
1005 with the corresponding bulk temperature (T^*), and values of the ratio k_{unf}/k_{agg} at which fouling
1006 begins to build-up (i.e. when $m_{dep,c} \geq 0.1$).

1007

1008 **Table 1.** Experimental design used for the heat treatment (which consisted of the variation of
 1009 four independent process parameters, that is, the product temperature at the PHE outlet (T_{op}),
 1010 the mean residence time (τ), the temperature increase between the PHE inlet and outlet (ΔT_p)
 1011 and the heat exchange efficiency (ϵ)).

Experiment	T_{ip} (°C)	T_{ih} (°C)	Q_p (l.h ⁻¹)	Q_h (l.h ⁻¹)	T_{op} (°C)	T_{oh} (°C)	τ (s)	ϵ (%)
Investigation of T_{op} influence								
#1 (reference)	60	87.8	150	150	85.1	62.7	74.6	90.3
#2	45	72.8	150	150	70	47.7	74.6	89.9
#3	50	77.8	150	150	75	52.7	74.6	89.9
#4	55	82.8	150	150	80	57.7	74.6	90.3
#5	65	92.8	150	150	90	67.7	74.6	90.3
#6	70	97.8	150	150	95	72.7	74.6	90.3
Investigation of τ influence								
#1 (reference)	60	87.8	150	150	85.1	62.7	74.6	90.3
#7	60	87.8	175	175	85	62.7	63.9	89.9
#8	60	87.8	200	200	85	62.7	56	89.9
#9	60	87.8	250	250	84.9	62.8	44.8	89.6
#10	60	88	300	300	85	62.9	37.3	89.3
Investigation of ΔT_p influence								
#1 (reference)	60	87.8	150	150	85.1	62.7	74.6	90.3
#11	50	88.8	150	150	85	53.7	74.6	90.2
#12	55	88.3	150	150	85	58.2	74.6	90.1
#13	65	87.2	150	150	85	67.1	74.6	90.1
#14	70	86.6	150	150	85	71.6	74.6	90.4

Investigation of ϵ influence								
#10	60	88	300	300	85	62.9	37.3	89.3
#15	60	98.5	300	150	85.1	60.8	37.3	65.2
#16	60	91.6	300	200	85	61.6	37.3	79.1
#17	60	86	300	400	85.1	66.8	37.3	96.5
#18	60	85.4	300	600	85	72.7	37.3	98.4

1012
1013

For Peer Review

1014 **Table 2.** Kinetic parameters used for the protein reaction scheme adopted in the prediction of
 1015 fouling (unfolding and aggregation reactions of BLG, Petit et al. (2011)).

1016

Reaction	Variables	Values	Units
Unfolding	$E_{a,unf}$	304.7	kJ.mol^{-1}
	$\ln(k_{0,unf})$	98.4	(-)
	reaction order	1.5	(-)
Aggregation	$E_{a,agg}$	111	kJ.mol^{-1}
	$\ln(k_{0,agg})$	32.1	(-)
	reaction order	1.5	(-)

1017

1018

1019 **Table 3.** Calculation of the unfolding degree of BLG (α) on the basis of the formal kinetic
 1020 parameters and according to eqn. (11).

1021

T (°C)	k_n ($\text{g}^{-0.5} \cdot \text{l}^{0.5} \cdot \text{s}^{-1}$)	$\text{Ln}(k_n)$	$\text{Ln}(k_{\text{agg}})$	$\text{Ln}(k_n) - \text{Ln}(k_{\text{agg}})$	$\text{Ln } \alpha$	α (-)
110	6.42×10^{-2}	-2.745	-2.745	0.0	0.0	1.0
105	4.05×10^{-2}	-3.206	-3.206	0.0	0.0	1.0
100	2.52×10^{-2}	-3.679	-3.679	0.0	0.0	1.0
95	1.55×10^{-2}	-4.165	-4.165	0.0	0.0	1.0
90	9.43×10^{-3}	-4.664	-4.664	0.0	0.0	1.0
85	5.64×10^{-3}	-5.178	-5.178	0.0	0.0	1.0
80	3.33×10^{-3}	-5.705	-5.705	0.0	0.0	1.0
78	2.56×10^{-3}	-5.969	-5.921	-0.048	-0.032	0.969
75	1.04×10^{-3}	-6.868	-6.248	-0.62	-0.413	0.662
73	5.66×10^{-4}	-7.476	-6.470	-1.006	-0.671	0.511
70	2.24×10^{-4}	-8.402	-6.807	-1.595	-1.063	0.345
67	8.75×10^{-5}	-9.344	-7.150	-2.193	-1.462	0.232
65	4.63×10^{-5}	-9.981	-7.382	-2.599	-1.732	0.177
60	9.10×10^{-6}	-11.608	-7.975	-3.633	-2.422	0.089
55	1.70×10^{-6}	-13.284	-8.586	-4.698	-3.132	0.044
50	3.02×10^{-7}	-15.012	-9.215	-5.797	-3.864	0.021
45	5.09×10^{-8}	-16.794	-9.864	-6.930	-4.620	0.010

1022

1023

1024 **Table 4.** Values of the ratio $R=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ corresponding to the maximum of the fitted $m_{\text{dep,c}}$
 1025 versus R curve, i.e., $R^*=k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}^*$, for which the deposit mass $m_{\text{dep,c}}$ is the highest together
 1026 with the corresponding bulk temperature (T^*), and values of the ratio $k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}$ at which fouling
 1027 begins to build-up (i.e. when $m_{\text{dep,c}} \geq 0.1$).
 1028

Type of experiment	$R^* = k_{\text{unf}}/k_{\text{agg}}^*$ (-)	T^* (°C)	R at which fouling begins to build-up, i.e., when $m_{\text{dep,c}} \geq 0.1$ g (-)
varying τ (s)	0.391	72.6	0.037
varying T_{op} (°C)	0.659	75.5	0.01
varying ε (%)	0.362	72.1	0.0305
Varying ΔT_p (°C)	0.339	71.8	0.0065
All data points (runs #1 .. #18)	0.405	72.8	0.0145

