



HAL
open science

Elaboration de membranes “vertes” de séparation gazeuse à base de gélatine : mécanismes de structuration, réticulation et relations structure-propriétés

Jennifer Biscarat

► To cite this version:

Jennifer Biscarat. Elaboration de membranes “vertes” de séparation gazeuse à base de gélatine : mécanismes de structuration, réticulation et relations structure-propriétés. Génie des procédés. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014. Français. NNT : 2014MON20213 . tel-02115986

HAL Id: tel-02115986

<https://theses.hal.science/tel-02115986>

Submitted on 30 Apr 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences des Procédés –
Sciences des Aliments
Et de l'unité de recherche Institut Européen des Membranes (UMR
5635)

Spécialité : **Génie des Procédés**

Présentée par **Jennifer Biscarat**

**Elaboration de membranes “vertes” de séparation
gazeuse à base de gélatine : mécanismes de
structuration, réticulation et relations structure-
propriétés**

Soutenue le 02/10/2014 devant le jury composé de

Dr. Violette DUCRUET, Ingénieur de recherches-HDR, INRA	Rapporteur
Pr. Eliane ESPUCHE, Professeur, Université Lyon I	Rapporteur
Pr. Jean-Pierre HABAS, Professeur, Université Montpellier 2	Examineur
Dr. Catherine JOLY, Maître de conférences, Université Lyon I	Examinatrice
Dr. Martine MEIRELES-MASBERNAT, Directrice de recherche, CNRS	Examinatrice
Dr. José SANCHEZ, Directeur de recherche, CNRS	Examineur
Dr. Céline POCHAT-BOHATIER, Maître de conférences, Université Montpellier 2	Directrice de thèse

Elaboration de membranes "vertes" de séparation gazeuse à base de gélatine : mécanismes de structuration, réticulation et relations structure-propriétés

L'épuisement des ressources d'origine pétrochimique conduit à la recherche de matières premières renouvelables pour l'élaboration des membranes. La gélatine, un biopolymère abondant, sous-produit de l'industrie agroalimentaire, représente grâce à ses propriétés filmogènes un candidat de choix pour l'élaboration de membranes "vertes". L'objectif de cette thèse est l'élaboration de membranes à base de gélatine et l'étude de l'impact de la structure du matériau sur les propriétés mécaniques, thermiques, de résistance à l'eau et de transfert gazeux. Pour cela les mécanismes d'élaboration par TIG-Dry cast process ont d'abord été formalisés par l'établissement du diagramme de phase du système gélatine/eau. Puis des réticulants alternatifs au glutaraldéhyde, toxique, ont été examinés pour augmenter la résistance à l'eau de la gélatine hydrosoluble. L'acide férulique et le téréphthalaldéhyde se sont montrés les plus prometteurs et complémentaires suivant les applications visées. Les films de gélatine se sont révélés barrières aux gaz à cause de la forte cristallinité induite par la renaturation des triples hélices. L'ajout d'un élastomère de la famille des polyéther amines a permis d'augmenter drastiquement les coefficients de perméabilité du CO₂ de 1,4 à 250 Barrer. L'influence de la température et de l'humidité relative des flux gazeux sur les perméabilités a également été étudiée.

Mots clés : Séparation gazeuse, Gélatine, Membrane, Réticulation, Diagramme de phase

Elaboration of gelatin based "green" gas separation membranes: structuring mechanisms, cross-linking and structure-properties relations

Petroleum based raw materials shortage leads to investigate renewable raw materials for membrane elaboration. Gelatin, an abundant, industrial by-product is a biosourced polymer with filmogenic properties which makes it an educated choice for "green" membrane production. This thesis work aims at developing gelatin based membrane and studying the influence of the material structure on mechanical and thermal properties, water resistance and gas transport properties. Thus, the elaboration mechanisms by TIG/Dry-cast process were studied in details by establishing the phase diagram of the gelatin/water system. To improve the water resistance of the hydrosoluble gelatin, crosslinking is necessary. Alternative cross-linkers were tested to replace the glutaraldehyde, classified as toxic. Ferulic acid and terephthalaldehyde were promising and showed complementary characteristics. The high crystallinity level of gelatin films, related to their renaturation level, led to rather gas barrier properties. By adding an elastomer, polyetheramine, the permeability to CO₂ increased from 1.4 to an outstanding 250 Barrer. The influence of the temperature and relative humidity of the gas flux on permeability was also studied.

Keywords: Gas separation, Gelatin, Membrane, Cross-linking, Phase diagram

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie le Professeur Philippe Miele de m'avoir permis de réaliser ma thèse à l'Institut Européen des Membranes.

Un très grand merci à Céline Pochat, ma directrice de thèse pour trois années de travail très agréables. Merci de m'avoir fait confiance et dès le début de m'avoir considéré comme une collaboratrice à part entière, de m'avoir laissée autonome mais s'être toujours impliquée dans mon sujet.

Merci à José Sanchez pour sa participation et ses idées nombreuses, très nombreuses, trop nombreuses.

Je remercie tout spécialement Christophe Charmette pour toute son aide précieuse, pour le pilote qui marche enfin grâce à lui, pour sa confiance en moi, pour sa patience et son implication sans faille dans le projet malgré ses nombreuses obligations.

Je remercie l'ensemble du personnel administratif pour leur efficacité et pour m'avoir permis de ne pas avoir à penser à toutes ces questions logistiques.

Je remercie les ITA pour leur aide et leur bonne humeur. Merci à Nathalie de m'avoir soutenue dans mon acharnement avec la DSC. Merci à Didier et Arie de m'avoir fait confiance et m'avoir formée. Merci à Eddy pour toutes les discussions fructueuses et sa gentillesse.

Merci aux membres de l'équipe GPM et notamment à Catherine Faur de m'avoir permis de m'impliquer de façon importante dans la vie du labo, à Marie-Pierre Belleville d'avoir pris soin de tous les doctorants et pour nous avoir « attaqués » dans les couloirs avec des chocolats, et à Stéphanie Bocquet pour sa participation à ma thèse et pour tous les débats de geek au détour d'un couloir.

Je remercie certains de mes stagiaires : Benjamin Galea, Priscilla Brandao et Lan Lin à qui je souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie mes co-bureau : Amira, Oualid et Sushumna pour leur résistance au bruit, leur bonne humeur et tous les bons moments passés dans l'aquarium.

Je remercie également tous les doctorants pour ces trois années inoubliables et notamment : Mélisa pour sa défense indéfectible de nos droits, Jullian pour ses discussions philosophiques, Caroline (la deuxième sœur tape-dur) pour son écoute et sa folie, Elsa pour notre passion commune des vieux films, Mathilde pour sa maturité rafraichissante, Damien pour son calme et ses gâteaux, Jean-Fabien pour son écoute le long du tram, Antoine pour ses talents de chanteur, Benoit pour le sauvetage de mon chapitre IV, Vanessa pour avoir repris le rôle de gentille

REMERCIEMENTS

organisatrice, Renaud pour sa jovialité, David pour le tourisme ici et ailleurs et Claudia pour être la fille que j'adorerais pouvoir détester.

Je remercie évidemment Mikael et Matthias parce que ce n'est pas tous les jours qu'on trouve des gens aussi fous que soi, pour leur talent de décorateur, pour les voyages, pour les débats et discussions sans fin, pour la pastèque et surtout pour leur amitié.

Je remercie également tous les gens de l'école de danse et surtout Liliane, Philippe, Aude, Agota et évidemment Alex ; car sans la danse, j'aurais probablement pété un plomb.

Je remercie ma famille qui m'a soutenue quand je leur ai annoncé vouloir reprendre mes études quatre ans après mon diplôme d'ingénieur. Je les remercie d'avoir essayé de comprendre mon sujet de thèse et de tenter de suivre toutes mes pérégrinations.

Enfin un merci spécial à Vinnie et Anna sans qui cette thèse ne se serait pas passée de la même façon. Elles ont été mes *Jiminy Cricket*. Merci pour votre coaching avant le concours de l'ED, pour votre amitié sans faille et pour m'avoir menacée d'un coup de pied au c* magistral si je tombais dans le syndrome du thésard de 3^{ème} année qui pleure sur son sort.

INTRODUCTION GENERALE	1
BIBLIOGRAPHIE	5
1. LA GELATINE	6
1.1. STRUCTURE DE LA GELATINE	6
1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA GELATINE : LA GELIFICATION	10
1.2.1. <i>La transition sol/gel</i>	10
1.2.2. <i>Renaturation de la gélatine</i>	13
1.3. APPLICATIONS DE LA GELATINE	15
2. PROCEDES D'ELABORATION DE FILMS DE GELATINE	17
2.1. LA PLASTIFICATION	17
2.2. PROCEDES D'ELABORATION	21
3. LA RETICULATION CHIMIQUE DE LA GELATINE	26
3.1. PRINCIPE DE LA RETICULATION CHIMIQUE	26
3.2. LE GLUTARALDEHYDE	26
3.3. LES RETICULANTS ALTERNATIFS	29
3.3.1. <i>Un dialdéhyde alternatif : le téréphthalaldéhyde</i>	29
3.3.2. <i>Un phénol biosourcé : l'acide férulique</i>	30
3.3.3. <i>Les N-hydroxysuccinimide esters</i>	32
4. PROPRIETES DES FILMS DE GELATINE	33
4.1. PROPRIETES MECANIQUES EN TRACTION	33
4.1.1. <i>Influence de la plastification</i>	34
4.1.2. <i>Influence de la réticulation chimique</i>	35
4.1.3. <i>Influence de l'origine de la gélatine</i>	36
4.1.4. <i>Influence du Bloom</i>	37
4.1.5. <i>Influence des conditions de séchage</i>	38
4.2. PROPRIETES THERMIQUES	39
4.3. PROPRIETES DE TRANSFERT GAZEUX A TRAVERS DES FILMS MINCES	43
4.3.1. <i>Rappels théoriques</i>	43
4.3.1.1. Le modèle de solution-diffusion	43
4.3.1.2. Le coefficient de diffusion (D)	44
4.3.1.3. Le coefficient de solubilité (S)	46
4.3.1.4. Les modes de sorption	46
4.3.1.5. Le coefficient de perméabilité (Pe)	48
4.3.1.6. La sélectivité	49
4.3.2. <i>Paramètres influençant les propriétés de transport</i>	49
4.3.2.1. Influence de la nature du gaz	50

4.3.2.2.	Influence de la température.....	50
4.3.2.3.	Influence de l'humidité relative.....	51
4.3.2.4.	Influence de la cristallinité.....	51
4.3.2.5.	Influence de la réticulation.....	51
4.3.3.	<i>Synthèse des résultats obtenus dans la littérature pour la gélatine</i>	52
5.	LA FAMILLE DES POLYETHER AMINES.....	55
5.1.	STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	55
5.2.	PROPRIETES DE TRANSPORT GAZEUX.....	56
6.	CONCLUSIONS - OBJECTIFS.....	59
	<u>MATERIELS ET METHODES.....</u>	60
1.	MATERIEL.....	61
1.1.	LA GELATINE.....	61
1.2.	LES PLASTIFIANTS : LES POLYETHYLENE GLYCOLS (PEG).....	61
1.3.	LES RETICULANTS.....	61
1.4.	LES POLYETHER AMINES.....	62
2.	METHODES.....	64
2.1.	PREPARATION DES SOLUTIONS ET GELS DE GELATINE.....	64
2.1.1.	<i>Réticulation avec le glutaraldéhyde (GTA)</i>	64
2.1.2.	<i>Réticulation avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) :</i>	64
2.1.3.	<i>Réticulation avec le Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)₉)</i>	64
2.1.4.	<i>Réticulation avec l'acide férulique (FA)</i>	65
2.1.5.	<i>Réticulation avec le téréphthalaldéhyde (TPA)</i>	65
2.2.	PREPARATION DES SOLUTIONS DES MELANGES GELATINE/POLYETHER AMINE.....	65
2.3.	CARACTERISATIONS DES GELS.....	65
2.3.1.	<i>Cinétiques de réticulation</i>	65
2.3.2.	<i>Calcul du taux de réticulation</i>	66
2.4.	PROCEDE DE FABRICATION DES FILMS.....	67
2.5.	CARACTERISATIONS STRUCTURELLES DES FILMS.....	67
2.5.1.	<i>Microscopie électronique à balayage (MEB)</i>	67
2.5.2.	<i>Spectroscopie infra-rouge (FTIR)</i>	68
2.5.3.	<i>Calorimétrie</i>	68
2.5.3.1.	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	68
2.5.3.2.	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	69
2.5.4.	<i>Diffraction des rayons X (DRX)</i>	69
2.6.	CARACTERISATIONS FONCTIONNELLES DES FILMS.....	70
2.6.1.	<i>Propriétés mécaniques</i>	70

2.6.2.	<i>Tests de swelling</i>	71
2.6.3.	<i>Isotherme de sorption d'eau</i>	72
2.7.	CARACTERISATION DES PROPRIETES DE TRANSPORT GAZEUX	74
2.7.1.	<i>Perméation de gaz purs secs en mode frontal</i>	75
2.7.1.1.	Dispositif expérimental.....	75
2.7.1.2.	Protocole d'expérimentation	76
2.7.1.3.	Détermination expérimentale des coefficients de diffusion et de perméabilité	76
2.7.1.	<i>Perméation de mélange Air/CO₂ à humidité contrôlée en mode tangentiel</i>	80
2.7.1.1.	Dispositif expérimental.....	80
2.7.1.2.	Protocole d'expérimentation	83
2.7.1.3.	Détermination expérimentale des coefficients de perméabilité	84
2.8.	STATISTIQUES	86
PROCEDE D'ELABORATION DE MEMBRANES DE GELATINE.....		87
1.	INTRODUCTION DU CHAPITRE III	88
2.	PUBLICATION 1 :	92
PREPARATION OF DENSE SELF-SUPPORTED GELATIN MEMBRANES BY COMBINING TEMPERATURE INDUCED GELATION AND DRY-CASTING		92
2.1.	GRAPHICAL ABSTRACT.....	92
2.2.	ABSTRACT.	92
2.3.	INTRODUCTION	93
2.4.	EXPERIMENTAL.....	94
2.4.1.	<i>Materials</i>	94
2.4.2.	<i>Preparation of membranes</i>	94
2.4.3.	<i>Characterization</i>	94
2.4.3.1.	Morphological observation	94
2.4.3.2.	Measurement of sol/gel transitions	94
2.4.3.3.	Mechanical properties.....	95
2.4.3.4.	Measurements of the gel/membrane transition	95
2.4.3.5.	Sorption isotherm.....	95
2.4.3.6.	Fast Scan Differential Scanning Calorimetry	96
2.4.3.7.	Gas permeation experiments	97
2.4.3.8.	Statistical analysis.....	97
2.5.	RESULTS AND DISCUSSION	98
2.5.1.	<i>Preparation of gelatin dense membranes</i>	98
2.5.1.1.	Determination of the casting temperature	98
2.5.1.2.	Gelatin gel/membrane transition : drying	99
2.5.1.3.	Membrane stability domain	103
2.5.1.4.	Temperature Induced Gelation/Dry-cast process	105

2.5.2.	<i>Addition of a plasticizer</i>	<i>107</i>
2.5.3.	<i>Gas permeability</i>	<i>109</i>
2.6.	CONCLUSIONS.....	112
3.	CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.....	113
	<u>RETICULATION CHIMIQUE DE LA GELATINE.....</u>	<u>114</u>
1.	INTRODUCTION.....	115
2.	PUBLICATION 2:	116
	DEVELOPMENT OF A NEW FAMILY OF FOOD PACKAGING BIOPLASTICS FROM CROSS-LINKED GELATIN BASED FILMS	116
2.1.	ABSTRACT	116
2.2.	INTRODUCTION	116
2.3.	EXPERIMENTAL.....	118
2.3.1.	<i>Materials.....</i>	<i>118</i>
2.3.2.	<i>Film preparation</i>	<i>118</i>
2.3.3.	<i>Morphological observation.....</i>	<i>118</i>
2.3.4.	<i>Mechanical properties</i>	<i>119</i>
2.3.5.	<i>Swelling kinetics.....</i>	<i>119</i>
2.3.6.	<i>Gas permeation experiments.....</i>	<i>119</i>
2.3.1.	<i>Statistical analysis.....</i>	<i>120</i>
2.4.	RESULTS AND DISCUSSIONS.....	120
2.4.1.	<i>Cross-linkers selection.....</i>	<i>120</i>
2.4.2.	<i>Film morphology</i>	<i>121</i>
2.4.3.	<i>Film Mechanical properties.....</i>	<i>123</i>
2.4.1.	<i>Water resistance</i>	<i>125</i>
2.4.2.	<i>Films gas transfer properties</i>	<i>125</i>
2.5.	CONCLUSION	127
3.	INTRODUCTION DE LA PUBLICATION 3.....	129
4.	PUBLICATION 3:	130
	CROSS-LINKING OF GELATIN MEMBRANES WITH FERULIC ACID OR GLUTARALDEHYDE: RELATIONSHIP BETWEEN GAS PERMEABILITY AND RENATURATION LEVEL OF GELATIN TRIPLE HELICES	130
4.1.	TOC	130
4.2.	ABSTRACT	130
4.3.	INTRODUCTION	131
4.4.	EXPERIMENTAL.....	133
4.4.1.	<i>Materials.....</i>	<i>133</i>

4.4.2.	<i>Preparation of membranes</i>	134
4.4.1.	<i>Mechanical properties</i>	135
4.4.2.	<i>Cross-linking ratio: TNBS assays</i>	135
4.4.3.	<i>Thermal properties</i>	136
4.4.4.	<i>Infrared spectra measurements</i>	136
4.4.5.	<i>Gas permeation experiments</i>	136
4.4.6.	<i>Statistical analysis</i>	137
4.5.	RESULTS AND DISCUSSIONS.....	137
4.5.1.	<i>Influence of cross-linking method on gelatin membrane characteristics</i>	137
4.5.2.	<i>Effect of polyethylene glycol 200 addition</i>	139
4.5.3.	<i>Gas permeability</i>	142
4.1.	CONCLUSION	145
5.	INTRODUCTION DE LA PUBLICATION 4	147
6.	PUBLICATION 4:	149
	EFFECT OF CHEMICAL CROSS-LINKING ON GELATIN MEMBRANE SOLUBILITY WITH A NON-TOXIC AND NON-VOLATILE AGENT: TEREPHTHALALDEHYDE	149
6.1.	TOC	149
6.2.	ABSTRACT	149
6.3.	INTRODUCTION	149
6.4.	EXPERIMENTAL SECTION.....	151
6.4.1.	<i>Materials</i>	151
6.4.2.	<i>Preparation of gels and films</i>	151
6.4.3.	<i>Thickness measurement</i>	152
6.4.4.	<i>Rheological analysis</i>	152
6.4.5.	<i>2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assays</i>	152
6.4.6.	<i>Water content</i>	153
6.4.7.	<i>Swelling kinetics</i>	153
6.4.1.	<i>Water vapor resistance</i>	153
6.4.2.	<i>Statistical analysis</i>	154
6.5.	RESULTS AND DISCUSSION	154
6.5.1.	<i>Cross-linking reaction in gelatin solutions</i>	154
6.5.1.1.	Effect of the solution's temperature	154
6.5.1.2.	Influence of TPA concentration	157
6.5.2.	<i>Influence of TPA cross-linking on gelatin membranes properties</i>	159
6.5.2.1.	Swelling kinetics	160
6.5.2.2.	Water vapor resistance.	161
6.5.2.3.	Mechanical properties.....	163

6.6.	CONCLUSION	164
7.	COMPLEMENT A LA PUBLICATION 4 : RELATION PERMEATION/STRUCTURE DES FILMS DE GELATINE RETICULES AVEC LE TEREPTHALALDEHYDE.....	166
8.	CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV	168
	<u>ELABORATION DE MEMBRANES GELATINE/POLYETHER AMINE.....</u>	170
1.	INTRODUCTION.....	171
2.	PUBLICATION 5:	172
	GAS PERMEABILITY PROPERTIES OF GELATIN/POLYETHERAMINE BLEND MEMBRANES MADE WITHOUT ORGANIC SOLVENT.....	172
2.1.	GRAPHICAL ABSTRACT.....	172
2.2.	ABSTRACT	172
2.3.	INTRODUCTION	173
2.4.	EXPERIMENTAL.....	174
2.4.1.	<i>Materials.....</i>	<i>174</i>
2.4.2.	<i>Preparation of membranes.....</i>	<i>175</i>
2.4.3.	<i>Differential scanning calorimetry (DSC).....</i>	<i>176</i>
2.4.4.	<i>X-Ray diffraction</i>	<i>176</i>
2.4.5.	<i>Gas permeation experiments.....</i>	<i>177</i>
2.5.	RESULTS AND DISCUSSIONS.....	177
2.5.1.	<i>Influence of temperature on gas permeability.....</i>	<i>177</i>
2.5.2.	<i>Influence of formulation on gas permeability.....</i>	<i>180</i>
2.5.3.	<i>Selectivity.....</i>	<i>185</i>
2.6.	CONCLUSIONS.....	186
3.	COMPLEMENT A LA PUBLICATION 5: LES COEFFICIENTS DE DIFFUSION	188
4.	INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE SUR LES PROPRIETES DE PERMEATION GAZEUSE	190
5.	CONCLUSIONS DU CHAPITRE V	197
	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	198
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	204
	<u>ANNEXES</u>	215
	<u>ANNEXE A : LES PRINCIPES DE LA CHIMIE VERTE.....</u>	216
	<u>ANNEXE B : GLOSSAIRE.....</u>	217

Chapitre I

Figure I- 1 Organisation des fibres de collagène (Vicky Earle, Medical Illustration)..... 6

Figure I- 2 Acides aminés constituant le collagène et la gélatine, adapté de (Dan Cojocari, University of Toronto 2010) 7

Figure I- 3 Structure du tropocollagène. (a,b) une séquence de motifs Gly-X-Pro ou Gly-X-Hyp adopte une structure d'hélice gauche avec 3 résidus par tour. (c) 3 de ces hélices gauches s'enroulent pour former une triple hélice droite. (d) vue du dessus de la triple hélice, en rouge sont représentés les résidus de glycine (Lehninger *et al.* 1993) 8

Figure I- 4 Distribution de masse molaire typique pour une gélatine obtenue par traitement basique (type B) et par traitement acide (type A) (Schrieber *et al.* 2007a)..... 9

Figure I- 5 Réseau à structure d'arbre, théorie de Flory-Stockmayer (El Harfaoui 2007)11

Figure I- 6 Schéma théorique de l'évolution des modules de perte G'' et de conservation G' dans le cas d'une gélification12

Figure I- 7 Structure du gel physique de gélatine après renaturation (Hellio Serughetti 2004)....13

Figure I- 8 Images de microscopie électronique en transmission pour un gel de gélatine à (a) 2 % et épaisseur des répliques $h = 0,10 \pm 0,01 \mu\text{m}$, (b) 10% et épaisseur des répliques $h = 0,015 \pm 0,005 \mu\text{m}$ (Djabourov *et al.* 1993)14

Figure I- 9 Représentation de la formation de la multicouche polymoléculaire d'eau liée sur les triples hélices de collagène. (a) triple hélice nue, (b) ajout de l'eau de structure, (c,d) formation de la multicouche (Bella *et al.* 1995)15

Figure I- 10 Effet de la masse molaire des PEG sur les propriétés mécaniques de films de gélatine bovine (Cao *et al.* 2009) : (a) contrainte à la rupture, (b) module d'Young, (c) élongation à la rupture.20

Figure I- 11 Effets de la plastification sur la température de transition vitreuse de films d'hydrolysats de collagène (Langmaier *et al.* 2008) : (1) PEG 3350, (2) PEG 400, (3) PEG 600, (4) PEG 300 et (5) glycérol.....21

Figure I- 12 Extrudeuse simple vis utilisée par Park *et al.* (Park *et al.* 2008) : (A) cylindre, (B) zone de chauffe, (C) élément de centrage, (D) filière, (E) film de gélatine, (F) bobineuse refroidisseuse, (G) réservoir matière première et (H) panneau de contrôle22

Figure I- 13 Influence du procédé d'élaboration des films de gélatine sur les propriétés mécaniques (Park *et al.* 2008; Krishna *et al.* 2012) sur la température de transition vitreuse (Krishna *et al.* 2012)25

Figure I- 14 Forme possible du glutaraldéhyde en solution aqueuse (Migneault *et al.* 2004)27

Figure I- 15 Réaction de condensation des molécules de glutaraldéhyde (Farris *et al.* 2009).....27

Figure I- 16 Réactions du polymère de glutaraldéhyde avec les protéines en conditions basiques (Migneault *et al.* 2004)28

Figure I- 17 Réaction du polymère de glutaraldéhyde avec les protéines en conditions acides (Farris <i>et al.</i> 2009).....	29
Figure I- 18 Structure chimique du téréphthalaldéhyde.....	30
Figure I- 19 Réaction de réticulation des fonctions amines du chitosan avec le téréphthalaldéhyde (Chu <i>et al.</i> 2013)	30
Figure I- 20 Structure chimique de l'acide férulique.....	31
Figure I- 21 Modèle de mécanisme de réaction entre les parties lysine d'une protéine et la forme quinone d'un polyphénol (Rawel <i>et al.</i> 2001)	31
Figure I- 22 Structure chimique de la N-hydroxysuccinimide.....	32
Figure I- 23 Réactions de réticulation du collagène (coll) avec une carbodiimine ($R_1-N=C=N-R_2$) et le N-hydroxysuccinimide (Olde Damink <i>et al.</i> 1996a)	32
Figure I- 24 Diagramme classique contrainte vs. élongation d'un test en traction (Yakimets <i>et al.</i> 2005)	34
Figure I- 25 Valeurs moyennes des propriétés mécaniques des films de gélatine obtenus par procédé en solvant, plastifiés ou non, référencés dans la littérature : (Bigi <i>et al.</i> 1998; Bigi <i>et al.</i> 2001; Bigi <i>et al.</i> 2004; Carvalho <i>et al.</i> 2004; Bertan <i>et al.</i> 2005; Thomazine <i>et al.</i> 2005; Yakimets <i>et al.</i> 2005; Dai <i>et al.</i> 2006b; Bergo <i>et al.</i> 2007; Cao <i>et al.</i> 2007; Wang <i>et al.</i> 2007; Carvalho <i>et al.</i> 2008b; Chiou <i>et al.</i> 2008; Park <i>et al.</i> 2008; Cao <i>et al.</i> 2009; Chiou <i>et al.</i> 2009; Rivero <i>et al.</i> 2010; Andreuccetti <i>et al.</i> 2011; Ahmad <i>et al.</i> 2012; Martucci <i>et al.</i> 2012; Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b; Jridi <i>et al.</i> 2013; Ortiz-Zarama <i>et al.</i> 2014).....	35
Figure I- 26 Influence de la réticulation avec du glutaraldéhyde sur (a) le module d'Young, (b) la contrainte à la rupture et (c) l'élongation à la rupture de films de gélatine porcine (Bigi <i>et al.</i> 2001)	36
Figure I- 27 Influence de la réticulation avec de l'acide férulique sur la contrainte () et l'élongation à la rupture de films () de gélatine bovine (Cao <i>et al.</i> 2007)	36
Figure I- 28 Influence de l'origine de la gélatine sur les propriétés mécaniques (Chiou <i>et al.</i> 2008; Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)	37
Figure I- 29 Influence du Bloom de la gélatine sur les propriétés mécaniques, adapté de (Bigi <i>et al.</i> 2004).....	38
Figure I- 30 Influence de la température de séchage des films de gélatine de colin sur les propriétés mécaniques, adapté de (Chiou <i>et al.</i> 2009)	39
Figure I- 31 Influence de l'ajout de glutaraldéhyde et du procédé de réticulation sur la température de transition vitreuse ; (Méthode A) trempe des films de gélatine dans une solution de glutaraldéhyde, (méthode B) ajout du réticulant directement dans la solution de gélatine avant coulage. Adapté de (Catalina <i>et al.</i> 2011).....	40
Figure I- 32 Influence de la concentration et de la nature des plastifiants sur la température de transition vitreuse de film en gélatine porcine. Adapté de (Vanin <i>et al.</i> 2005).....	41

Figure I- 33 Influence de la température de séchage sur le degré de renaturation de films de gélatine bovine (Dai <i>et al.</i> 2006a).....	42
Figure I- 34 Influence de quantité d'eau présente dans des films de gélatine bovine sur l'enthalpie et la température de dénaturation (Yakimets <i>et al.</i> 2005).....	43
Figure I- 35 Schématisation du mécanisme de solution-diffusion lors de la perméation de gaz à travers une membrane dense.....	44
Figure I- 36 Mode de sorption classiques : nature des interactions et allure des isothermes (Klopffer <i>et al.</i> 2001).....	47
Figure I- 37 Influence de la température et de la vitesse d'extrusion sur la perméabilité de l'oxygène pour des films de plastifié avec du glycérol de gélatine bovine (),.....	53
Figure I- 38 Structure chimique des diamines (A) et des triamines (B).....	55

Chapitre II

Figure II-1 Domaines linéaires des solutions de gélatine à différents vieillissements.....	66
Figure II- 2 Exemple de calcul de taux de cristallinité avec le logiciel Origin	70
Figure II- 3 Montage expérimental pour la mesure des isothermes de sorption	73
Figure II- 4 Représentation schématique du perméamètre à flux frontal.....	75
Figure II- 5 Allure d'une courbe expérimentale de perméation gazeuse	77
Figure II- 6 Représentation schématique du pilote de perméation en flux tangentiel à humidité contrôlée	82
Figure II- 7 Représentation schématique de la vanne 10 voies du GC en position ON et OFF	84

Chapitre III

Figure III- 1 Allure typique des courbes obtenues par rhéologie pour la détermination de la transition sol/gel.....	90
Figure III- 2 Suivi au cours du séchage des propriétés mécaniques (A) et de la teneur en eau par ATG (B), pour un film de gélatine	91
Figure III- 3 Typical thermogram of gelatin/water system for a temperature range from -25 to 210°C: determination of glass transition temperature and denaturation heat flow.	97
Figure III- 4 Typical TGA curve of gelatin/water system for a temperature range from 0 to 450°C: determination of total water, bound water and free water.....	100
Figure III- 5 Evolution of free and bound water, determined by TGA analyses, with gelatin mass fraction during the drying of gelatin membrane at 20°C and 45±5 %RH	101
Figure III- 6 Drying kinetics of gelatin at 20°C and 45±5% HR with natural convection. AB: lag period, BC: constant rate period, CD: first falling rate period, after D: equilibrium plateau.....	102

Figure III- 7 Evolution of the mechanical properties gelatin/water system with gelatin mass fraction during drying at 20°C and 45±5% RH under natural convection	103
Figure III- 8 Sorption isotherms of gelatin based membrane	104
Figure III- 9 Gelatin phase diagram and membrane stability domain	106
Figure III- 10. Cross-section morphology of gelatin membranes (a, a') and gelatin/PEG200 membranes (b, b')	108
Figure III- 11 Fitting of the gas permeability values to the Arrhenius' law.....	110

Chapitre IV

Figure IV- 1 Cross-linker influence on gelatin stress-strain curves	123
Figure IV- 2 Influence of the FA cross-linking on the swelling ratios. Data are represented until the samples broke apart.	125
Figure IV- 3 Carbon dioxide and oxygen permeabilities ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{kPa}$) and CO_2/O_2 permselectivity of gelatin-based films compared with various films (data for 0% RH). (Park <i>et al.</i> 1995; Mujica-Paz <i>et al.</i> 1997; Bao <i>et al.</i> 2006; Yam 2009)	127
Figure IV- 4 Chemical structure of a) Ferulic Acid and b) Glutaraldehyde	132
Figure IV- 5 Effect of PEG200 addition on infrared spectra in ATR mode of gelatin-based membranes.....	141
Figure IV- 6 DSC thermogram of G-P200-NC membrane stored under vacuum and then tested after 10, 40 and 60 min.....	144
Figure IV- 7 Chemical structure of terephthalaldehyde (TPA).....	151
Figure IV- 8 Influence of solution temperature on cross-linking kinetics with 0.005g TPA/g gelatin (the curves are representations of mean data).....	156
Figure IV- 9 Influence of TPA concentration (g/g of gelatin) on cross-linking kinetics at 60°C..	157
Figure IV- 10 Cross-linking ratio at 60°C determined by TNBS assays (Values are given as average \pm 1.96 x standard deviation determined on 3 samples).	158
Figure IV- 11 Influence of TPA concentration on 7 days old cross-linked gelatin gels	159
Figure IV- 12 Influence of plasticizing and cross-linking on swelling ratio of gelatin membranes in water. All the sample plasticized with PEG (cross-linked and uncross-linked) lost their integrity before the first weighting. (Values are given as average determined on 4 samples. For lisibility issues standard deviations are not represented).....	160
Figure IV- 13 Water vapor sorption isotherms of gelatin films at 20°C prepared at 60°C (values are given as average \pm 1.96 x standard deviation determined on 3 samples).....	162

Chapitre V

Figure V- 1 Influence of the PO/EO molar content on the CO₂ and N₂ permeability coefficients.181

Figure V- 2 Typical DSC thermogram obtained with PEA/gelatin blends and used to determine Tg and denaturation heat flow 182

Figure V- 3 Connection between N₂ permeability and material characteristics (values are given as average ± standard deviation determined on 3 samples) 183

Figure V- 4 Connection between CO₂ permeability and material characteristics (values are given as average ± standard deviation determined on 3 samples) 183

Figure V- 5 Influence of PEAs on the triple helix content/crystallinity relationship (values are given as average ± standard deviation determined on 3 samples) 184

Figure V- 6 X-ray diffractogram of GD600-40 membrane..... 185

Figure V- 7 Influence de l'humidité relative sur le coefficient de perméation au CO₂ pour la membrane G-T3000-100#2 194

Figure V- 8 Isothermes de sorption à 20°C des films de gélatine seule, de gélatine réticulée avec le TPA et du mélange gélatine/T3000 réticulé avec le TPA 195

Chapitre I

Table I- 1 Composition en acide aminé des gélatines de type A et B et du collagène en résidus pour 1 000 résidus (Rose 1987)	10
Table I- 2 Applications de la gélatine (Schrieber <i>et al.</i> 2007b)	16
Table I- 3 Nature et quantité des plastifiants utilisés pour les différents types de gélatine	18
Table I- 4 Procédés utilisés pour les différents types de gélatine.....	23
Table I- 5 Perméabilité à l’oxygène de films de quatre types de gélatine seule, adapté de (Chiou <i>et al.</i> 2008)	52
Table I- 6 Synthèse des résultats de perméation à l’oxygène obtenus dans la littérature	54
Table I- 7 Propriétés de perméation gazeuse de <i>blend membranes</i> intégrant des PEG (Liu <i>et al.</i> 2013)	57
Table I- 8 Perméation des gaz purs pour des mélanges PEA/POSS à 1Bar (Chua <i>et al.</i> 2011)	58

Chapitre II

Table II- 1 Liste des polyéthylène glycols utilisés	61
Table II- 2 Liste des réticulants utilisés avec leur origine et risques associés	62
Table II- 3 Caractéristiques des polyéther amines utilisées.....	63
Table II- 4 Protocole des tests de rhéologie extensionnelle	71
Table II- 5 Humidité relative des solutions saturées de différents sels en fonction de la température, adapté de (Greenspan 1977).....	73

Chapitre III

Table III- 1 Microstructure et perméabilités aux gaz des membranes de gélatine plastifiés avec PEG200, PEG1000 et PEG2000	89
Table III- 2.Relative humidity (%) given by saturated salt solutions at 20°C (Greenspan 1977) .	96
Table III- 3.Influence of the gelatin solution concentration on the Sol/Gel transition temperature	98
Table III- 4 Influence of PEG200 on mechanical properties of gelatin films determined at 25°C	108
Table III- 5 Influence of temperature on gas transport properties on gelatin/PEG200 film.....	110

Chapitre IV

Table IV- 1 Extensional rheology protocol.....	119
Table IV- 2 Hazards identification and origin of cross-linkers	121

Table IV- 3 Influence of cross-linker and plasticizer on the cross-section film morphology. G: gelatin, G/PEG200: gelatin/PEG200 blend.....	122
Table IV- 4 Influence of formulation on mechanical properties of gelatin films	124
Table IV- 5 Influence of formulation on gelatin films gas permeabilities (lower case letters indicate the statistical significance for columns and upper case letters for lines).....	126
Table IV- 6 Membrane sample coding	134
Table IV- 7 Relative humidity (%) given by saturated salt solutions at 20°C (Greenspan 1977).....	135
Table IV- 8 Water sorption on G-NC and G-FA membranes at 20±2°C.....	137
Table IV- 9 Mechanical properties, cross-linking ratio and thermal properties of uncross-linked and cross-linked gelatin membranes stored at 25% RH and 20°C. ...	139
Table IV- 10 Effect of PEG 200 addition on mechanical properties and water mass fraction of membranes stored at 25% RH and 20°C.....	140
Table IV- 11 Composition, gas permeability and renaturation level of G-P200-NC, G-FA and G-P200-FA membranes	142
Table IV- 12 Influence of re-hydration of G-P200-NC membrane on the thermal properties after vacuum conditioning	144
Table IV- 13 Influence of the temperature on the chemical cross-linking of gelatin solutions and time needed to obtain a gel, (data were obtained on 8 samples).	154
Table IV- 14 Speed of water uptake.....	163
Table IV- 15 Influence of plasticizing, cross-linking and humidity conditioning on mechanical properties (values are given as average ± standard deviation determined on ⁽¹⁾ 10 points, ⁽²⁾ 3 samples). "a" represents the comparison within values in the same column (p≤0.05) "A" between dry and humid state.	163
Table IV- 16 Influence de la réticulation de la gélatine avec le téréphthalaldéhyde sur les coefficients de perméabilité de He, CO ₂ , N ₂ et O ₂ à 25 et 90°C (les lettres représentent les différences significatives avec p< 0,05).....	166
Table IV- 17 Propriétés thermiques des membranes réticulées avec le téréphthalaldéhyde.....	167
Table IV- 18 Caractéristiques comparées de l'acide férulique et du téréphthalaldéhyde	169

Chapitre V

Table V- 1 Formulae and molecular weight of the synthetic polymers.....	175
Table V- 2 Composition of studied membranes	176
Table V- 3 Influence of temperature on gas permability coefficients for G-D600 and G-T3000 blend membranes for He, CO ₂ and N ₂	179
Table V- 4 Thermal properties of GD600 and GT3000 blend membranes : glass transition temperature (Tg), denaturation temperature (Td) and denaturation enthalpie (ΔHd).....	179

Table V- 5 Influence of temperature on selectivity coefficient values for G-D600 and G-T3000 blend membranes.....	186
Table V- 6 Influence de la température sur les coefficients de diffusion déterminés expérimentalement pour les membranes G-D600 and G-T3000 pour He, CO ₂ and N ₂	189
Table V- 7 Débits des gaz fixés pour l'ensemble des mesures.....	190
Table V- 8 Coefficients de perméabilité et facteurs de séparation pour la membrane G-T3000-100#1	191
Table V- 9 Coefficients de perméabilité et facteurs de séparation pour la membrane G-T3000-100#2	192

Introduction générale

Les sciences et technologies membranaires sont aujourd'hui reconnues comme des outils puissants pour développer les nouveaux procédés nécessaires à une croissance industrielle durable. Dans le domaine de la séparation gazeuse, contrairement aux opérations unitaires traditionnelles (adsorption avec des solvants aminés, distillation cryogénique), la séparation membranaire ne nécessite pas de changement de phase et apparaît donc beaucoup plus sobre énergétiquement.

Du fait de leur coût plus faible que les membranes inorganiques, la majorité des modules de séparation gazeuse commercialisés sont basés sur des membranes denses polymériques. Cependant les polymères organiques sont caractérisés par un compromis entre les valeurs de perméabilité, qui caractérisent la productivité des membranes, et la sélectivité qui représente l'efficacité du procédé de séparation. Idéalement il faudrait pouvoir trouver un matériau polymérique combinant de hautes perméabilités avec de grandes sélectivités. Le développement et l'étude de nouveaux matériaux pour atteindre ces objectifs sont donc indispensables.

De plus, les applications des membranes polymériques ne se limitent pas aux procédés industriels de séparation. L'ensemble de l'industrie de l'emballage demande des matériaux aux propriétés de transport gazeux contrôlées. Des matériaux très barrière à l'oxygène sont nécessaires pour les emballages pharmaceutiques ou la protection de composants électroniques alors que des matériaux faiblement perméables présentant une sélectivité entre l'oxygène et le dioxyde de carbone sont demandés pour les emballages respirant des produits frais. Que ce soit dans le domaine de la séparation gazeuse ou celui des emballages, la demande en nouveaux matériaux polymériques à bas coût aux propriétés de transport gazeux contrôlées ne tarit pas.

Cette demande doit tenir compte de la diminution des ressources pétrolières à l'origine des polymères synthétiques qui rend inévitable la recherche de sources alternatives durables de polymères. Dans ce contexte, les biopolymères constituent une alternative durable aux polymères pétrochimiques. Les biopolymères sont généralement classés en trois catégories : (i) les polymères naturels, directement extraits de la biomasse comme la cellulose, l'amidon et les protéines ; (ii) les polymères synthétisés à partir de monomères biosourcés, comme le PLA (polylactic acid) et (iii) les polymères naturellement synthétisés par des micro-organismes, comme les polyhydroxybutyrates et les polyhydroxyvalérates. Des biopolymères sont déjà utilisés à l'échelle industrielle, comme le PLA pour la fabrication de matériaux d'emballage (films, barquettes). Cependant il est préférable de choisir des polymères constituant un déchet ou un sous-produit d'un procédé industriel déjà en place pour ne pas rentrer en compétition avec la production alimentaire que ce soit pour le produit lui-même ou pour les terres agricoles nécessaires pour le produire.

Dans ce contexte, la gélatine se révèle un candidat de choix. En effet, elle provient de l'hydrolyse du collagène, la protéine la plus abondante sur terre, qui est un constituant notamment de la peau et des os. Le collagène est de plus un sous-produit abondant et économique de l'industrie agro-alimentaire. La gélatine a été largement utilisée dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques mais la crise de la vache folle et le développement des marchés halal, casher et végétarien incitent les industriels à remplacer la gélatine issue de mammifères par d'autres agents tels que l'agar-agar ou les alginates. Dans ce cadre, l'utilisation de la gélatine comme matériau, ou bioplastique, devient pertinente.

La gélatine est une protéine qui présente une structure complexe et une grande variété de groupes fonctionnels qui lui donnent des propriétés filmogéniques très intéressantes pour la fabrication de membranes autosupportées. De plus elle est soluble dans l'eau ce qui permet de mettre en œuvre des procédés d'élaboration sans solvant organique dangereux. Cependant pour assurer la pérennité dans le temps et la stabilité des membranes en cas de contact avec l'eau, la réticulation de la gélatine est primordiale. Le réticulant le plus utilisé pour la gélatine est le glutaraldéhyde qui est toutefois classé comme toxique. La mise en place au niveau européen de la réglementation REACH, visant à évaluer l'impact des composés chimiques sur l'environnement mais aussi sur la santé des employés et du public, impose le développement de procédés excluant les composés toxiques. Il faut donc trouver de nouvelles voies de réticulation de la gélatine utilisant des composés non toxiques.

C'est dans ce contexte que se place ce travail de thèse qui a pour objectif le développement de membranes à base de gélatine et l'étude de leurs propriétés de transport gazeux. La mise en œuvre de cette protéine en tant que bioplastique va nécessiter le développement d'un procédé d'élaboration propre avec des composés les moins toxiques possibles, et dans la mesure du possible, biosourcés pour respecter les principes de la chimie verte (Annexe A).

Le chapitre I, "Bibliographie", décrit le contexte scientifique et technologique dans lequel s'est déroulée cette étude. Il présente la gélatine en tant que molécule et polymère ainsi que ses caractéristiques physico-chimiques. Il introduit une notion essentielle dans la compréhension des mécanismes de structuration de la gélatine appelée renaturation des triples hélices. Il expose la nécessité de réticuler un matériau hydrosoluble et présente un certain nombre de réticulants ainsi que leurs mécanismes réactionnels. Il décrit les différents procédés d'élaboration de films de gélatine et fait une synthèse des propriétés des films référencés dans la littérature. Enfin il présente la famille des polyéther amines (PEA), élastomères utilisés au cours de cette étude pour fabriquer des membranes issues de mélanges gélatine/PEA.

Le chapitre II, "Matériels et méthodes", présente l'ensemble des techniques mises en œuvre concernant l'élaboration des membranes, leur réticulation et leur caractérisation autant structurelle que fonctionnelle. Ce chapitre décrit également les méthodes utilisées pour étudier la gélatine sous sa forme gel, ainsi que le pilote conçu et construit spécifiquement pour ce projet pour l'étude de la perméation de mélange de gaz en conditions humides contrôlées.

Au cours du chapitre III, "Procédé d'élaboration de membranes de gélatine", nous établirons le diagramme de phase du système gélatine/eau utilisé dans cette thèse. Nous nous intéresserons à l'impact de la plastification des membranes de gélatine avec le polyéthylène glycol (PEG200) et nous étudierons l'influence de la température sur la perméabilité aux gaz des membranes gélatine/PEG200.

Le chapitre IV, "Réticulation chimique de la gélatine", est consacré à la recherche de réticulants alternatifs au glutaraldéhyde, moins toxiques et idéalement biosourcés pour répondre aux exigences de la chimie verte. Au cours de ces études, l'influence de la réticulation sur la structuration de la gélatine, ainsi que sur les propriétés fonctionnelles des membranes réticulées obtenues, sera examinée.

Le cinquième et dernier chapitre, "Elaboration de membranes gélatine/polyéther amines" est dédié à l'étude de membranes mixtes élaborées dans le but d'augmenter les valeurs de perméabilités aux gaz des membranes à base de gélatine. Il étudie l'influence d'une part de la température et d'autre part de l'humidité relative du flux gazeux sur les propriétés de transport gazeux de membranes gélatine/PEA.

Nous concluons enfin ce travail en récapitulant les différentes avancées obtenues et en présentant les différentes perspectives de recherche possibles.

Bibliographie

1. La gélatine

1.1. *Structure de la gélatine*

La gélatine est une protéine issue de la dénaturation du collagène, la protéine la plus répandue du règne animal puisqu'elle se trouve dans les tissus conjonctifs tels que la peau, les os, les cartilages et les tendons. Le terme collagène désigne en réalité toute une famille de protéines regroupant 27 types différents suivant son origine (Schrieber *et al.* 2007a). Plusieurs facteurs influencent fortement les propriétés de la gélatine : l'origine (porcine, bovine ou ichthyenne), l'âge de l'animal, le type de collagène et la méthode de fabrication (Ledward 1986).

Le collagène se présente sous la forme de fibres stabilisées par des liaisons intra et intermoléculaires (Dickerson *et al.* 1969). Ces fibres sont constituées de bâtonnets eux-mêmes formés de trois chaînes polypeptidiques organisées sous forme de triples hélices droites, le tropocollagène (Figure I- 1).

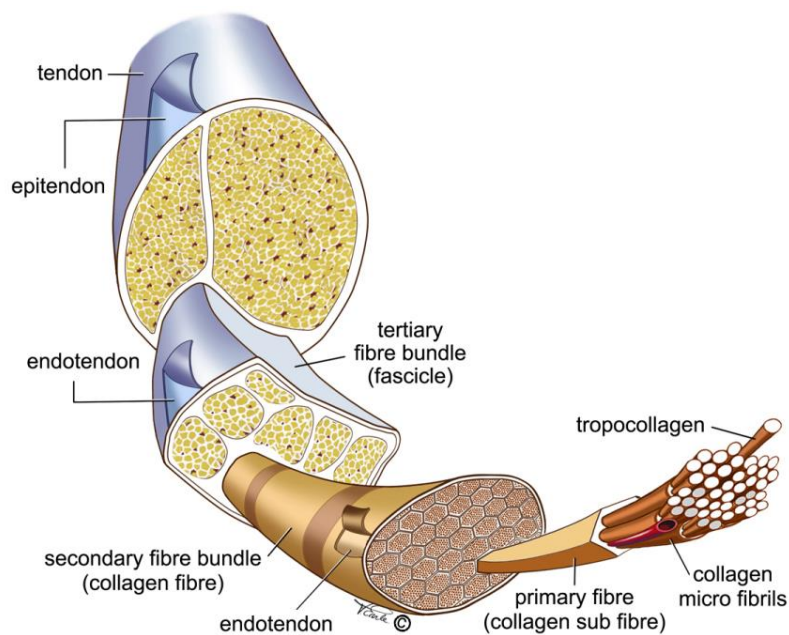


Figure I- 1 Organisation des fibres de collagène (Vicky Earle, Medical Illustration)

Le collagène, et par extension la gélatine, contient 20 acides aminés différents. La séquence d'acides aminés détermine les propriétés physico-chimiques et structurales des protéines. La structure d'un acide aminé, $H_2N-CHR-COOH$, varie selon la nature de son groupement latéral R aussi appelé résidu. On peut classer les résidus en trois groupes, les groupements hydrophobes, les groupements polaires non chargés (ceux impliqués dans les liaisons hydrogène avec l'eau) et les groupements chargés (**Figure I- 2**).

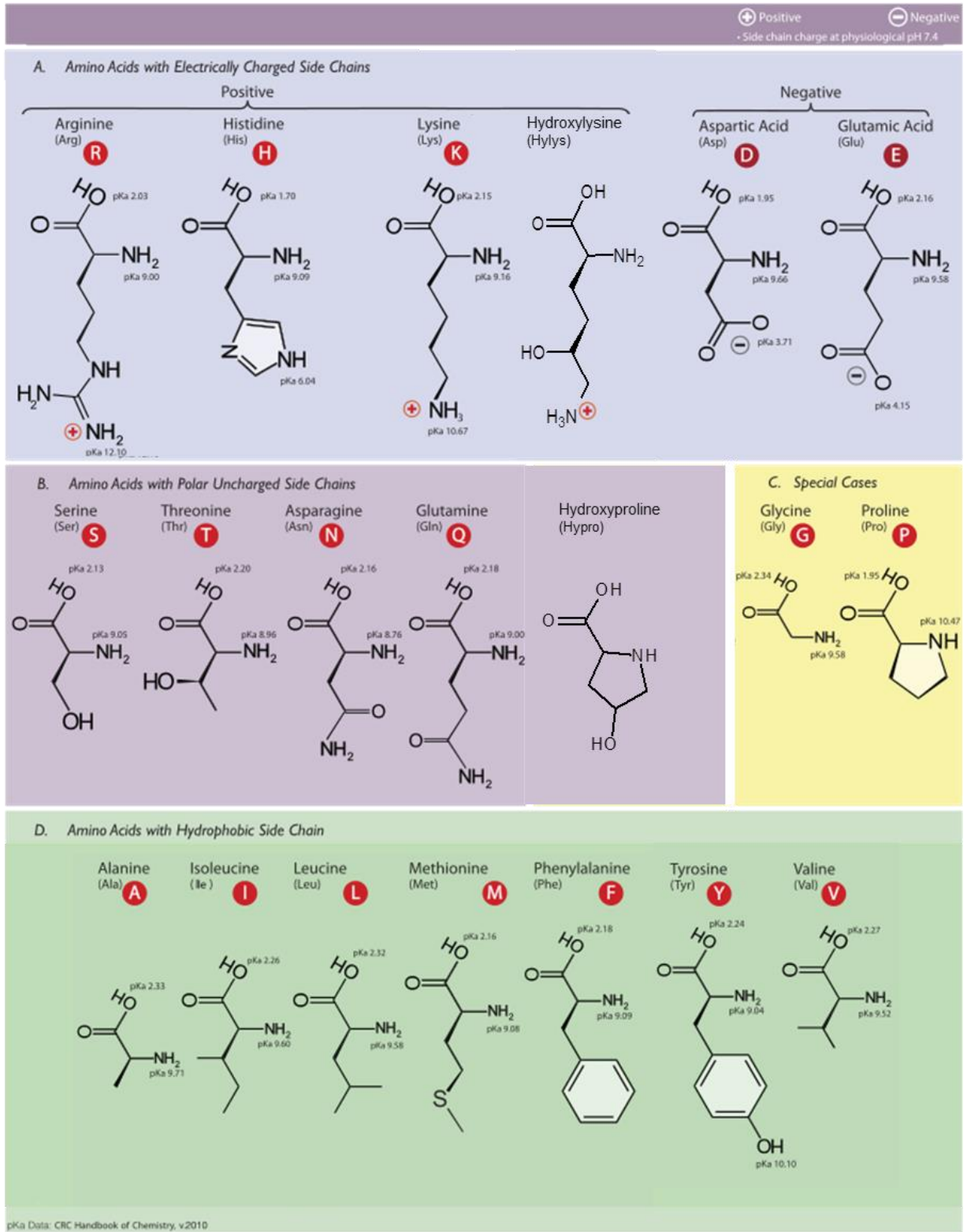
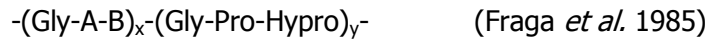


Figure I- 2 Acides aminées constituant le collagène et la gélatine, adapté de (Dan Cojocari, University of Toronto 2010)

Un enchaînement spécifique de certains acides aminés permet l'enroulement du collagène en triple hélice. Un résidu glycine (Gly) est présent dans la séquence tous les trois résidus et des résidus plus rigides, proline (Pro) et hydroxyproline (Hypro) s'intercalent suivant l'enchaînement suivant :



Des liaisons hydrogène entre acides aminés et molécules d'eau stabilisent la triple hélice (Bella *et al.* 1995; Yakimets *et al.* 2005). La glycine, le plus petit des acides aminés, permet l'emboîtement des chaînes (Figure I- 3).

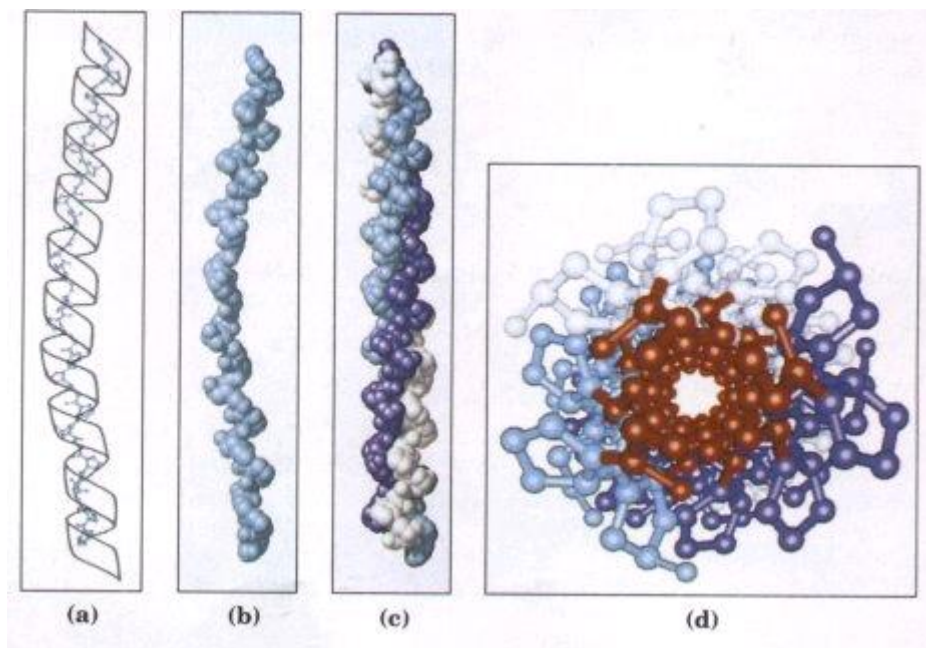


Figure I- 3 Structure du tropocollagène. (a,b) une séquence de motifs Gly-X-Pro ou Gly-X-Hyp adopte une structure d'hélice gauche avec 3 résidus par tour. (c) 3 de ces hélices gauches s'enroulent pour former une triple hélice droite. (d) vue du dessus de la triple hélice, en rouge sont représentés les résidus de glycine (Lehninger *et al.* 1993)

La fabrication industrielle de la gélatine s'effectue par chauffage de matières premières riches en collagène auquel est associé un traitement acide ou basique pour dénaturer le collagène. On obtient alors respectivement une gélatine acide de type A (principalement issue de la peau de porc) ou basique de type B (issue des os et des peaux de bovins). Le traitement va influencer sur deux paramètres principaux :

- la distribution de masse molaire et par ce biais sur la viscosité et la force de gel (Figure I- 4). Dans le cas spécifique de la gélatine, la force de gel est appelée Bloom, ce qui correspond à la masse en gramme nécessaire à un poinçon normalisé pour déformer

d'une hauteur définie la surface d'un gel standard thermostaté dans des conditions standards de température et de pression. Des Bloom entre 50 et 300 sont disponibles pour les gélatines commerciales. En comparaison avec les gélatines de type A, les gélatines de type B ont des plus hauts Bloom, une majorité de chaînes à plus de 100 000 g.mol⁻¹ et des distributions de masses molaires plus étroites.