1029
 1030

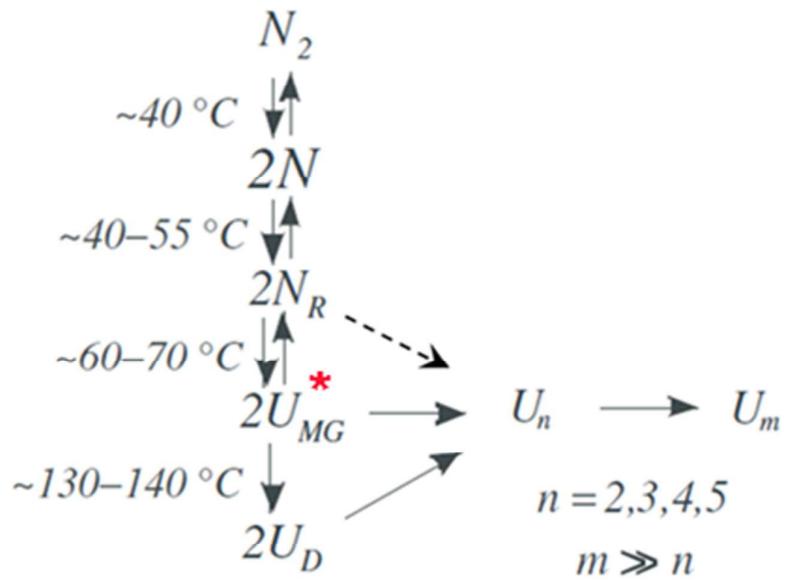


Figure 1

1031
 1032
 1033
 1034

P. Blanpain-Avet.
FIGURE 1

Peer Review

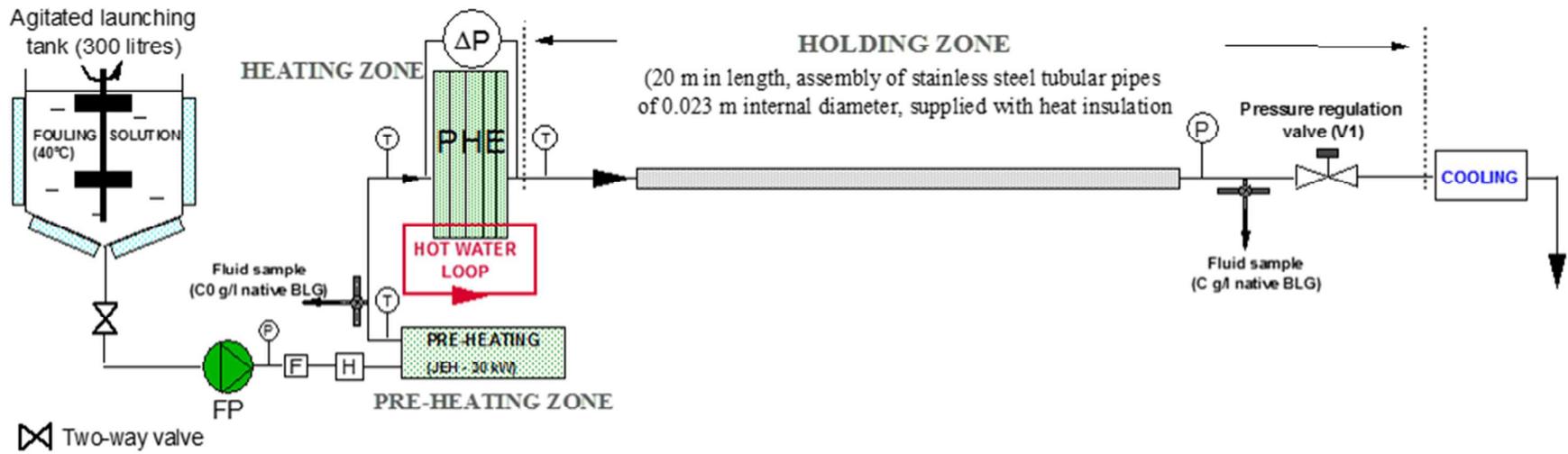


FIGURE 2

1035
1036
1037
1038
1039

P. Blanpain-Avet.
FIGURE 2

1040

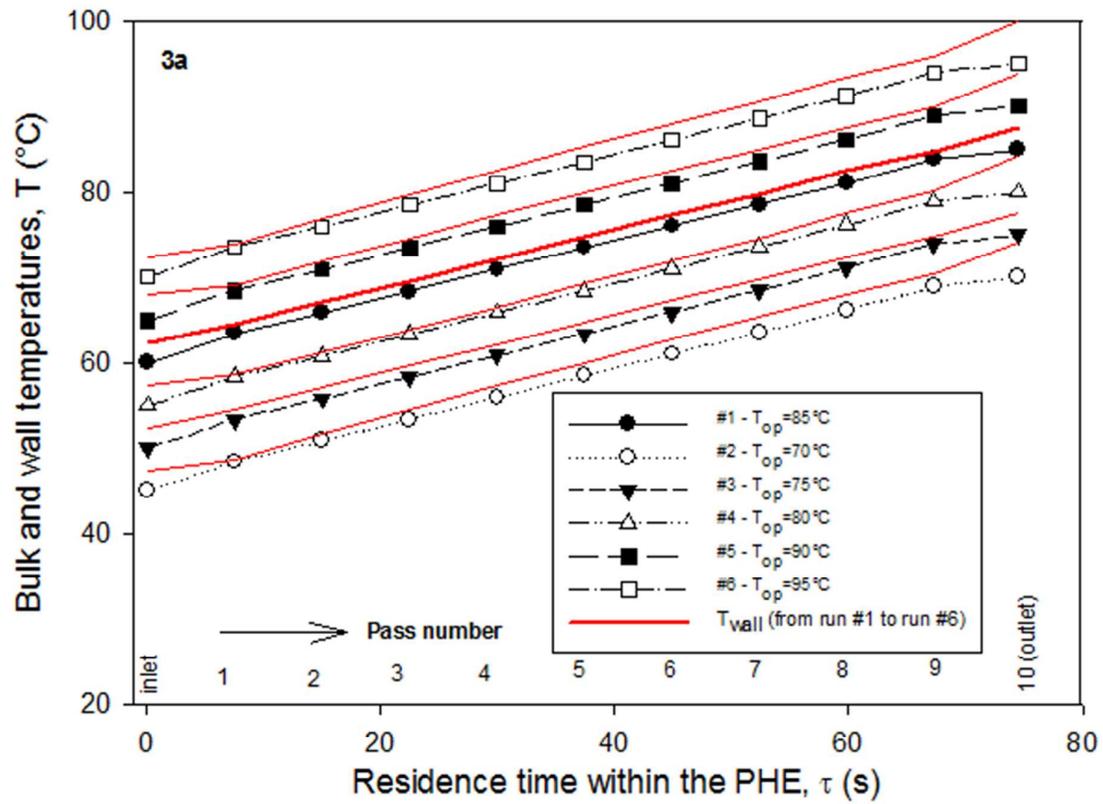


Figure 3a

1041
1042
1043
1044
1045

P. Blanpain-Avet.
FIGURE 3a

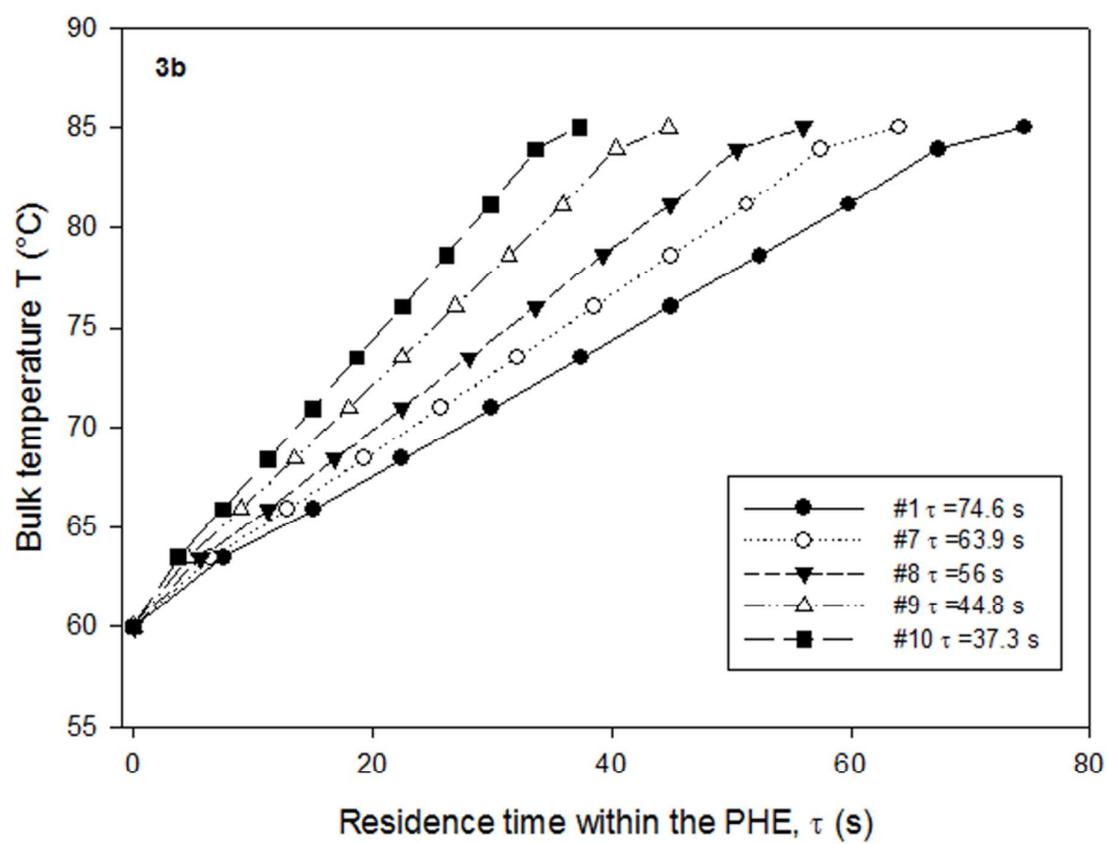


Figure 3b

1046
1047
1048
1049

P. Blanpain-Avet
FIGURE 3b

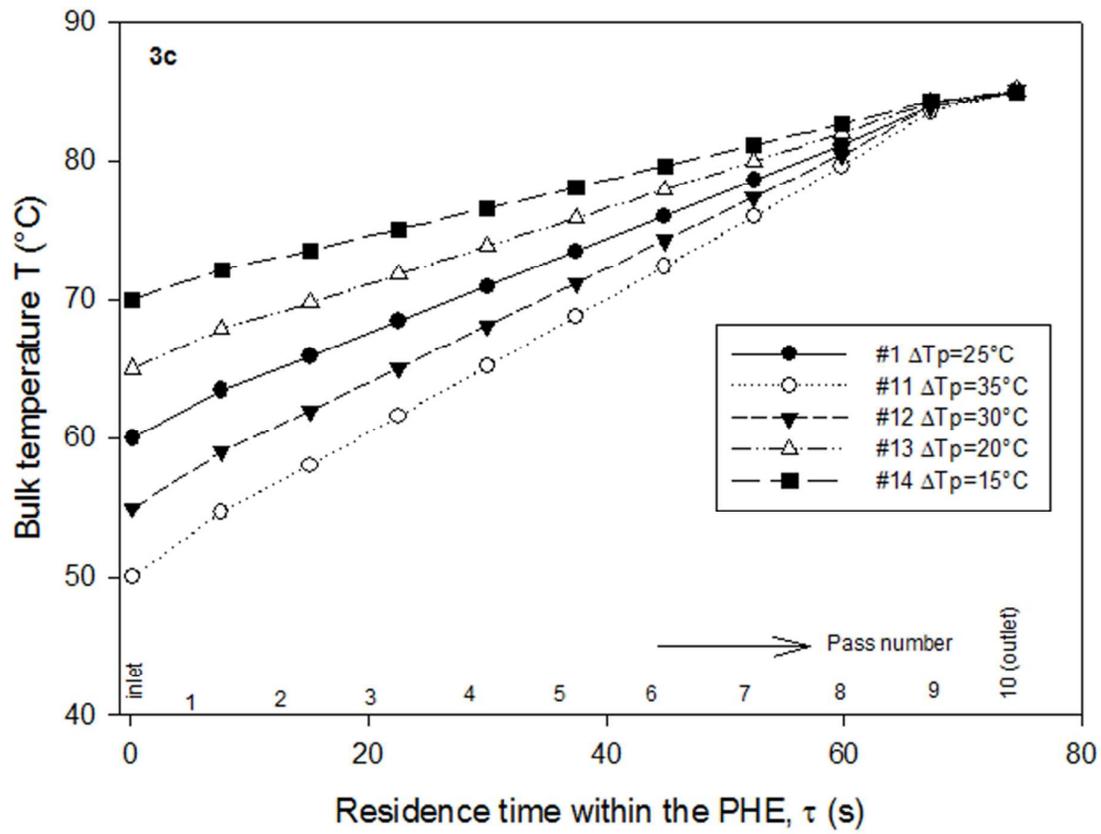


Figure 3c

1050
1051
1052
1053

P. Blanpain-Avet
FIGURE 3c

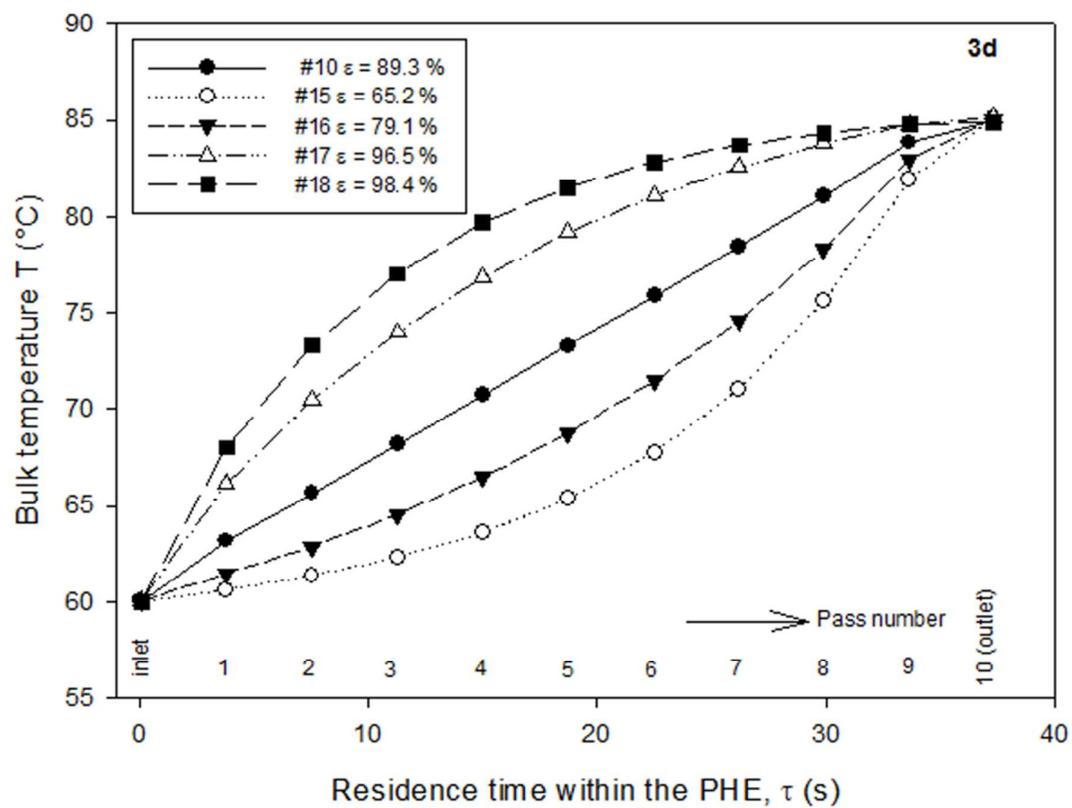
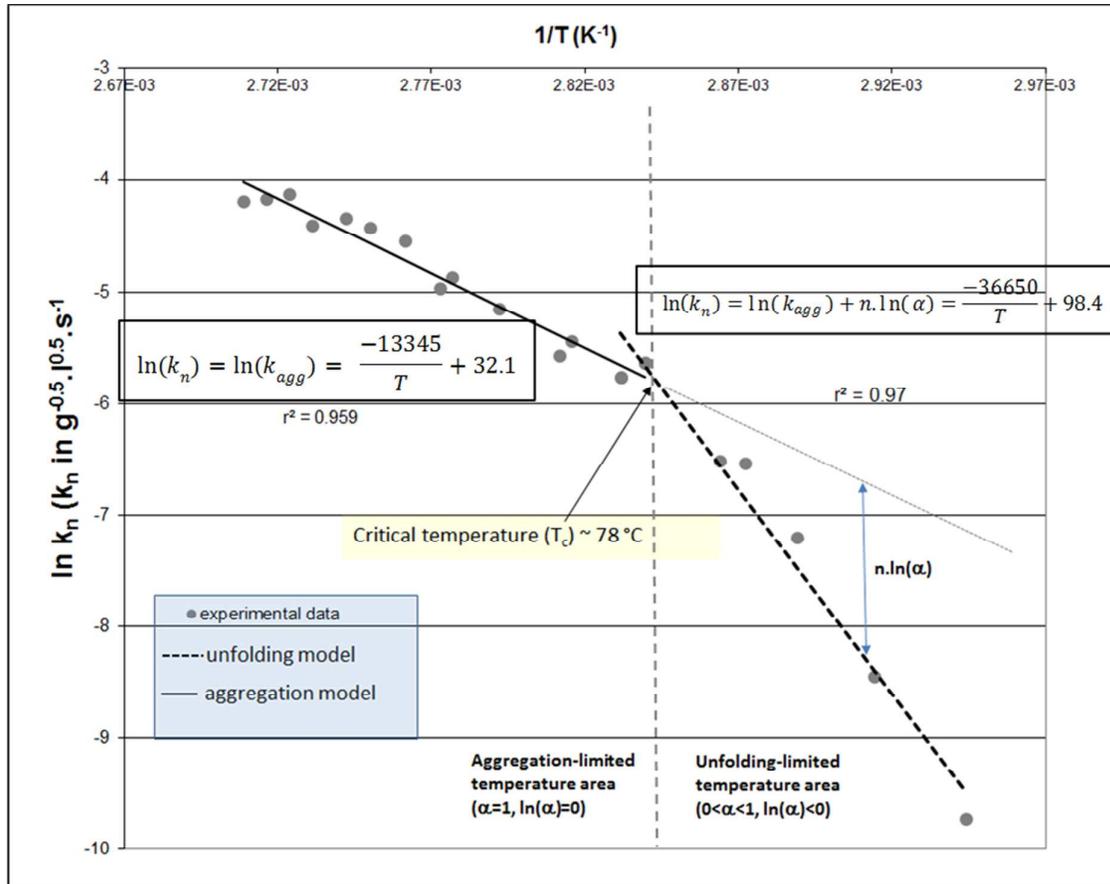