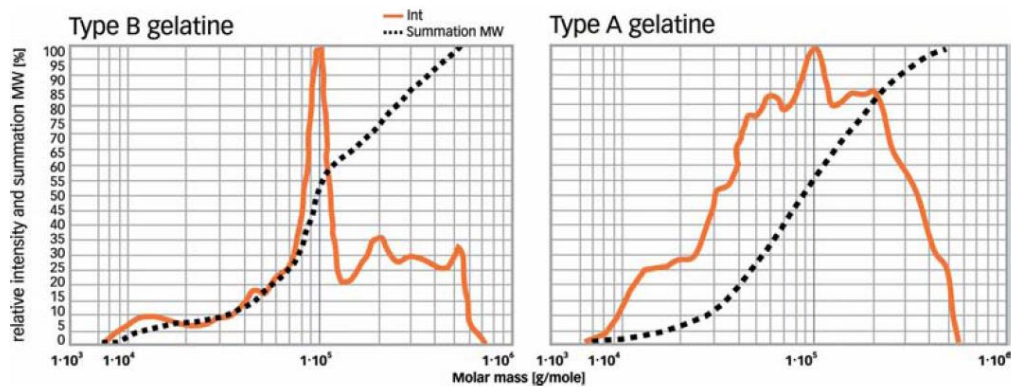


Figure I- 4 Distribution de masse molaire typique pour une gélatine obtenue par traitement basique (type B) et par traitement acide (type A) (Schrieber *et al.* 2007a)

- La composition en acides aminés (Table I- 1) et donc le point isoélectrique. La composition ne varie quasiment pas entre le collagène et la gélatine de type A. Par contre pour la gélatine de type B, l'hydrolyse basique convertit l'asparagine et la glutamine en acide aspartique et en acide glutamique, expliquant ainsi la différence de point isoélectrique autour de pH 8-9 pour la type A et de pH 4,8-5,5 pour la type B. Le point isoélectrique influence la structure spatiale de la gélatine suivant le pH puisqu'il détermine la charge globale de la protéine.

Table I- 1 Composition en acide aminé des gélatines de type A et B et du collagène en résidus pour 1 000 résidus (Rose 1987)

Amino Acid	Gelatine Type A	Gelatine Type B	Type 1 collagen (cattle)
Alanine	112	117	114
Arginine	49	48	51
Asparagine	16	0	16
Aspartic acid	29	46	29
Cysteine	–	–	–
Glutamic acid	48	72	48
Glutamine	25	0	25
Glycine	330	335	332
Histidine	4	4.2	4.4
Hydroxyproline	91	93	104
Hydroxylysine	6.4	4.3	5.4
Isoleucine	10	11	11
Leucine	24	24.3	24
Lysine	27	28	28
Methionine	3.6	3.9	5.7
Phenylalanine	14	14	13
Proline	132	124	115
Serine	35	33	35
Threonine	18	18	17
Tryptophan	–	–	–
Tyrosine	2.6	1.2	4.4
Valine	26	22	22

1.2. Propriétés physico-chimiques de la gélatine : la gélification

Les solutions de gélatine présentent la particularité de gélifier à température ambiante. Elles forment des hydrogels physiques thermoréversibles. Cette propriété est très importante dans de nombreuses applications et est de premier ordre dans le cas de la fabrication de films/membranes. En effet tous les procédés dits "en solvant" (cf. partie 2), sont basés sur le séchage d'hydrogels préalablement mis en forme. Le passage de l'état solution à gel est appelé la transition sol/gel.

1.2.1. La transition sol/gel

La transition sol/gel se produit quand les interactions physiques et chimiques entre les molécules forment un amas "infini" dans l'ensemble du système, c'est-à-dire qui connecte deux bords opposés du réseau. Plusieurs modèles théoriques ont été proposés pour décrire la transition sol/gel :

- La théorie classique développée par Flory et Stockmayer (Flory 1953; Flory *et al.* 1960) qui consiste à assimiler la gélification à un processus de branchement ou de polymérisation dendritique. Dans ce modèle, toutes les structures créées ont une forme arborescente, ce qui exclut la formation de boucle (Figure I- 5).

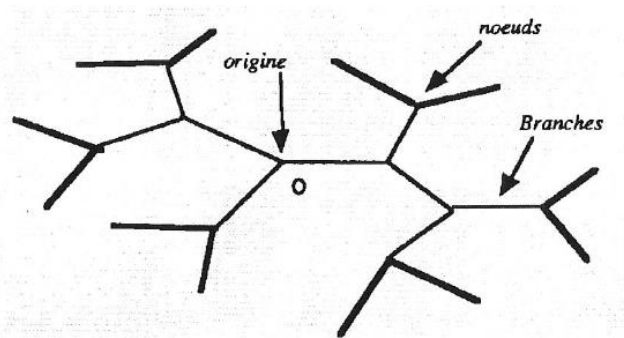


Figure I- 5 Réseau à structure d'arbre, théorie de Flory-Stockmayer (El Harfaoui 2007)

- Le modèle de percolation de sites à trois dimensions proposé par de Gennes et Stauffer (De Gennes 1979; Stauffer *et al.* 1982) qui s'intéresse à l'influence de la variation du nombre d'interconnexions dans un système aléatoire. Ici un amas percolant correspond au réseau infini. Ce modèle est basé sur un réseau sites-liens qui permet de calculer des données à fréquence nulle telles que la probabilité de percolation d'une molécule (est-ce qu'une molécule va faire partie d'un réseau infini ?), les dimensions moyennes des amas et le nombre moyen de liens par amas.
- Le critère de Winter (Winter *et al.* 1986; Chambon *et al.* 1987) qui se base sur des mesures rhéologiques. Ce modèle est basé sur le lien entre un module élastique non nul aux temps d'observation infiniment long et l'existence d'un gel. La méthode consiste à mesurer les évolutions respectives des modules de conservation G' et de perte G'' à une fréquence ω donnée. A l'état sol, G'' est grand alors que G' est presque négligeable. Avec la croissance des amas, G'' et G' augmentent, et au point critique, G' dépasse G'' . Les deux modules se stabilisent lorsque la réaction est terminée (Figure I- 6).

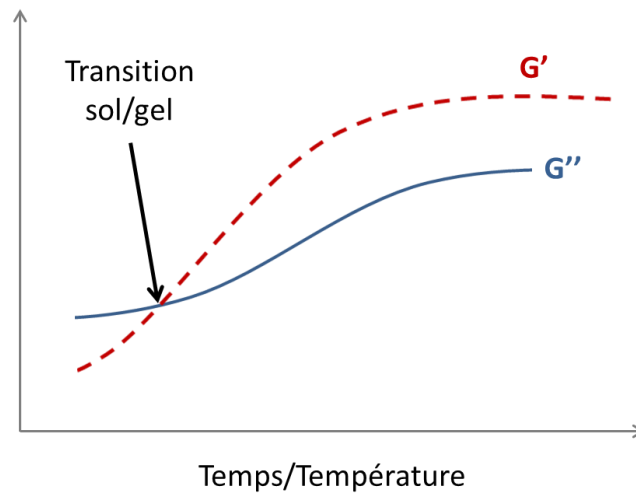


Figure I- 6 Schéma théorique de l'évolution des modules de perte G'' et de conservation G' dans le cas d'une gélification

Winter et Chambon, ont établi qu'à un certain temps de réaction, $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ suivaient des lois de puissance :

$$\begin{aligned} G'(\omega) &= G'_c \omega^n \\ G''(\omega) &= G''_c \omega^m \end{aligned} \quad \text{I. 1}$$

Avec, ω la fréquence telle que $0 < \omega < \infty$

G'_c et G''_c sont des constantes du matériau déterminées pour $\omega = 1 \text{ s}^{-1}$

Les exposants n et m sont considérés comme proches. Dans le cas où $n=m$, les relations de Kramers et Kronig montrent que :

$$G'_c = \frac{G''_c}{\tan \frac{n\pi}{2}} \quad \text{avec } n < 1 \quad \text{I. 2}$$

Dans ces conditions :

$$G'(\omega) = \frac{G''(\omega)}{\tan \frac{n\pi}{2}} \quad \text{avec } n < 1 \text{ et } 0 < \omega < \infty \quad \text{I. 3}$$

L'équation ci-dessus prédit que quelle que soit la fréquence ω :

Si $n > 1/2$ $G''(\omega) > G'(\omega)$

Si $n < 1/2$ $G''(\omega) < G'(\omega)$

Si $n = 1/2$ $G''(\omega) = G'(\omega)$

Le rapport G''/G' , aussi appelé damping factor ($\tan\delta$), est donc indépendant de la fréquence.

$$\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} = \tan \delta(\omega) = \tan \frac{n\pi}{2} \quad \mathbf{I. 4}$$

Contrairement au modèle de percolation qui n'est applicable qu'à fréquence nulle, le critère de Winter est indépendant de la fréquence. C'est donc une méthode largement utilisée pour déterminer les temps de gélification des solutions à partir des spectres en fréquence G' et G'' obtenus par des mesures avec un rhéomètre.

1.2.2. Renaturation de la gélatine

La gélification des solutions de gélatine se produit par un mécanisme original. Durant le refroidissement, les chaînes subissent une transition de conformation de désordonnée à ordonnée et régénèrent en partie la structure en triple hélice du collagène. Ce phénomène s'appelle la renaturation. Il n'y a pas de niveau supérieur de structure, les triples hélices ne s'associent pas entre elles comme dans le collagène natif (Figure I- 7).

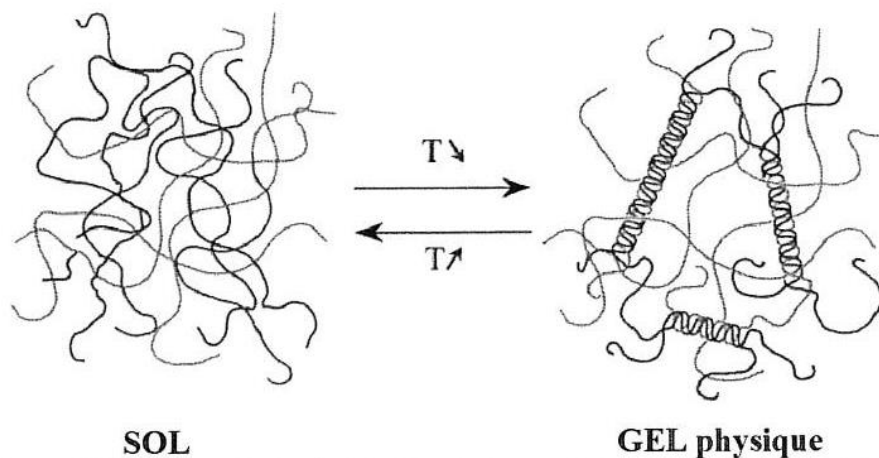
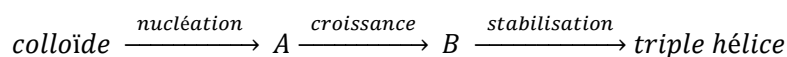


Figure I- 7 Structure du gel physique de gélatine après renaturation (Hellio Serughetti 2004)

Achet (Achet *et al.* 1995) a décrit la renaturation de la gélatine comme étant issu d'un mécanisme de nucléation-croissance en trois étapes :



Où A correspond à la conformation des chaînes après initiation d'hélices par interactions entre résidus proline des chaînes protéiques. Ces zones constituent les nuclei à partir desquels les triples hélices vont pouvoir se développer. Après la phase de croissance on obtient l'intermédiaire B où les hélices sont déjà pleinement formées. Une fois stabilisée par liaisons hydrogène, la conformation finale où cohabitent phase colloïdale et triples hélices est achevée. L'existence de l'intermédiaire B est très fugace du fait de son instabilité et de la cinétique de l'étape de stabilisation beaucoup plus rapide que celle de l'étape de croissance.

Le ratio de triples hélices par rapport à la part colloïdale résiduelle, ou taux de renaturation, est influencé par de nombreux paramètres comme la température (Chiou *et al.* 2009), le Bloom (Bigi *et al.* 2004), ou la concentration. Djabourov (Djabourov *et al.* 1993) a mis en évidence l'effet de la concentration grâce à des images de microscopie électronique en transmission où ne sont visibles que les triples hélices (Figure I- 8). On voit bien le réseau tridimensionnel des gels de gélatine ainsi que la densification et l'homogénéisation du réseau à plus grande concentration.

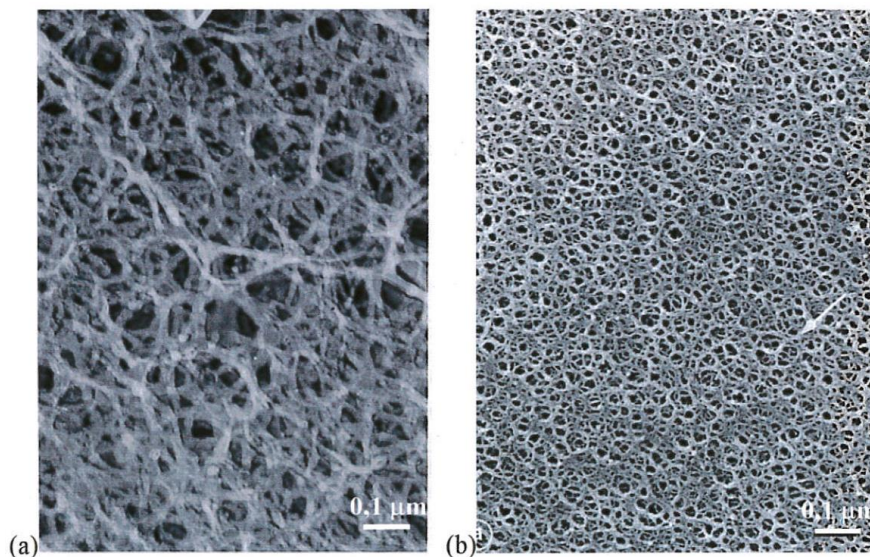


Figure I- 8 Images de microscopie électronique en transmission pour un gel de gélatine à (a) 2 % et épaisseur des répliques $h = 0,10 \pm 0,01 \mu\text{m}$, (b) 10% et épaisseur des répliques $h = 0,015 \pm 0,005 \mu\text{m}$ (Djabourov *et al.* 1993)

Les triples hélices sont stabilisées notamment par liaisons hydrogène, celles-ci existent entre acides aminés mais également par interaction avec l'eau. Si on se réfère aux travaux de Kozlov (Kozlov *et al.* 1983) et Yakimets (Yakimets *et al.* 2005) sur les films de gélatine quatre niveaux d'interactions entre l'eau et les molécules de gélatine existent :

- L'eau liée à des centres de sorption de haute énergie (de 0 à 0,055g/g ou 0-10% HR). Cette eau interagit avec les résidus chargés et forme des liaisons intramoléculaires avec les acides aminés dans les triples hélices permettant leur stabilisation.
- L'eau de structure (de 0,055 à 0,14g/g ou 10-40% HR). Cette eau est directement liée aux protéines dans les fragments hélicoïdaux.
- Les couches polymoléculaires (de 0,14 à 0,37g/g ou 40-90% HR). L'eau se retrouve en excès et transforme la monocouche d'eau à la surface des triples hélices en multicouche qui recouvre les hélices. Ce phénomène est connu pour les triples hélices de collagène natif (Figure I- 9).
- L'eau libre (au-delà de 0,37g/g ou 90% HR).

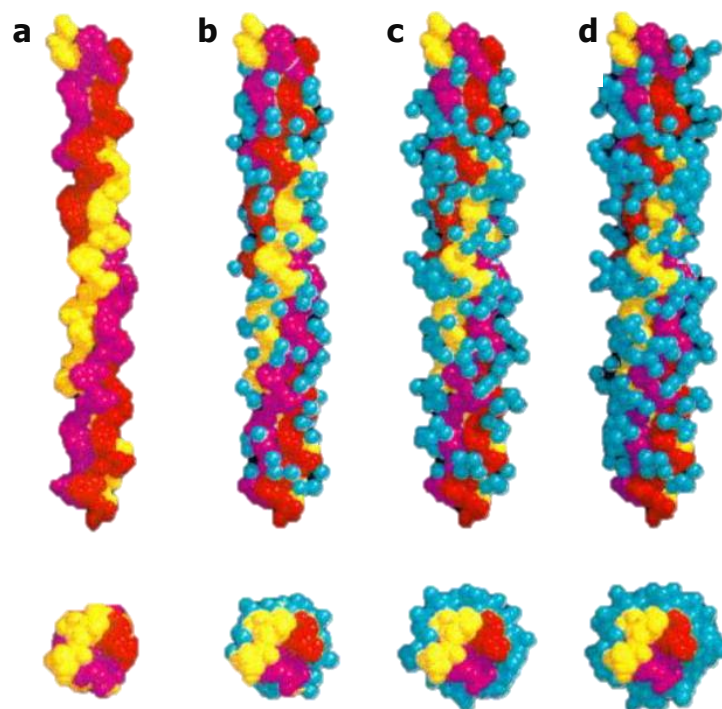


Figure I- 9 Représentation de la formation de la multicouche polymoléculaire d'eau liée sur les triples hélices de collagène. (a) triple hélice nue, (b) ajout de l'eau de structure, (c,d) formation de la multicouche (Bella *et al.* 1995)

1.3. Applications de la gélatine

Les propriétés uniques de la gélatine font que ce polymère est utilisé dans de très nombreux domaines (Table I- 2). On peut séparer ses propriétés d'intérêt industriel en deux familles, les propriétés liées à la gélification (formation de gel, agent de texture, épaississant, liant d'eau) et celles liées aux propriétés de surface (émulsifiant et stabilisant, protecteur de colloïde, agent moussant, agent filmogène, adhésif). La suite de ce manuscrit va se consacrer à l'étude de la fabrication de films/membranes à base de gélatine.

Table I- 2 Applications de la gélatine (Schrieber *et al.* 2007b)

Domaine d'application	Exemples
Agroalimentaire	Confiseries, crèmes glacées, plats préparés, conserves de viande, sauces salade, jus de fruits, produits allégés...
Pharmaceutique	Capsules, micro-encapsulation, excipients...
Médical	Substitut plasmatique, adhésifs, ingénierie tissulaire, éponges hémostatiques, implants, traitement de l'arthrite...
Cosmétique	Crèmes, compléments alimentaires, traitements capillaires ...
Impression/Papèterie	Papiers, encres d'imprimante...
Autres applications	Colle, agents de coacervation, médecine légale, milieu de culture biologique, films et coatings, détergents, désamiantage, polymérisation en suspension, galvanisation...

2. **Procédés d'élaboration de films de gélatine**

2.1. *La plastification*

Du fait de ses propriétés de gélification, la gélatine présente un caractère filmogène prononcé qui en fait un biopolymère attractif pour la fabrication de films (Wang *et al.* 2007). Différents procédés de mise en forme des solutions filmogènes de gélatine coexistent dans la littérature : coulage, étalement, extrusion. Comme dans l'industrie des plastiques d'origine synthétique, la plupart de ces procédés met en œuvre des adjuvants, notamment des plastifiants.

La plastification consiste en l'incorporation d'un additif qui va abaisser la température de transition vitreuse du polymère. Un plastifiant doit être compatible avec le polymère, peu volatile, ne doit pas détériorer les propriétés mécaniques et de résistance mécanique du polymère. La plastification peut être soit interne, avec modification de la chaîne polymérique, soit externe, il s'agit alors d'un simple mélange.. La plastification externe de la gélatine est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique où elle rentre dans le cadre de la formulation des capsules. Elle présente l'avantage de rendre plus souple le matériau et ainsi d'améliorer l'écoulement de polymères fondus ou en solution dans les procédés de mise en œuvre.

L'importance de l'eau dans la structuration de la gélatine ayant déjà été traitée dans la partie 1., le paragraphe suivant se concentrera sur les plastifiants organiques référencés dans la littérature pour avoir été testés spécifiquement pour la gélatine (Table I- 3) :

Table I- 3 Nature et quantité des plastifiants utilisés pour les différents types de gélatine

Origine de la Gélatine	Plastifiant		Référence
	nature	quantité	
bovine	glycérol	3% w/w	(Ortiz-Zarama <i>et al.</i> 2014)
		0-100% w/w	(Rivero <i>et al.</i> 2010)
		4.5% w/w	(Carvalho <i>et al.</i> 2004)
		0-1% w/w	(Coppola <i>et al.</i> 2012)
		40% w/w	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)
	sorbitol	30% w/w	(Martucci <i>et al.</i> 2012)
		15-65% w/w	(Sobral <i>et al.</i> 2001b)
	sucrose acide citrique acide tartrique acide malique PEG300, 400, 600, 800, 1500, 4000, 10000, 20000 mannitol sorbitol éthylène glycol diéthylène glycol triéthylène glycol éthanolamine diéthanolamine triéthanolamine acide oléique	20-40% w/w	(Cao <i>et al.</i> 2009)
		acides gras	10% w/w
	porcine	glycérol	40% w/w
0-45% w/w			(Bergo <i>et al.</i> 2007)
25/65% w/w			(Thomazine <i>et al.</i> 2005)
0,6 et 8% w/v			(Park <i>et al.</i> 2008)
sorbitol		15-65% w/w	(Sobral <i>et al.</i> 2001b)
		25/65% w/w	(Thomazine <i>et al.</i> 2005)

		0,6 et 8% w/v	(Park <i>et al.</i> 2008)
	lécithine de soja extrait de yucca	10% w/w	(Andreuccetti <i>et al.</i> 2011)
	glycérol éthylène glycol diéthylène glycol propylène glycol	10-30% w/w	(Vanin <i>et al.</i> 2005)
poisson		40% w/w	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)
	glycérol	25% w/w	(Ahmad <i>et al.</i> 2012)
		15% w/w	(Jridi <i>et al.</i> 2013)
		15-30% w/w	(Krishna <i>et al.</i> 2012)
	sorbitol	30% w/w	(Carvalho <i>et al.</i> 2008b)
	glycérol sorbitol éthylène glycol PEG 200, 400	25-75% w/w	(Jongjareonrak <i>et al.</i> 2006)
hydrolysat de collagène	glycérol PEG 300, 400, 600, 3350	0-50% w/w	(Langmaier <i>et al.</i> 2008)
Non précisé	glycérol	50% w/w	(Wang <i>et al.</i> 2007)

De très nombreuses études ont été consacrées au glycérol et au sorbitol. Ces deux molécules présentent l'avantage d'être solubles dans l'eau et comestibles. Cependant leur faible masse molaire limite leur utilisation dans le cadre de films utilisés pour la perméation de gaz sous pression. En effet elles risquent d'être désorbées de la matrice polymère puisqu'elles n'y sont liées que par des interactions faibles.

Pour limiter les risques de modification de la composition des films durant les essais de perméation, tout en conservant un caractère hydrosoluble et non toxique, cette étude a utilisé le polyéthylène glycol (PEG) comme plastifiant.

Cao *et al.* (Cao *et al.* 2009) ont montré les effets plastifiants des PEG de masse molaire comprise entre 300 et 20 000 g.mol⁻¹ pour une composition de 20 % w/w, sur les propriétés mécaniques de films de gélatine bovine (Figure I- 10). Ils ont observé une baisse importante du module

d'Young (de 30 à 50%) accompagnée d'une hausse de l'élongation à la rupture (de 115 à 170%) caractéristique de la plastification des polymères. Cette plastification s'accompagne d'une diminution importante (de 30 à 50%) de la contrainte à la rupture. Tous ces effets sont d'autant plus importants que la masse molaire du PEG étudié est faible. Ces mêmes effets des PEG de faible masse molaire ont aussi été observés par Jongjareonrak et al. (Jongjareonrak *et al.* 2006).

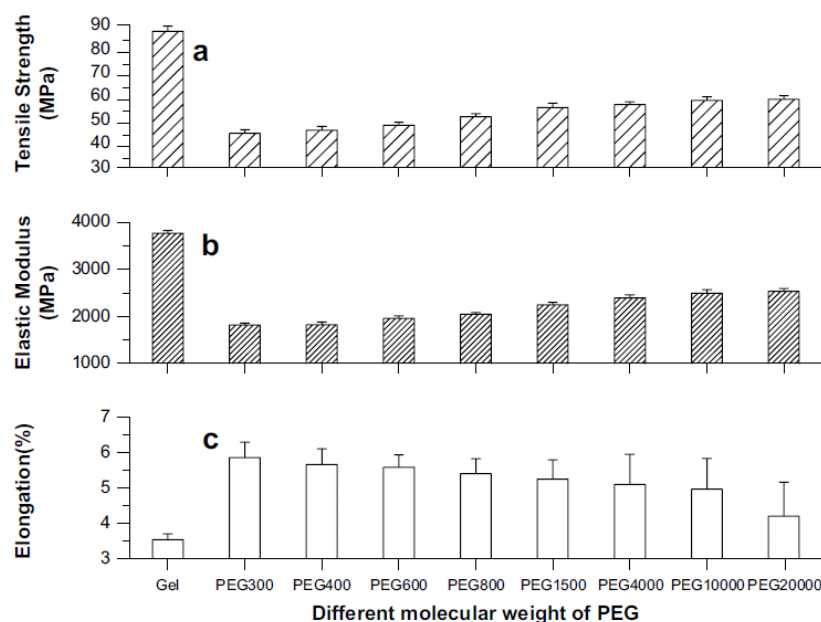


Figure I- 10 Effet de la masse molaire des PEG sur les propriétés mécaniques de films de gélatine bovine (Cao et al. 2009) : (a) contrainte à la rupture, (b) module d'Young, (c) élongation à la rupture.

Langmaier et al. ont étudié les propriétés thermiques de films d'hydrolysats de collagène plastifiés avec des PEG de masse molaire 300 à 3 350 g.mol⁻¹. Ils ont étudié l'influence des PEG sur la température de transition vitreuse (T_g) qui est l'indicateur le plus classique de la plastification (Figure I- 11). Ils ont observé que l'ajout de PEG plastifiait le biopolymère en diminuant la T_g et que globalement la diminution de la taille du PEG accentuait la baisse de la T_g . Ils ont également montré que l'augmentation de la quantité de plastifiant ne diminuait pas linéairement la T_g mais que celle-ci présentait une inflexion vers 15% w/w, à la fois pour les PEGs et le glycérol, et atteignait un plateau à partir d'environ 30% w/w de PEG.

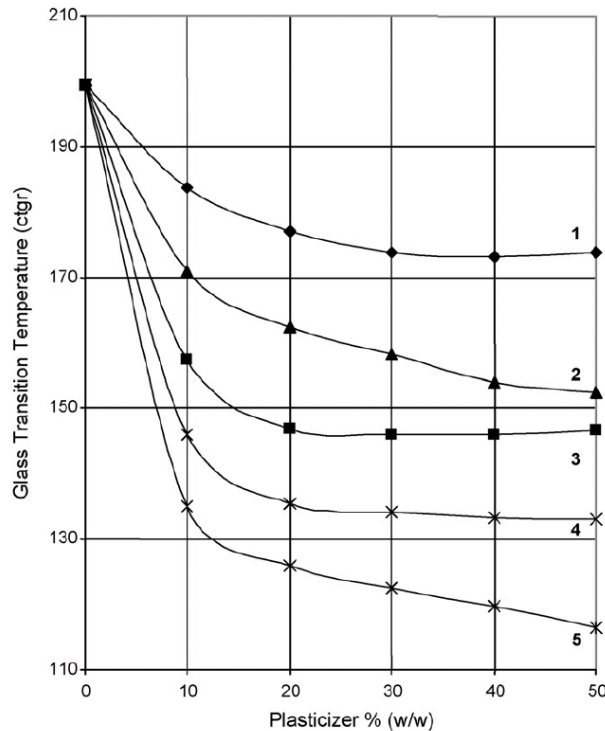


Figure I- 11 Effets de la plastification sur la température de transition vitreuse de films d'hydrolysats de collagène (Langmaier *et al.* 2008) : (1) PEG 3350, (2) PEG 400, (3) PEG 600, (4) PEG 300 et (5) glycérol.

Les groupes hydroxyle polaires présents le long des chaînes de PEG développent des interactions plastifiant/polymère *via* des liaisons hydrogène qui remplacent, en partie, les interactions polymère/polymère (Yang *et al.* 2000). La capacité à former des liaisons hydrogène des PEG est dirigée par de nombreux facteurs dont la concentration en groupes hydroxyle, la taille du polymère, sa solubilité ou sa polarité. La formation de liaisons hydrogène diminue avec l'augmentation de la masse molaire des PEG car leur polarité et leur solubilité baissent, défavorisant les interactions avec les chaînes polymères (Turhan *et al.* 2001).