Figure 3d

1054
1055
1056
1057

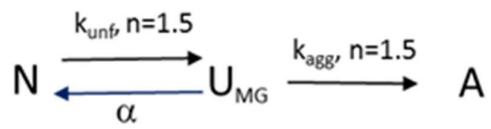
P. Blanpain-Avet.
FIGURE 3d



1058
1059
1060
1061

P. Blanpain-Avet
FIGURE 4

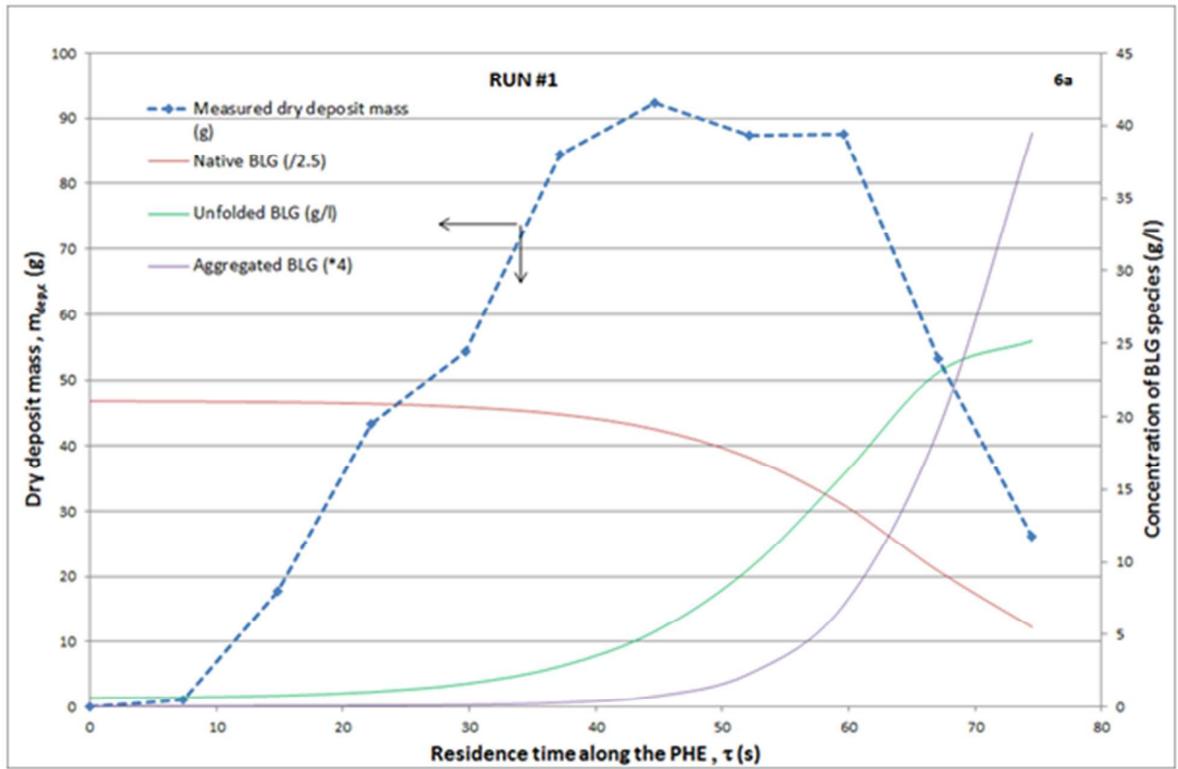
review



1062
1063
1064
1065

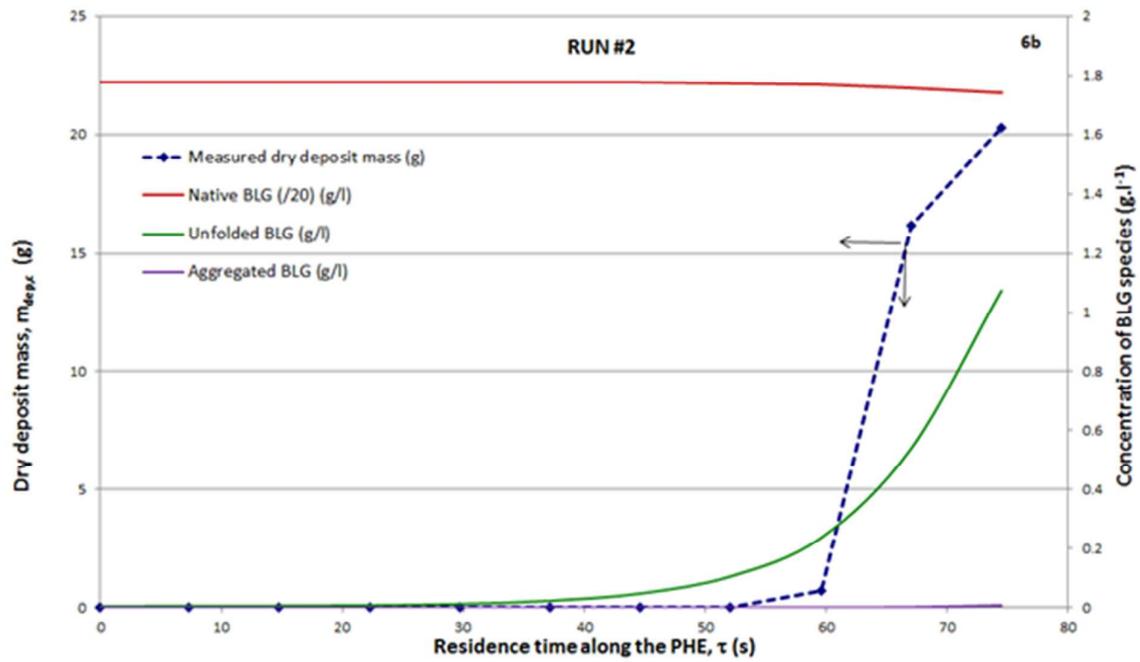
P. Blanpain-Avet
FIGURE 5

For Peer Review



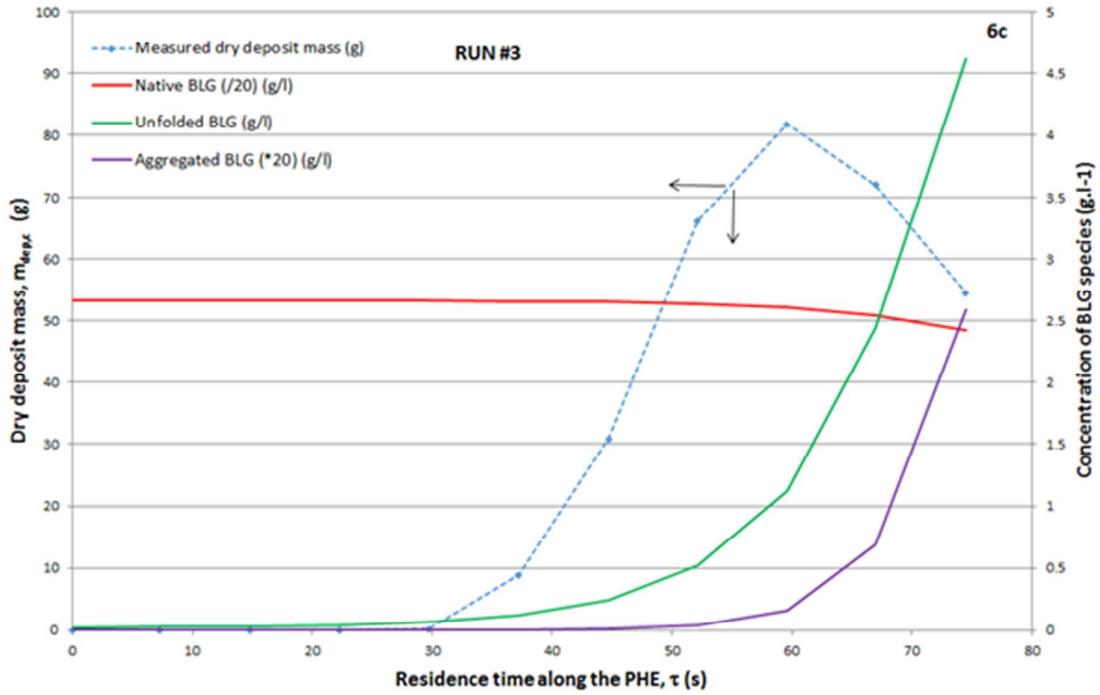
1066
 1067
 1068
 1069
 1070

P. Blanpain-Avet
FIGURE 6a



1071
1072
1073
1074

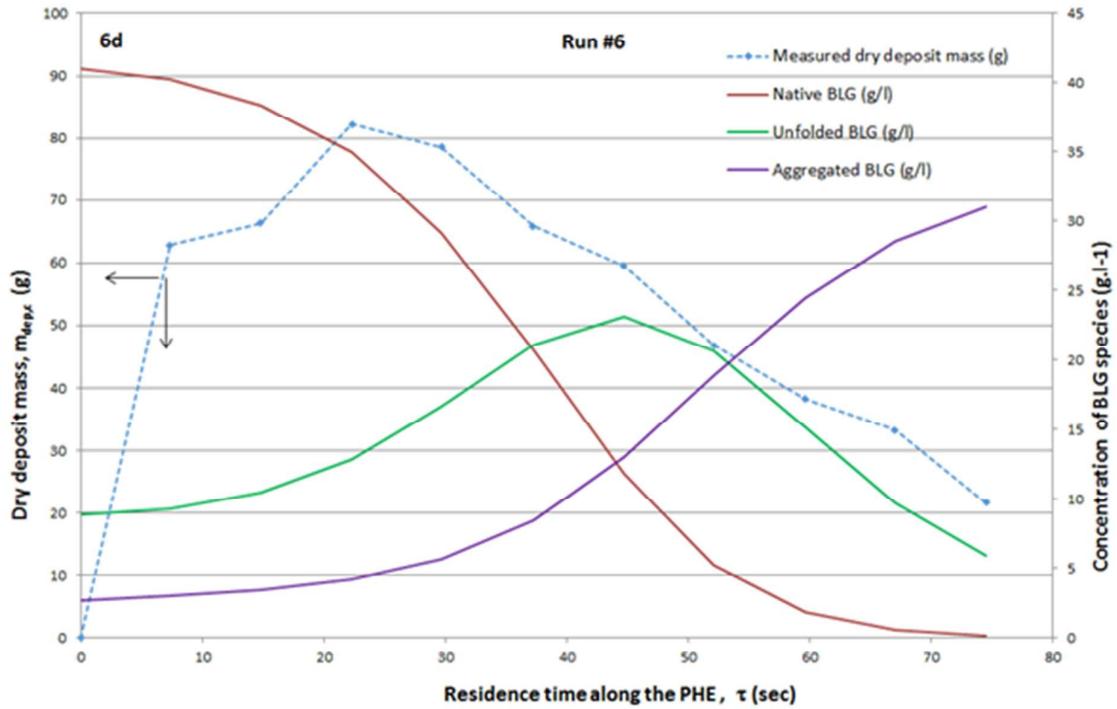
P. Blanpain-Avet
FIGURE 6b



1075
1076
1077
1078

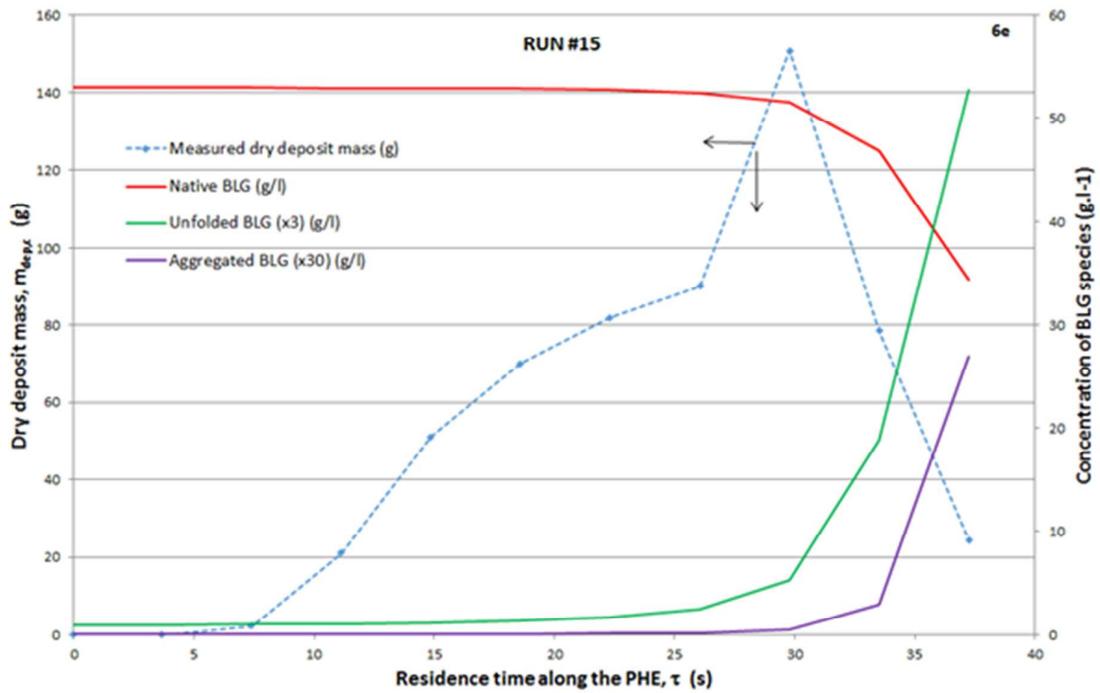
P. Blanpain-Avet
FIGURE 6c

Peer Review



1079
1080
1081
1082
1083

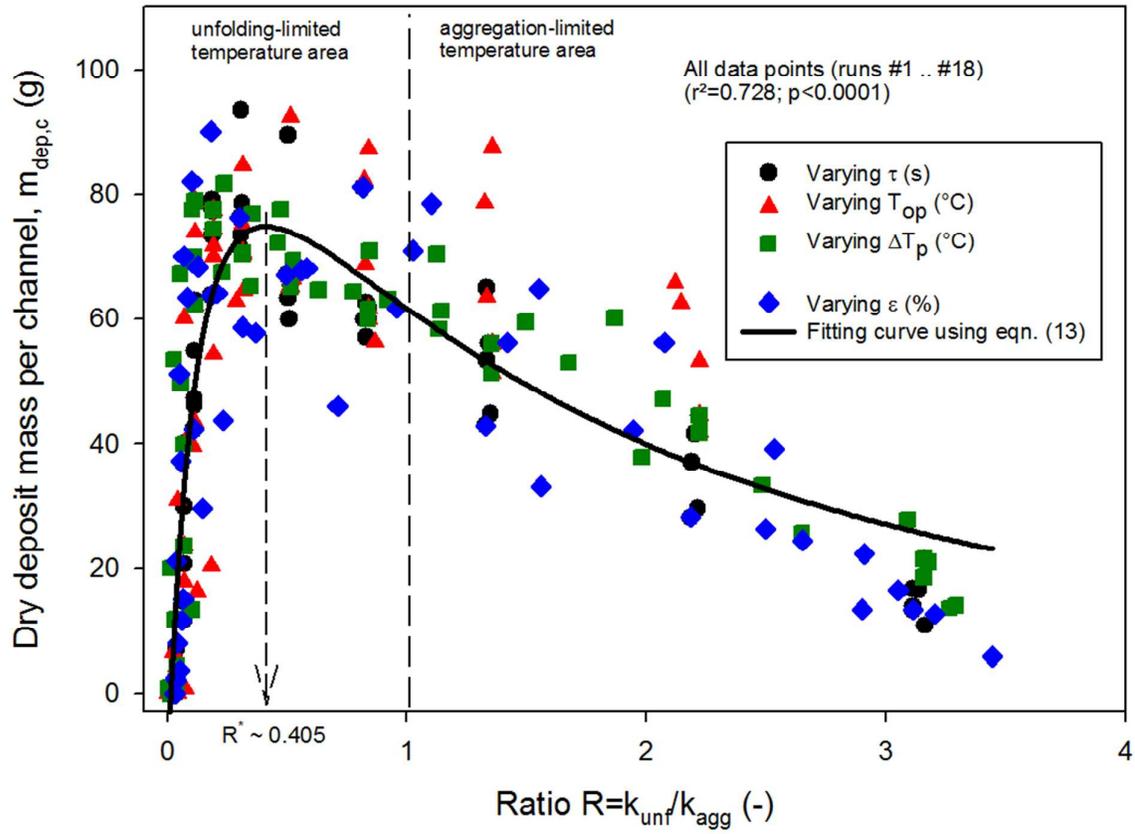
P. Blanpain-Avet
FIGURE 6d



1084
 1085
 1086
 1087
 1088

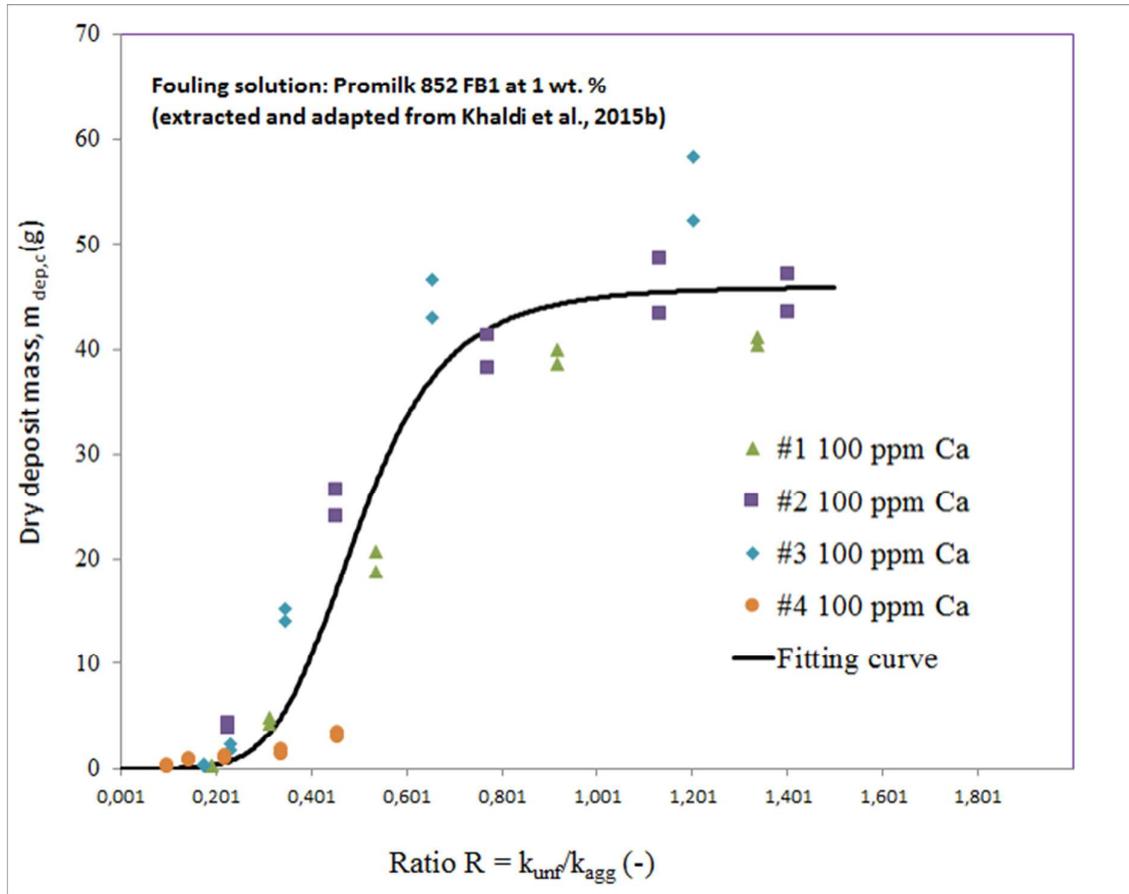
P. Blanpain-Avet
FIGURE 6e

Peer Review



1089
1090
1091
1092
1093

P. Blanpain-Avet
FIGURE 7



1094
1095
1096
1097
1098

P. Blanpain-Avet
FIGURE 8



Effect of the calcium/protein molar ratio on β -lactoglobulin denaturation kinetics and fouling phenomena

Journal:	<i>Biofouling</i>
Manuscript ID	GBIF-2016-0118
Manuscript Type:	Original Paper
Keywords:	milk derivative fouling mechanisms, plate heat exchanger, calcium, β -lactoglobulin, heat-induced denaturation, structure deposit analyses

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Effect of the calcium/protein molar ratio on β -lactoglobulin denaturation kinetics and 2 fouling phenomena

3
4 M. Khaldi^{a,b,c*}, T. Croguennec^{d,e}, C. André^{a,b,f}, G. Ronse^{a,b}, M. Jimenez^{b,g}, S. Bellayer^{b,g}, P.
5 Blanpain-Avet^{a,b}, L. Bouvier^{a,b}, T. Six^{a,b}, S. Bornaz^h, R. Jeantet^{d,e}, and G. Delaplace^{a,b}

6 ^aINRA, UR 638, PIHM, Villeneuve d'Ascq, France ; ^bUMET, CNRS-UMR 8207, Université de
7 Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France; ^cInstitut National Agronomique de Tunisie, Tunis
8 Mahrajène, Tunisia; ^dAgrocampus Ouest, UMR 1253, Rennes, France; ^eINRA, UMR1253,
9 Rennes, France; ^fHEI, Laboratoire de Génie des procédés, Lille, France; ^gENSCL, ISP,
10 Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France; ^hESIAT, Tunis El Khadra, Tunisia.

11 *Corresponding author. Email: marwa.khaldi@gmail.com

12
13 Many studies demonstrated the key role of β -lactoglobulin (β -LG) denaturation in the initiation of fouling and
14 mentioned that interactions between β -LG and calcium are involved in the deposit fouling growth. However, no
15 study in the literature addressed exhaustively the influence of calcium/protein molar ratio on β -LG denaturation and
16 its consequence both on fouling mass along the plate heat exchanger (PHE) and the structure of the fouling deposit
17 layer. The objective of this work is to partially fill this gap.

18 For the investigated operating conditions, results established that β -LG denaturation constants, the deposit mass and
19 the structure of the fouling deposits are correlated to calcium/protein molar ratio. This work shows that
20 calcium/protein molar ratio is a lever to consider to control fouling, and that it is possible, for solutions containing
21 different calcium/protein molar ratio, to use denaturation rate constants combined with temperature profiles in the
22 PHE for predicting their fouling behaviour.

23 **Keywords:** milk derivative fouling mechanisms, plate heat exchanger, calcium, β -lactoglobulin, heat-induced
24 denaturation, structure deposit analyses.

26 Abbreviations

27	A	aggregated β -LG
28	C_i	channel number
29	h	hot water
30	N	native β -LG
31	p	product
32	P_i	plate number
33	PHE	plate heat exchanger
34	U	unfolded β -LG
35	WPI	whey protein isolate
36	α -La	alpha-lactalbumine
37	β -LG	beta-lactoglobulin

38 Introduction

39 Heat treatments are commonly applied to milk during industrial processing in order to
40 ensure the microbial safety of dairy products as well as to extend shelf life (McKinnon et al.,
41 2009). Fouling of heat treatment equipment in the dairy industry is a persistent issue which is
42 not yet totally understood and consequently is still a challenge to overcome.

43 Fouling is the accumulation of unwanted material on solid surfaces of heat exchangers. The
44 formation of this additional insulated layer on heat exchanger walls leads to reduced product
45 outputs (both the flow rate and outlet temperature). To compensate the overall decrease of heat
46 exchanger processing performances (i.e. the decrease of heat transfer efficiency on the process
47 side and the increase of the pressure drop required for pumping the product at the desired flow
48 rate) and to achieve the desired thermal schedule, additional thermal or mechanical energy
49 inputs are required (Müller-Steinhagen, 1993; Delplace et al., 1994; Visser and Jeurink, 1997;
50 Bansal and Chen, 2006).

51 The presence of fouling in milk derivative processing plants also induces protein losses and
52 the risk of re-entrainment of unconsolidated deposit in the processing line. To avoid any
53 process quality problem, reduced run times are often imposed (Gillham et al., 2000). The
54 frequent cleaning increases strongly the environmental impacts, due to the use of important
55 water volumes and detergent quantities. According to van Asslet et al. (2005), about 80% of the
56 total production costs in the dairy industry can be attributed to fouling and cleaning of the
57 process equipment.

58 Researchers have clearly established that both calcium and whey proteins are involved in the
59 deposit build-up (Jeurink et al., 1996) for milk-based derivatives. Due to their heat sensitivity,
60 it is known that these two components are destabilized in the bulk solution at temperatures
61 above 70°C (Petit et al., 2011). Less knowledge is available concerning foulant transport of
62 these species from the bulk of the process fluid to the surface and subsequent interactions
63 between these reactive forms and the surface.

64 The great majority of the published fouling studies focus mainly on the description of the
65 protein heat induced mechanisms. The two major proteins in the bovine whey are β -LG and α -
66 lactalbumin (α -LA). Both of these proteins are sensitive to heat treatments but β -LG is the
67 major protein reported in fouling deposit studies (Visser and Jeurink, 1997). This fact explains
68 why protein fouling models are mainly based on the heat denaturation of this protein. Oldfield
69 et al. (2005) and Petit et al. (2011) proposed a 2-step reaction to model the β -LG denaturation
70 mechanism: $N \rightarrow U \rightarrow A$.

1
2
3 71 Under heat treatment, the native β -LG (*N*) unfolds to form reversibly unfolded β -LG (*U*).
4
5 72 Then, these unfolded β -LG can react with native or other unfolded β -LG via disulfide
6
7 73 interchange or thiol oxidation to form aggregates (*A*) or can stick on the heat transfer surface.
8
9 74 The question, of which of the aggregated or unfolded β -LG governs the fouling reaction, was
10
11 75 during a long time a controversy about β -LG fouling mechanism. Nevertheless, Blanpain-Avet
12
13 76 et al. (2012) put an end to this debate by showing that the deposit structure is free from
14
15 77 aggregated β -LG, indicating that β -LG aggregates are not involved in the fouling mechanism
16
17 78 and that the unfolded β -LG are the precursor species.

17 79 Even if the exact role of calcium in the formation of fouling is not wholly elucidated, it was
18
19 80 reported that calcium plays a double role: in the denaturation reaction and in facilitating the
20
21 81 attachment of the β -LG unfolded species. Indeed, calcium ions influence the denaturation
22
23 82 temperature of β -LG and promote its aggregation by attaching to β -LG in the bulk (Jeyarajah
24
25 83 and Allen, 1994; O’Kennedy and Mounsey, 2009), and enhance the deposition on the heat
26
27 84 transfer surface by forming bridges between the proteins, adsorbed on the heat transfer surface
28
29 85 or located on the upper layer of the deposit, and reactive species formed in the bulk (Xiong,
30
31 86 1992; Changani et al., 1997; Christian et al., 2002; Bansal and Chen, 2006).

31 87 The nature of the inorganic salt, which participates to the deposit by creating carboxylate
32
33 88 bonds between the protein and precipitated minerals, is highly dependent on the composition of
34
35 89 the fouling solution. Indeed, some studies reported that calcium phosphate is present in the
36
37 90 protein fouling deposit (Lalande and René, 1988; Tsuge et al., 2002) while other authors
38
39 91 reported that calcium carbonate is detected at the interface (Jimenez et al., 2013).

40 92 Simons et al. (2002) investigated specifically the interactions between calcium and β -LG
41
42 93 fouling solutions and it was suggested that calcium is able to influence β -LG denaturation and
43
44 94 aggregation mechanisms in three different ways depending on the environmental conditions:

- 45 95 i) Calcium can cause the intermolecular crosslinking of adjacent negatively charged groups
46
47 96 (such as carboxylic groups) of β -LG, leading to β -LG aggregation by bridging;
48
49 97 ii) Ionic calcium takes part in the intramolecular electrostatic shielding of β -LG negative
50
51 98 charges, which tends to lower Coulombian repulsions between β -LG molecules and favors
52
53 99 β -LG aggregation by hydrophobic bonds;
54
55 100 iii) Calcium can induce specific conformational changes in the β -LG tertiary structure, leading
56
57 101 to local unfolding of β -LG and exposition of its free thiol group.

58 102 Most of studies on fouling mechanisms were based on β -LG solutions, by investigating
59
60 103 only protein deposition and putting aside the contributions of inorganic salts such as calcium.
104
104 No study in the literature has demonstrated the relationship between the calcium/protein molar

1
2
3 105 ratio and the amount of fouling along the PHE. Only Phan-Xuan et al. (2013) work has reported
4
5 106 that a critical molar ratio of calcium to proteins changes the whey protein aggregate structure
6
7 107 independently on the protein concentration. Furthermore, no study reported the influence of
8
9 108 calcium/protein molar ratio on the structure of the fouling layer deposit. Jimenez et al. (2013)
10
11 109 have recently tried to identify the role of calcium in fouling deposition and growth mechanisms
12
13 110 at a stainless steel surface but the influence of calcium/protein molar ratio on fouling layer
14
15 111 growth mechanisms is not addressed.

16 112 The originality of the current work is twofold. First, kinetic parameters related to heat-
17
18 113 induced β -LG denaturation (from 70 to 90°C) were determined by HPLC for different whey
19
20 114 protein isolate (WPI) model solutions containing different calcium/protein molar ratio (ranging
21
22 115 from 2.3 to 22.9). The evolution of the kinetic parameters of these fouling solutions with both
23
24 116 the temperature and the calcium/protein molar ratio are discussed. In a second part, fouling runs
25
26 117 with these WPI solutions are carried out and fouling phenomena (the amount deposit mass and
27
28 118 the surface characterization of the fouling layer) are investigated and discussed in regards of
29
30 119 calcium/protein molar ratio.

30 120

31 121 **Materials and methods**

32 122 *Fouling model fluids*

33 123 The model fluids used in this study were reconstituted from WPI Promilk 852FB1 supplied
34
35 124 by Ingredia (France). The composition of the powder is shown in Table 1.

36
37 125 For the whole experiment, the 0.25, 0.5, 1, 2 and 2.5% (w/w) WPI solutions with a fixed
38
39 126 calcium concentration (100 ppm) were prepared by mixing respectively 2.5, 5, 10, 20, and 25 g
40
41 127 of WPI powder in 1 L reverse osmosis water at room temperature. Then, different quantities of
42
43 128 a molar calcium chloride (anhydrous, 96%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific,
44
45 129 Waltham, MA, USA) solution were added to the β -LG solutions to obtain a total calcium
46
47 130 amount equal to 100 ppm (Table 2). The pH of these fouling solutions was close to 6.8. As
48
49 131 model solutions contain the same amount of calcium, the calcium/protein molar ratio decreases
50
51 132 (from 22.9 to 2.3) when protein concentration in model solution increases (from 0.25 to 2.5%
52
53 133 (w/w).

54
55 134 The calcium concentration of the five model solutions was determined by atomic absorption
56
57 135 spectrometry with a Spectro AA 55B apparatus (Varian, Palo Alto, CA, USA).

58
59
60

136 *Thermal denaturation experiments*

137 A similar heat treatment protocol was applied to each model solution in order to determine
138 the kinetic parameters of β -LG thermal denaturation.

139 All thermal denaturation experiments were conducted on twelve samples of 2 mL that were
140 placed in stainless steel tubes (350 mm length, 10 mm core diameter, and 1 mm wall thickness).
141 The investigated temperatures ranged from 70 to 90°C and correspond to the bulk temperature
142 range imposed on the PHE.

143 Before submitting samples to the desired holding temperatures, the samples were preheated in
144 a first water bath at 60°C when desired holding temperatures are below 80°C, and at 65°C for
145 desired holding temperatures over 80°C. The temperature of the two water baths used for
146 preheating are 5 degrees different, in order to get a faster temperature rise when higher holding
147 temperatures are targeted. It should be noted that the temperature of the water bath used for
148 preheating is less than the β -LG denaturation temperature, which is comprised between 74 and
149 77°C (Nielsen et al., 1995; Linmark-Mansson et al., 2005; Guérin et al., 2007).

150 The temperature increase from the preheating temperature to the desired holding temperature
151 was performed by placing the samples in a second water bath whose temperature was maintained
152 until 20°C higher than the holding temperature. The second water bath was used in order to
153 reduce the heat increase time and to limit the denaturation level before sampling. The first
154 sample, corresponding to time zero, was taken when the sample temperature was equal to the
155 desired holding value.

156 The eleven other samples were maintained during a sufficient time in a third water bath (fixed
157 2°C higher than the desired holding temperature), taken off at different times, and cooled down
158 immediately in a beaker with melting ice after sampling to stop further β -LG denaturation.

159 The temperature profile in samples placed in the three water baths was determined using a
160 sensor connected to a temperature measurement acquisition system and placed in a stainless
161 steel tube filled with water (Figure 1).

162

163 *HPLC analysis*

164 The soluble (native and unfolded) β -LG concentration in the samples was evaluated by
165 HPLC after precipitation of the aggregated protein at pH 4.6 and their removal by
166 centrifugation (9000 rpm for 30 min at 4°C). The chromatographic system (Waters, Milford,
167 Massachusetts, USA) included a 717 Plus autosampler, a 616 quadratic pump system, a Jones
168 Model 7971 column oven, a HPLC ACE 300 Å C4 separation column, and the associated guard

1
2
3 169 column (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, United-Kingdom), a 486 UV-
4
5 170 visible spectrophotometer and an acquisition software (Millenium 3.2, Waters).

6
7 171 The mobile phases used in HPLC were 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid (99 %, Acros
8
9 172 Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in Milli-Q water
10
11 173 (Millipore, Bedford, MA), and 0.1 % trifluoroacetic acid in a mixture of 80% acetonitrile
12
13 174 (HPLC grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and 20% Milli-Q
14
15 175 water.

16 176 The HPLC analyses were carried out in the following conditions: flow rate 1 mL.min⁻¹,
17
18 177 injection volume 20 µL, temperature 40°C, elution of the proteins using a gradient of
19
20 178 acetonitrile and detection of the eluted proteins at wavelength 214 nm. Analyses were repeated
21
22 179 three times for each standard or sample. Calibration standards in the range from 0.5 to 4 g.L⁻¹
23
24 180 were prepared by dissolving pure β-LG powder (Biopure industrial powder: β-LG 88.85%) in
25
26 181 Milli-Q water. A daily column conditioning was achieved by eluting acetonitrile at 1 mL.min⁻¹
27
28 182 during one hour.

29
30 183 For each experiment, the sample concentrations were calculated by averaging the three
31
32 184 measured chromatographic areas and converting this area value into a β-LG concentration
33
34 185 using the HPLC calibration curve.

35 187 *Determination of the β-LG rate constants*

36
37 188 The reaction model used in this study is derived from the work of Tolkach and Kulozik
38
39 189 (2007). The denaturation reaction concerns the transformation of soluble species (*S*) into
40
41 190 aggregates (*A*). HPLC analysis is solely able to quantify β-LG soluble concentration (*C_S*).
42
43 191 Indeed, native and unfolded β-LG concentrations (*C_N* and *C_U*) remain inaccessible with this
44
45 192 analytical technique.

46 193 The β-LG denaturation is described by the chemical equation $S \xrightarrow{k_n} A$
47
48 194 and defined by Equation 1.

$$49
50
51 196 \quad -\frac{dC_S}{dt} = k_n C_S^n \quad (1)$$

52
53
54 197 where *k_n* the denaturation rate constant, *n* the denaturation reaction order, and *t* the time.

55
56
57 198
58 199 For each desired holding temperature, the corresponding denaturation rate constant was
59
60 200 determined from the Arrhenius plot. The relation between the denaturation kinetic rate and the
201
202 heat treatment temperature is given by Equation 2.

202

203

$$\ln(k_n) = \ln(k_n^0) - \frac{E_A}{RT} \quad (2)$$

204 where k_n^0 is the denaturation frequency factor, E_A the denaturation activation energy, R the
205 universal gas constant, and T the desired holding temperature of heat treatment (K).

206

207 *Determination of the deposit mass distribution*

208 Fouling experiments were carried out on a pilot plant that is schematized on figure 2. The
209 fouling ring was composed of two distinct zones: i) a pre-heating zone composed of a heat
210 exchanger with V7 types plates (Vicarb, Alfa-Laval, France), 9 passes (one channel-per-pass)
211 necessary to preheat the model fluid; ii) a heating zone composed of a PHE (Vicarb, model V7,
212 Alfa-Laval, France).

213 Experiments have been conducted, at pilot scale, in a corrugated PHE consisting of 10
214 plates, i.e. 5 passes (one channel-per-pass) of about 0.074m^2 exchange surface (0.495 m
215 length, 0.15 m width), in counter-current configuration to optimize the heat transfer, as
216 represented in figure 3. The defined design permitted to be closer to industrial heat treatment
217 conditions.

218 The PHE was used to heat the WPI fouling solutions above the denaturation temperature.
219 During experiments, the inlet temperature of hot water was adjusted to ensure a constant outlet
220 fouling solution temperature in the holding zone as well as a constant profile of product
221 temperature along the PHE. 600 L of model fouling solution were processed during each pilot
222 scale experiment, which corresponds to a fouling duration of about 2 hours. The pH of the
223 fouling solutions was about 6.8.

224 The temperature profile inside the PHE was simulated with Sphere software (previously
225 developed in our laboratory): temperatures in all passes of hot and cold fluids were calculated
226 from the knowledge of fluids inlet temperature and flow rate, plate properties, and exchanger
227 design, and validated in our previous study (Khaldi et al., 2015a). The temperature profile is
228 controlled by the PHE inlet parameters: product and hot water inlet temperatures (T_{ip} and T_{ih})
229 and product and hot water flow rates (Q_p and Q_h). As the temperature value for the β -LG
230 denaturation is comprised between 74 and 77°C (Nielsen et al., 1995; Linmark-Mansson et al.,
231 2005; Guérin et al., 2007), it was decided to set the product outlet temperature (T_{op}) at 85°C .
232 This was achieved with the operating conditions indicated in Table 3, displaying the average
233 values of temperatures and flow rates recorded for each WPI fouling solution.

1
2
3 234 The bulk temperature profile displayed in figure 4 was obtained by Sphere simulations by
4
5 235 employing the operating conditions gathered in Table 3. One fouling run was conducted for
6
7 236 each WPI fouling solution (0.25, 0.5, 1, 2, and 2.5% w/w) prepared at fixed calcium content
8
9 237 (100 ppm).

10 238 Heat exchanger plates were weighed before each heat-treatment experiment. After each
11
12 239 fouling experiment, the PHE was dismantled and each fouled plate was carefully removed and
13
14 240 stored in an air oven at 50°C for 2 hours. Then, fouled plates were weighed at ambient
15
16 241 temperature and the dry deposit mass on each plate was calculated by simple subtraction.
17
18 242

19 243 *Surface characterization of the fouling layer*

20
21 244 To determine the fouling deposit composition, Electron Probe Micro Analyzer (EPMA) and
22
23 245 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) were used. Surface characterization techniques were
24
25 246 carried out on samples of heat exchanger plates (cut pieces of heat exchanger plates) after the
26
27 247 fouling run. In spite of requiring the destruction of the fouled plate, the destructive method put
28
29 248 in place was deliberately chosen in order to probe real fouling layers. It is seldom that
30
31 249 characterization of the fouling layer involved fouling deposit formed in situ (in the PHE) under
32
33 250 real conditions. This was the case for this work, since no distortion with reality was used to
34
35 251 form or to collect the fouling deposit (in this study the analysed fouling deposits are formed in
36
37 252 a corrugated surface of a plate of heat exchanger located in a heating zone). It was decided to
38
39 253 study the most concentrated model fouling solution (2.5% w/w) and the least concentrated
40
41 254 model fouling solution (0.25% w/w). For both β -LG solutions, the thermal profile imposed for
42
43 255 the heat-treatment experiment was #1 (T_{ip} 65°C, T_{op} 85°C, Q_p 300 L.h⁻¹, and Q_h 300 L.h⁻¹).

44 257 *EPMA*

45
46 258 Samples were embedded into epoxy resin, polished with an ESCIL 200 GT polishing
47
48 259 machine using different grade of SiC sheets (up to ¼ µm), and carbon coated with a Bal-Tec
49
50 260 SCD005 sputter coater. This kind of sample preparation allows access to a very flat surface
51
52 261 necessary for EPMA analysis.

53 262 A Cameca SX-100 EPMA was used to perform elemental analysis. Back scattered electron
54
55 263 images were carried out at 15 kV 15 nA and X-ray mappings were carried out at 15 kV 40 nA.
56
57 264 For mappings, a PET cristal was used to detect K α X-rays of sulphur (characteristic element of
58
59 265 β -LG protein) calcium, and chlorine (characteristic element of CaCl₂ used), and a LiF cristal to
60
266 detect iron K α X-ray (characteristic element of the plates of the heat exchanger).

1
2
3 267 The mappings are colour coded from black to red, with black characterizing the absence of
4
5 268 the element and red the highest concentration detected.
6

7 269

8
9 270 *XPS*

10 271 XPS analyses were performed on an Axis ultra DLD (Kratos analytical) using a
11
12 272 monochromatic Al K α X-ray source (1486.6 eV) under the following conditions: a voltage of
13
14 273 15 kV, a current source of 10 mA, a pressure of 10⁻⁷ Pa in the analysing chamber, and an
15
16 274 analysed area size of 300 \times 700 μ m², with a depth of 10 nm.

17 275 High resolution spectra of C1s peaks of carbon were recorded for binding energies between
18
19 276 0 and 1300 eV with a 1 eV step, at 160 eV pass energy. Data treatment and peak-fitting
20
21 277 procedures were performed with the Casa XPS program (Casa Software, Ltd). The binding
22
23 278 energy scale was calibrated to the C1s peak at 285 eV for charge correction. The Ca2p peak
24
25 279 shapes were decomposed using is a combination of Lorentzian and Gaussian shapes.
26

27 280

28 281 **Results and discussion**

29 30 282 *Reaction order of β -LG denaturation*

31 283 The characterization of β -LG denaturation kinetic parameters in the WPI model solutions
32
33 284 started with the identification of the appropriate reaction order, n . In the literature, n is often
34
35 285 taken between 1 and 2 (Mulvihill and Donovan, 1987; Relkin, 1996; Petit et al., 2011).

36
37 286 In this study, n was varied from 1 to 2 (by 0.1 steps) to determine the reaction order that best
38
39 287 fits the experimental decrease of soluble β -LG concentration plotted versus time. Figure 5
40
41 288 shows the experimental data for β -LG denaturation in a 0.5% (w/w) WPI model solution heated
42
43 289 at 85°C.

44 290 As seen in figure 5, the $n = 2$ reaction order model curve diverged noticeably from the
45
46 291 experimental points, whereas the 1.5 reaction order model precisely fitted the experimental data
47
48 292 of β -LG denaturation at 85°C. This was confirmed for β -LG denaturation in all WPI model
49
50 293 solutions in the temperature range investigated (from 70 to 90°C). For the following
51
52 294 experiments, a reaction order of 1.5 was used for fitting β -LG denaturation of all WPI
53
54 295 solutions.
55

56 296

57 297 *Arrhenius plots for the β -LG denaturation of the WPI model solutions*

58 298 The Arrhenius plots of β -LG denaturation reaction of the various WPI solutions (0.25, 0.5,
59
60 299 1, 2, and 2.5 % w/w) are presented in figure 6. This figure represents the temperature influence

1
2
3 300 on the β -LG denaturation kinetic rates from 70 to 90°C. Each symbol refers to one kinetic of β -
4
5 301 LG denaturation for a given holding temperature.

6
7 302 From figure 6, two β -LG denaturation regimes appear separated by an Arrhenius critical
8
9 303 temperature at around 80°C. The slope break delimitates two temperature ranges: below the
10
11 304 critical temperature, the β -LG denaturation reaction is unfolding limited which means that the
12
13 305 unfolding reaction is slower than aggregation, and over 80°C, β -LG denaturation is limited by
14
15 306 the aggregation reaction and in that case, aggregation is the slower reaction. Each temperature
16
17 307 range is related to the predominance of the unfolding or aggregation mechanisms, indicating
18
19 308 that denaturation kinetic rates varied with the temperature. The shape of Arrhenius plots is in
20
21 309 agreement with the well-established chemical model for β -LG denaturation, stating that β -LG
22
23 310 unfolds then aggregates, according to two successive kinetically-driven reactions (Tolkach and
24
25 311 Kulozik, 2007; Petit et al., 2011).

26
27 312 When analysing the plots in regards of protein concentration in model solutions, it can be
28
29 313 observed that β -LG denaturation kinetic decreases when protein concentration in model
30
31 314 solutions increases. This trend is rather surprising regarding the reaction order of the kinetics of
32
33 315 β -LG denaturation (1.5) and regarding the widely expected behaviour on fouling “the higher is
34
35 316 the protein concentration in the solution, the higher is the reactivity of the solution”. This
36
37 317 investigation clearly shows that limiting the β -LG concentration is not a pertinent parameter to
38
39 318 decrease denaturation level, and so another parameter should be found out to assess
40
41 319 denaturation behaviour from fouling solution composition.

42
43 320 When analysing the plots in regards of calcium/protein molar ratio of model solutions, it
44
45 321 appears clearly that Arrhenius plots are almost parallel both in the unfolding and aggregation
46
47 322 limited areas, and shifted depending on the calcium/protein molar ratio. Indeed, β -LG
48
49 323 denaturation kinetics increase strongly when the calcium/protein molar ratio in WPI model
50
51 324 solutions increase, in both unfolding and aggregation limited regions. Denaturation is strongly
52
53 325 enhanced in 0.25% (w/w) WPI model solution, owing to its higher calcium/protein molar ratio
54
55 326 when compared to 2.5% WPI model solution. These results are in agreement with Sherwin and
56
57 327 Foegeding (1997), who demonstrated that aggregation rates are affected by CaCl_2 /protein
58
59 328 stoichiometry rather than the Ca^{2+} and protein concentrations separately. This confirms that
60
61 329 calcium strongly affects β -LG heat denaturation by favouring β -LG unfolding (Jeyarajah and
62
63 330 Allen, 1994) and triggering its aggregation (Simons et al., 2002).

64
65 331 Even if Arrhenius plots of WPI model solutions are ranked depending on calcium/protein
66
67 332 molar ratio, the ordinate shift of denaturation rate constants is not proportional to

1
2
3 333 calcium/protein molar ratio. Moreover, analysis of figure 6 seems to indicate the existence of a
4
5 334 threshold effect in calcium/protein molar ratio for higher denaturation rate constants. This
6
7 335 threshold effect is particularly visible in the aggregation limited temperature area of 0.25 and
8
9 336 0.5% (w/w) WPI model solutions, since the Arrhenius plots of these two solutions are
10
11 337 superimposed. These results are in agreement with Simons et al. (2002) work suggesting that
12
13 338 calcium was bound to carboxylates with a threshold affinity.

14 339 Further analysis of the Arrhenius plots in regards of calcium/protein molar ratio of model
15
16 340 solutions, we concluded that for all calcium/protein molar ratios, the Arrhenius plots are purely
17
18 341 shifted in ordinate axis values similarly both in unfolding and aggregation limited areas and can
19
20 342 be viewed as a family of parallel curves. Note however, that this trend seems not wholly satisfy
21
22 343 for the WPI solution with the highest calcium/protein molar ratio. Indeed for 0.25% (w/w)
23
24 344 model solution, the shift in ordinate axis for the unfolding limited temperature area seems a
25
26 345 little bit different than that for aggregation limited temperature. No explanation could be put
27
28 346 forward to explain this slope change for the unfolding limited temperature area.

29 347

30 348 *Kinetic parameters of β -LG denaturation*

31 349 Kinetic parameters of β -LG denaturation were presented in table 4 in terms of frequency
32
33 350 factor logarithm ($\ln k^\circ$) and activation energy (E_A) for unfolding and aggregation reactions.

34 351 It is not possible to compare our results with those of the literature, such as those reported by
35
36 352 Tolkach and Kulozik (2007) and Petit et al. (2011) since their results were obtained for
37
38 353 solutions with different composition (both in β -LG and calcium concentrations). Moreover, the
39
40 354 calcium/protein molar ratio are rarely reported. We can just mention that the kinetic rates
41
42 355 increased with calcium concentration as found in previous studies (Petit et al., 2011; Khaldi et
43
44 356 al., 2015a; Khaldi et al., 2015b).

45 357 Kinetic parameters in the unfolding and aggregation limited ranges were significantly
46
47 358 different, confirming the well-known transition from one mechanism to another in β -LG
48
49 359 denaturation. Table 4 confirms that the activation energy (E_A) is higher at lower temperatures
50
51 360 ($< 80^\circ\text{C}$), when protein unfolding is the rate-limiting step rather than in the aggregation rate-
52
53 361 limiting step at higher temperatures ($> 80^\circ\text{C}$).