2.2. Procédés d'élaboration

Deux grandes familles de procédés existent pour produire des films de gélatine. La première regroupe les techniques dites en solvant qui consistent à fabriquer une solution, dans notre cas aqueuse, de polymère et de le mettre en forme soit par coulage : dans un moule (Jridi *et al.* 2013), entre deux plaques (Coppola *et al.* 2012) ou dans une boîte de Pétri (Bigi *et al.* 1998; Sobral *et al.* 2001b; Nur Hanani *et al.* 2012b) ; soit par casting où la solution est activement étalée sur un support. Les films obtenus sont ensuite séchés en conditions ambiantes ou avec de l'air chaud, sous ondes infra-rouge ou par des micro-ondes (Dangaran *et al.* 2009). Les

conditions de séchage affectent significativement les propriétés finales des films protéiques telles que leur aspect macroscopique, leur morphologie, leurs propriétés mécaniques et barrières (Perez-Gago *et al.* 2000).

La deuxième famille de procédés concerne les techniques d'extrusion. La gélatine solide (poudre ou résine) est extrudée avec des installations simples (Park *et al.* 2008) ou à double vis (Krishna *et al.* 2012; Nur Hanani *et al.* 2012a) avec l'ajout de glycérol ou sorbitol comme plastifiant. La vitesse et la température de l'extrusion influencent fortement les propriétés des films obtenus. Cette étape d'extrusion est régulièrement couplée avec une étape de mise en forme finale des films par moulage-compression (compression-molding) ou pression à chaud (heat-pressing).

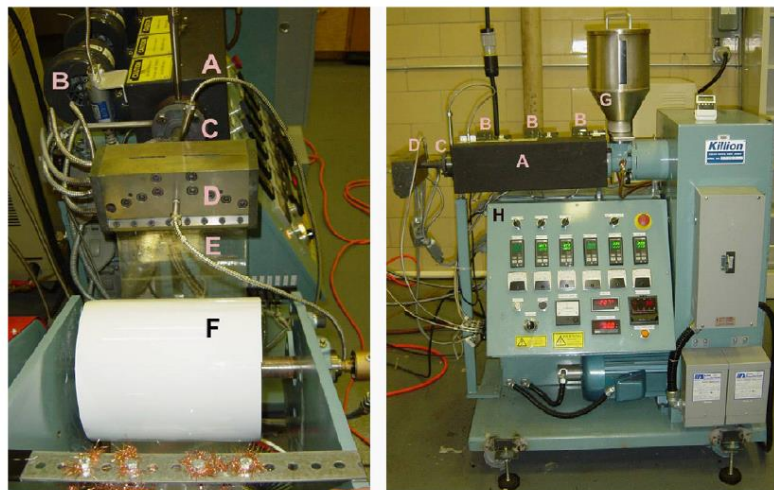


Figure I- 12 Extrudeuse simple vis utilisée par Park et al. (Park *et al.* 2008) : (A) cylindre, (B) zone de chauffe, (C) élément de centrage, (D) filière, (E) film de gélatine, (F) bobineuse refroidisseuse, (G) réservoir matière première et (H) panneau de contrôle

Les procédés en solvant sont beaucoup plus représentés dans la littérature (Table I- 4) que ceux par extrusion, du à la difficulté de mise en œuvre des seconds. Cependant l'extrusion est un procédé plus adapté à la production à l'échelle industrielle car il est plus rapide, moins encombrant et moins énergivore (Nur Hanani *et al.* 2014).

Table I- 4 Procédés utilisés pour les différents types de gélatine

procédé	Gélatine		référence
	origine	quantité	
casting	bovine	10% w/w	(Bertan <i>et al.</i> 2005; Dai <i>et al.</i> 2006b)
		26.5% w/w	(Achet <i>et al.</i> 1995)
		12% w/w	(Cao <i>et al.</i> 2009)
	porcine	26.5% w/w	(Achet <i>et al.</i> 1995)
		5% w/w	(Chiou <i>et al.</i> 2009)
	poisson	5% w/w	(Chiou <i>et al.</i> 2008) (Chiou <i>et al.</i> 2009)
Non précisé	10% w/w	(Dai <i>et al.</i> 2006a)	
coulage	bovine	7.5% w/v	(Rivero <i>et al.</i> 2010)
		9% w/w	(Ortiz-Zarama <i>et al.</i> 2014)
		4% w/w	(Yakimets <i>et al.</i> 2005)
		10% w/w	(Carvalho <i>et al.</i> 2004; Martucci <i>et al.</i> 2012)
		1% w/w	(Sobral <i>et al.</i> 2001b)
		30% w/w	(Coppola <i>et al.</i> 2012)
		4, 6, 8% w/v	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)
	porcine	4% w/w	(Andreuccetti <i>et al.</i> 2011)
		2% w/w	(Vanin <i>et al.</i> 2005; Bergo <i>et al.</i> 2007)
		5% w/w	(Bigi <i>et al.</i> 1998; Bigi <i>et al.</i> 2001; Bigi <i>et al.</i> 2004)
	4, 6, 8% w/v	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)	

		1% w/w	(Sobral <i>et al.</i> 2001b)
		3% w/v	(Park <i>et al.</i> 2008)
	poisson	2% w/v	(Carvalho <i>et al.</i> 2008b)
		3% w/v	(Ahmad <i>et al.</i> 2012)
		4, 6, 8% w/v	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)
		4% w/v	(Jridi <i>et al.</i> 2013)
	Non précisé	4-16% w/w	(Wang <i>et al.</i> 2007)
extrusion	porcine	Non-applicable	(Park <i>et al.</i> 2008)
	bovine porcine poisson	Non-applicable	(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012a)
	poisson	Non-applicable	(Krishna <i>et al.</i> 2012)

Park et al. (Park *et al.* 2008) et Krishna et al. (Krishna *et al.* 2012) ont comparé l'influence du procédé, coulage ou extrusion, sur les propriétés mécaniques et la température de transition vitreuse (Figure I- 13). Ils ont travaillé respectivement avec de la gélatine d'origine porcine et de poisson plastifiée avec 20% w/w de glycérol. Si le procédé n'a pas eu d'impact majeur sur la température de transition vitreuse, le choix de l'extrusion a des effets importants sur les propriétés mécaniques. Une forte diminution de la contrainte à la rupture et du module d'Young accompagnée d'une augmentation drastique de l'élongation ont été observées. Ces disparités peuvent être dues aux modifications dans le mécanisme de formation du film, par solubilisation dans l'eau ou par fonte de la gélatine, qui peuvent amener des organisations différentes de la matrice polymérique. De plus l'extrusion favorise l'organisation anisotrope du polymère en orientant les chaînes polymères.

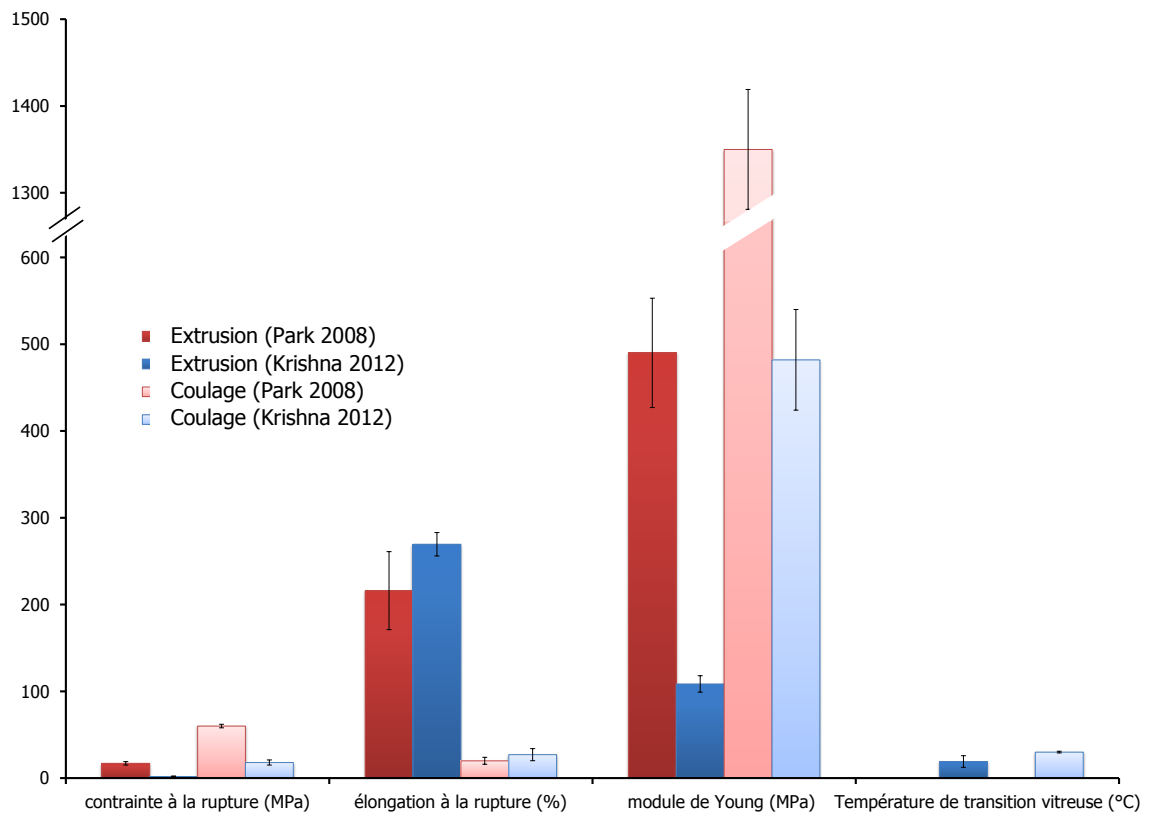


Figure I- 13 Influence du procédé d'élaboration des films de gélatine sur les propriétés mécaniques (Park *et al.* 2008; Krishna *et al.* 2012) sur la température de transition vitreuse (Krishna *et al.* 2012)

Le procédé de mise en forme de la gélatine a une grande influence sur les propriétés fonctionnelles finales du film obtenu et cela doit être pris en compte lors du choix de la technique par rapport aux applications visées.

3. La réticulation chimique de la gélatine

La gélatine étant une protéine hydrosoluble, de nombreux travaux se sont intéressés à sa modification pour assurer sa résistance à l'eau et sa stabilité dans le temps. Une méthode classique pour rendre un polymère insoluble consiste à augmenter sa masse molaire et à développer un réseau tridimensionnel par le biais d'une réticulation. Celle-ci peut être physique ou chimique suivant la nature des liaisons créées : interactions (ionique, liaison hydrogène) ou liaisons covalentes.

3.1. *Principe de la réticulation chimique*

La réticulation chimique est caractérisée par la création de liaisons covalentes. Ces dernières peuvent avoir différentes origines. Les chaînes de polymère peuvent réagir entre elles suite à une activation physique ou chimique (irradiation, chauffe, pression, changement de pH...) ou à l'addition d'une molécule ou d'une macromolécule chimiquement active qui va permettre la formation des liaisons covalentes entre les chaînes. De nombreux composés ont été utilisés pour réticuler la gélatine par réaction avec ses fonctions amine, carboxyle ou hydroxyle. La littérature référence l'utilisation d'enzyme telle que la transglutaminase (Carvalho *et al.* 2004) ; de composés chimiques tels que le glutaraldéhyde (Bigi *et al.* 1998; Bigi *et al.* 2001; Chiou *et al.* 2008; Ratanavaraporn *et al.* 2010; Catalina *et al.* 2011; Martucci *et al.* 2012), le glyoxal (Carvalho *et al.* 2006), les époxydes (Sung *et al.* 1996; Sung *et al.* 1999), les isocyanates (Bertoldo *et al.* 2007), les carbodiimines (Sung *et al.* 1999; Liang *et al.* 2004) ou le formaldéhyde (Sung *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 2004) ; et de molécules naturelles telles que l'acide tannique, l'acide férulique (Cao *et al.* 2007), l'acide caféique (Kosaraju *et al.* 2010), les succinimides, le gènipin (Bigi *et al.* 2002; Liang *et al.* 2004; Nickerson *et al.* 2006; Chiono *et al.* 2008) ou le glycéraldéhyde (Kosmala *et al.* 2000). Si le glutaraldéhyde reste le réticulant le plus largement utilisé, dû à son faible coût et à sa grande réactivité, sa cytotoxicité (Bonnard *et al.* 2010) incite à la recherche de réticulants alternatifs moins toxiques et si possible d'origine naturelle.

3.2. *Le glutaraldéhyde*

Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde séparé par trois méthylènes, disponible sous forme de solution aqueuse. En solution il ne se présente pas uniquement sous forme monomérique mais sous tout un panel de forme suivant le pH de la solution (Figure I- 14). La polymérisation du glutaraldéhyde a lieu par aldolisation (Figure I- 15).

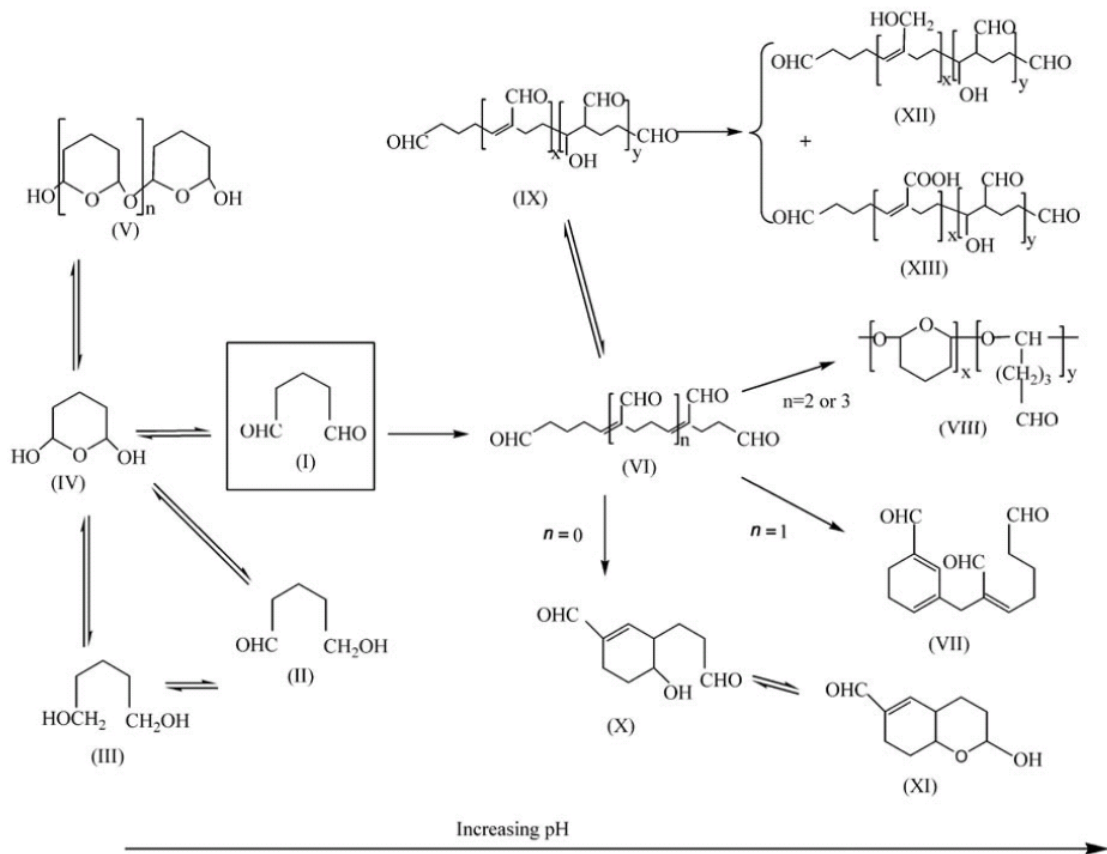


Figure I- 14 Forme possible du glutaraldéhyde en solution aqueuse (Migneault *et al.* 2004)

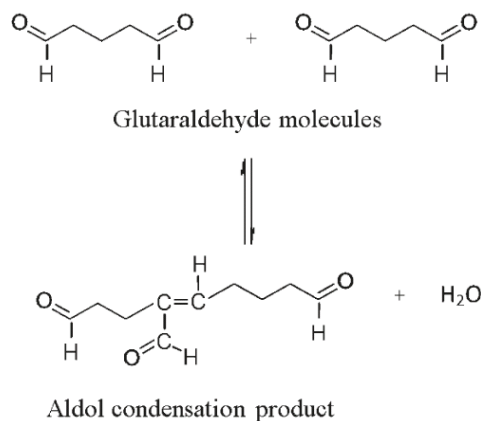


Figure I- 15 Réaction de condensation des molécules de glutaraldéhyde (Farris *et al.* 2009)

Le mécanisme réactionnel du glutaraldéhyde avec les protéines est dépendant du pH. En milieu basique, deux réactions d'addition cohabitent : (1) une addition de Michael où se produit l'addition conjuguée d'un groupe amine de la protéine avec une double liaison de l'oligomère α,β -

insaturé de glutaraldéhyde, (2) une réaction de Schiff où les groupements aldéhyde de l'oligomère de glutaraldéhyde et les fonctions amine des protéines produisent des imines stabilisées par conjugaison. Ces deux réactions peuvent se produire successivement pour permettre la liaison de plusieurs protéines sur le même oligomère de glutaraldéhyde et former le réseau tri-dimensionnel (Figure I- 16).

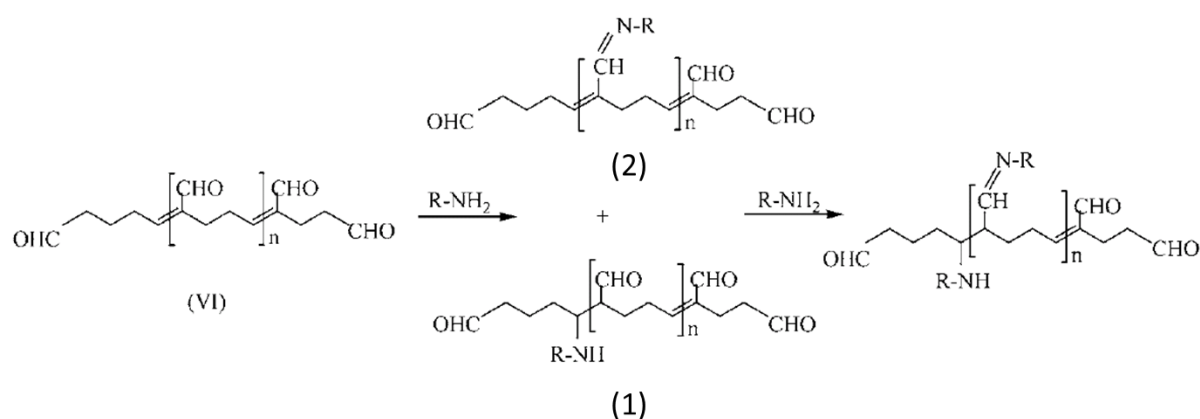


Figure I- 16 Réactions du polymère de glutaraldéhyde avec les protéines en conditions basiques (Migneault *et al.* 2004)

En conditions acides, une grande partie des groupements amine des protéines est protonnée défavorisant les réactions nucléophiles décrites précédemment. La réticulation se produirait par réaction entre les groupes aldéhyde des polymères de glutaraldéhyde et les groupements hydroxyle des hydroxyproline et des hydroxylysine, formant ainsi des hémiacétales (Farris *et al.* 2009) (Figure I- 17).

La multiplicité des formes du glutaraldéhyde en solution et des fonctions présentes sur les protéines rend difficile l'explicitation d'un seul mécanisme réactionnel. Il est probable que plusieurs réactions différentes se produisent simultanément.

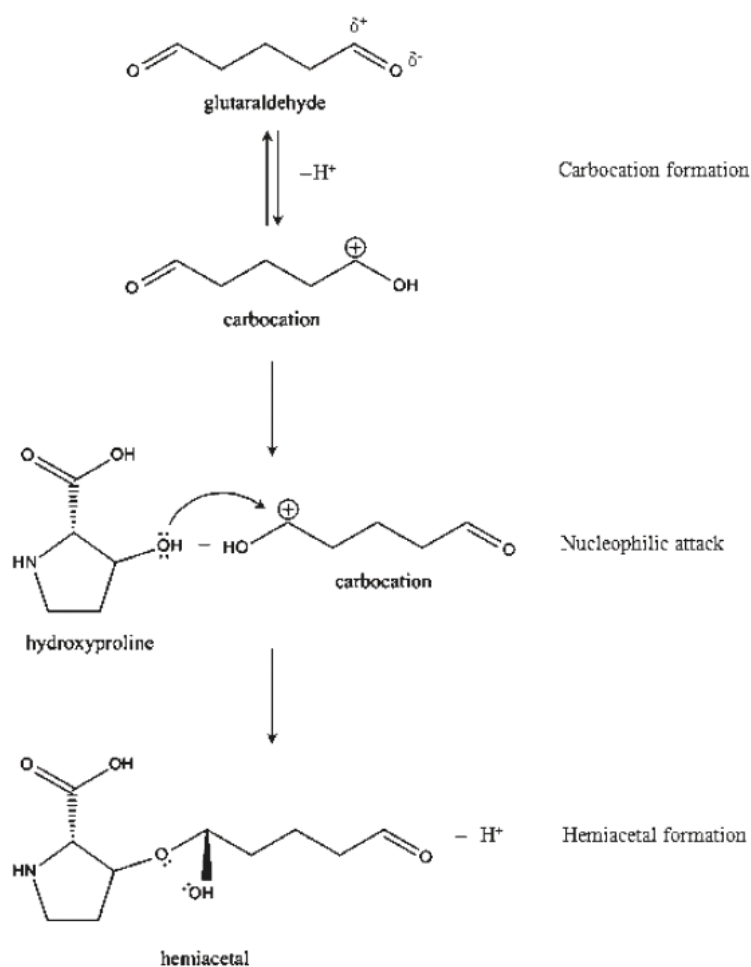


Figure I- 17 Réaction du polymère de glutaraldéhyde avec les protéines en conditions acides (Farris *et al.* 2009)

3.3. Les réticulants alternatifs

3.3.1. Un dialdéhyde alternatif : le téréphthalaldéhyde

Le téréphthalaldéhyde est un dialdéhyde aromatique (Figure I- 18) insoluble dans l'eau. Il présente l'avantage d'être non toxique et de ne pas pouvoir se polymériser du fait de l'absence d'hydrogène sur le carbone en α . Les doublets électroniques des deux oxygènes étant conjugués ce qui diminue leur nucléophilie, le téréphthalaldéhyde est moins réactif que le glutaraldéhyde.

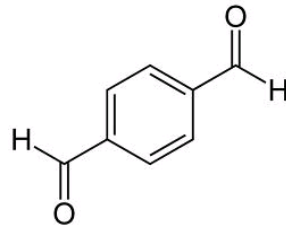


Figure I- 18 Structure chimique du téréphthalaldéhyde

Il n'existe pas à notre connaissance de référence dans la littérature de l'utilisation du téréphthalaldéhyde comme réticulant de la gélatine. Cependant son utilisation comme réticulant a été décrit pour le poly(alcool vinylique) (Qiao *et al.* 2005) par réaction d'addition entre les fonctions aldéhyde du téréphthalaldéhyde et alcool du PVA ; ainsi que comme réticulant du chitosan par formation d'iminés suivant une réaction de Schiff (Chu *et al.* 2013) (Figure I- 19). La réactivité du téréphthalaldéhyde avec les fonctions amines du chitosan ainsi que son utilisation comme réactif pour la production de polyiminés par réaction avec des diamines (Natansohn *et al.* 1991), laisse penser qu'il pourrait être un réticulant pour la gélatine.

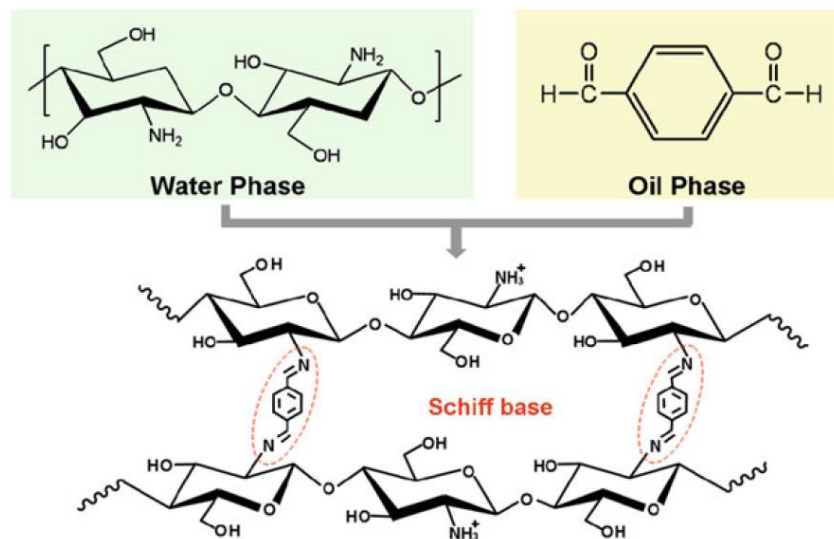


Figure I- 19 Réaction de réticulation des fonctions amines du chitosan avec le téréphthalaldéhyde (Chu *et al.* 2013)

3.3.2. Un phénol biosourcé : l'acide férulique

L'acide férulique est un phénol biosourcé faiblement toxique très répandu dans le règne végétal puisqu'il est un agent réticulant des parois cellulaires végétales (Liyama *et al.* 1984). Il a de nombreuses fonctions phytochimiques, il est notamment antimicrobien et antioxydant (Ou *et al.* 2004).

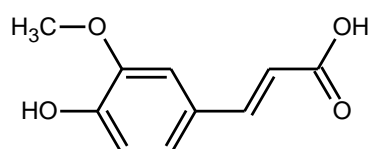


Figure I- 20 Structure chimique de l'acide férulique

Les phénols peuvent interagir avec les protéines à la fois de façon covalente (liaisons σ et π) et non-covalente (liaisons hydrogène, ioniques, hydrophobes). Dans des conditions non-oxydantes, ce sont des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène qui stabilisent les complexes protéines/phénols (Chen *et al.* 2004). Les interactions peuvent être multi-sites (plusieurs phénols liés à une protéine) ou multi-dentâtes (un phénol lié à plusieurs protéines). Le type d'interaction dépend de la nature et du ratio molaire des phénols et des protéines impliqués (Prigent *et al.* 2003).

Outre les liaisons faibles, l'acide férulique peut se lier de façon covalente avec les protéines suivant trois mécanismes (Ou *et al.* 2005). Si l'acide férulique est oxydé sous sa forme quinone, celle-ci peut réagir avec les fonctions amines et thiols de la protéine (Figuroa-Espinoza *et al.* 1999; O'connell *et al.* 2001). Un exemple de mécanisme impliquant une protéine et la forme quinone d'un polyphénol est présenté Figure I- 21. Il peut aussi réticuler avec les tyrosines et d'autres acides aminés par un mécanisme impliquant la forme radical libre de l'acide férulique et un intermédiaire radical libre stabilisé par résonnance (Oudgenoeg *et al.* 2001; Hopkins *et al.* 2003). La forme radicale libre de l'acide férulique peut réagir avec elle-même pour former l'acide diférulique. Enfin, la présence d'une fonction acide carboxylique permet à l'acide férulique de s'estérifier avec les fonctions hydroxyles des acides aminés tels que la sérine.

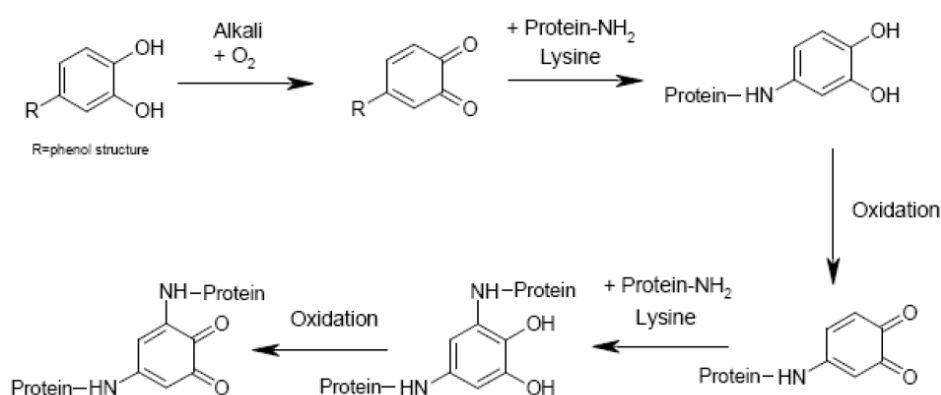


Figure I- 21 Modèle de mécanisme de réaction entre les parties lysine d'une protéine et la forme quinone d'un polyphénol (Rawel *et al.* 2001)

3.3.3. Les N-hydroxysuccinimide esters

Cette famille de composés est dérivée de la N-hydroxysuccinimide (Figure I- 22) qui est un réactif non toxique utilisé avec les carbodiimines pour réticuler les protéines suivant les mécanismes décrits par Olde Damink (Olde Damink *et al.* 1996a) (Figure I- 23).