54 362 By examining the unfolding limited range in table 4, it can be seen that the more the
55
56 363 calcium/protein molar ratio increased (with decreasing the β -LG concentration), the more the
57
58 364 frequency factor logarithm parameters increased (from 107.4 logarithm units at 2.5% w/w
59
60 365 model solution to 147.7 logarithm units at 0.25% w/w model solution). This can be related to
366 the stabilization of unfolded β -LG by calcium, which exposes its free thiol on protein surface.

1
2
3 367 The free thiol is available for the formation of intermolecular disulfide bonds (Jeyarajah and
4 Allen, 1994) and therefore enhances β -LG denaturation. Moreover, the great increase of $E_{A,unf}$
5 368 between 2.3 and 22.9 calcium/protein molar ratios indicates that the unfolding reaction needs
6 369 more energy to initiate at higher calcium/protein molar ratio. This means that calcium ions
7 370 should have a protective effect against β -LG unfolding. This can be explained by the fact that
8 371 calcium alters the native β -LG tertiary structure and forms intermolecular bonds with some
9 372 negatively charged groups, leading to the reinforcement of the native β -LG (Jeyarajah and
10 373 Allen, 1994; Simons et al., 2002, O’Kennedy and Mounsey, 2009; Petit et al., 2011).

11
12
13
14
15
16
17 375 In the aggregation limited range, activation energy increases from 2.5 to 1% (w/w) of WPI
18 376 model solution. This indicated that calcium favors β -LG aggregation (Verheul et al., 1998;
19 377 Allen and Smith, 2001; Schmitt et al., 2007) by bridging of unfolded β -LG. The observed
20 378 increase in β -LG aggregation frequency factor, with increasing the calcium/protein molar ratio
21 379 from 2.3 to 5.7, may derive from protein electrostatic charge shielding and intermolecular
22 380 crosslinking by calcium ions (Jeyarajah and Allen, 1994). However, a threshold effect of
23 381 calcium/protein molar ratio was observed for 0.25 and 0.5% (w/w) model solutions. Indeed,
24 382 excess of calcium at 11.5 and 22.9 calcium/protein molar ratios have an inhibitory effect on β -
25 383 LG aggregation as indicated by the decrease of aggregation frequency factor and activation
26 384 energies in agreement with Roefs and Peppelman (2001) study.

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

386 *Fouling mass distribution in the PHE*

38 387 Figure 7 represents the fouling results obtained with 0.25, 0.5, 1, 2, and 2.5% (w/w) WPI
39 388 model solutions containing 100 ppm of total calcium, for the same temperature profile imposed
40 389 along the PHE.

41
42
43
44 390 According to figure 7, PHE fouling is markedly impacted by the temperature in the channels
45 391 whatever the WPI model solutions. As a general trend, fouling began in the 1st channel at
46 392 66.7°C and increased in the other passes of the PHE, where the temperature is higher.
47 393 Moreover, the dry deposit mass is not uniform in all the channels and is distributed differently
48 394 depending on the calcium/protein molar ratio of the fouling solutions. Indeed, for the WPI
49 395 model solution at 0.25% (w/w), the dry deposit mass increases almost linearly from the 1st
50 396 channel until the 4th channel and a decrease was then observed in the 5th channel of the PHE:
51 397 the dry deposit mass goes from 40.6 g in the 4th channel to 34.7 g in the 5th channel, in spite of
52 398 the fact that the temperature of the WPI model solution is still increasing. For the other WPI
53 399 solutions, 0.5, 1, 2, and 2.5% (w/w), the dry deposit mass increases continuously to reach a
54 400 maximum in the 5th channel. Note that a slight decrease of the fouling deposit in the last

1
2
3 401 channel of the PHE was observed for the 2.5% (w/w) model solution. In this case, there is a
4
5 402 small decline of the dry deposit mass from 10.6 to 9.7 g.

6
7 403 Whatever the heated WPI solution, the dry deposit mass strongly increases at the 2nd
8
9 404 channel. This increase results from the initiation of β -LG denaturation between 66.7°C (1st
10
11 405 channel temperature) and 70.9°C (2nd channel temperature), as indicated by Havea et al.
12
13 406 (2001) and Linmark-Mansson et al. (2005). The dry deposit mass is higher in the second
14
15 407 channel for WPI solutions at 0.25 and 0.5% (w/w) than the others, in agreement with higher β -
16
17 408 LG unfolding kinetics.

18
19 409 In our work, the growth of the fouling mass is closely related to the availability of β -LG
20
21 410 unfolded species as precursors in β -LG fouling mechanism. This is in agreement with the study
22
23 411 of Blanpain-Avet et al. (2012). Indeed, these authors concluded from fouled deposit analysis by
24
25 412 Raman spectroscopy that protein aggregates are not present in the deposit and the precursor
26
27 413 specie of fouling is the unfolded β -LG.

28
29 414 From these experiments, it is clear that the dry deposit mass is not positively correlated with
30
31 415 the protein concentration in the WPI fouling solutions, but depends on β -LG denaturation
32
33 416 kinetics that are affected by the calcium/protein molar ratio in the fouling solutions.

34
35 417
36
37 418 ***Relationship between the calcium/molar ratio and the total amount of the deposit mass in the***
38
39 419 ***PHE***

40
41 420 Figure 8 represents the effect of the calcium/protein molar ratio on the total amount of dry
42
43 421 deposit mass in the PHE for the five WPI fouling solutions. It can be observed that, for the
44
45 422 same inlet and outlet product temperatures, the total deposit mass increased with the increase of
46
47 423 the calcium/protein molar ratio (obtained by the decrease of β -LG concentration for a constant
48
49 424 calcium concentration) up to a calcium/protein molar ratio of 11.5 (protein concentration of
50
51 425 0.5% w/w). Indeed, for a 2.5% (w/w) WPI model solution containing a calcium/protein molar
52
53 426 ratio of 2.3, the total deposit mass is about 29 g, whereas it is equal to 155.5 g for the 0.5%
54
55 427 (w/w) WPI model solution containing a calcium/protein molar ratio of 11.5.

56
57 428 For higher calcium/protein molar ratio in the WPI model solution, a slow decline of the total
58
59 429 deposit mass from 155.5 g to 135.1 g for 0.25% (w/w) WPI model solution is observed. This
60
430 decrease can be explained by the fact that protein concentration is lower and may be limiting
431 for constituting the fouling layer (more than 10% of the dry matter of the 0.25% WPI solution
432 is recovered on the heated plates). Hence, the denaturation rate was slowed down by the
433 depletion in native β -LG, leading to lower concentration of unfolded β -LG and lower fouling
434 masses (Petit et al., 2013). The decrease of dry deposit mass could also be explained by the

1
2
3 435 protective effect of calcium toward β -LG denaturation at high calcium/protein molar ratio
4
5 436 (Roefs and Peppelman, 2001).

6
7 437 Figure 9 shows a picture of the deposit layer formed in the heat exchanger plates after
8
9 438 conducting the fouling experiments with WPI model solutions at 0.25 and 2.5% (w/w) and
10
11 439 containing 100 ppm of total calcium each. The observation of the fouling layer obtained after 2
12
13 440 hours of fouling runs at 70.9°C corresponding to 2nd channel (WPI model solutions at 0.25%
14
15 441 w/w) and 84°C corresponding to 5th channel (WPI model solutions at 2.5% w/w) exhibited
16
17 442 different aspects.

18 443 For 0.25% (w/w) WPI model solution, the fouling layer in the 2nd channel of the PHE is
19
20 444 white, thick abundant and homogeneously distributed on the heated plate. It clearly appears that
21
22 445 even at low temperature (70.9°C) an extensive fouling is obtained. These observations are in
23
24 446 agreement with Havea et al. (2001) and Linmark-Mansson et al. (2005) who showed that whey
25
26 447 proteins are expected to denature at temperatures as low as 70.9°C.

27 448 For 2.5% (w/w) model solution, the fouling layer in the 5th channel of the PHE is thin and
28
29 449 barely visible in spite of the higher temperature in the PHE channel (84°C). Fewer fouling is
30
31 450 observed at temperature over 80°C.

32 451 In order to characterize the fouling and understand the role of calcium/protein molar ratio in
33
34 452 the fouling growth after 2 hours of fouling runs, the morphology and chemical composition of
35
36 453 the fouling layer on the surface of heat exchanger plates were analysed using EPMA and XPS
37
38 454 (Figure 10). Profile analyses reveal the elements characteristic of steel (Fe, iron), protein (S,
39
40 455 sulfur), calcium (Ca) and chloride (Cl). As already said, the mappings are colour coded from
41
42 456 black to red, with black characterizing the absence of the element and red the highest
43
44 457 concentration detected. It is possible to compare the concentrations of an element between
45
46 458 pictures a) and b) as colour scales are identical.

47 459 Calcium and sulfur mappings of the 0.25% (w/w) WPI solution (Figure 10a) indicate that
48
49 460 the fouling layer is thick, not homogenous and has developed following an arborescence
50
51 461 growth. It was also observed that calcium and sulfur are quite homogeneously dispatched in the
52
53 462 arborescence and are co-localized. These results are in agreement with Jimenez et al. (2013)
54
55 463 who explained the arborescent structure as a co-construction of the fouling layer by proteins
56
57 464 and calcium containing particles. These latter act as anchoring points for further deposit
58
59 465 growth.

60 466 Note that it is difficult to compare further our results with those obtained by Jimenez et al.
467 (2013) since fouling layers were not formed under the same operating conditions (composition
468 of the solutions of both calcium and protein concentrations, history of the imposed temperature

1
2
3 469 in the PHE, etc.) and collected on the same localisation in the fouling experimental set-up. In
4
5 470 our case, fouling deposits were obtained in the heating zone, on a channel of the plate heat
6
7 471 exchanger and consequently on a corrugated surface, while the fouling deposits characterized
8
9 472 by Jimenez et al. (2013) were formed in stainless steel flat coupons inserted in a pipe
10
11 473 corresponding to a holding zone located after the PHE used for heating.

12 474 The 2.5% (w/w) WPI solution is thin, homogenous and much more compact and smaller
13
14 475 (about 50 μm) than the previous one (Figure 10b). In this case, also calcium and sulfur are co-
15
16 476 localized, with a lower calcium/protein molar ratio than for the 0.5% (w/w) solution (blue
17
18 477 colour mainly versus green colour in picture a). The calcium/protein molar ratio acts not only
19
20 478 on the deposit mass located on the surface of the heat exchanger plates but also on its structure.
21
22 479 From the observed fouling layer, it is assumed that protein–protein interactions and protein–
23
24 480 calcium particles interactions contribute to the formation of the fouling layer. At low
25
26 481 calcium/protein molar ratio, protein–protein interactions are favoured at the expense of protein–
27
28 482 calcium particles interactions in the fouling layer, resulting in a thin, smooth and compact
29
30 483 structure. At high calcium/protein molar ratio, the calcium particles accelerate the growth of the
31
32 484 fouling layer by exposing a larger surface for protein deposition. The growth of the fouling
33
34 485 layer is then oriented by the deposit of calcium particles resulting in thicker, spongier and
35
36 486 rougher structure.

37 487 As 90 ppm of calcium under CaCl_2 form was added to the 0.25% WPI model solution, it was
38
39 488 suggested that chloride could participate to the constitution of the fouling layer and could
40
41 489 explain the different structures of the fouling layer. However, chloride was not detected at all in
42
43 490 the fouling layer meaning that it is not present or present in too low amount in the fouling layer.
44
45 491 Consequently, chloride is not a major constituent in the build-up of the fouling layer.

46 492 To complete the analysis of the fouling layer obtained from the fouling runs of 0.25% (w/w)
47
48 493 WPI model solution, the chemical form of the calcium constituting the deposit was investigated
49
50 494 by XPS analyses (Figure 11). One peak could be identified for phosphorus (not shown here)
51
52 495 and two peaks for the calcium, at 350,8 eV and 347.2 eV respectively, corresponding to the Ca
53
54 496 $2p_{1/2}$ and Ca $2p_{3/2}$ in calcium phosphate. The experimental molar calcium/phosphate ratio was
55
56 497 found equal to 1.45, which is close to the value found in the literature of about 1.47 (Tissier and
57
58 498 Lalande, 1986) and 1.5 (Chusuei and Goodman, 1999). This is also a great difference with the
59
60 499 work of Jimenez et al. (2013) who have established, for their fouling solution and tested
500
501 500 operating conditions, that calcium carbonate was involved in the deposition mechanism. This
502
503 501 difference may be explained mainly by the fact that WPI model solution of Jimenez et al.
504
505 502 (2013) was obtained by rehydrating tap water (letting the possibilities of carbonate calcium to

1
2
3 503 be induced in the fouling solution). In our case, the fouling solutions were prepared using
4
5 504 reverse osmosis water to limit the formation of carbonate calcium. Moreover, mineral
6
7 505 concentrations of the model fouling solutions (namely in calcium and in phosphorus elements)
8
9 506 are really different and lead to different salts balance.
10

11 507
12 508 ***Relationship between β -LG heat denaturation rate constants and the distribution of the***
13
14 509 ***deposit mass along the PHE***

15 510 We have shown in the previous part of this article that β -LG denaturation kinetics increase
16 511 strongly when calcium/protein molar ratio in WPI model solutions increase, in both unfolding
17 512 and aggregation limited regions. We have also shown in a previous paper (Khaldi et al. 2015a),
18 513 for two model fouling solutions containing a fixed protein content and various calcium content
19 514 (precisely 1% w/w WPI solution containing 100 and 120 ppm total calcium), that it is possible
20 515 to link the deposit formation rate within the PHE to the denaturation chemical reactions
21 516 (unfolding and aggregation) occurring in the bulk. To do that, we suggested that the dry deposit
22 517 mass distribution in the various channels of the PHE was plotted against the ratio between the
23 518 unfolding reaction rate constant (k_{unf}) and the aggregation reaction rate constant (k_{agg})
24 519 calculated at the temperature of the bulk solution in the corresponding channel ($r = k_{unf}/k_{agg}$).
25 520 In this last part, we will bring a further insight into this field and how calcium/protein molar
26 521 ratio of WPI model solutions impacts these plots.
27

28 522 Figure 12 represents the variation of the measured dry deposit mass in the different channels
29 523 of the PHE with the ratio r , for the various investigated WPI model solutions.
30

31 524 For each fouling solution, it could be observed that an S curve exists to describe the
32 525 variation of the dry deposit mass in the various channels of the PHE. The different master
33 526 curves, representing the deposit mass per channel vs the ratio r , contained two characteristic
34 527 zones:
35

- 36 528 i) an unfolding limited zone with an initial sharp increase at values of r close to zero, followed
37 529 by a maximum of the deposit mass with r ;
38 530 ii) an aggregation limited zone where the deposit mass per channel seems to reach a limiting
39 531 value.
40

41 532 From figure 12, it is noticed that r values, at which fouling build-up starts, are very close to
42 533 zero. This confirms that very little unfolded β -LG species are required for fouling to be
43 534 deposited. Fouling first builds up and deposit mass increases sharply in the unfolding limited
44 535 zone for $0.73 < r < 0.98$, corresponding to bulk temperatures ranging from 76 to 80°C, where
45

1
2
3 536 the deposit mass is the highest. The fact that the deposit mass increases strongly, when r is
4
5 537 below 1, shows that the unfolding limited zone controls the growth of the deposit mass.

6
7 538 Figure 12 also shows that the increase of the deposit mass per channel does not follow the
8
9 539 same slope. The slope is clearly impacted by the values of calcium/protein molar ratio. Indeed,
10
11 540 for WPI model solution containing a calcium/protein molar ratio equal to 11.5, the higher is the
12
13 541 calcium/protein molar ratio, the sharper is the rise of the deposit mass per channel.
14
15 542 Consequently for this WPI model solution, it seems that the temperature range of the
16
17 543 aggregation limited zone is reducing when calcium/protein molar ratio increases. For the WPI
18
19 544 model solution containing a calcium/protein molar ratio equal to 22.9 (0.25% w/w WPI
20
21 545 solution), it is difficult to conclude since a change in the slope of the denaturation rate constant
22
23 546 has been observed previously in the unfolding temperature area and impacted also the
24
25 547 representation (the deposit mass per channel vs the ratio r).

26
27 548 At higher temperature along the PHE (above 80°C) and $r > 1$, corresponding to the
28
29 549 aggregation limited area, for each fouling solution a plateau in the deposit mass is observed.
30
31 550 This can be explained by an increase in the collision probability between unfolded β -LG
32
33 551 molecules which will promote aggregate formation rather than deposit layer formation
34
35 552 (Delplace et al., 1997). The values of this plateau increase with calcium/protein molar ratio
36
37 553 values up to a calcium/protein molar ratio of 11.5. The value of the plateau seems to slightly
38
39 554 decrease for higher calcium/protein molar ratio. This is in agreement with fouling mass
40
41 555 distribution and total mass distribution which have shown a decrease for this calcium/protein
42
43 556 molar ratio.

44
45 557 These results show unambiguously that whatever the calcium protein molar ratio of the
46
47 558 fouling solution, the deposit mass per channel reaches a maximum limit when the aggregation
48
49 559 reaction is high enough to consume the unfolded species under aggregated forms.
50
51 560 Calcium/protein molar ratio of the fouling solutions impacts significantly both unfolding and
52
53 561 aggregation reactions and consequently influences significantly the fouling mass distribution
54
55 562 occurrence for a given bulk temperature profile.

56
57 563 For fouling solutions with various calcium/protein molar ratios, the fouling mass per channel
58
59 564 is reasonably well correlated to the ratio r providing additional proof that denaturation data
60
565 basis are prerequisites for controlling fouling.

566 Conclusions

567 The aim of this study was to evidence the influence of calcium/protein molar ratio on β -LG
568 heat-induced denaturation, the deposit mass distribution, and the fouling layer structure
569 obtained when processing protein-calcium solutions. Five WPI model fouling solutions at
570 various calcium/protein molar ratios (ranging from 2.3 to 22.9) were elaborated for this
571 purpose. The solutions were made by varying protein concentrations (from 0.25 to 2.5% w/w)
572 and fixing the total calcium content (100 ppm).

573 It was shown that:

- 574 - 1.5 reaction order is relevant to model β -LG denaturation reaction for all WPI model fouling
575 solutions, whatever the calcium/protein molar ratio of the model solutions;
- 576 - β -LG heat denaturation mechanism is limited either by aggregation or by unfolding
577 according to the temperature value, whatever the calcium/protein molar ratio of the WPI
578 fouling solutions;
- 579 - Increasing calcium/protein molar ratio increases the β -LG denaturation kinetic parameters,
580 both in the unfolding and aggregation limited zones;
- 581 - Increasing the calcium/protein molar ratio leads to a strong increase of the fouling mass
582 within the PHE at low temperatures;
- 583 - On the contrary, β -LG denaturation kinetic parameters and the fouling mass are not
584 positively correlated with the protein concentration of the WPI fouling solutions (prepared at
585 constant calcium content);
- 586 - The microstructure of the fouling layers is impacted by calcium/protein molar ratio. Indeed,
587 the layer is thin, smooth and compact at low calcium/protein molar ratio, and on the contrary
588 very thick, rough and spongy at high calcium/protein molar ratio;
- 589 - Mappings of the highest calcium/protein molar ratio indicate that calcium particles
590 accelerate the growth of the fouling layer by exposing a larger surface for protein deposition;
- 591 - Mappings of the lowest calcium/protein molar ratio indicate that protein–protein interactions
592 are favoured at the expense of protein–calcium particles interactions in the fouling layer;
- 593 - For each model solution with different calcium/protein molar ratio, the plot of deposit mass
594 per channel vs $r = k_{unf}/k_{agg}$ leads to an S curve. The deposit mass per channel increases and
595 the final plateau of the S curve is clearly impacted by the values of calcium/protein molar
596 ratio. It is recommended to determine more systematically the denaturation rate constants of
597 fouling solutions to predict their fouling behaviour and the location of the deposit mass
598 inside the PHE for an imposed temperature profile.

1
2
3 599 **Nomenclature**

4
5 600 Ca calcium concentration, ppm
6
7 601 C_N concentration of native β -LG along the PHE channels, g L^{-1}
8
9 602 C_S soluble β -LG concentration, g L^{-1}
10 603 C_S^0 initial β -LG total soluble concentration (at time zero), g L^{-1}
11
12 604 C_U concentration of unfolded β -LG along the PHE channels, g L^{-1}
13
14 605 E_A activation energy, J mol^{-1}
15
16 606 $E_{A,\text{unf}}$ β -LG unfolding activation energy, J mol^{-1}
17
18 607 $E_{A,\text{agg}}$ β -LG aggregation activation energy, J mol^{-1}
19
20 608 k_n denaturation rate constant, $\text{g}^{1-n} \text{L}^{n-1} \text{s}^{-1}$
21
22 609 k_n° denaturation frequency factor, $\text{g}^{1-n} \text{L}^n \text{s}^{-1}$
23
24 610 k_{unf} unfolding rate constant, $\text{g}^{1-n} \text{L}^{n-1} \text{s}^{-1}$
25
26 611 k_{agg} aggregation rate constant, $\text{g}^{1-n} \text{L}^{n-1} \text{s}^{-1}$
27
28 612 n heat-induced denaturation reaction order
29
30 613 Q flow rate, L h^{-1}
31
32 614 Q_p WPI fouling solution flow rate, L h^{-1}
33
34 615 Q_h hot water flow rate, L h^{-1}
35
36 616 r ratio between the unfolding and aggregation rate constants
37
38 617 R the universal gas constant equal to 8.314, $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
39
40 618 T temperature, K
41
42 619 T_{ip} WPI fouling solution temperature at the PHE inlet, $^\circ\text{C}$
43
44 620 T_{op} hot water temperature at the PHE outlet, $^\circ\text{C}$
45
46 621

47
48
49
50
51
52
53 622 **Acknowledgement**

54
55 623 This work was carried out within the framework of an ALIBIOTECH program. The authors are indebted to the
56 624 scientific committee of Agrocampus Ouest Rennes and HEI (Hautes Etudes d'Ingénieur, Lille) for stimulating
57 625 discussions and financial support for the Ph.D. Thesis of the first author. The authors thank the Haut de France
58 626 region and FEDER for their financial support.
59
60 627

61
62
63 628 **References**

64
65 629 Bansal B, Chen XD, Lin SXQ. 2005. Skim milk fouling during ohmic heating. In: Müller-
66 630 Steinhagen H, Malayeri MR, Watkinson AP, editors. Proceedings of 6th International
67 631 Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning - Challenges and Opportunities, Editors
68 632 Engineering Conferences; 2005 June 5–10; Kloster Irsee, Germany.

1
2
3 633 Bansal B, Chen XD. 2005. Fouling of heat exchangers by dairy fluids – a review. In:
4 634 Müller-Steinhagen H, Malayeri MR, Watkinson AP, editors. Proceedings of 6th International
5 635 Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning - Challenges and Opportunities, Editors
6 636 Engineering Conferences; 2005 June 5–10; Kloster Irsee, Germany.

7
8
9 637 Bansal B, Chen XD. 2006. A Critical Review of Milk Fouling in Heat Exchangers.
10 638 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 5: 27–33.

11
12
13 639 Belmar-Beiny MT, Gotham WR, Paterson WR, Fryer PJ. 1993. The effect of Reynolds
14 640 number and fluid temperature in whey protein fouling. Journal of Food Engineering 19: 119–
15 641 139.

16
17
18 642 Blanpain-Avet P, Hédoux A, Guinet Y, Paccou L, Petit J, Six T, Delaplace G. 2012.
19 643 Analysis by Raman spectroscopy of the conformational structure of whey proteins constituting
20 644 fouling deposits during the processing in a heat exchanger. Journal of Food Engineering 110:
21 645 86–94.

22
23
24 646 Changani SD, Belmar-Beiny MT, Fryer PJ. 1997. Engineering and chemical factors
25 647 associated with fouling and cleaning in milk processing. Experimental Thermal and Fluid
26 648 Science 14: 392–406.

27
28
29 649 Chusuei CC, Goodman DW. 1999. Calcium Phosphate Phase Identification Using XPS and
30 650 Time-of-Flight Cluster SIMS. Analytical Chemistry 71: 149–153.

31
32
33 651 Chen XD, Chen J, Wilson DI. 2001. Modelling whey protein based fouling of heat
34 652 exchangers - Further examining the deposition mechanisms. In: Müller-Steinhagen H, Malayeri
35 653 MR, Watkinson AP, editors. 4th International Conference on Heat Exchanger Fouling –
36 654 Fundamental Approaches and Technical Solutions; 2001 July 8–13; Davos, Switzerland.

37
38
39 655 Christian GK, Changani SD, Fryer PJ. 2002. The effect of adding minerals on fouling from
40 656 whey protein concentrate - development of a model fouling fluid for a plate heat exchanger.
41 657 Trans IChemE C 80: 231–239.

42
43
44 658 de Jong, P, Bouman S, van Der Linder HJ. 1992. Fouling of heat treatment equipment in
45 659 relation to denaturation of β -lactoglobulin. Journal of the Society of Dairy Technology 45(1):
46 660 3–8.

47
48
49 661 Daufin G, Labbé JP, Quemerais A, Brulé G, Michel F, Roignant M, Priol M. 1987. Fouling
50 662 of a heat exchanger surface by whey, milk and model fluids: an analytical study. Lait 67: 339–
51 663 364.

52
53
54 664 de Jong P. 1997. Impact and control of fouling in milk processing. Trends in Food Science
55 665 and Technology 8: 401–405.

- 1
2
3 666 de Jong P, van der Horst HC, Waalewijn R. 1998. Reduction of protein and mineral fouling.
4
5 667 Fouling and Cleaning in Food Processing. In: Wilson DI., Fryer PJ, Hasting APM Eds, editors.
6
7 668 Fouling and Cleaning in Food Processing, (pp. 39-46). Cambridge, England.
8
9 669 Delplace F, Leuliet, JC, Tissier JP. 1994. Fouling experiments of a plate heat exchanger by
10
11 670 whey proteins solutions. *Trans IChemE C* 72 : 163–169.
12
13 671 Delplace F, Leuliet JC, Levieux D. 1997. A reaction engineering approach to the analysis of
14
15 672 fouling by whey proteins of a six-channels-per-pass plate heat exchanger. *Journal of Food*
16
17 673 *Engineering* 34: 91–108.
18
19 674 Delsing BMA, Hiddink J. 1983. Fouling of heat transfer surfaces by dairy fluids.
20
21 675 *Netherlands Milk Dairy Journal* 37: 139–148.
22
23 676 Georgiadis MC, Papageorgiou LG, Macchietto S. 2000. Optimal cleaning policies in heat
24
25 677 exchanger networks under rapid fouling. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 39:
26
27 678 441–454.
28
29 679 Gillham CR, Fryer PJ, Hasting APM, Wilson DI. 2000. Enhanced cleaning of whey protein
30
31 680 soils using pulsed flows. *Journal of Food Engineering* 46: 199–209.
32
33 681 Grandison, AS. 1988. Effects of natural (or seasonal) variation in concentration of
34
35 682 components of milk and addition of divalent cations on ultra-high temperature processing
36
37 683 characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology* 41: 117–119.
38
39 684 Guérin R, Ronse G, Bouvier L, Debreyne P, Delaplace G. 2007. Structure and rate of growth
40
41 685 of whey protein deposit from in situ electrical conductivity during fouling in a plate heat
42
43 686 exchanger. *Chemical Engineering Science* 62: 1948–1957.
44
45 687 Havea P, Singh H, Creamer LK. 2001. Characterization of heat-induced aggregates of β -
46
47 688 lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate
48
49 689 environment. *Journal of Dairy Research* 68: 483–497.
50
51 690 Jeyarajah S, Allen JC. 1994. Calcium binding and salt-induced structural changes of native
52
53 691 and preheated beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 80–85.
54
55 692 Jeurnink TJM, Walstra P, de Kruif CG. 1996. Mechanism of Fouling in Dairy Processing,
56
57 693 *Netherlands Milk and Dairy Journal* 50: 407–426.
58
59 694 Jimenez M, Delaplace G, Nuns N, Bellayer S, Deresmes D, Ronse G, Alogaili G, Collinet-
60
61 695 Fressancourt M, Traisnel M. 2013. Toward the understanding of the interfacial dairy fouling
62
63 696 deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: A multiscale approach. *Journal*
64
65 697 *of Colloid and Interface Science* 404: 192–200.
66
67 698 Khaldi M, Ronse G, André C, Blanpain-Avet P, Bouvier L, Six T, Bornaz S, Croguennec T,
68
69 699 Jeantet R, Delaplace G. 2015a. Denaturation kinetics of whey protein isolate solutions and

1
2
3 700 fouling mass distribution in a plate heat exchanger. *International Journal of Chemical*
4 701 *Engineering*, 2015 (Article ID 139638): 10 p.

5
6 702 Khaldi M, Blanpain-Avet P, Guérin R, Ronse G, Bouvier L, André C, Bornaz S,
7 703 Croguennec T, Jeantet R, Delaplace, G. 2015b. Effect of calcium content and flow regime on
8 704 whey protein fouling and cleaning in a plate heat exchanger. *Journal of Food Engineering* 147:
9 705 68–78.

10 706 Lalande M, René F. 1988. Fouling by milk and dairy product and cleaning of heat
11 707 exchangers. In: Melo LF, Bott TR, Bernardo CA, editors. *Fouling Science and Technology*;
12 708 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 557–574.

13 709 Linmark-Mansson H, Timgren A, Alden G, Paulsson M. 2005. Two-dimensional gel
14 710 electrophoresis of proteins and peptides in bovine milk. *International Dairy Journal* 15: 111–
15 711 121.

16 712 Mahdi Y, Mouheb A, Oufer L. 2009. A dynamic model for milk fouling in a plate heat
17 713 exchanger. *Applied Mathematical Modelling* 33: 648–662.

18 714 McKinnon IR, Yap SE, Augustin MA, Hemar Y. 2009. Diffusing-wave spectroscopy
19 715 investigation of heated reconstituted skim milks containing calcium chloride. *Food*
20 716 *Hydrocolloid* 23(4): 1127–1133.

21 717 Morison KR, Tie S.H. 2002. The Development and Investigation of a Model Milk Mineral
22 718 Fouling Solution. *Food and Bioproducts Processing* 80(4): 326–331.

23 719 Mulvihill, DM, Donovan M. 1987. Whey proteins and their thermal denaturation - A review.
24 720 *Irish Journal of Food Science and Technology* 11: 43–75.

25 721 Müller-Steinhagen H. 1993. Fouling: the ultimate challenge for heat exchanger design. 6th
26 722 *International Symposium on Transport Phenomena in Thermal Engineering*; 1993 May 9-13;
27 723 Seoul, Korea.

28 724 Nielsen BT, Singh H, Latham JM. 1995. Aggregation of bovine β -lactoglobulin A and B on
29 725 heating at 75°C. *International Dairy Journal* 6: 519–527.

30 726 O’Kennedy BT, Mounsey JS. 2009. The dominating effect of ionic strength on the heat-
31 727 induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin in simulated milk ultrafiltrate.
32 728 *International Dairy Journal* 19: 123–128.

33 729 Oldfield DJ, Singh H, Taylor MW. 2005. Kinetics of heat induced whey protein
34 730 denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *Journal*
35 731 *of Dairy Research* 72: 369–378.

- 1
2
3 732 Petit J, Herbig AL, Moreau A, Delaplace G. 2011. Influence of calcium on blactoglobulin
4 733 denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. *Journal of Dairy*
5 734 *Science* 94: 5794–5810.
- 6
7 735 Petit J, Six T, Moreau A, Ronse G, Delaplace G. 2013. β -lactoglobulin denaturation,
8 736 aggregation, and fouling in a plate heat exchanger: pilot-scale experiments and dimensional
9 737 analysis. *Chemical Engineering. Science* 101: 432–450.
- 10
11 738 Phan-Xuan T, Durand D, Nicolai T. 2013. Tuning the structure of protein particles and gels
12 739 with calcium or sodium ions. *Biomacromolecules* 14: 1980–1989.
- 13
14 740 Relkin P. 1996. Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum
15 741 albumin: A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36: 565–
16 742 601.
- 17
18 743 Roefs SPFM, de Kruif KG. 1994. A model for the denaturation and aggregation of β -
19 744 lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry* 226: 883–889.
- 20
21 745 Roefs SPFM, Peppelman HA. 2001. Aggregation and gelation of whey proteins: specific
22 746 effect of divalent cations? In: Dickinson E, Miller R, editors. *Food colloids: Fundamentals of*
23 747 *formulation*, Royal Society of Chemistry Cambridge, UK: 358–368.
- 24
25 748 Sherwin C, Foegeding E. 1997. The effects of CaCl_2 on aggregation of whey proteins.
26 749 *Milchwissenschaft* 52: 93–96.
- 27
28 750 Simons JWFA, Kusters HA, Visschers RW, de Jongh, HHJ. 2002. Role of calcium as trigger
29 751 in thermal beta-lactoglobulin aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 406: 143–
30 752 152.
- 31
32 753 Tissier JP, Lalande M. 1986. Experimental device and methods for studying milk deposit
33 754 formation on heat exchange surfaces. *Biotechnology Progress* 2: 218–229.
- 34
35 755 Tolkach A, Kulozik U. 2007. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal
36 756 denaturation of β -lactoglobulin. *Dairy Science and Technology* 87: 301–315.
- 37
38 757 Toyoda I, Schreier PJR, Fryer PJ. 1994. A computational model for reaction fouling from
39 758 whey protein solutions. In: Fryer PJ, Hasting APM, Jeurnink TJM, editors. *Fouling Cleaning in*
40 759 *Food Processing*; Jesus College, Cambridge, UK.
- 41
42 760 Tsuge H, Tanaka Y, Yoshizawa S, Kuraishi T. 2002. Reactive crystallization behaviour of
43 761 calcium phosphate with and without whey protein addition: *Chemical Engineering Research*
44 762 *and Design* 80: 105–110.
- 45
46 763 van Asselt AJ, Vissers MMM, Smit F, de Jong P. 2005. In-line control of fouling. In: Müller-
47 764 Steinhagen H, Malayeri MR, Watkinson AP, editors. *6th International Conference on Heat*

- 1
2
3 765 Exchanger Fouling and Cleaning - Challenges and Opportunities, Editors Engineering
4
5 766 Conferences; 2005 June 5–10; Kloster Irsee, Germany.
6
7 767 Visser J, Jeurnink, TJM. 1997. Fouling of heat exchangers in the dairy industry.
8
9 768 Experimental Thermal and Fluid Science 14: 407–424.
10
11 769 Xiong YL. 1992. Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of whey
12 770 proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 380–384.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

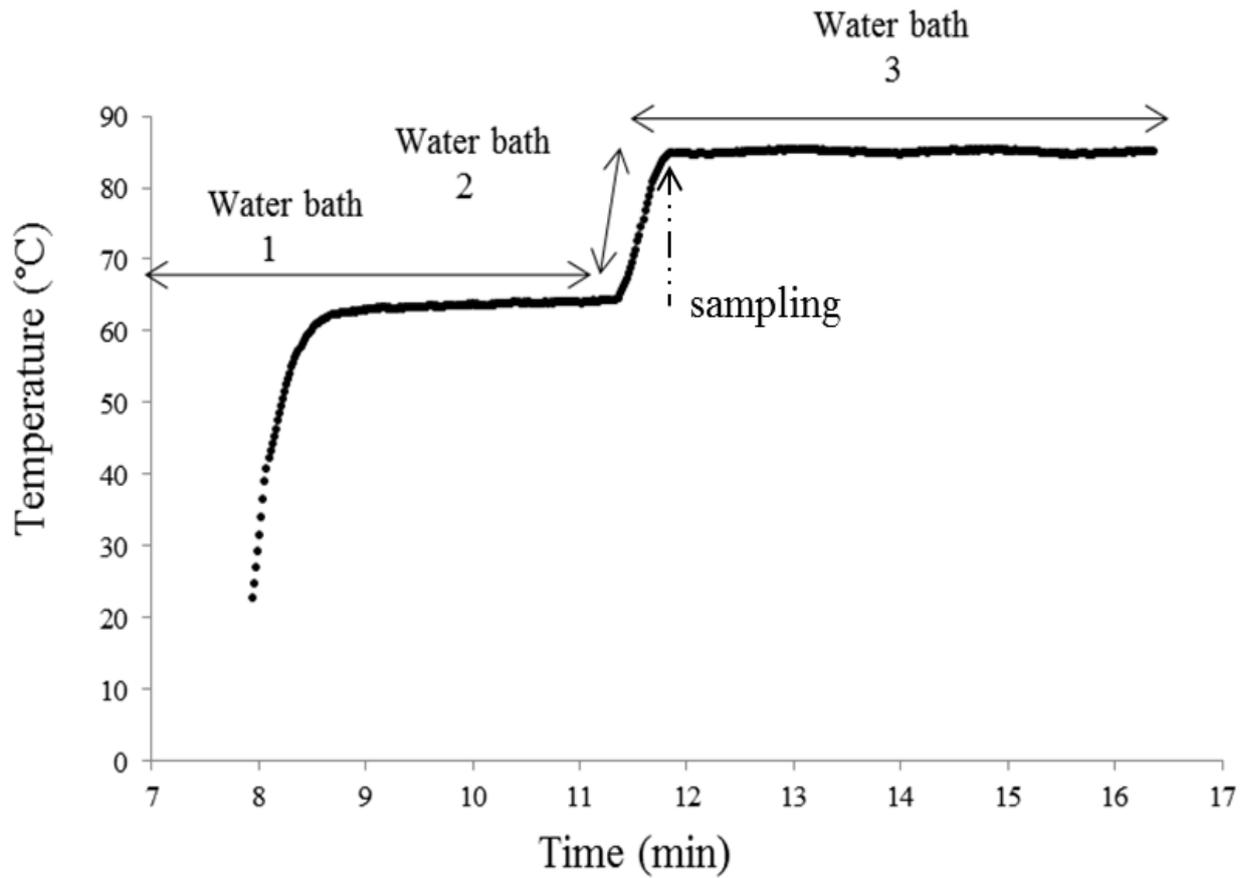


Figure 1. Experimental temperature profiles obtained by immersing the stainless steel tubes containing the protein solution in three successive water baths for the determination of β -LG denaturation rate constants.