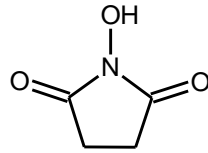


Figure I- 22 Structure chimique de la N-hydroxysuccinimide

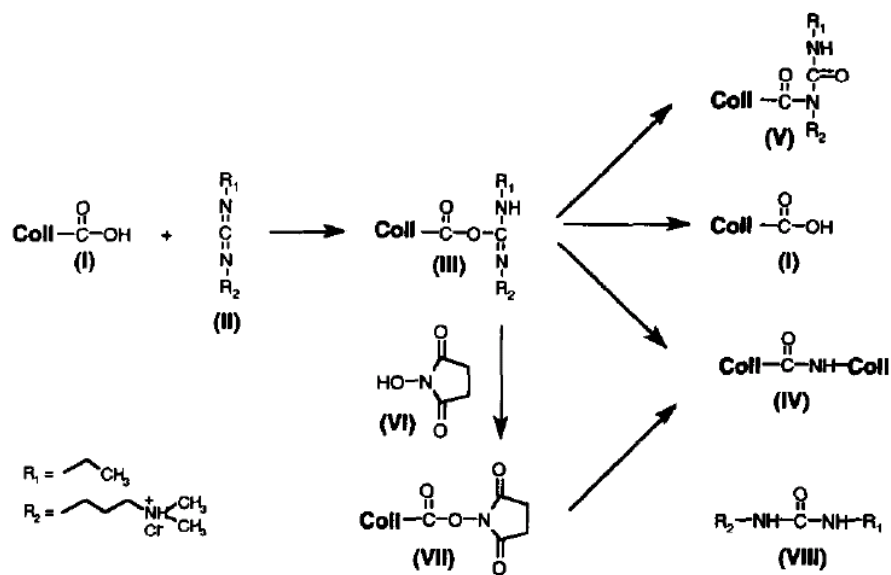


Figure I- 23 Réactions de réticulation du collagène (coll) avec une carbodiimine ($R_1-N=C=N-R_2$) et le N-hydroxysuccinimide (Olde Damink *et al.* 1996a)

Les N-hydroxysuccinimide esters réagissent avec les fonctions α -amines terminales et ϵ -amines des résidus lysine pour former des liaisons covalentes amides (Chang *et al.* 2004). Ces composés étant hydrolysables, il est important de les mettre en œuvre dans des solutions tampons (Abdella *et al.* 1979).

4. Propriétés des films de gélatine

De nombreuses caractérisations structurelles et fonctionnelles peuvent être réalisées sur les films de gélatine suivant leur application. Ce chapitre n'ayant pas vocation à être une revue exhaustive, ne seront traitées que les propriétés dont il sera question dans ce travail de thèse. Cependant il reste intéressant de citer quelques-unes de ces grandes familles de caractérisations :

- Les analyses colorimétriques et d'opacité, notamment pour les applications dans le domaine des emballages où la transparence du film est très importante.
- Les propriétés mécaniques autres que celles obtenues par test de traction, comme la résistance à la déchirure, à la perforation...
- La perméabilité à la vapeur d'eau.
- La biodégradabilité des films.
- Leur capacité en tant que support de culture cellulaire, ces tests sont très répandus pour les applications en ingénierie tissulaire.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les propriétés mécaniques en traction et les propriétés thermiques, caractérisations nécessaires pour les polymères, ainsi que sur les propriétés de transfert gazeux qui est notre application visée.

4.1. *Propriétés mécaniques en traction*

Les propriétés mécaniques en traction permettent de déterminer plusieurs caractéristiques mécaniques d'un film par l'établissement du diagramme contrainte vs. élongation (Figure I- 24) :

- Le module élastique ou module d'Young (E) : la pente de la partie linéaire initiale du diagramme.
- La limite élastique (σ_{pl} et ϵ_{pl}) ou limite du domaine proportionnel.
- La limite du début de la déformation plastique (yielding), qui peut dans le cas des films de gélatine être associée à la limite viscoélastique (σ_y et ϵ_y).
- Les valeurs de contrainte (σ_b) et d'élongation (ϵ_b) à la rupture du film.

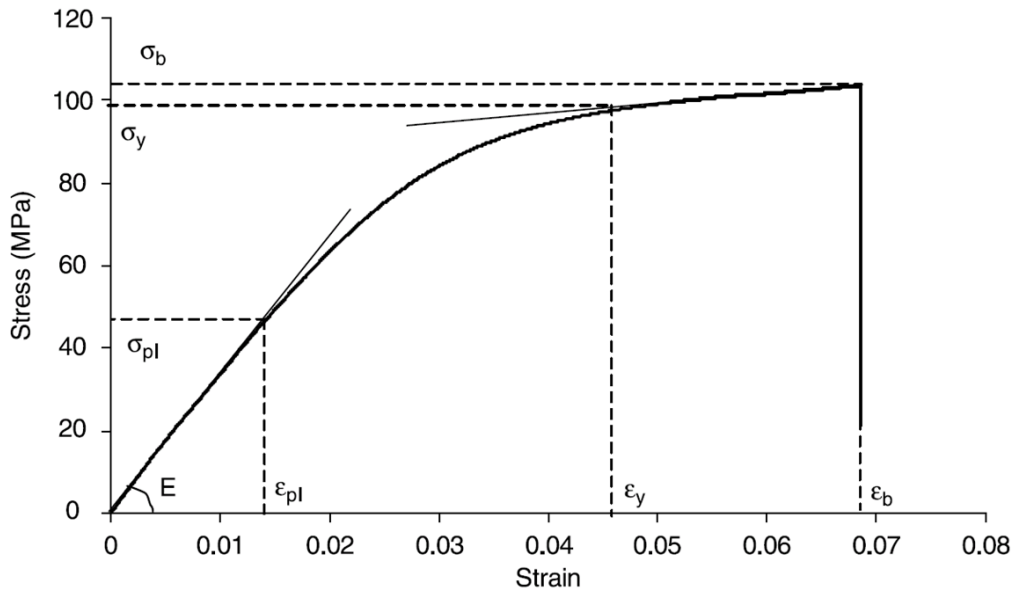


Figure I- 24 Diagramme classique contrainte vs. élongation d'un test en traction (Yakimets *et al.* 2005)

La plupart des publications référencent seulement le module d'Young et les valeurs à la rupture. Les propriétés mécaniques des films de gélatine sont très dépendantes de certains facteurs :

- L'épaisseur du film.
- Le procédé de mise en œuvre du film (cf. partie 2.2).
- La plastification.
- La réticulation.
- L'origine de la gélatine.
- Le Bloom de la gélatine.
- Les conditions de séchage.

4.1.1. Influence de la plastification

L'utilisation de plastifiants diminue le module d'Young et augmente l'élongation à la rupture (Figure I- 25). La compilation des résultats de la littérature montre que les valeurs obtenues par ce type de test sont très disparates (écart-types importants) particulièrement pour l'élongation à la rupture dont les valeurs vont de 3 à 260% (resp. (Bergo *et al.* 2007) et (Bigi *et al.* 2004)) pour des films de gélatine porcine non plastifiés.

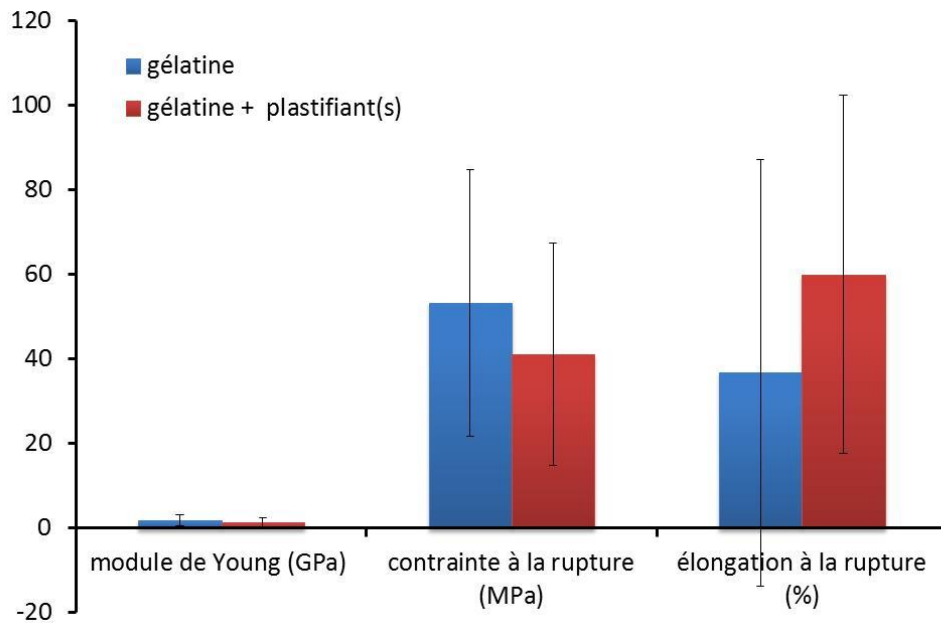


Figure I- 25 Valeurs moyennes des propriétés mécaniques des films de gélatine obtenus par procédé en solvant, plastifiés ou non, référencés dans la littérature : (Bigi *et al.* 1998; Bigi *et al.* 2001; Bigi *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Bertan *et al.* 2005; Thomazine *et al.* 2005; Yakimets *et al.* 2005; Dai *et al.* 2006b; Bergo *et al.* 2007; Cao *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008b; Chiou *et al.* 2008; Park *et al.* 2008; Cao *et al.* 2009; Chiou *et al.* 2009; Rivero *et al.* 2010; Andreuccetti *et al.* 2011; Ahmad *et al.* 2012; Martucci *et al.* 2012; Nur Hanani *et al.* 2012b; Jridi *et al.* 2013; Ortiz-Zarama *et al.* 2014)

4.1.2. Influence de la réticulation chimique

La réticulation chimique de la gélatine rigidifie les films obtenus. Bigi (Bigi *et al.* 2001) et Cao (Cao *et al.* 2007) ont respectivement étudié les effets du glutaraldéhyde et de l'acide férulique sur les propriétés mécaniques de films de gélatine porcine et bovine (Figure I- 26, Figure I- 27). L'addition de réticulant conduit aux mêmes tendances, l'augmentation de la contrainte à la rupture jusqu'à atteindre un plateau et la diminution de l'élongation à la rupture. Bigi *et al.* ont également observé l'augmentation du module d'Young. Tous ces comportements sont compatibles avec la réduction de la mobilité des chaînes polymériques due à la création de ponts intra- et intermoléculaires. L'impact du réticulant est très dépendant de la nature de celui-ci. Les di-aldéhydes (glutaraldéhyde, formaldéhyde) sont très efficaces et modifient drastiquement les propriétés de la gélatine même à faible concentration (Martucci *et al.* 2012) alors que les acides (acide férulique, acide tannique) et les enzymes (transglutaminase) entraînent des modifications plus légères (Carvalho *et al.* 2004) dues à la nature de la réaction chimique mise en œuvre lors de la réticulation et à la réactivité et la taille du réticulant.

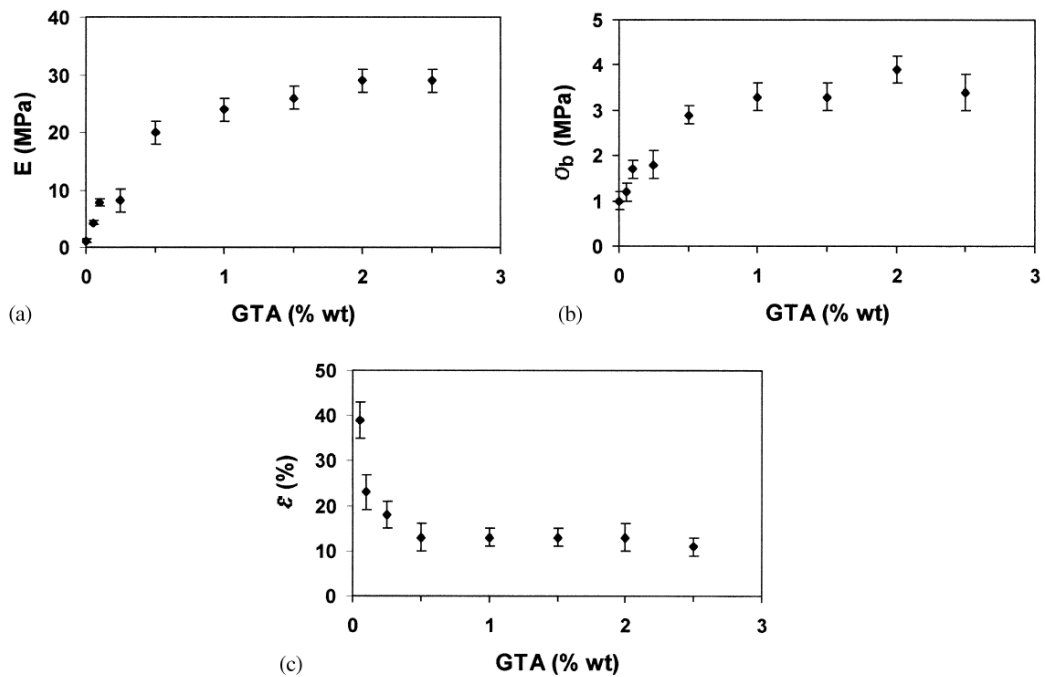


Figure I- 26 Influence de la réticulation avec du glutaraldéhyde sur (a) le module d'Young, (b) la contrainte à la rupture et (c) l'élongation à la rupture de films de gélatine porcine (Bigi *et al.* 2001)

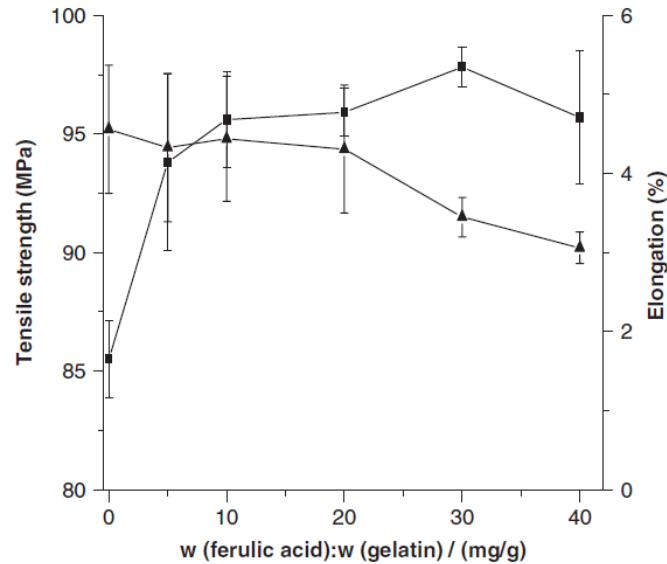


Figure I- 27 Influence de la réticulation avec de l'acide férulique sur la contrainte (■) et l'élongation à la rupture de films (▲) de gélatine bovine (Cao *et al.* 2007)

4.1.3. Influence de l'origine de la gélatine

L'origine de la gélatine, bovine, porcine ou ichtyenne ; Chiou et Nur Hanani *et al.* (Chiou *et al.* 2008; Nur Hanani *et al.* 2012b) ont comparé les propriétés mécaniques de films à respectivement

5 et 6wt-% de gélatine de différentes origines (Figure I- 28). Si l'origine n'a pas eu d'influence sur le module d'Young, Chiou et Nur Hanani ont observé que les films à base de poisson ont une élongation à la rupture plus faible que ceux originaires de mammifère. En ce qui concerne la contrainte à la rupture, seul Chiou a mis en évidence une différence significative entre les types de gélatine. Ces différences sont à mettre à la fois sur le compte des compositions en acide aminé des différentes gélatines et leur distribution de masse molaire (Gómez-Guillén *et al.* 2009).

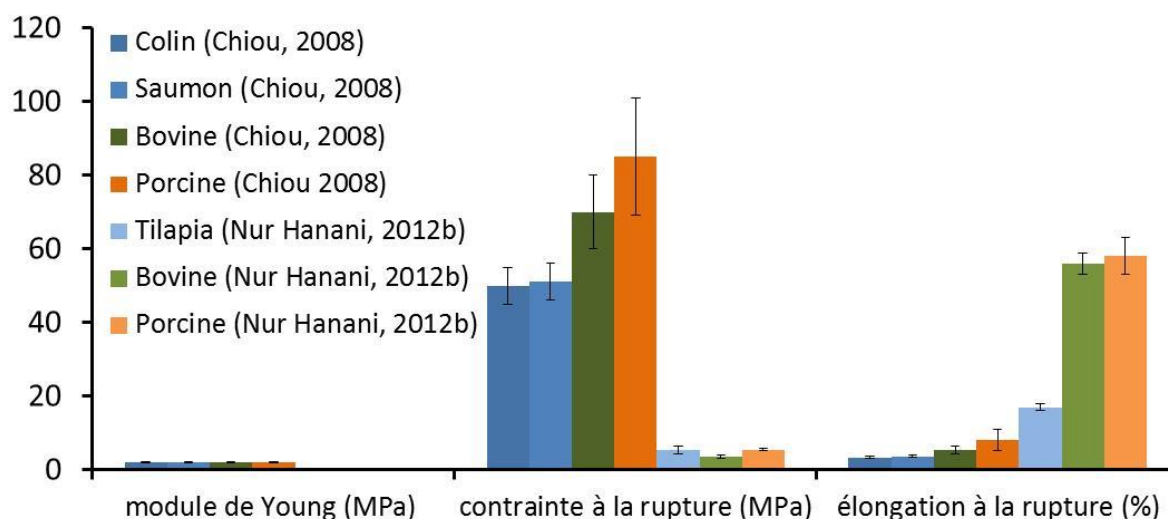


Figure I- 28 Influence de l'origine de la gélatine sur les propriétés mécaniques (Chiou *et al.* 2008; Nur Hanani *et al.* 2012b)

4.1.4. Influence du Bloom

Le Bloom qui correspond à la rigidité du gel. Bigi *et al.* (Bigi *et al.* 2004) ont étudié son influence sur le module d'Young, la contrainte et l'élongation à la rupture (Figure I- 29). Ils ont observé une augmentation des valeurs de ces trois propriétés avec l'augmentation du Bloom avec une hausse plus prononcée pour le module de Young. Ces résultats ont été mis en relation avec l'augmentation du degré de renaturation avec le Bloom qui rigidifie la structure. En effet plus le nombre de triple hélice est important plus la cristallinité apparente de la gélatine augmente et plus les mouvements des chaînes de polymère sont gênés.

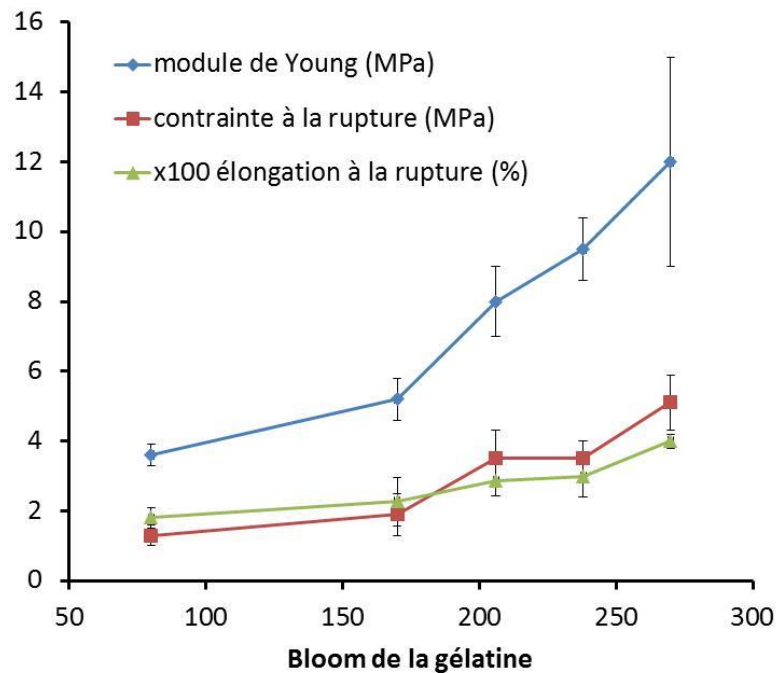


Figure I- 29 Influence du Bloom de la gélatine sur les propriétés mécaniques, adapté de (Bigi *et al.* 2004)

4.1.5. Influence des conditions de séchage

les conditions de séchage des films après mise en forme (température, humidité relative). La température de séchage est un paramètre essentiel puisque qu'il va influencer directement sur le degré de renaturation de la gélatine. Chiou (Chiou *et al.* 2009) a mesuré les propriétés mécaniques de films de gélatine de poisson pour quatre températures de séchage. Le module d'Young reste inchangé alors que la contrainte et l'élongation à la rupture diminuent entre 4 et 24°C pour atteindre un palier (Figure I- 30). En effet, si le film est séché au-dessous de la température de gélification (cold-cast), les chaînes de gélatine restent toujours en solution dans l'eau peuvent se ré-organiser sous forme de triples hélices avant l'évaporation de l'eau qui fige la structure dans cette configuration alors que les hot-casted films sont amorphes (Gómez-Guillén *et al.* 2002).

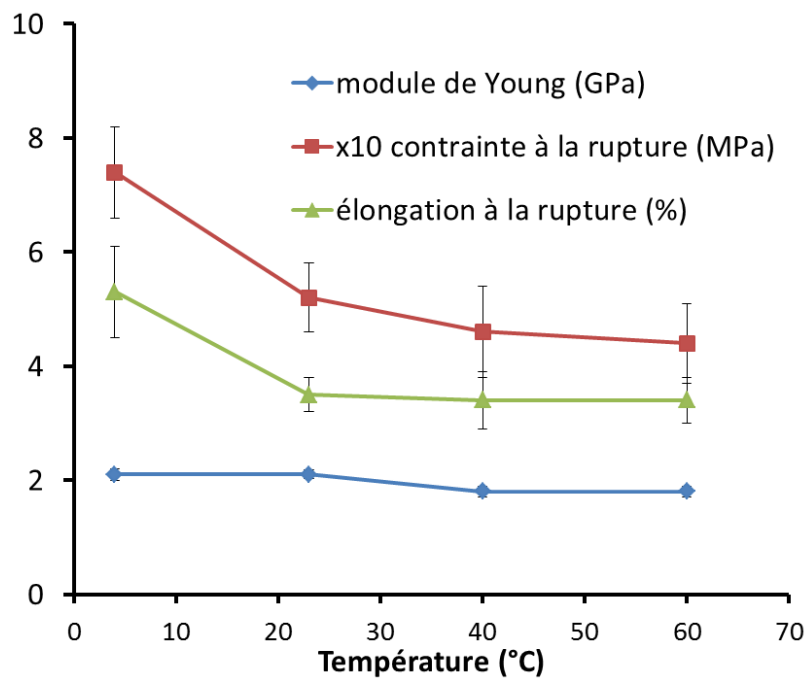


Figure I- 30 Influence de la température de séchage des films de gélatine de colin sur les propriétés mécaniques, adapté de (Chiou *et al.* 2009)

4.2. Propriétés thermiques

L'étude des propriétés thermiques permet d'obtenir plusieurs informations :

- La température de dégradation qui donne les limites d'utilisation des films.
- La température de transition vitreuse (T_g) qui est essentielle à connaître dans le cas de procédé de mise en œuvre sans solvant (extrusion, molding...) et qui indique la qualité de la plastification, l'addition d'un plastifiant diminuant la T_g .
- L'enthalpie de dénaturation qui permet de calculer le degré de renaturation de la gélatine c'est-à-dire la quantité de triples hélices dans le film.

Comme les propriétés mécaniques, les propriétés thermiques sont dépendantes de l'origine de la gélatine, de la formulation (plastification, réticulation) et des conditions de séchage ce qui rend difficile la comparaison directe entre les données de la littérature. Cependant des tendances sont observables. La température de dégradation d'une gélatine de poisson réticulée avec du formaldéhyde a été mesurée entre 230 et 260°C (Fraga *et al.* 1985) alors celles de films plastifiés avec 25 et 20wt-% de glycérol, respectivement de poisson et de bœuf, ont été déterminées à respectivement 157°C (Ahmad *et al.* 2012) et 113°C (Rivero *et al.* 2010). A titre de référence Rivero et al. ont mesuré la température de dégradation de leur gélatine bovine à 88°C. L'augmentation de masse molaire par la réticulation ou l'ajout d'interactions faibles par la plastification augmente l'énergie nécessaire pour dégrader la matrice polymère.

Les différences entre les valeurs issues de la littérature pour la température de transition vitreuse sont très importantes allant de -20°C (Sobral *et al.* 2001b; Coppola *et al.* 2012) à $120-160^{\circ}\text{C}$ (Fraga *et al.* 1985; Coppola *et al.* 2012) rendant impossible une prise en compte globale des résultats. Néanmoins certaines publications se concentrent sur l'effet d'un paramètre sur un type de gélatine donnant des indications sur son influence sur la température de transition vitreuse. Catalina (Catalina *et al.* 2011) a montré que la réticulation avec le glutaraldéhyde, par trempe ou par addition directe, augmente la Tg des films en gélatine (Figure I- 31). La densification du réseau polymérique réduit la mobilité des chaînes et l'énergie nécessaire pour le changement de phase est plus importante.

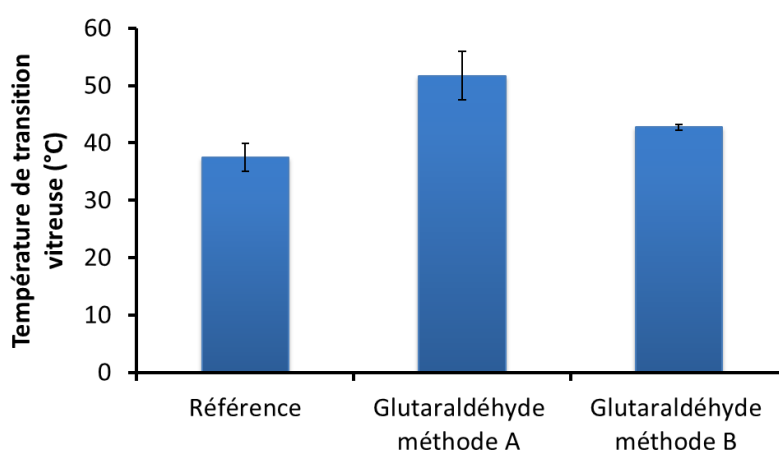


Figure I- 31 Influence de l'ajout de glutaraldéhyde et du procédé de réticulation sur la température de transition vitreuse ; (Méthode A) trempe des films de gélatine dans une solution de glutaraldéhyde, (méthode B) ajout du réticulant directement dans la solution de gélatine avant coulage. Adapté de (Catalina *et al.* 2011)

Vanin (Vanin *et al.* 2005) a étudié l'effet de l'ajout de polyols sur la température de transition vitreuse de films de gélatine porcine. Comme attendu (cf. 2.1.), la température de transition vitreuse diminue avec l'augmentation de la quantité de plastifiant (Figure I- 32). Les différences observées entre les polyols s'expliquent par les différences d'hygroscopie de ceux-ci. Une corrélation existe entre la quantité totale de plastifiant (polyol + eau) présente dans le film et la température de transition vitreuse. L'eau étant un plastifiant des protéines, il faut tenir compte de sa présence et des interactions qu'elle établit non seulement avec la gélatine mais aussi avec le plastifiant.