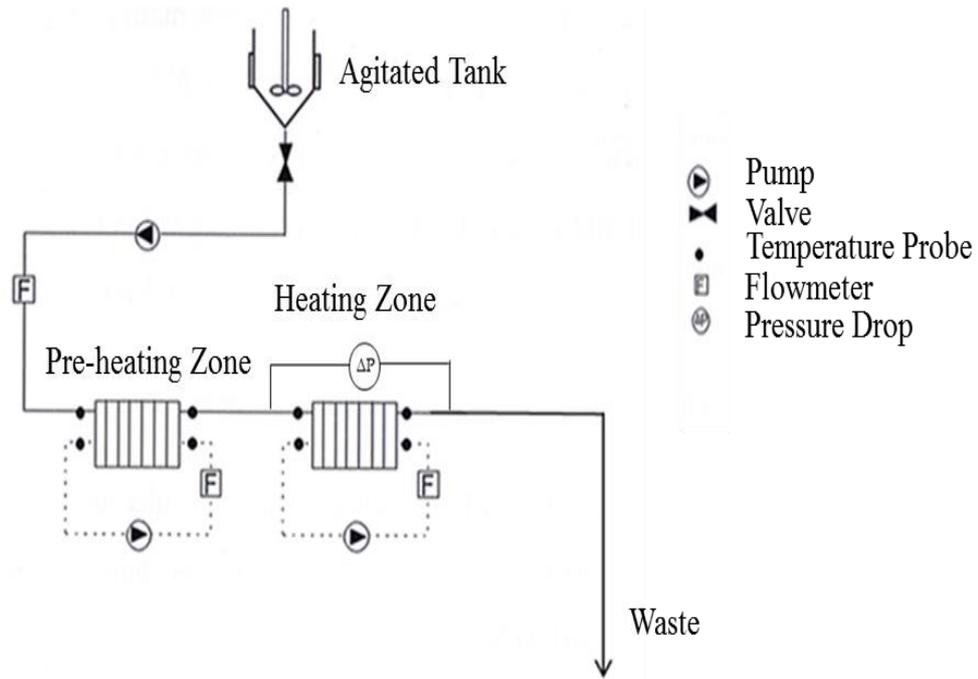


Figure 2. Schematic diagram of the experimental set-up used at pilot scale for the whole fouling experiments.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

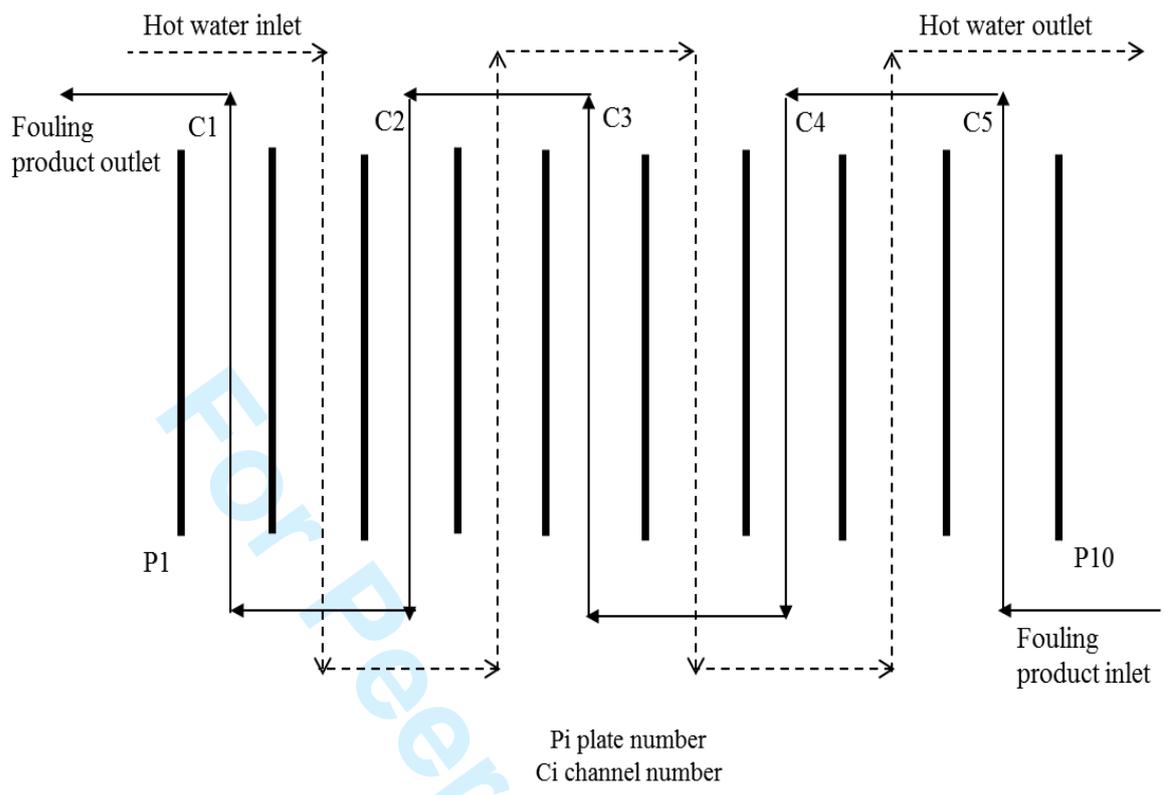


Figure 3. Plate heat exchanger flow arrangement.

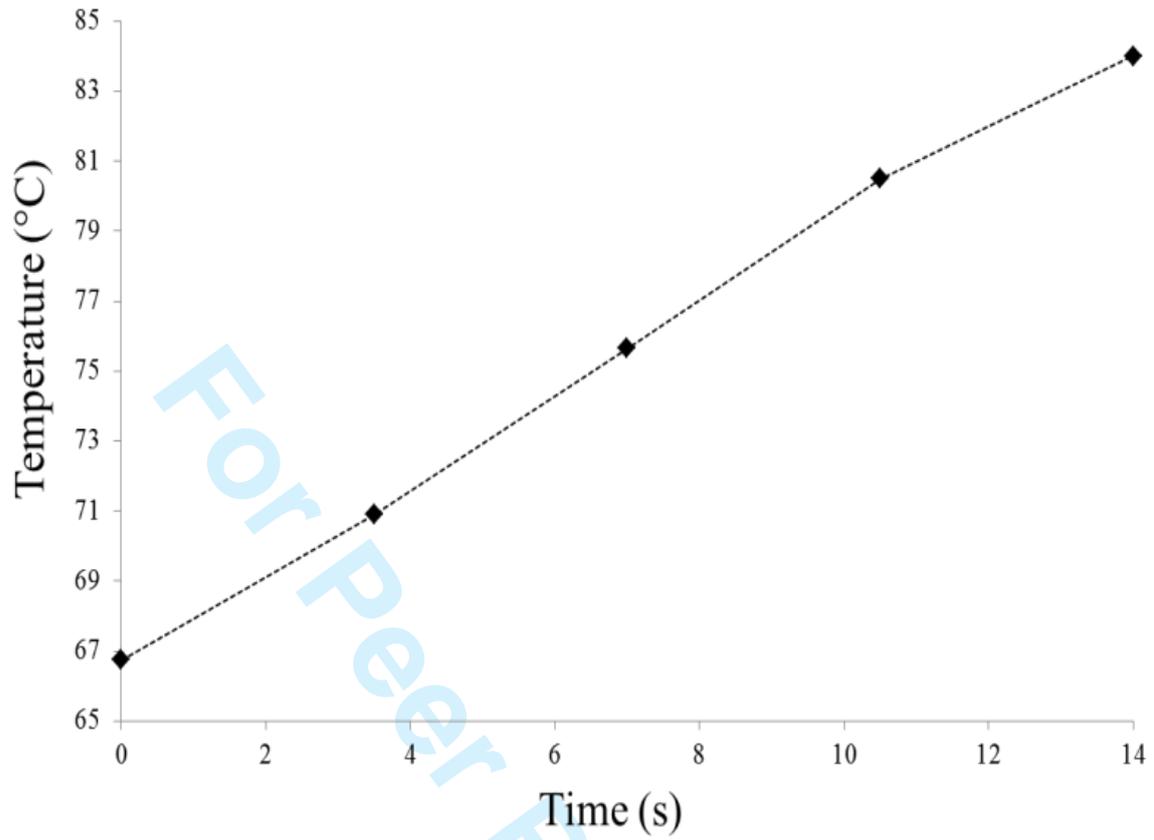


Figure 4. The imposed thermal profile in the PHE.

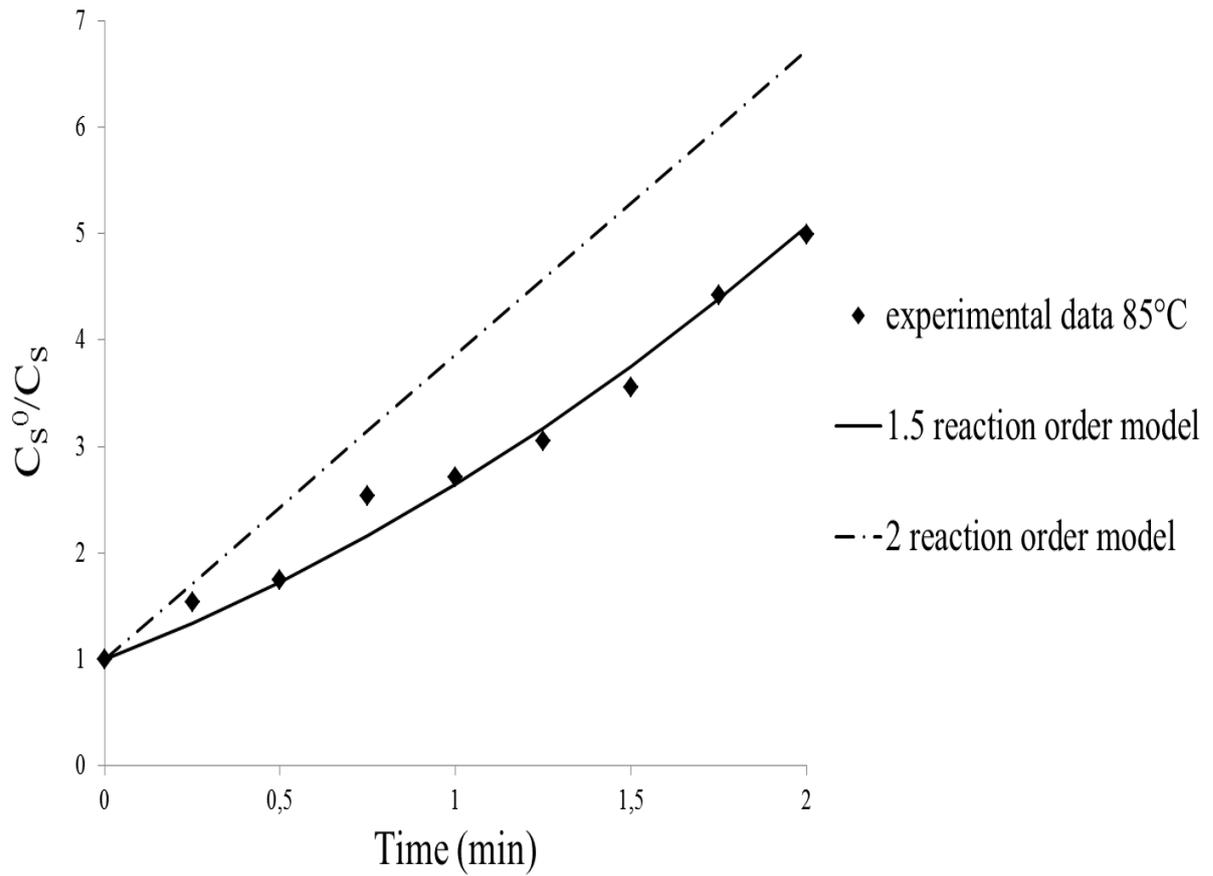


Figure 5. Comparison between the β -LG denaturation models based on different reaction orders (1.5 and 2) at 85°C of 0.5% (w/w) WPI model solution.

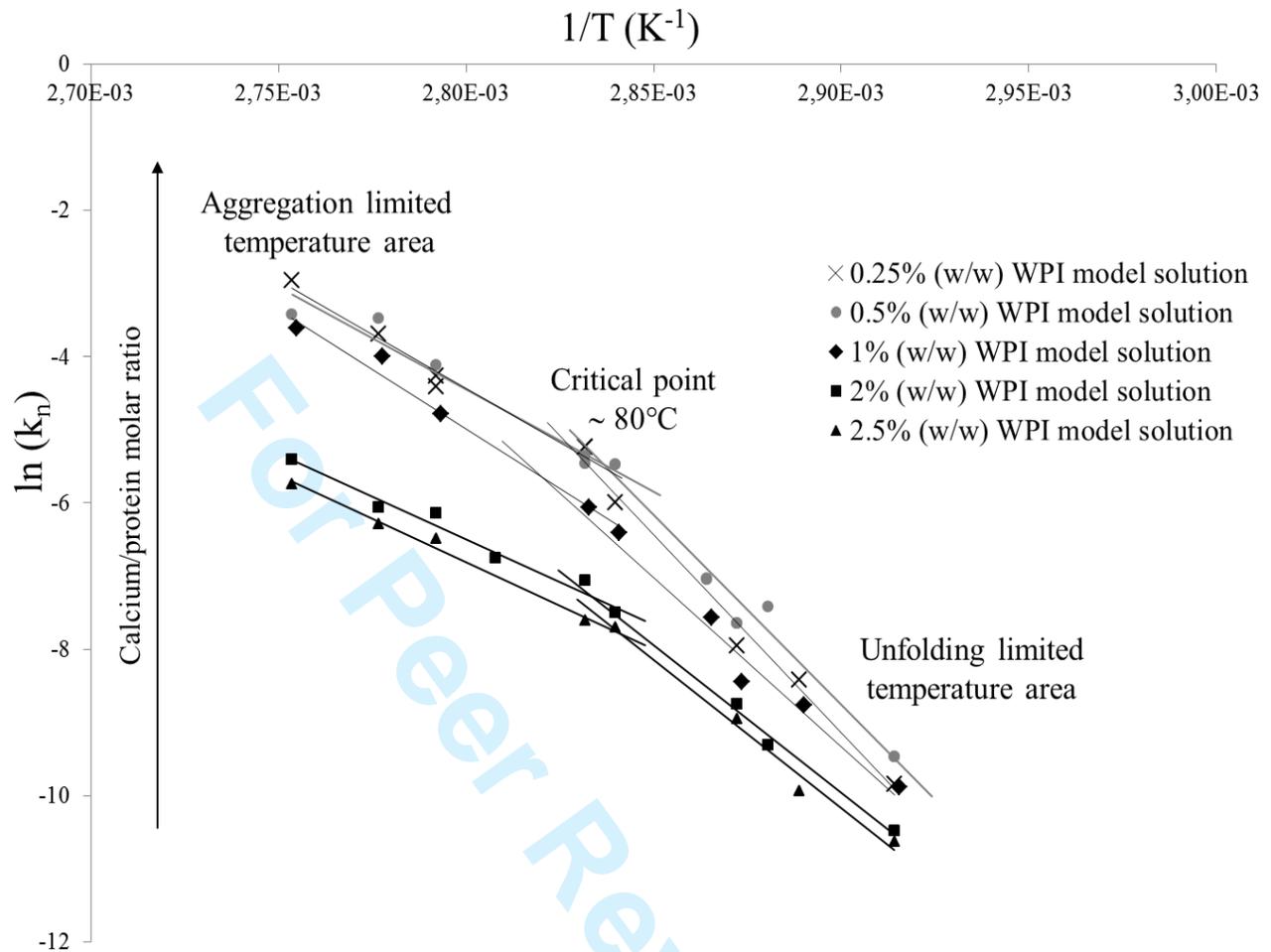


Figure 6. Arrhenius plot for the β -LG denaturation of various heat-treated WPI model solutions (from 0.5 to 2.5% w/w corresponding to calcium/protein molar ratio from 2.3 to 23).