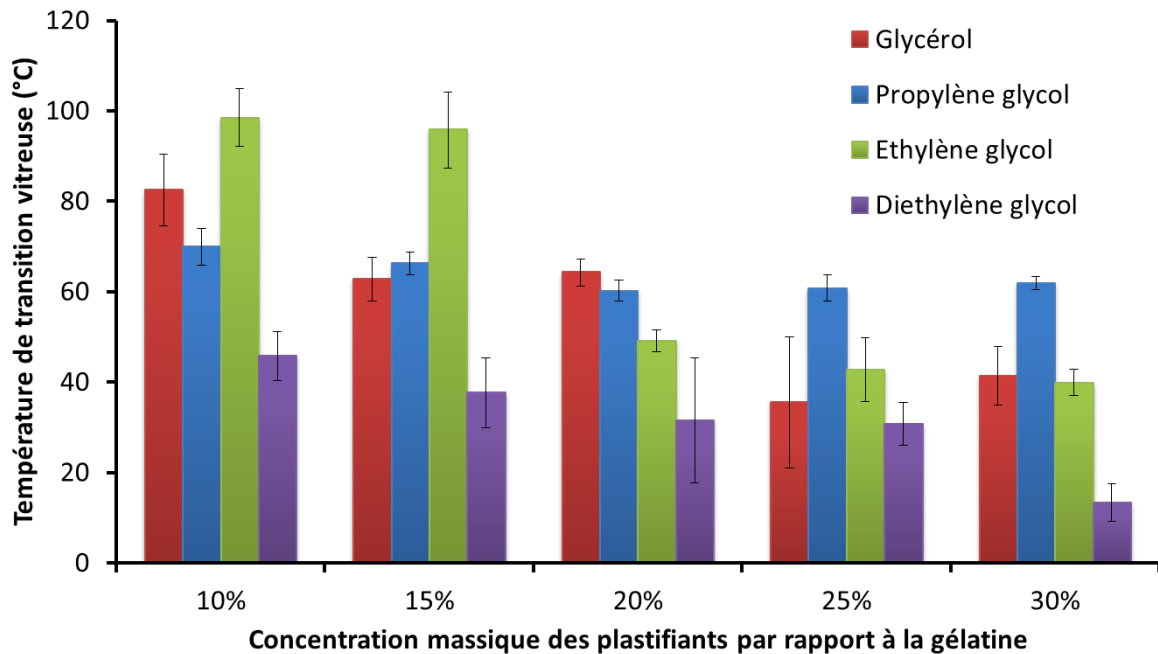


Figure I- 32 Influence de la concentration et de la nature des plastifiants sur la température de transition vitreuse de film en gélatine porcine. Adapté de (Vanin *et al.* 2005)

Un des facteurs structurels essentiels influant sur les propriétés fonctionnelles de la gélatine est la quantité de chaînes polymères organisées sous forme de triples hélices ou degré de renaturation. Alors que les plastifiants de la famille des polyols et l'épaisseur des films n'ont pas d'influence significative sur le degré de renaturation (Sobral *et al.* 2001a; Vanin *et al.* 2005; Dai *et al.* 2006a), d'autres facteurs comme les conditions de séchage peuvent considérablement modifier la transition colloïde/triples hélices. L'influence de la température de séchage sur l'organisation structurelle de la gélatine bovine a été étudiée par Dai (Dai *et al.* 2006a). Ils ont montré que la quantité de triples hélices diminue de 24% à 0% avec l'augmentation de la température de séchage de 5 à 50°C (Figure I- 33). Comme expliqué dans la partie 4.1., suivant si la gélatine est séchée au-dessous ou au-dessus de sa température de gélification, la gélatine a la possibilité ou pas de figer sa structure sous forme de triples hélices avant l'évaporation de l'eau.

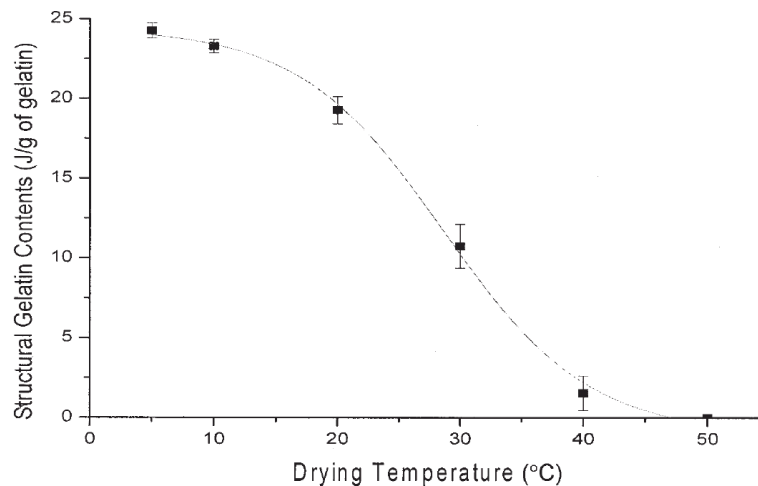


Figure I- 33 Influence de la température de séchage sur le degré de renaturation de films de gélatine bovine (Dai *et al.* 2006a)

Le degré de renaturation est fortement lié aux interactions avec l'eau, puisque les triples hélices sont structurées par l'eau liée par liaisons hydrogène. Dai (Dai *et al.* 2006a) a montré que pour un séchage entre 30 et 65% d'humidité relative, le degré de renaturation n'affiche pas de variation supérieure à 5%. Par contre Yakimets (Yakimets *et al.* 2005), après avoir séché les films à $45 \pm 5\%$ d'humidité, les a réhydraté dynamiquement puis a mesuré par DSC l'enthalpie de dénaturation des films (Figure I- 34). La formation de triples hélices est favorisée pour une teneur en eau des films entre 7,6 et 14%, cette gamme correspond à l'eau de structure, en deçà il n'y pas assez d'eau pour stabiliser toutes les triples hélices, au-dessus l'eau en excès réorganise la structure en faveur de la forme colloïdale.

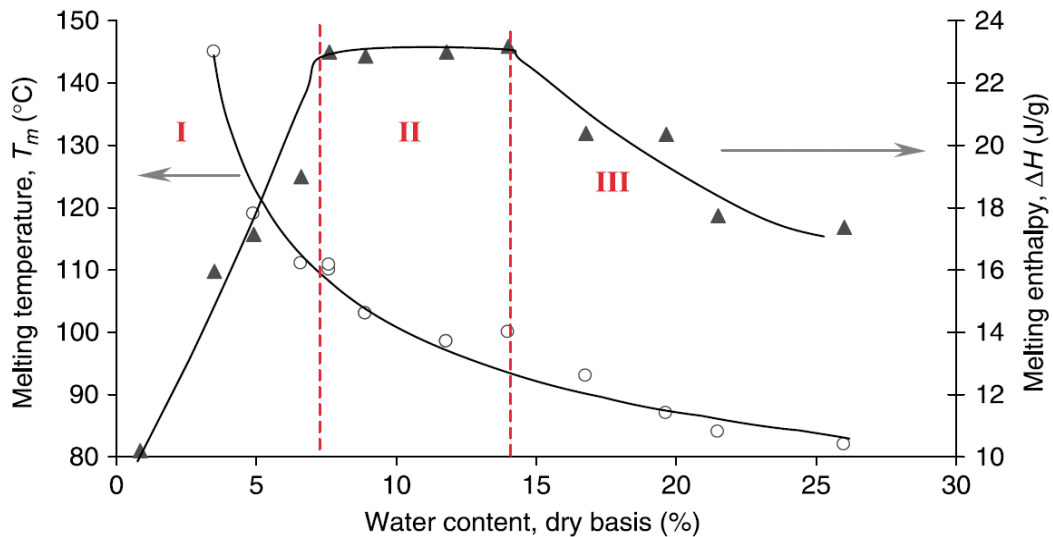


Figure I- 34 Influence de quantité d'eau présente dans des films de gélatine bovine sur l'enthalpie et la température de dénaturation (Yakimets *et al.* 2005)

4.3. Propriétés de transfert gazeux à travers des films minces

4.3.1. Rappels théoriques

4.3.1.1. Le modèle de solution-diffusion

Le transport gazeux à travers une membrane dense est habituellement décrit par le mécanisme de solution-diffusion (Graham 1866; Klopffer *et al.* 2001). Le transport à travers le matériau dense se déroule en plusieurs étapes :

- Le gaz s'absorbe à la surface amont du polymère, s'y dissout et il s'établit un équilibre rapide entre les phases solide et gazeuse.
- Les molécules de gaz diffusent dans le matériau membranaire de manière aléatoire par des sauts successifs avec une fréquence de ϕ sauts par unité de temps d'une longueur δ . Ces déplacements sont définis par une grandeur D , le coefficient de diffusion établi par Kumins (Kumins *et al.* 1968).

$$D = \frac{1}{6} \phi \delta^2$$

I. 5

- Les molécules de gaz se désorbent de la surface aval de la membrane

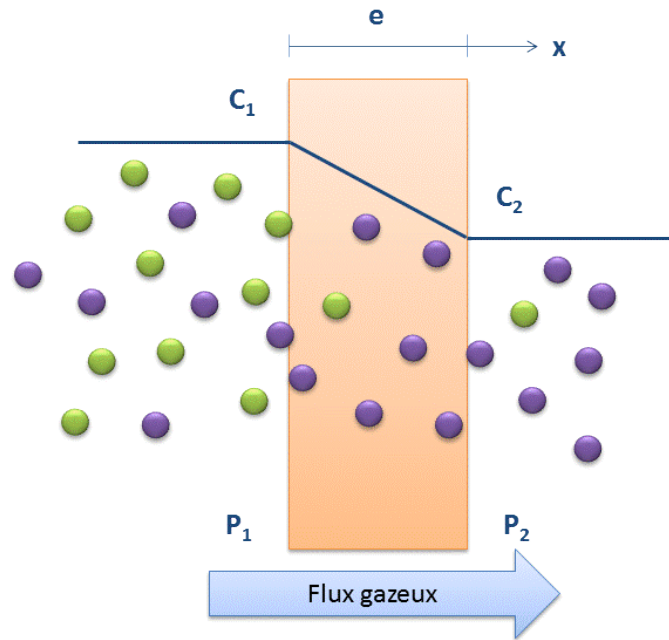


Figure I- 35 Schématisation du mécanisme de solution-diffusion lors de la perméation de gaz à travers une membrane dense

Le mécanisme de solution-diffusion est dirigé par la différence d'activité thermodynamique existant entre les faces amont et aval de la membrane ainsi que par les interactions intermoléculaires existant entre les molécules perméant et la matrice polymérique constituant la membrane. Le gradient de concentration oriente la diffusion vers les activités décroissantes. Les différences de perméabilité entre les divers gaz ne sont donc pas entièrement imputables à la diffusivité des gaz mais aussi aux différences d'interactions physico-chimiques des gaz dans le polymère. Le modèle de solution-diffusion suppose que la pression ainsi que le gradient de potentiel chimique à travers le film soit uniforme.

4.3.1.2. Le coefficient de diffusion (D)

La diffusion est le mécanisme par lequel une molécule est déplacée dans un système grâce à des mouvements moléculaires aléatoires. Le coefficient de diffusion (D) est donc le terme qui représente la contribution cinétique de la perméation. D reflète la mobilité du gaz pénétrant (soluté) dans la matrice polymère.

Dans le cas de la diffusion fickienne, le transport d'un perméat à travers des polymères homogènes isotropes est bien décrit par les lois phénoménologiques de Fick (Fick 1855). La première loi (I. 6) relie le flux spécifique J au gradient de concentration, le transfert étant supposé en régime permanent et unidirectionnel. Pour que l'hypothèse de la diffusion

unidirectionnelle soit valide, l'épaisseur de la membrane doit être très petite devant les autres dimensions.

$$J_x = -D \frac{dc}{dx} \quad \mathbf{I. 6}$$

En régime transitoire, le transfert de matière par diffusion est non nul et la concentration en soluté est dépendante du temps et de l'espace. Il est décrit par la seconde loi de Fick (I. 7).

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial J_x}{\partial x} = \frac{\partial (D \nabla c)}{\partial x} = \frac{\partial D}{\partial x} \frac{\partial c}{\partial x} + D(c) \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \mathbf{I. 7}$$

Où J est la densité de flux de perméat à travers la membrane d'épaisseur e , D est le coefficient de diffusion et $\frac{\partial c}{\partial x}$ est le gradient de concentration c en soluté dans la direction x allant de la face amont (notée 1) à la face aval (notée 2).

Cette équation différentielle (I. 7) peut être intégrée en prenant en compte les conditions initiales ($t=0$) et les conditions aux limites ($x=0, e$) (Crank 1975). Deux cas se présentent :

(1) D est constant :

Pour de nombreux couples soluté-polymère, et dans certaines conditions, D peut être considéré constant dans toute l'épaisseur de la membrane et l'équation I. 7 devient :

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad \mathbf{I. 8}$$

(2) D dépend de la concentration :

Dans la plupart des cas, D est dépendant de la concentration de soluté et est noté $D(c)$. La définition d'un coefficient de diffusion moyen \bar{D} sur toute l'épaisseur de la membrane simplifie l'équation I. 7 (Park *et al.* 1968):

$$\bar{D} = \frac{\int_{c_2}^{c_1} D(c) dc}{\int_{c_2}^{c_1} dc} \frac{1}{c_1 - c_2} \int_{c_2}^{c_1} D(c) dc \quad \mathbf{I. 9}$$

Lorsque le régime stationnaire est atteint, l'équation I. 9 devient:

$$\bar{D} = \frac{1}{c_1 - c_2} \int_{c_2}^{c_1} D(c) dc \quad \text{I. 10}$$

Des valeurs apparentes de D peuvent être obtenues par la méthode du « time lag » développée par Barrer (Barrer *et al.* 1939). Cette méthode analytique détaillée par (Flaconneche *et al.* 2001) est présentée dans le chapitre II de ce manuscrit.

4.3.1.3. Le coefficient de solubilité (S)

Le coefficient de solubilité représente la contribution thermodynamique et dépend à la fois des interactions soluté/polymère et de la condensabilité des gaz. Pour de faibles pressions et si on considère les gaz parfaits, S peut être exprimé par la loi de Henry.

$$c = S(c) P_1 \quad \text{I. 11}$$

Concernant les polymères vitreux, la dissolution de Henry décrit correctement la dissolution de petites molécules, en particulier les gaz simples et les molécules peu solubles présentant peu d'interactions avec le polymère. Ce modèle s'applique également au processus de dissolution des gaz permanents dans les élastomères (Frisch 1980; Stern *et al.* 1981; Flaconneche 1995). La dissolution est alors définie par l'équation de l'isotherme linéaire :

$$c = k_D P_1 \quad \text{I. 12}$$

Avec c : concentration en molécules dissoutes dans le polymère (mol.m^{-3})

k_D : constante de Henry, c'est-à-dire la pente de l'isotherme ($\text{mol.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$)

P_1 : pression amont (Pa)

Quand S n'est pas dépendant de la concentration, $S = k_D$. Cependant généralement, S est dépendant de la température, de la pression ou de la concentration. Différents modèles de sorption ont été développés pour décrire ces influences.

4.3.1.4. Les modes de sorption

La sorption est un terme qui regroupe tout un faisceau de phénomènes menant à la dissolution du soluté dans la matrice polymère : l'absorption, l'adsorption, le piégeage dans des microvides ou l'agglomération d'agrégats. De plus pour un même polymère, les mécanismes de sorption mis en œuvre peuvent être différents suivant la nature et la concentration du soluté, la température, la plastification du polymère, etc. Pour les mélanges de gaz, la compétition entre les solutés

rajoute des déviations supplémentaires importantes par rapport aux valeurs de solubilités obtenues pour les gaz purs (Costello *et al.* 1993).

Nous ne rentrerons pas ici dans les détails des modèles associés aux différents modes de sorption mais la Figure I- 36 présente cinq des plus classiques avec l'allure de l'isotherme associée ainsi que la nature des interactions dominantes (Klopffer *et al.* 2001).

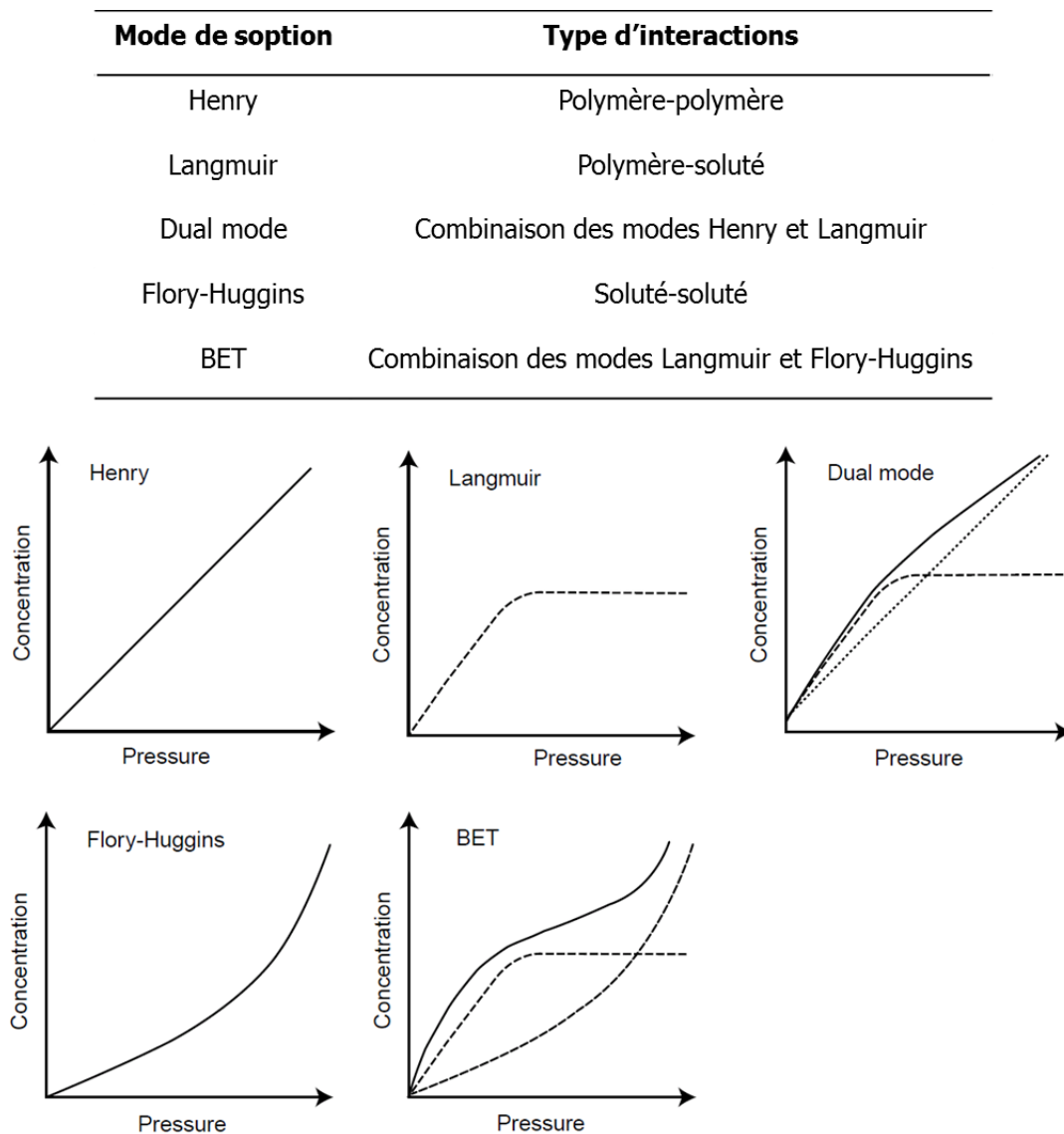


Figure I- 36 Mode de sorption classiques : nature des interactions et allure des isothermes (Klopffer *et al.* 2001)

4.3.1.5. Le coefficient de perméabilité (Pe)

Quand les conditions d'application de la loi de Henry sont remplis, le flux gazeux unidirectionnel à travers la membrane en régime permanent est donné par :

$$J = D S \left(\frac{P_1 - P_2}{e} \right) \quad \text{I. 13}$$

Le produit DS est défini comme le coefficient de perméabilité Pe :

$$Pe = D S \quad \text{I. 14}$$

Pe est le produit d'un facteur cinétique (D) qui reflète la dynamique du système soluté/polymère, et d'un facteur thermodynamique (S) qui dépend des interactions soluté/polymère. Ainsi, Pe représente la facilité avec laquelle le gaz traverse la membrane quand il subit un gradient de pression. Cette grandeur est une caractéristique intrinsèque du matériau et ne dépend pas de l'épaisseur.

Si on considère le cas général où D dépend de la concentration et S de la pression, le flux à travers la membrane s'exprime, en remplaçant dans l'équation I. 6 les concentrations par leur valeur, par l'expression suivante :

$$J = - \frac{\bar{D}}{e} (c_1 - c_2) = - \frac{\bar{D}}{e} (S(P_2) \cdot P_2 - S(P_1) \cdot P_1) = \frac{Pe}{e} (P_1 - P_2) \quad \text{I. 15}$$

Ce qui entraîne que :

$$Pe = \bar{D} \left(\frac{S(P_1) \cdot P_1 - S(P_2) \cdot P_2}{P_1 - P_2} \right) \quad \text{I. 16}$$

Or,

$$\bar{S} = \frac{S(P_1) \cdot P_1 - S(P_2) \cdot P_2}{P_1 - P_2} \quad \text{I. 17}$$

Et donc :

$$Pe = \bar{D} \bar{S} \quad \text{I. 18}$$

Cette relation est une caractéristique de la diffusion fickienne. En effet, elle est vérifiée même si D dépend de la concentration et S de la pression. Si cette égalité n'est pas vérifiée, la diffusion étudiée n'est pas fickienne.

4.3.1.6. La sélectivité

L'aptitude d'une membrane à séparer les constituants d'un mélange gazeux est décrite par la sélectivité α . Dans le cas d'un mélange binaire idéal (gaz A et B), la sélectivité $\alpha_{A/B}$ est définie par le rapport des perméabilités P_e (A) et P_e (B) :

$$\alpha_{A/B} = \frac{P_e(A)}{P_e(B)} \quad \text{I. 19}$$

En remplaçant les coefficients de perméabilité par leur expression en fonction des coefficients de diffusion et de solubilité (équation I. 18), on peut écrire :

$$\alpha_{A/B} = \frac{D(A).S(A)}{D(B).S(B)} = \alpha_{A/B}^D \cdot \alpha_{A/B}^S \quad \text{I. 20}$$

La sélectivité globale $\alpha_{A/B}$ peut, par conséquent, être définie comme le produit d'une sélectivité cinétique, ou de diffusion, α^D et d'une sélectivité thermodynamique, ou de solubilité, α^S .

La sélectivité de mobilité α^D est liée à la capacité de la matrice polymère à fonctionner comme un tamis moléculaire, les molécules de gaz les plus petites étant généralement les plus mobiles.

La sélectivité de solubilité α^S est essentiellement déterminée par la différence de condensabilité des gaz A et B, directement liée aux interactions physico-chimiques gaz/polymère.

Cette sélectivité déterminée à partir de l'étude du transport des gaz purs ne sera égale à la valeur réelle que dans le cas d'un mélange idéal où il n'y a pas d'interaction au niveau des processus de diffusion et de solubilité des deux gaz.

4.3.2. Paramètres influençant les propriétés de transport

De très nombreux facteurs ont une influence sur le transfert du soluté à travers la membrane :

- Des facteurs environnementaux, liés à l'état du flux amont de gaz comme sa température, sa pression, sa concentration ou son humidité relative.
- Des facteurs intrinsèques à la nature de la membrane polymérique, comme sa formulation (nature des fonctions chimiques, présence de plastifiants, réticulation), l'orientation des chaînes de polymères ou sa cristallinité.
- Et la nature du gaz perméant.

Chacun de ces paramètres peut avoir un effet sur la contribution cinétique (D) et/ou thermodynamique (S), rendant la modélisation de leurs impacts très complexe.

4.3.2.1. Influence de la nature du gaz

La nature et la taille des molécules de gaz ont un impact important sur le coefficient de diffusion. En effet l'énergie d'activation de la diffusion représente l'énergie nécessaire pour la séparation des chaînes de polymère pour permettre au soluté d'effectuer son saut diffusionnel (Pace *et al.* 1979b, a, c). Les grosses molécules, nécessitant donc de plus grand vide pour diffuser auront une énergie d'activation plus grande, cela impactera le coefficient de diffusion.

Il a été montré que le coefficient de solubilité est lié au point d'ébullition et à la température critique du gaz (Van Amerongen 1964; Chern *et al.* 1985), à la constante de la force de Lennard-Jones (Stannett 1968) ainsi qu'à la taille des molécules de gaz (Naylor 1989).

4.3.2.2. Influence de la température

Un grand nombre de données dans la littérature suggère que le transport de gaz à travers une membrane polymérique dense est un phénomène activé thermiquement et que les coefficients qui le caractérisent (Pe , D et S) sont, à une pression donnée, dépendants de la température *via* la loi d'Arrhenius pour une certaine gamme de température (Barrer 1937; Comyn 1985).

$$S(T) = S_0 \exp\left(-\frac{\Delta H_S}{RT}\right) \quad \text{I. 21}$$

$$D(T) = D_0 \exp\left(-\frac{E_D}{RT}\right) \quad \text{I. 22}$$

$$Pe(T) = Pe_0 \exp\left(-\frac{E_P}{RT}\right) \quad \text{I. 23}$$

Les termes pré-exponentiels représentent les valeurs limites pour une agitation moléculaire infinie ($T \rightarrow \infty$). E_P est l'énergie apparente d'activation de la perméation et, d'après l'équation I. 18, est égale à la somme de E_D , l'énergie d'activation de la diffusion, et de ΔH_S , l'enthalpie de solubilité nécessaire pour la dissolution d'une mole de soluté dans la matrice polymère.

$$E_P = E_D + \Delta H_S \quad \text{I. 24}$$

Ces paramètres dépendent des caractéristiques physico-chimiques du polymère : cristallinité, températures caractéristiques (T_g , T_f) (Meares 1954; Meares 1958), etc.

E_D représente physiquement le niveau d'énergie que doit atteindre une molécule de gaz pour effectuer un saut. Cette valeur est toujours positive et donc D croît avec la température. Physiquement, ce phénomène peut être relié à l'augmentation du volume libre relié à l'expansion globale du polymère due à l'augmentation de la mobilité des chaînes. Si le volume augmente et que les chaînes sont plus mobiles, la diffusion des molécules est facilitée.

La variation avec la température du coefficient de diffusion est prédominante par rapport à celle du coefficient de solubilité (Koros *et al.* 1978) ; le coefficient de perméabilité augmente donc avec la température.

4.3.2.3. Influence de l'humidité relative

L'augmentation de l'humidité relative du flux gazeux et par conséquent du degré d'hydratation de la membrane va influencer les perméabilités et les sélectivités des différents gaz. Ces effets ont été observés sur différents biopolymères notamment le gluten de blé (Gontard *et al.* 1996; Mujica-Paz *et al.* 1997) et le chitosan (Despond *et al.* 2001) où les perméabilités du CO_2 et de O_2 augmentent avec le degré d'hydratation ; la perméabilité du CO_2 augmentant plus que celle de l'oxygène augmentant ainsi la sélectivité. Ces effets ont été attribués à la plus grande solubilité du CO_2 dans l'eau mais aussi pour le gluten de blé par l'effet plastifiant de l'eau qui en modifiant la structure des chaînes protéiques augmente le nombre de sites pouvant interagir avec le CO_2 (Pochat-Bohatier *et al.* 2006). Des études ont également été menées sur des polymères synthétiques, comme des polyimides où des comportements complexes ont été observés suivant la composition hydrophile/hydrophobe (Piroux *et al.* 2004) ou des Nafion pour lesquels les perméabilités de l'azote et de l'oxygène augmentent plus que celle de l'hélium (Catalano *et al.* 2012).

4.3.2.4. Influence de la cristallinité

La plupart des modèles existants sont basés sur ceux développés par Michaels *et al.* sur le HDPE semi-cristallin (Michaels *et al.* 1959; Michaels *et al.* 1961b, a). Ils ont montré que la sorption et la diffusion ne se produisent que dans la phase amorphe. Les zones cristallines agissent comme des barrières et ne semblent pas avoir d'effet sur les capacités de sorption des zones amorphes. Cependant, les zones cristallines gênent la diffusion en augmentant la longueur du trajet suivi par le soluté et en réduisant la mobilité des chaînes dans la phase amorphe (entrave de bouts de chaînes dans la phase cristalline voisine).

4.3.2.5. Influence de la réticulation

Cette effet a été étudié sur des élastomères à différents degrés de vulcanisation (Stannett 1968) et sur des polyéthylènes à différents degrés de branchement (Michaels *et al.* 1959). Dans les

deux cas, l'augmentation du degré de réticulation a augmenté l'énergie d'activation de la diffusion et réduit la mobilité des chaînes conduisant à une diminution du coefficient de diffusion. Cette réduction reflète la plus grande difficulté du soluté à se déplacer dans la matrice polymère ce qui est compatible avec la plus grande rigidité des chaînes et la réduction des volumes libres apportées par la réticulation.

4.3.3. Synthèse des résultats obtenus dans la littérature pour la gélatine

Il y a très peu d'études qui traitent des propriétés de transfert gazeux de la gélatine. Seul Chiou (Chiou *et al.* 2008) donne des valeurs de perméation de l'oxygène pour quatre types de gélatine sans aucun additif (Table I- 5). Cette étude n'a pas montré d'influence majeure de l'origine de la gélatine. Cependant avec des perméabilités de l'ordre de 10^{-3} Barrer, la gélatine se classe dans la catégorie des matériaux barrières.

Table I- 5 Perméabilité à l'oxygène de films de quatre types de gélatine seule, adapté de (Chiou *et al.* 2008)

Origine de la gélatine	Perméabilité à l'oxygène ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{j} \cdot \text{kPa}$)	Perméabilité à l'oxygène (Barrer)
Colin	$2,4 \pm 0,5^a$	$3,7 \cdot 10^{-3}$
Saumon	$3,5 \pm 0,5^b$	$5,4 \cdot 10^{-3}$
Bovine	$4,8 \pm 0,1^b$	$7,4 \cdot 10^{-3}$
Porcine	$4,8 \pm 0,2^b$	$7,4 \cdot 10^{-3}$

Des lettres différentes dans une colonne indiquent une différence significative avec $p < 0,05$

Quelques autres articles à propos de gélatine plastifiée et/ou réticulée fournissent des valeurs de perméation uniquement encore pour l'oxygène. Ces études sont toutes dans l'optique d'une application de la gélatine comme films d'emballage avec pour objectif l'obtention des films les plus barrières possibles, elles étudient l'influence de différents paramètres (Table I- 6).

Si l'origine de la gélatine et sa réticulation n'ont pas d'influence importante, les concentrations en gélatine et en plastifiant ont des impacts significatifs. Cependant suivant les publications, les influences ne sont pas les mêmes. Wang (Wang *et al.* 2007) observe un doublement de la valeur de la perméabilité en passant de 4 à 8 wt-% de gélatine alors que Nur Hanani (Nur Hanani *et al.* 2012b) ne montre pas de tendance claire. De plus, pour des conditions de formulation et de procédé similaires, les valeurs obtenues par Wang et al. sont de deux ordres de grandeurs supérieures à celles de Nur Hanani et al. Les deux équipes ont pourtant utilisé le même type d'équipement de mesure décrit par Papkovsky (Papkovsky *et al.* 2000).

Le paramètre prépondérant sur la perméation gazeuse est le procédé de mise en œuvre. Les résultats de perméabilité obtenus par Nur Hanani (Nur Hanani *et al.* 2012a) par extrusion, entre environs 100 et 20 000 $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{j.kPa}$, sont beaucoup plus élevés que tous ceux obtenus par procédés de coulage ou de casting. De plus la vitesse et la température d'extrusion ont des effets significatifs sur la perméation de l'oxygène (Figure I- 37). Les valeurs très élevées obtenues à faibles vitesses notamment pour la gélatine de poisson, sont à mettre en relation avec la structure des films extrudés. En effet, Nur Hanani et al. ont observé au MEB des bulles et des défauts d'homogénéités. Les molécules d'oxygène ont pu trouver des chemins préférentiels de diffusion au niveau des interfaces entre ces défauts et la matrice polymère. Il est très important de s'assurer de l'homogénéité des films élaborés, et dans le cadre de matériaux composites de la bonne adhésion aux interfaces matière minérale/gélatine, pour conserver soit de faibles perméabilités (film barrière) soit une sélectivité satisfaisante (membrane de séparation).

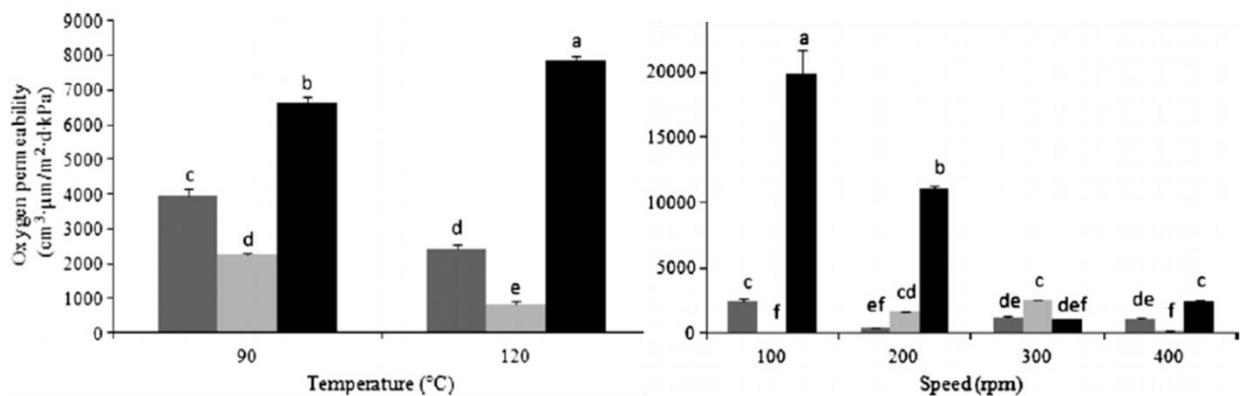


Figure I- 37 Influence de la température et de la vitesse d'extrusion sur la perméabilité de l'oxygène pour des films de plastifié avec du glycérol de gélatine bovine (■), porcine (■) et ichthyenne (■), des lettres différentes au-dessus des barres indiquent une différence significative avec $p < 0,05$ (Nur Hanani *et al.* 2012a)

Table I- 6 Synthèse des résultats de perméation à l'oxygène obtenus dans la littérature

Référence	Gélatine		Plastifiant		Réticulant	Procédé	Perméabilité oxygène (cm ³ ·µm/m ² ·j.kPa)	Influences
	Origine	Quantité	Nature	Quantité				
(Chiou <i>et al.</i> 2008)	Colin Saumon Porcine Bovine	5% w/w	-	-	Glutaraldéhyde	Casting- étalement	2,4-4,8	Origine : 0 (sauf colin) Réticulation : 0 (sauf 0.75%w/w de glutaraldéhyde pour le colin)
(Carvalho <i>et al.</i> 2004)	Bovine	10% w/w	Glycérol	4.5 wt-%	Formaldéhyde Transglutaminase Glyoxal	Coulage	22,6-23,2	Réticulation : 0
(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012b)	Bovine Porcine Tilapia	4/6/8% w/v	Glycérol	40% w/w	-	Coulage	0,25-0,7	Origine : +/- Concentration en gélatine : +/-
(Nur Hanani <i>et al.</i> 2012a)	Bovine Porcine Poisson	-	Glycérol	-	-	Extrusion	100-20 000	Vitesse d'extrusion : - Température d'extrusion: - (porcine, bovine) + (poisson)
(Wang <i>et al.</i> 2007)	Non précisé	4/8 w%	Glycérol	50% w/w	-	Coulage	30-60	Concentration en gélatine : +
(Bertan <i>et al.</i> 2005)	Bovine	10% w/v	Acides gras	15/25% w/w	-	Casting- étalement	15-24	Concentration en plastifiant : +

+ Influence significative à la hausse

- Influence significative à la baisse

+/- Influence significative sans tendance linéaire

0 Pas d'influence significative

5. La famille des Polyéther amines

Pour modifier drastiquement les propriétés des membranes à base de gélatine, une approche qui permet de rester dans le cadre de la formulation et non de la modification chimique est le mélange avec un autre polymère. Celui-ci peut être synthétique ou naturel suivant les propriétés visées. Pour que le mélange soit stable et éviter les séparations de phase au cours de la préparation des films, il faut que le polymère choisi soit compatible avec la gélatine et donc préférentiellement hydrosoluble. De plus pour la réalisation de films insolubles dans l'eau, il serait mieux de choisir un polymère avec des fonctions réticulables dans les mêmes conditions que la gélatine. Pour répondre à ces critères, il a été décidé dans le cadre de cette thèse, de travailler avec des polyéther amines (PEA).

5.1. *Structure et propriétés physico-chimiques*

Les polyéther amines utilisées sont des produits commercialisés par la société Huntsman sous le nom de Jeffamine[®]. Il s'agit de copolymères de propylène oxyde et d'éthylène oxyde munis de fonctions terminales amine primaire. Ils existent notamment sous la forme de polymères linéaires, dit diamines, et de polymères branchés, les triamines.

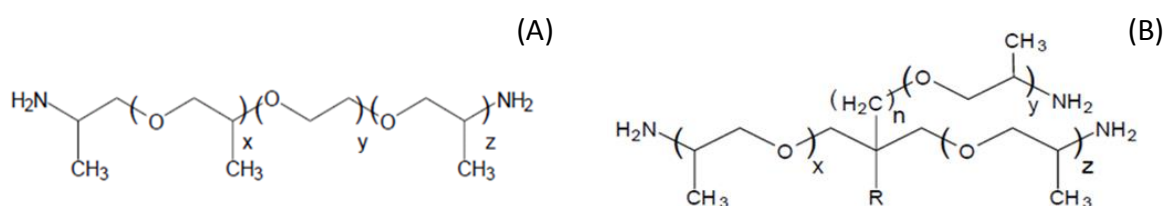


Figure I- 38 Structure chimique des diamines (A) et des triamines (B)

Il s'agit d'élastomères hydrosolubles et leurs nombreuses fonctions éther permettent de les mélanger aisément avec la gélatine. Les fonctions amines terminales peuvent être également réticulées avec des dialdéhydes suivant une réaction de Schiff, ce qui permet d'envisager la formation dans un système gélatine/PEA/dialdéhyde de pont gélatine/gélatine, gélatine/PEA et PEA/PEA.

L'incorporation de polymères dont le squelette est, comme les PEA, constitué majoritairement de poly(oxyéthylène) et/ou de poly(oxypropylène) dans des matériaux peut changer significativement leurs propriétés comme le rapport hydrophile/hydrophobe, la biocompatibilité, ou les paramètres cinétiques des réactions en phase solide (Froimowicz *et al.* 2005). De plus dans le cas spécifique des PEA, il a été montré qu'ils permettent également d'augmenter la conductivité (Meador *et al.* 2003) et la ténacité (Gheneim *et al.* 2002).

5.2. Propriétés de transport gazeux

Le squelette des PEA est semblable à celui des polyéthylène oxydes (PEO ou PEG suivant la masse molaire). Or les PEO sont connus pour leur CO₂-philie induite par les interactions quadripolaires entre le CO₂ et les fonctions éthers (Charmette *et al.* 2004; Lin *et al.* 2004; Charmette *et al.* 2009). Les PEO à haute masse molaire ont tendance à être cristallins alors que les PEG plus petits et amorphes présentent de meilleures propriétés de transport gazeux. Cependant ces oligomères, qui se présentent sous forme liquide, ne permettent pas utilisables directement comme matériau membranaire en raison de leur trop faible masse molaire. Il en est de même pour les PEA utilisés pour cette étude qui sont liquides avec des masses molaires maximales de 3 000 g.mol⁻¹ et n'ont pas de propriété filmogène.

Pour pouvoir mettre à profit les caractéristiques des PEO pour l'élaboration de membrane, trois grandes approches ont été mises en œuvre dans la littérature (Liu *et al.* 2013) :

- La synthèse de copolymères à blocs avec de petits blocs d'éthylène oxyde pour éviter la cristallisation.
- L'utilisation de PEG ou de PEO de faible masse molaire comme additif d'un polymère filmogène pour former des *blend membranes*.
- La synthèse de copolymères hautement branchés et réticulés qui peuvent entrer dans la composition de membranes organiques ou de membranes à matrice mixte.

Pour cette étude, c'est la deuxième approche qui a été sélectionnée. Les PEA sont mélangés directement avec la gélatine. Le mélange de PEG avec un polymère de haut poids moléculaire et capable de former une matrice donne, suivant la nature du polymère, des propriétés de perméation vis-à-vis du CO₂ très disparates (Table I- 7). Les coefficients de perméabilité au CO₂ vont de 5,8 à 896 Barrer avec des sélectivités vis-à-vis de l'azote allant de 9 à 109. Ces résultats sont difficilement comparables entre eux étant donné la diversité des formulations et des conditions procédés (température et pression). Cependant ils permettent de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de PEO pour la formulation de membranes de séparation gazeuse.

Table I- 7 Propriétés de perméation gazeuse de *blend membranes* intégrant des PEG (Liu *et al.* 2013)

Polymer	PEG properties		T (°C)	P (atm)	Permeability (Barrer ^a)	Selectivity		
	Molecular weight (g/mol)	Concentration (wt.%)				CO ₂	CO ₂ /H ₂	CO ₂ /N ₂
Poly(amide- <i>b</i> -ethylene oxide)	200	50	30	–	151	10.8	47	15.5
	250 ^b	50	30	–	606	15.2	43	–
	3800 ^c	50	35	4	532	10.6	36.1	10.8
Poly(ethylene oxide)-poly(butylenes terephthalate (PEO-PBT)	206 ^d	40	30	0.30	750	12.4	40.0	11.2
PEO-ran-PPO-T6T6T ^e	3800 ^e	50	35	4	896	10.6	36.0	10.9
Poly(styrene- <i>b</i> -ethylene oxide- <i>b</i> -styrene) (SEOS)	400	45	35	–	86	4.3	–	–
	4600	45	35	–	17	2.2	–	–
Cellulose nitrate	300	43	25	–	8.2	–	37.8	–
Poly(vinyl chloride)	4000	30	25	20.0	5.8	–	109	84
Poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene imine)	–	–	25	0.99	27	–	9	–

^a 1 Barrer = 10⁻¹⁰ cm³ (STP) cm/(cm² s cm Hg), where STP refers to standard temperature and pressure.

^b Poly(ethylene glycol) terminated with dimethyl ether was used.

^c Poly[dimethylsiloxane-*co*-methyl(3-hydroxypropyl)siloxane]-*graft*-poly(ethylene glycol) methyl ether (PDMS-PEG) with 80 wt.% PEG.

^d Poly(ethylene glycol) terminated with dibutyl ether was used.

^e Poly(ether-amide) block copolymer that contained a random distribution of 75 wt.% PEO and 25 wt.% PPO and uniform tetra-amide (T6T6T).

Les propriétés de transport gazeux de films à base d'un mélange intégrant des PEA ont été étudiées par Chua et al. (Chua *et al.* 2011) (Table I- 8). Les PEA sont associés dans cette étude au silsesquioxane oligomérique polyédrale (POSS). La perméabilité au CO₂ est mesurée entre 275 et 579 Barrer avec des sélectivités CO₂/N₂ s'échelonnant de 25,4 à 46,7. L'augmentation de la température augmente, comme attendu, les coefficients de perméabilité et conformément à la corrélation mise en évidence par Robeson (Robeson 1991, 2008), les sélectivités diminuent. Les propriétés optimales ont été obtenues pour le mélange 50:50 qui correspond à la cristallinité la plus faible.

Table I- 8 Perméation des gaz purs pour des mélanges PEA/POSS à 1Bar (Chua *et al.* 2011)

Pure H₂, N₂ and CO₂ permeation results for (a) PEA:POSS 30:70 and 50:50, and (b) PEA:POSS 70:30 and 80:20, tested at 1 bar.

Ratio of PEA POSS	T _m (°C)	T _{cell} (°C)	Permeability (Barrer)			Selectivity	
			H ₂	N ₂	CO ₂	CO ₂ /H ₂	CO ₂ /N ₂
(a)							
30:70	-	30	45.0 ± 0.4	7.3 ± 0.1	321 ± 2	7.1 ± 0.2	44.1 ± 0.7
		35	57.5 ± 0.5	9.6 ± 0.1	372 ± 3	6.5 ± 0.1	38.8 ± 0.6
		40	70.5 ± 0.5	12.9 ± 0.1	416 ± 3	5.9 ± 0.1	32.2 ± 0.4
		45	87.5 ± 0.6	16.1 ± 0.2	464 ± 4	5.3 ± 0.1	28.9 ± 0.4
		50	109 ± 1	20.1 ± 0.2	510 ± 4	4.7 ± 0.1	25.4 ± 0.4
50:50	2.6	30	44.1 ± 0.4	8.2 ± 0.1	335 ± 3	7.6 ± 0.1	40.7 ± 0.8
		35	54.2 ± 0.2	9.7 ± 0.1	380 ± 2	7.0 ± 0.1	39.1 ± 0.6
		40	76.2 ± 0.6	15.0 ± 0.1	453 ± 4	5.9 ± 0.1	30.2 ± 0.4
		45	92.3 ± 1.0	18.5 ± 0.1	520 ± 3	5.6 ± 0.2	28.0 ± 0.4
		50	120 ± 1	21.5 ± 0.2	579 ± 4	4.8 ± 0.1	26.9 ± 0.5
(b)							
70:30	8.6	30	42.7 ± 0.4	7.3 ± 0.1	335 ± 3	7.8 ± 0.1	46.2 ± 0.6
		35	51.6 ± 0.4	9.4 ± 0.1	401 ± 2	7.7 ± 0.2	42.4 ± 0.5
		40	63.3 ± 0.5	12.5 ± 0.1	457 ± 4	7.2 ± 0.1	36.5 ± 0.5
		45	76.3 ± 0.3	15.4 ± 0.2	499 ± 5	6.5 ± 0.1	32.3 ± 0.8
		50	90.3 ± 0.8	18.5 ± 0.2	560 ± 4	6.2 ± 0.1	30.3 ± 0.4
80:20	25.5	30	30.5 ± 0.2	5.9 ± 0.1	275 ± 2	9.0 ± 0.1	46.7 ± 0.7
		35	40.7 ± 0.4	8.1 ± 0.1	329 ± 2	8.1 ± 0.1	40.7 ± 0.5
		40	49.7 ± 0.4	10.5 ± 0.1	369 ± 3	7.4 ± 0.1	35.2 ± 0.4
		45	60.3 ± 0.4	13.4 ± 0.1	415 ± 3	6.9 ± 0.1	30.9 ± 0.5
		50	75.7 ± 0.5	16.5 ± 0.2	462 ± 2	6.1 ± 0.1	28.0 ± 0.4

Les propriétés CO₂-philes des PEO font des PEA des candidats prometteurs pour modifier les propriétés de la gélatine. On constate cependant une certaine variabilité des résultats obtenus dans la littérature, ce qui impose de faire des tests approfondis pour chaque formulation.

6. Conclusions - Objectifs

Au cours de cette étude bibliographique, les propriétés de la gélatine et des films élaborés avec ont été exposées. Les spécificités de cette protéine, comme la multiplicité des fonctions chimiques présentes et le mécanisme de renaturation de la triple hélice ont été discutés. La gélatine étant hydrosoluble, suivant les applications auxquelles sont destinés les films de gélatine, la réticulation devient nécessaire. Différents réticulants potentiels ont été décrits ainsi que leurs mécanismes réactionnels. Les films de gélatine peuvent être préparés par différents procédés réunis en deux grandes familles, les procédés en solvant et ceux par extrusion. Les propriétés thermiques et mécaniques des films élaborés à base de gélatine ont montré une très grande variabilité suivant l'origine de la gélatine, son Bloom, la formulation (plastification, réticulation) et les procédés de mise en œuvre et de séchage des films. Après quelques rappels théoriques sur la perméation gazeuse à travers des films denses, la synthèse des valeurs des coefficients de perméation de la gélatine disponibles dans la littérature a révélé que très peu d'études étaient disponibles. De plus, ces études étaient principalement focalisées sur des applications d'emballage et donc seules les valeurs pour l'oxygène ont été mesurées. Pour finir, les propriétés des polyether amines ont brièvement été décrites pour une utilisation dans le cadre d'un mélange avec la gélatine dans le but d'augmenter les coefficients de perméabilité. Encore une fois l'étude de la littérature a montré que suivant les polymères auxquels ils sont associés, les mélanges PEA/polymères peuvent avoir des propriétés de perméation gazeuse très différentes. Ainsi, la complexité de la gélatine rend difficile la prévision de son comportement et rend indispensable les études expérimentales qui font l'objet de ce travail de thèse.

L'objectif de cette thèse est l'étude des propriétés de perméation gazeuse de membranes à base de gélatine. Pour mener à bien ce travail, l'étude bibliographique a clairement démontré la complexité de cette protéine et des mécanismes qui permettent d'aboutir à la formation d'un film. C'est en tenant compte de cette spécificité que le l'étude du mécanisme d'élaboration des films de gélatine et de leurs propriétés peut être menée. L'étude de la réticulation de la gélatine, en privilégiant des réactifs non toxiques et biosourcés, ainsi que l'évaluation de l'impact de la réticulation sur les propriétés des films, est une étape indispensable pour préparer des membranes stables dans le temps dans des conditions humides. Enfin les résultats de ces travaux seront mis à profit pour l'élaboration de membrane gélatine/PEA sur lesquelles l'influence d'une part de la température et d'autre part de l'humidité relative du flux gazeux sur les propriétés de transport gazeux sera examinée.

Matériels et méthodes

1. Matériel

1.1. *La gélatine*

Dans cette étude, une seule gélatine a été utilisée : la gélatine de type A issue de la dénaturation du collagène de peaux de porc selon un protocole acide. La gélatine est issue du lot #0001409228 fourni par Fluka Analytical. Elle a un pI de 8,7, un Bloom de 188 g, une masse molaire moyenne de 40-50 kg.mol⁻¹. Elle se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre.

La gélatine est solubilisée dans de l'eau déionisée à pH 5,8 et les concentrations sont exprimées en % massique.

1.2. *Les plastifiants : les polyéthylène glycols (PEG)*

L'influence de la masse molaire des PEG a été étudiée pour une gamme de 200 à 10 000 g.mol⁻¹.

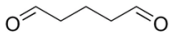


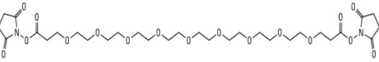
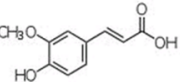

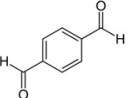
Table II- 1 Liste des polyéthylène glycols utilisés

PEG Mw	Appellation dans le manuscrit	Fournisseur
200	P200	Merck
1 000	P1000	Merck
2 000	P2000	Merck
3 000	-	Merck
10 000	-	Aldrich

1.3. *Les réticulants*

Plusieurs réticulants ont été étudiés durant cette étude :

Table II- 2 Liste des réticulants utilisés avec leur origine et risques associés

Réticulants		Risque	Origine	Fournisseur
<i>Réticulant classique</i>				
Glutaraldéhyde (GTA)			Pétrole	Aldrich
N-hydroxysuccinimide (NHS)		Cette substance n'est pas classée comme dangereuse	Pétrole	Aldrich
<i>Réticulant alternatif</i>				
Bis(succinimidyl) nona(ethylene glycol) (BS(PEG) ₉)		Cette substance n'est pas classée comme dangereuse	Pétrole	Fisher Scientific
Acide Férulique (FA)			Bio-sourcé	Aldrich
Téréphthalaldéhyde		Cette substance n'est pas classée comme dangereuse	Pétrole	Aldrich

1.4. Les polyéther amines

Les polyéther amines utilisées dans ce projet sont des composés commercialisés (jeffamines[®]) fournis par le groupe Hunstman. La Table II- 3 regroupe les différentes jeffamines utilisées ainsi que leurs caractéristiques.

Table II- 3 Caractéristiques des polyéther amines utilisées

Type de polyéther amine	Classe	Formule	Nature du groupe R	n	Moles de PO/EO* (x+y+z)	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Risque
D 230	Diamine		N.A.	N.A.	~2,5	230	
D 400	Diamine		N.A.	N.A.	~6,1	430	
ED 600	Diamine		N.A.	N.A.	y = ~9 x+z = ~3,6	600	Cette substance n'est pas classée comme dangereuse
T 403	Triamine		C ₂ H ₅	1	5-6	440	
T 3000	Triamine		H	0	50	3000	

*PO : Propylène Oxyde, EO : Ethylène Oxyde

2. Méthodes

2.1. Préparation des solutions et gels de gélatine

Les solutions filmogènes de 30g sont préparées en solubilisant 20% massique de poudre de gélatine dans de l'eau déionisée à 60°C sous agitation pendant au moins 2h jusqu'à dissolution complète. Le cas échéant, des PEGs sont additionnés à 0,3g PEG/g de gélatine en même temps que la poudre de gélatine.

Différentes méthodes de réticulation ont été mises en œuvre.

2.1.1. Réticulation avec le glutaraldéhyde (GTA)

Contrairement à tous les autres réticulants testés, le GTA à cause de sa réactivité trop importante n'est pas ajouté dans la solution de gélatine mais utilisé sur les membranes déjà formées et séchées comme proposé par Catalina et al. (Catalina *et al.* 2011). Les membranes de gélatine sont immergées dans une solution aqueuse de GTA à 4% v/v à température ambiante pendant 30s puis rincées avec de l'eau déionisée et enfin séchées de nouveau suivant le protocole décrit en 2.4.

2.1.2. Réticulation avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) :

Le NHS se présente sous la forme d'une poudre insoluble dans l'eau. Pour pouvoir l'ajouter dans les solutions de gélatine, une solution mère à 500 mM de NHS dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été préparée. Cette solution mère est ajoutée directement dans la solution de gélatine à hauteur de 4µL/mL de solution de gélatine. Au moment de l'ajout du réticulant, la solution de gélatine est maintenue à 60°C et agitée pendant 1h avant étalement. Le DMSO résiduel est inférieur à 0,1% volumique.

2.1.3. Réticulation avec le Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)₉)

Le BS(PEG)₉ est sensible à l'eau. Pour éviter son hydrolyse, la gélatine n'est plus dissoute dans l'eau mais dans une solution tampon de phosphate (PBS) achetée chez Sigma-Aldrich.

Comme pour le NHS, la fabrication d'une solution mère (ici à 250 mM) dans le DMSO est nécessaire. Le reste du protocole de réticulation (conditions d'ajout, concentration de BS(PEG)₉) est identique à celui suivi pour le NHS.

2.1.4. Réticulation avec l'acide férulique (FA)

Le FA est une poudre blanche cotonneuse soluble dans l'eau. Il est directement ajouté dans la solution de gélatine à 40mg/g gélatine puis agité à 50°C pendant 2h avant étalement.

2.1.5. Réticulation avec le téréphthalaldéhyde (TPA)

Le TPA est une poudre blanche insoluble dans l'eau. De 0,5g à 2,5g/100g gélatine est préalablement dissout dans 500 μ L de DMSO avant d'être ajouté dans les solutions de gélatine puis agité pendant 1h avant étalement. Trois températures des solutions de gélatine au moment de l'ajout du réticulant et pendant la période d'agitation ont été testées : 30°C, 40°C et 60°C.

2.2. Préparation des solutions des mélanges gélatine/polyéther amine

Des membranes dites « blend bioartificiel » qui sont un mélange de jeffamines et de gélatine comme composant filmogène ont été préparées. Les solutions filmogènes ont été préparées suivant le même protocole que pour les solutions de gélatine seule (2.1). Puis une fois la gélatine dissoute, les polyéther amines sont ajoutées avec une concentration de 0,4 à 2g/g gélatine. Les mélanges sont agités à 60°C pendant encore deux heures. Le cas échéant, les protocoles de réticulations utilisés sont les mêmes que ceux mis en œuvre pour la gélatine seule.

2.3. Caractérisations des gels

2.3.1. Cinétiques de réticulation

Les transitions sol/gel et les cinétiques de réticulation ont été déterminées par rhéologie. Pour cela une étude préliminaire du domaine linéaire de réponse des modules de perte (G'') et de conservation (G') en fonction du taux de cisaillement a été nécessaire. Ces mesures ont été effectuées pour des solutions de gélatine vieilles entre 24h et 48h pour vérifier la stabilité du domaine linéaire sur l'intervalle de temps nécessaire pour faire les analyses.

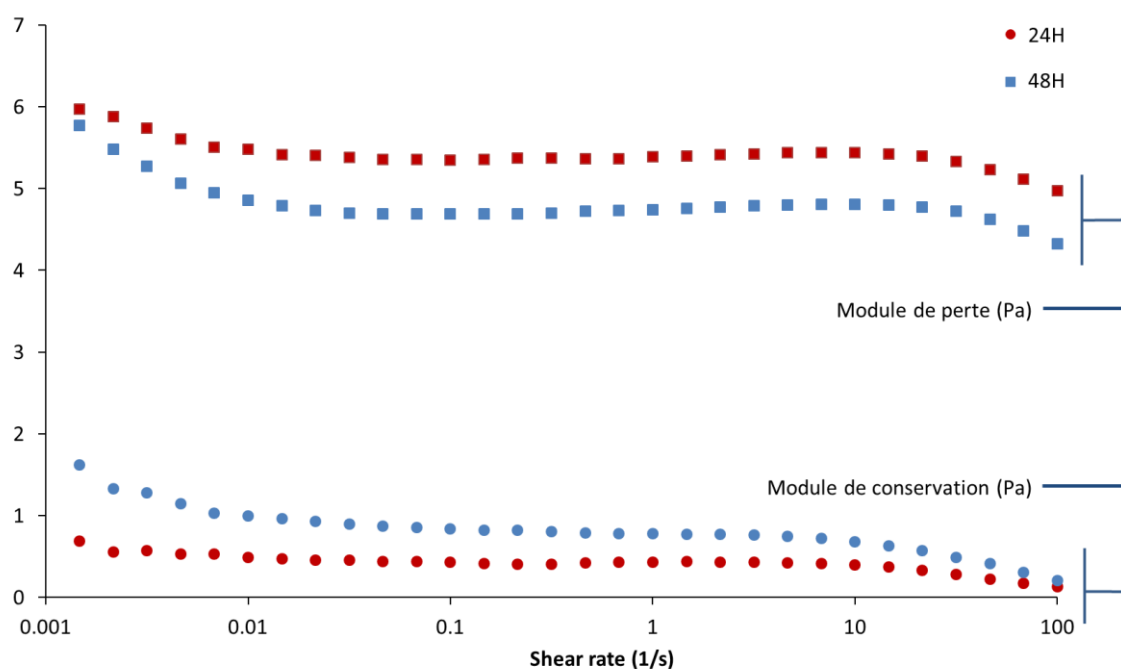


Figure II-1 Domaines linéaires des solutions de gélatine à différents vieillissements.