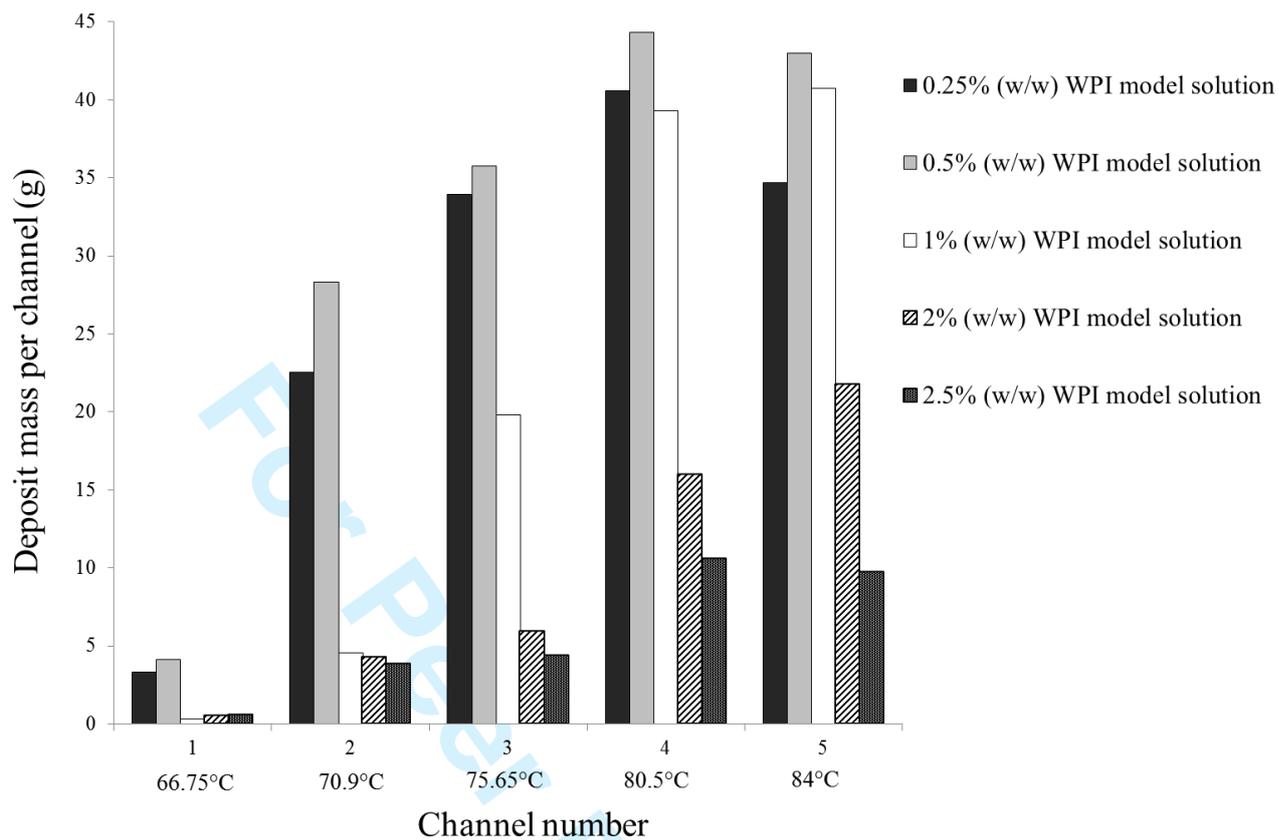


Figure 7. Fouling mass distribution in each channel of the PHE for various WPI fouling solutions (0.25, 0.5, 1, 2 and 2.5% w/w) containing 100 ppm of total calcium, at the same imposed temperature profile.

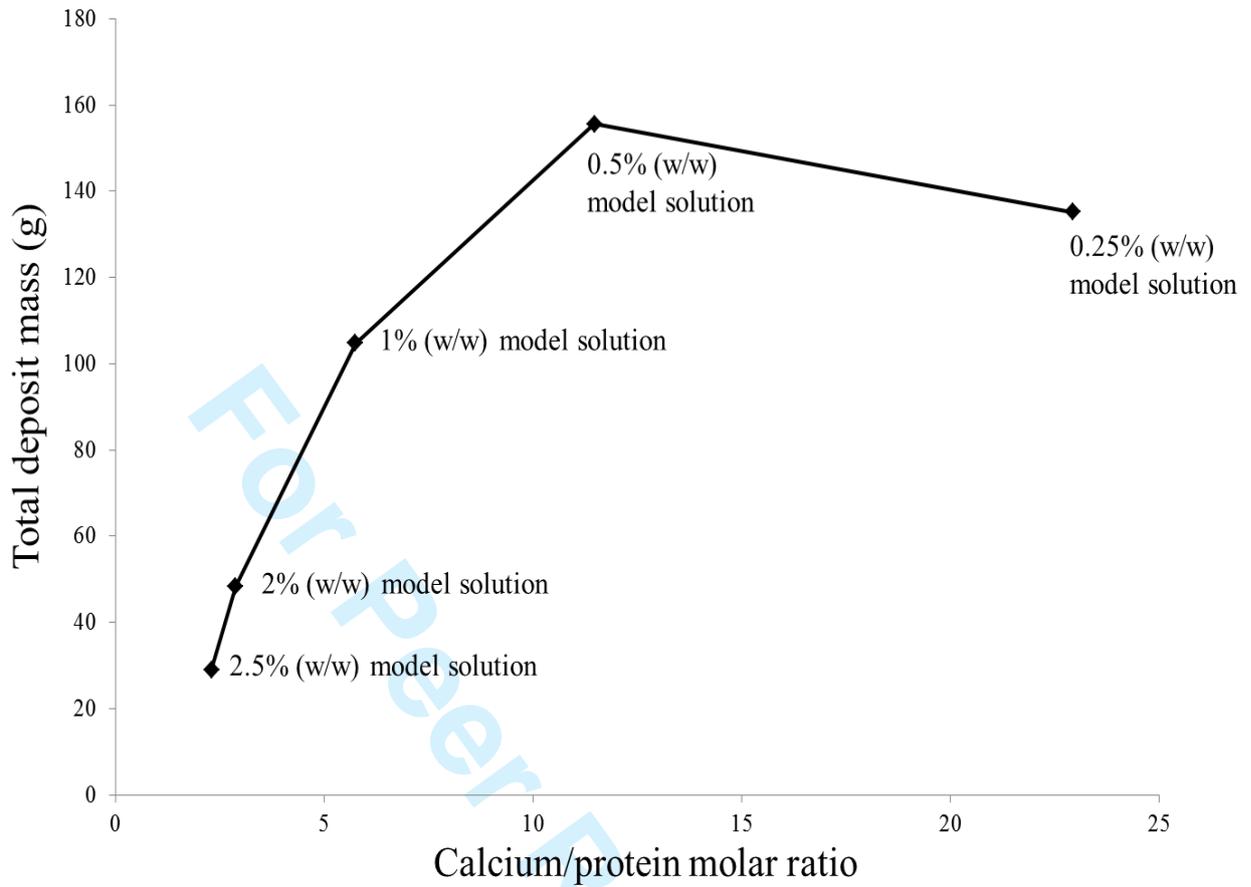
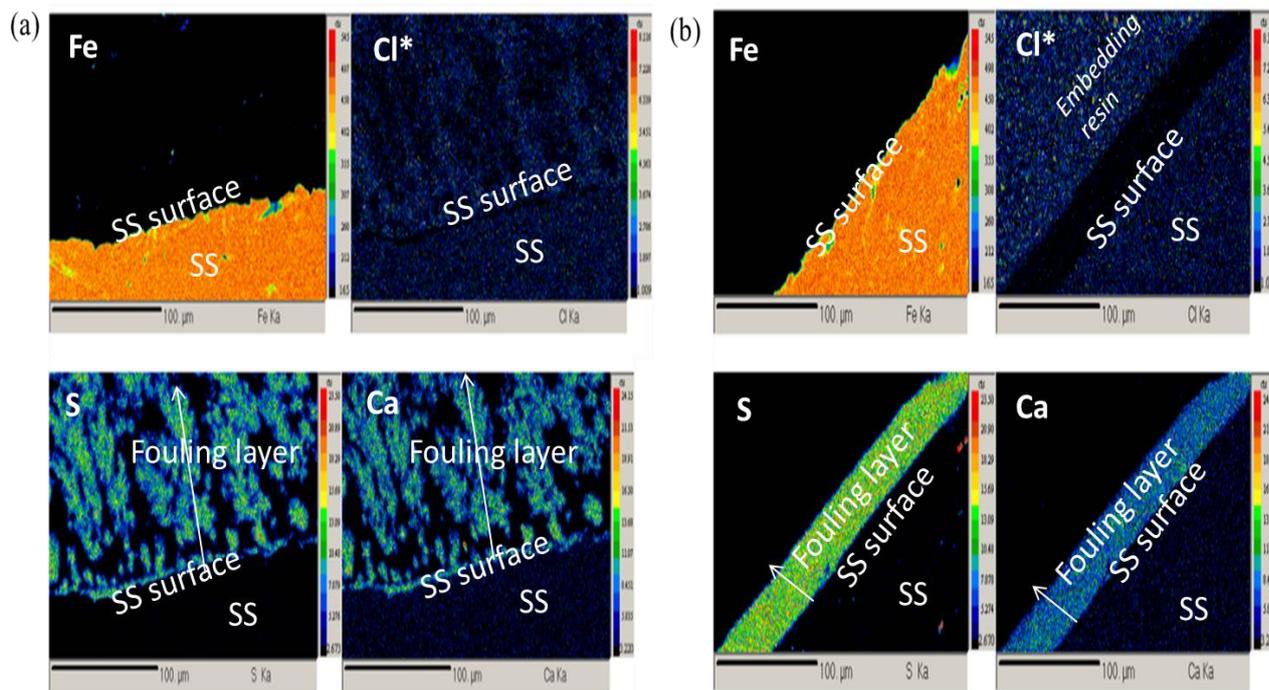


Figure 8. Plot of the total amount of dry deposit mass versus the calcium/protein molar ratio.



Figure 9. Pictures of the deposit layers on the surface of the PHE after conducting a 2 hours fouling experiment with either 0.25 (left) or 2.5% (w/w) (right) WPI model solutions.



**The cross section is embedded in an epoxy resin containing chloride this is why some Cl is detected above the SS surface*

Figure 10. Fe, Cl, S and Ca X-Ray mappings of the cross section of the fouling layer for (a) 0.25% and (b) 2.5% (w/w) WPI model solutions.

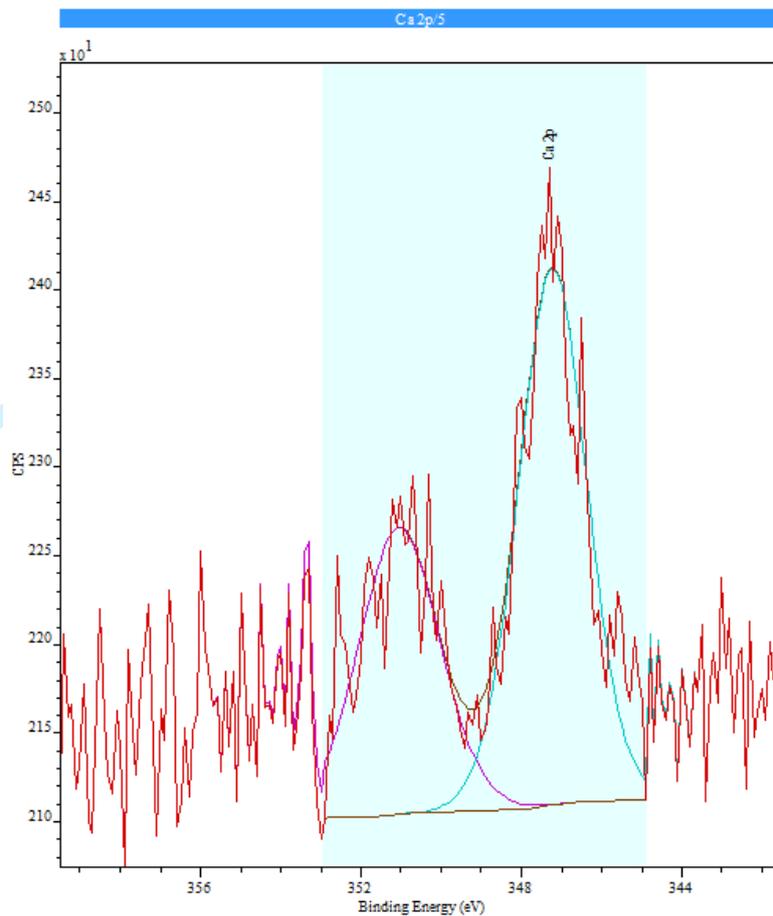


Figure 11. XPS analysis of the calcium containing particles.

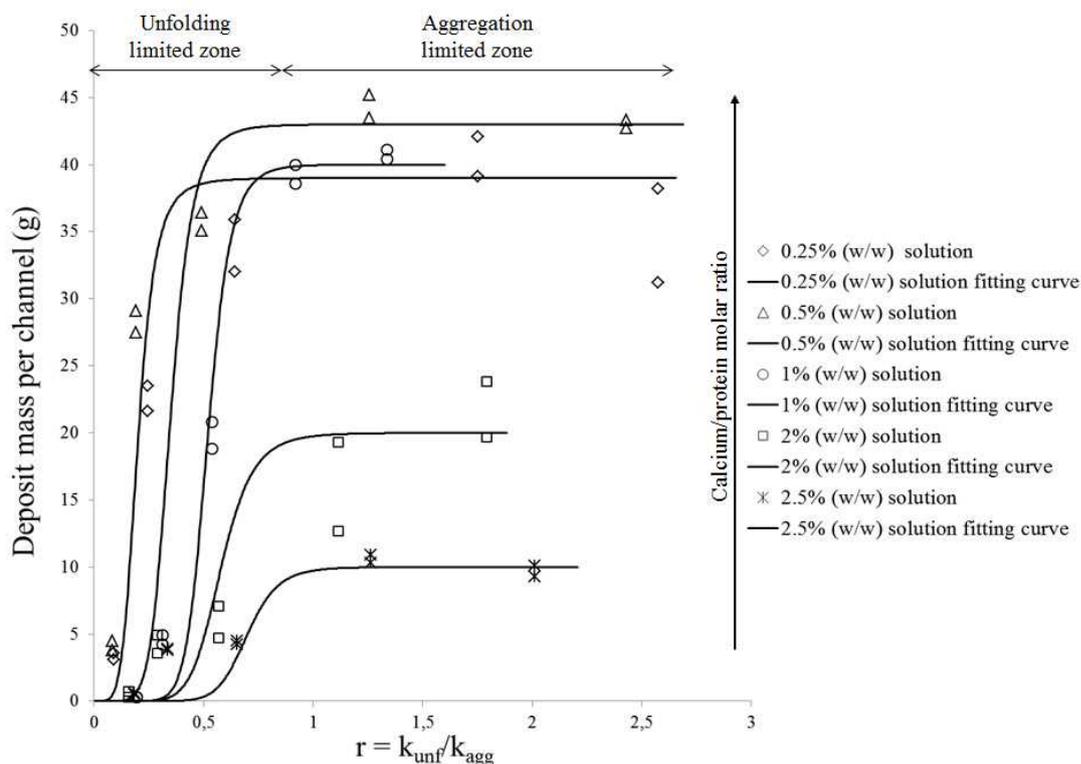


Figure 12. Variation of the dry deposit mass in the various channels of the PHE with the ratio r for the various WPI model solutions.

Table 1. Composition of WPI powder.

Component	Promilk 852FB1(% w/w)
Total proteins	80.1
β -LG	66.0
α -LA	13.3
Fat	1
Lactose	11
Minerals	2.9

Or Peer Review Only

Table 2. Initial and added calcium contents of the different model fouling solutions.

β -LG solution (% w/w)	WPI powder calcium concentration (ppm)	Calcium concentration in CaCl_2 solution (ppm)	Total calcium content (ppm)	Calcium/protein molar ratio
0.25	10	90	100	22.9
0.5	20	80	100	11.5
1	40	60	100	5.7
2	80	20	100	2.9
2.5	100	0	100	2.3

Table 3. Operating conditions investigated with the pilot-scale experimental set: mean inlet and outlet temperatures and flow rates of β -LG concentrate and hot water.

T_{ip} (°C)	T_{op} (°C)	Q_p (L.h ⁻¹)	Q_h (L.h ⁻¹)
65	85	300	300

For Peer Review Only

Table 4. β -LG denaturation parameters at various WPI concentrations and comparison with literature data.

WPI solution	This study				
	0.25	0.5	1	2	2.5
Unfolding					
$\ln(k^{\circ}_{unf})$	147.7	141.8	124.8	107.1	107.4
$E_{A,unf}$ (kJ/mol)	449.9	431.6	384.5	335.7	337.2
Aggregation					
$\ln(k^{\circ}_{agg})$	78.2	74.1	86.3	58.6	59.7
$E_{A,agg}$ (kJ/mol)	245.5	233.5	271.3	193.3	197.6

Rapport de soutenance de thèse

EN COTUTELLE

Nom et prénom : Mme Khaldi Marwa

Titre de la thèse : Etude du lien entre la physico-chimie de dérivés laitiers et leur aptitude à l'encrassement lors du traitement thermomécanique en échangeur de chaleur

Discipline : Génie Biologique et Agro-Alimentaire

Date de soutenance : 24/05/2016

Mardi 24 Mai 2016, Mme Marwa KHALDI a exposé, durant quarante-cinq minutes, ses travaux de thèse portant sur l'« étude du lien entre la physico-chimie de dérivés laitiers et leur aptitude à l'encrassement lors du traitement thermomécanique en échangeur de chaleur ».

Au travers d'un diaporama très bien construit et didactique, questionnements scientifiques, stratégie expérimentale et principaux résultats ont été présentés avec clarté et pédagogie. Cet exercice, délicat compte tenu de la pluridisciplinarité du sujet, a été unanimement apprécié par le jury.

Au cours de la discussion, qui a suivi la présentation, Mme Marwa KHALDI a été soumise à un ensemble de questions variées couvrant différents champs thématiques. Mme Marwa KHALDI a répondu à la majeure partie des interrogations qui lui ont été posées, avec détermination mais de façon calme et raisonnée. Avec justesse et honnêteté, elle a su convaincre les membres du jury des apports originaux de son travail notamment des rôles respectifs de la teneur en calcium et de la dénaturation des protéines dans l'encrassement.

Ses réponses aux questions et ses échanges avec le jury ont ainsi montré sa maîtrise du sujet multi-échelle et également pluridisciplinaire (i.e. génie de la réaction, biochimie, transfert de masse et d'énergie, analyse dimensionnelle...) et ainsi l'étendue de ses compétences.

Après délibération, et pour toutes les raisons évoquées ci-dessus, le jury a décidé d'attribuer à Madame Marwa KHALDI le grade de Docteur d'Université de Lille 1, discipline Génie Biologique et Agro-Alimentaire, avec la mention Très Honorable.

Mention :

Honorable

Très honorable

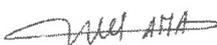
L'USTL n'attribue plus de mention « Très Honorables avec les Félicitations » (par décision du Conseil Scientifique du 15 Juin 2007)

Nombre de page du rapport : 1

Jury :

Président : Thierry Ruiz

Signature des membres :

DELAPLACE Guillaume		RUIZ Thierry	
BORNAZ Salwa		AYADI Mohamed Ali	
ATTIA Hamadi			
FILLAUDEAU Luc			