Le domaine linéaire caractérise la résistance mécanique en torsion du matériau avant rupture. Dans le cas de notre matériau, pour les durées applicables à notre étude, le vieillissement a peu d'influence sur les modules (Figure II-1). Un taux de cisaillement de 10 s^{-1} a été choisi pour l'ensemble des analyses.

Les cinétiques de réticulation du TPA à différentes concentrations et températures ont été déterminées avec un rhéomètre MCR 301 (Anton Paar) avec un module plan-plan PP50. La température est contrôlée grâce à un Peltier IMC70. La transition de liquide à solide a été déterminée avec un test en oscillation (fréquence 1Hz, force normale fixe à 0N) avec une contrainte variant de 1 à 0,01% en suivant une rampe logarithmique. La transition a lieu au moment où le module élastique (G') et le module de perte (G'') se croisent. Les données présentées sont les valeurs moyennes d'au minimum trois répliques.

2.3.2. Calcul du taux de réticulation

Le calcul du taux de réticulation a été effectué en déterminant le taux de groupement amine résiduel. Le protocole a été basé sur la méthode développée par Bigi et al. (Bigi *et al.* 2001). Une série de solutions réticulées et non-réticulées a été préparée puis stockée à 25°C pendant 24h. 0,5mg des gels obtenus ont été dissout dans 6mL de Borax. Ensuite 6mL d'une solution d'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à 10% v/v ont été ajoutés et les solution de gélatine/Borax/TNBS ont été agitées et chauffées à 30°C pendant 1h. Les solutions sont orange.

Pour stopper la réaction 12 mL de HCl à 1M ont été ajoutés. Les solutions devenues jaune vif ont reposé à température ambiante sans agitation pendant 30min.

L'absorbance des solutions a été mesurée avec un spectromètre UV-visible UV-2401 PC (Shimadzu) à 347 nm après dilution d'un facteur 10. Les absorbances d'un échantillon témoin de gélatine non réticulée (Abs_G) et d'un témoin TNBS/Borax/HCl (Abs_{TNBS}) ont été mesurées pour fournir les valeurs références nécessaires pour calculer le taux de réticulation.

$$\text{Taux de réticulation} = 100 \left[1 - \frac{100 (Abs - Abs_G)}{Abs_G - Abs_{TNBS}} \right] \quad \text{II. 1}$$

Toutes les données présentées sont les valeurs moyennes de trois répliques.

2.4. Procédé de fabrication des films

Les solutions de gélatines sont refroidies à 40°C puis par étalement à 33°C mises sous forme de membranes planes. Elles sont étalées sur des feuilles de Téflon avec un étaleur automatique K Control Coater 101 de chez Erichsen Instruments. Les films sont étalés avec une épaisseur contrôlée de 500 μm grâce à un couteau Erichsen Mod. 411 0956 à la vitesse de $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Les solutions de 30g permettent d'obtenir 2 membranes d'environ 15x25 cm. Les membranes sont ensuite séchées dans une étuve à 20°C et 45±5% d'humidité pendant 48h. Les membranes sont ensuite stockées dans une boîte dessicatrice à 25±5% HR.

2.5. Caractérisations structurelles des films

Dans le but de connaître les caractéristiques structurelles des membranes à base de gélatine, ainsi que des membranes bioartificielles et des membranes composites, différentes méthodes de caractérisations classiques des matériaux ont été utilisées après avoir adapté les protocoles aux contraintes spécifiques inhérentes aux biopolymères et en particulier aux protéines, c'est-à-dire à un polymère statistique de 20 monomères différents dans le cas de la gélatine.

2.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique d'observation de la morphologie des membranes, elle consiste à balayer la surface de la membrane par un faisceau d'électrons énergétiques. Les électrons secondaires émis par l'échantillon irradié sont analysés par un détecteur adapté, ce qui permet de reconstituer l'image de la surface.

Après métallisation avec un pulvérisateur cathodique SC7620, l'observation de la microstructure des membranes a été effectuée avec un MEB Hitachi SD-4800. Il s'agit d'un microscope à effet de champ détecteur d'électrons secondaires et rétrodiffusés. La tension d'accélération varie de

0.1 kV à 30 kV. Le grandissement maximal est de 800 000x. La résolution obtenue est de 1 nm à une tension de 15 kV.

Les surfaces membranes ont été étudiées, coté support d'étalement et coté air, ainsi que les tranches obtenues après cryo-fracture du matériau dans l'azote liquide afin d'obtenir une cassure nette respectant la structure d'origine.

2.5.2. Spectroscopie infra-rouge (FTIR)

La spectroscopie infrarouge est une technique de caractérisation de la structure chimique d'un polymère. Les énergies de vibrations des liaisons chimiques mesurées permettent d'identifier la nature des groupements fonctionnels présents dans l'échantillon. L'appareil employé est un spectromètre Nicolet 710 à transformée de Fourier (vitesse du miroir : $0,6329 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, ouverture de l'iris : 100, détecteur DTGS) équipé d'un accessoire ATR Diamant (Thermo-Electron) dont la résolution est fixée à 4 cm^{-1} . La plage de fréquences balayées couvre le domaine de l'infrarouge moyen $650\text{-}4\ 000 \text{ cm}^{-1}$. L'acquisition des spectres est réalisée en mode transmittance (128 balayages). Les spectres ont été obtenus à partir de membranes séchées à l'étuve à 50°C pendant deux jours puis dans un dessiccateur sous vide pendant cinq jours. Une acquisition du background a été effectuée avant de déposer l'échantillon sur le diamant.

2.5.3. Calorimétrie

2.5.3.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'ATG est une méthode d'analyse destructive qui en mesurant avec une microbalance la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps pour un profil de température donné, permet d'observer les températures de dégradation des différents composants ainsi que de mesurer la quantité d'eau présente dans l'échantillon.

L'ensemble des analyses a été réalisé sous un flux d'azote de 40 mL/min pour la balance et 60 mL/min pour le four, sur des échantillons d'environ 10mg sur un appareil TA Instruments TGA G500.

Pour déterminer la température de dégradation de la gélatine, les échantillons ont été chauffés jusqu'à $1\ 000^\circ\text{C}$ à 10°C/min . La gélatine commence à se dégrader vers 200°C . Cette température est importante à connaître pour réaliser des analyses en DSC.

Pour le suivi des cinétiques de séchage des membranes, seule la perte d'eau est importante. Celle-ci a lieu entre 30°C et 150°C . Pour raccourcir les analyses et permettre d'augmenter le nombre de points de suivi de la cinétique de séchage, le programme a été modifié. Jusqu'à 400°C , la température augmente à 10°C/min puis au-delà jusqu'à 1000°C à 50°C/min . Il est

nécessaire de dégrader complètement l'échantillon pour permettre le bon nettoyage du creuset en platine.

2.5.3.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC (Differential Scanning Calorimetry) est une technique employée pour mesurer les transitions thermiques d'un polymère. Elle traduit le changement du flux de chaleur entre un creuset de référence vide et un creuset contenant x mg de polymère lors d'un chauffage à vitesse constante. La DSC permet de détecter les processus exothermique (cristallisation d'un polymère) ou endothermique (fusion) subis par l'échantillon ; elle permet également de déterminer les changements de chaleur spécifique, comme la transition vitreuse dans le cas des polymères.

L'ensemble des analyses a été réalisé sous un flux d'azote de 200 mL/min, sur des échantillons d'environ 6mg sur un appareil TA Instruments DSC 2920 équipé d'un système de refroidissement RCS 90 (TA Instruments). L'instrument a été calibré avec de l'indium pur ($T_m = 156,6^\circ\text{C}$ et $\Delta H_m = 28,3 \text{ kJ/kg}$). Un creuset vide a servi de référence.

Les protocoles classiques avec des rampes de température autour de $10\text{-}20^\circ\text{C}/\text{min}$ n'ont pas permis de déterminer les températures de transition vitreuse (T_g) et présentaient un seul pic endothermique. Pour pouvoir obtenir les T_g ainsi que pour avoir deux endothermes différentes discernant les contributions de la dénaturation des triples hélices de la gélatine et de la dégradation de la gélatine, les membranes ont été testées en DSC avec une rampe de température rapide de $100^\circ\text{C}/\text{min}$ (Liu *et al.* 2009). Les valeurs de T_g et des enthalpies données dans cette étude sont les moyennes des valeurs obtenues par 3 analyses sur des échantillons différents.

2.5.4. Diffraction des rayons X (DRX)

Les spectres de diffraction des rayons X des membranes à base de gélatine ont été obtenus avec un diffractomètre PanAnalytical X'pert-Pro équipé d'une chambre sous vide Anton Paar HT1200. L'intervalle de balayage 2θ est compris entre 4° et 70° avec un pas de $0,017^\circ$ et une vitesse de $0,042^\circ/\text{s}$. Les films de gélatine, après avoir été conditionnés sous vide pendant 16h, ont été analysés en réflexion en utilisant un morceau de wafer de silicium comme support. Un spectre du support seul dans la même orientation que pour l'analyse du film de gélatine est systématiquement fait pour chaque échantillon, pour pouvoir soustraire la contribution du support dans les spectres des échantillons testés. Cette opération a été réalisée grâce au logiciel Eva.

Les taux de cristallinité des membranes ont été calculés à partir des aires des pics des spectres calculées avec le logiciel Origin suivant la méthode décrite par Charmette *et al.* (Charmette *et al.* 2009).

Taux de cristallinité

$$= \frac{\text{Aire du halo cristallin}}{\text{Aire du halo cristallin} + \text{Aire du halo amorphe}} \cdot 100$$

II- 2

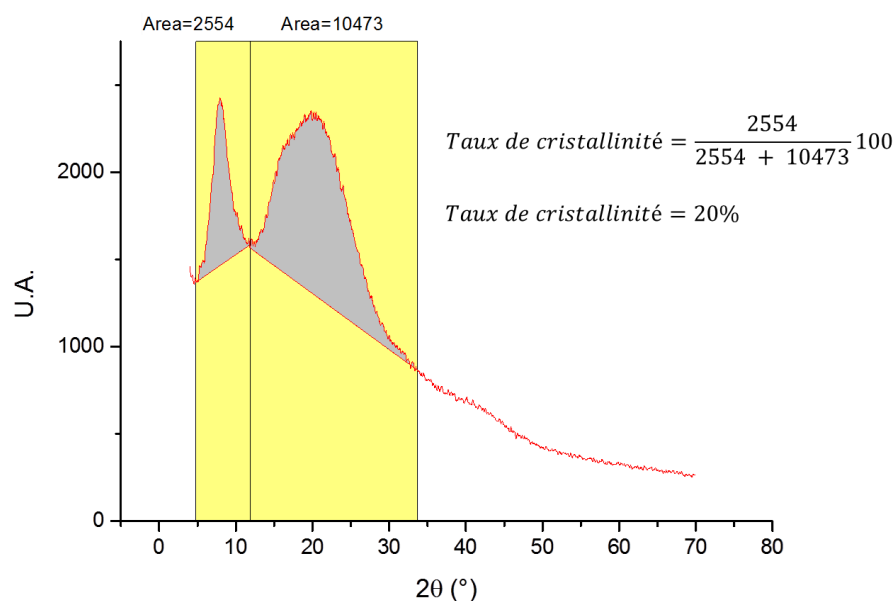


Figure II- 2 Exemple de calcul de taux de cristallinité avec le logiciel Origin

2.6. Caractérisations fonctionnelles des films

2.6.1. Propriétés mécaniques

Pour tester la résistance mécanique des membranes, des expériences rhéologiques ont été menées en utilisant un rhéomètre Physica MCR301 (Anton Paar) équipé de l'adaptateur UXF12/UNI. La température est contrôlée à 25°C grâce à un système de chauffage par convection CTD 180. Les échantillons testés sont des éprouvettes de 1x4 cm². Les valeurs données dans cette étude sont les moyennes des valeurs obtenues par 3 analyses sur des échantillons différents.

Table II- 4 Protocole des tests de rhéologie extensionnelle

Durée des phases successives	Variable	Type de variation	Gamme de variation
0,05s	Torque (mN m)	Rampe linéaire	0-1
0,3s	Angle de déflexion (°)	Rampe linéaire	0-10
Pas de limite de temps, prise de 34 points	Elongation (%)	Rampe logarithmique	0.001-300 Fréquence fixe à 1Hz

2.6.2. Tests de swelling

La gélatine est hydrosoluble. Pour tester l'influence de la formulation (réticulation, formulation) sur la résistance des membranes à l'eau et à la vapeur d'eau, des tests de swelling (gonflement) ont été menés.

Pour les tests de résistance à l'eau liquide, des échantillons de membranes de 2x2 cm² ont été séchés à 50°C pendant au moins 48h. Ils sont pesés puis immergés dans 30mL d'eau déionisée à température ambiante. Les cinétiques de gonflement ont été évaluées, jusqu'à la perte de l'intégrité mécanique de l'échantillon (dissolution, échantillon en lambeau), en pesant périodiquement les échantillons avec une microbalance (Sartorius CPA225D, avec une précision de 0,01 mg) après avoir délicatement essuyé la surface.

Le taux de gonflement a été évalué suivant l'équation II- 3:

$$SR(t) = \frac{\text{masse du film}(t) - \text{masse initiale du film sec}}{\text{masse initiale du film sec}} \quad \text{II- 3}$$

La masse initiale du film sec correspond à celle mesurée après passage à l'étuve. Toutes les données sont le résultat de 4 expériences menées sur des échantillons différents.

Pour évaluer la résistance à la vapeur d'eau, des enceintes à humidité contrôlée ont été préparées avec des solutions saturées de K₂SO₄ (97.6 ± 0.5% à 20°C). Des échantillons de membranes de 2x2 cm² ont été séchés à 50°C pendant au moins 48h puis pesés avant d'être exposés à l'humidité. Les enceintes à humidité contrôlée contenant les membranes ont ensuite été stockées à 20°C. Les échantillons ont été pesés après une semaine puis tous les 5 jours jusqu'à ce que les masses se stabilisent indiquant l'équilibre thermodynamique. Les données sont

le résultat de 3 expériences menées sur des échantillons différents. L'intégrité du film est alors vérifiée et ses propriétés mécaniques mesurées afin d'évaluer sa résistance à la vapeur d'eau.

2.6.3. Isotherme de sorption d'eau

La gélatine étant un produit hygroscopique, les isothermes de sorption d'eau ont été déterminées pour s'assurer de la stabilité de la teneur en eau des membranes pendant leur stockage et leurs caractérisations. Pour cela l'activité de l'eau à la surface du matériau ainsi que la teneur en eau ont été déterminées dans différentes conditions d'humidité. L'activité de l'eau dans un matériau dépend principalement de sa teneur en eau X et de sa température T . Les courbes représentant pour une température T donnée la teneur en eau X d'un matériau en fonction de la valeur de l'activité de l'eau A_w ou de l'humidité relative de l'air en équilibre HR constituent les isothermes de sorption. L'activité de l'eau est définie par la formule II- 4 et la teneur en eau par la relation II- 5

$$A_w = \frac{P_{matériau}}{P_{eau}} \quad \text{II- 4}$$

Avec $P_{matériau}$ = Pression partielle de l'eau à la surface du matériau

P_{eau} = Pression partielle de l'eau pure à la température considérée

$$X = \frac{m_e}{m_s} \quad \text{II- 5}$$

Avec m_e = Masse d'eau contenue dans le matériau

m_s = Masse de matière sèche du matériau

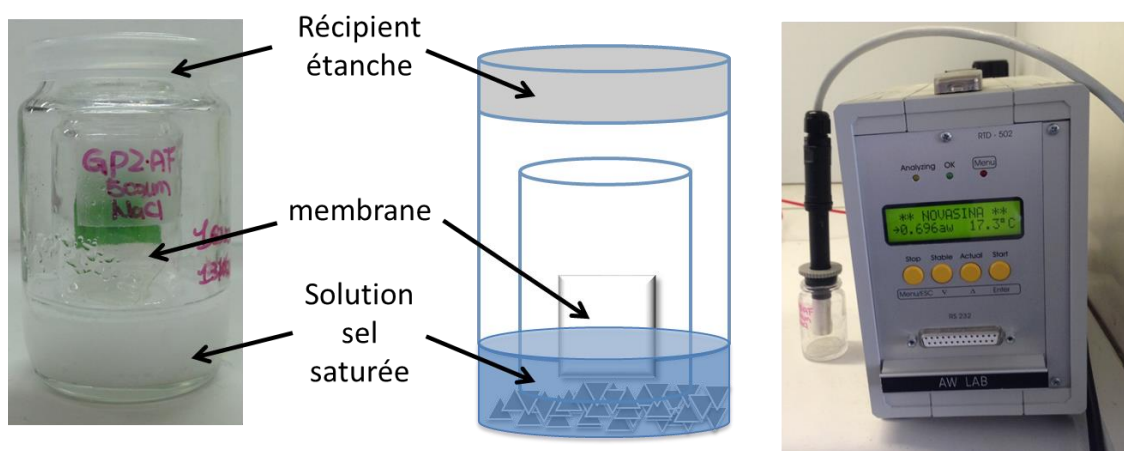
De plus l'humidité relative (HR) est définie comme le rapport de la pression partielle en vapeur d'eau contenue dans l'air (P_{va}) sur la pression de vapeur saturante (P_s à T) à la même température. A l'équilibre (ni transfert de chaleur, ni transfert de masse), il peut être considéré que $A_w = HR$.

Les échantillons de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ sont placés dans un récipient étanche à l'intérieur duquel une solution saline sursaturée maintient une humidité relative constante (Figure II- 3). Les récipients sont placés dans une enceinte thermostatée à 20°C . La Table II- 5 indique les humidités relatives générées par les solutions salines utilisées dans cette étude.

Table II- 5 Humidité relative des solutions saturées de différents sels en fonction de la température, adapté de (Greenspan 1977)

HUMIDITE RELATIVE (%)									
	Chlorure de Lithium (LiCl)	Chlorure de Magnésium (MgCl ₂)	Carbonate de Potassium (K ₂ CO ₃)	Nitrate de Magnesium (Mg(NO ₃) ₂)	Bromure de Sodium (NaBr)	Iodure de Potassium (KI)	Chlorure de Sodium (NaCl)	Chlorure de Potassium (KCl)	Sulfate de Potassium (K ₂ SO ₄)
15°C	11,3 ± 0,4	33,3 ± 0,2	43,2 ± 0,3	55,9 ± 0,3	60,7 ± 0,5	71,0 ± 0,3	75,6 ± 0,2	85,9 ± 0,3	97,9 ± 0,6
20°C	11,3 ± 0,3	33,1 ± 0,2	43,2 ± 0,3	54,4 ± 0,2	59,1 ± 0,4	69,9 ± 0,3	75,5 ± 0,1	85,1 ± 0,3	97,6 ± 0,5
25°C	11,3 ± 0,3	32,8 ± 0,2	43,2 ± 0,4	52,9 ± 0,2	57,6 ± 0,4	68,9 ± 0,2	75,3 ± 0,1	84,3 ± 0,3	97,3 ± 0,5

L'humidité et la température à l'intérieur des récipients sont contrôlées grâce à un Awmètre AwLab RS232 RTD 502 Novasina. L'échantillon est pesé à intervalle régulier jusqu'à ce que sa masse ne varie plus, il est alors en équilibre avec l'air à (T, HR). Connaissant sa masse humide, il suffit alors de déterminer sa masse sèche par pesée après passage à l'étuve à 100°C pendant 24h pour en déduire sa teneur en eau X. Le couple (HR, X) fournit un point de l'isotherme de sorption ou de désorption.

**Figure II- 3 Montage expérimental pour la mesure des isothermes de sorption**

2.7. Caractérisation des propriétés de transport gazeux

Les propriétés de transport gazeux des membranes à base de gélatine ont été déterminées dans deux environnements différents :

- dans un premier temps avec des gaz purs et secs dans une cellule frontale disponible au laboratoire décrite dans les travaux de Charmette *et al.* (Charmette *et al.* 2004; Charmette 2007; Charmette *et al.* 2009),
- ensuite dans un pilote développé au cours de cette étude où le transport a été caractérisé sur des mélanges de gaz en flux tangentiel et en conditions humides contrôlées.

Deux unités ont été utilisées au cours de cette étude pour le coefficient de perméabilité :

- Le Barrer, unité classique de la perméation gazeuse étudiée dans le cadre du génie des procédés :

$$1 \text{ Barrer} = 10^{-10} \frac{\text{cm}^3(\text{STP})_{\text{Gaz}} \cdot \text{cm}_{\text{membrane}}}{\text{cm}^2_{\text{membrane}} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}_{\text{Hg}}} \quad \text{II- 6}$$

- Une unité relative à l'étude de la perméation gazeuse pour une application en emballage alimentaire et correspondant plutôt aux valeurs faibles de perméabilité:

$$\frac{\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}}{\text{m}^2 \cdot \text{jour} \cdot \text{kPa}} \quad \text{II- 7}$$

$$1 \text{ Barrer} = 648 \frac{\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}}{\text{m}^2 \cdot \text{jour} \cdot \text{kPa}} \quad \text{II- 8}$$

2.7.1. Perméation de gaz purs secs en mode frontal

2.7.1.1. Dispositif expérimental

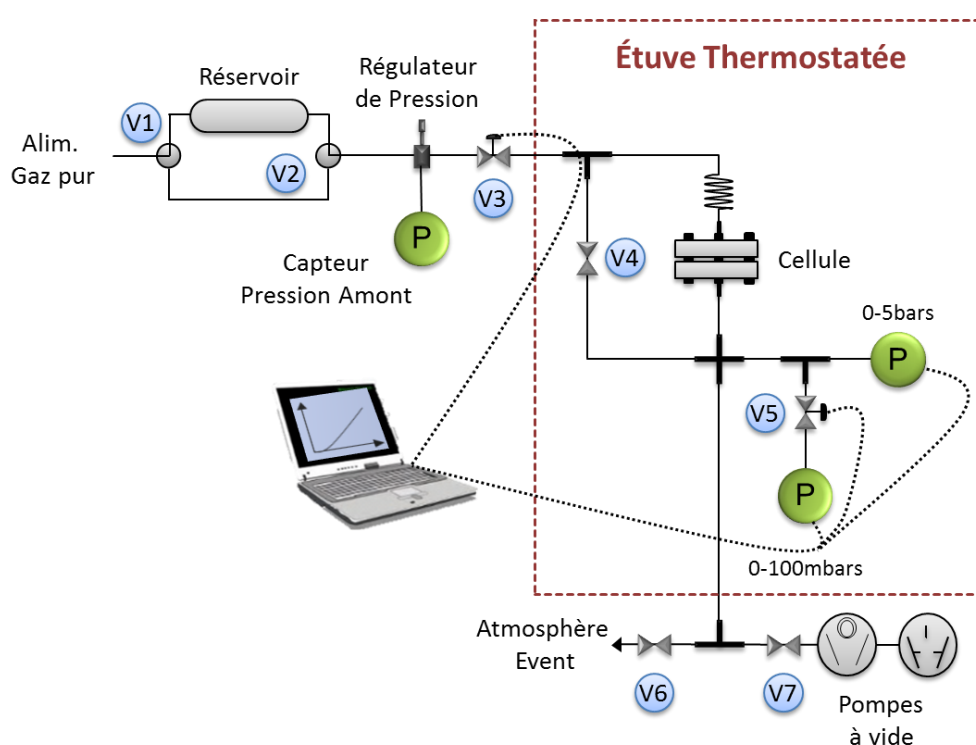


Figure II- 4 Représentation schématique du perméamètre à flux frontal

Le montage de perméation gazeuse en gaz pur et flux frontal, présenté dans la

Figure II- 4, est constitué de trois parties :

- Au centre, se trouve la cellule de perméation en acier inoxydable (Millipore). La cellule est placée dans une étuve thermostatée permettant de contrôler la température entre 25°C et 90°C. L'étanchéité entre les deux compartiments de la cellule est assurée par un joint torique en viton qui impose la surface des membranes testées à 15,9 cm². Un deuxième joint torique en périphérie de la cellule assure l'étanchéité globale du dispositif.
- En amont de la cellule se trouve le système d'alimentation en gaz pur. A la sortie des bouteilles de gaz est placé un réservoir de 100 cm³ assurant l'autonomie du dispositif pendant le temps de l'analyse. Une vanne manométrique couplée à un transmetteur de pression (Keller PA 210, 2-20 bars) permet de fixer la pression P_1 désirée pour les mesures. Une électrovanne est placée entre la vanne de régulation de pression et la cellule de perméation. Son ouverture correspond au temps $t = 0$ de l'acquisition des données.
- En aval de la cellule, une remise à l'air est possible par la vanne V6 qui fait office d'évent. La vanne V7 quant à elle permet de mettre le système sous vide au moyen d'une pompe

turbomoléculaire Leybold Turbovac 50. L'ouverture de la vanne by-pass V4 permet de faire le vide dans toutes les parties du montage, amont et aval. La pression aval P_2 est mesurée par deux capteurs de pression. Le premier, un MSK Baratron 623A dont la gamme de mesure est 0-100 mbars permet une acquisition précise de P_2 . Le deuxième, un MKS Baratron 121A 0-5 bars dont la gamme de pression plus étendue peut être utilisée pour les mesures à température contrôlée jusqu'à 90°C.

L'incertitude sur les coefficients de perméabilité a été expérimentalement évaluée à 10%.

2.7.1.2. Protocole d'expérimentation

Après avoir découpé un échantillon de 4,7 cm de diamètre de la membrane à tester et mesuré son épaisseur avec un micromètre palmer Mitutoyo (10 points de mesure), celui-ci est placé dans la cellule. Une fois la cellule fermée, la vanne V6 est fermée, la vanne bypass V4 est ouverte et la vanne V7 est ouverte pour permettre le dégazage sous vide de l'ensemble du système (perméamètre à partir de la vanne V3 et membrane) pendant 24 heures. Une fois cette étape finie, la vanne V7 est fermée pour isoler le dispositif du vide et la bascule des vannes V1 et V2 permet le remplissage du réservoir avec le gaz choisi. Grâce au régulateur de pression, la pression amont P_1 est fixée à 2 ou 3 Bar suivant les séries d'expériences. La vanne V4 est fermée pour isoler les deux compartiments de la cellule. Les deux vannes pneumatiques V3 et V5 permettent d'alimenter la cellule en gaz pur et d'isoler le capteur de pression le plus sensible lors de mises à l'atmosphère. Elles sont commandées par un programme informatique développé au laboratoire à partir de Labview. L'acquisition des données et l'ouverture de la vanne V3 sont commandées simultanément par le logiciel. Lorsque la pression P_2 atteint 80 mBar, la vanne V8 se ferme pour protéger le capteur de pression MSK Baratron 623A et l'acquisition est stoppée. Les données informatiques sont ensuite traitées sous Excel pour déterminer les coefficients de perméabilité et de diffusion.

2.7.1.3. Détermination expérimentale des coefficients de diffusion et de perméabilité

La mesure des coefficients de perméabilité et de diffusion est réalisée avec un perméamètre basé sur la mesure à volume constant et pression variable. Pour déterminer les coefficients de diffusion, la méthode expérimentale du « temps de retard » ou « time lag » a été utilisée.

La membrane étudiée est placée dans une cellule de perméation plane, les deux compartiments amont et aval sont ensuite dégazés sous vide secondaire (10^{-2} Pa). A l'instant $t=0$, et après avoir isolé les deux compartiments, une quantité de gaz est instantanément introduite dans le compartiment amont à une pression P_1 choisie et étant généralement beaucoup plus élevée que la pression P_2 mesurée dans le compartiment aval. La mesure de l'augmentation de P_2 en fonction du temps permet l'obtention d'une courbe similaire à la Figure II- 5 5. Dans les premiers

instants de l'expérimentation, un régime transitoire d'évolution de la pression met en évidence le phénomène de time-lag. Ensuite un régime pseudo stationnaire (le régime est en effet toujours transitoire) se met en place, représenté par une droite si le transport gazeux est fickien et que la pression aval est toujours très faible devant la pression amont.

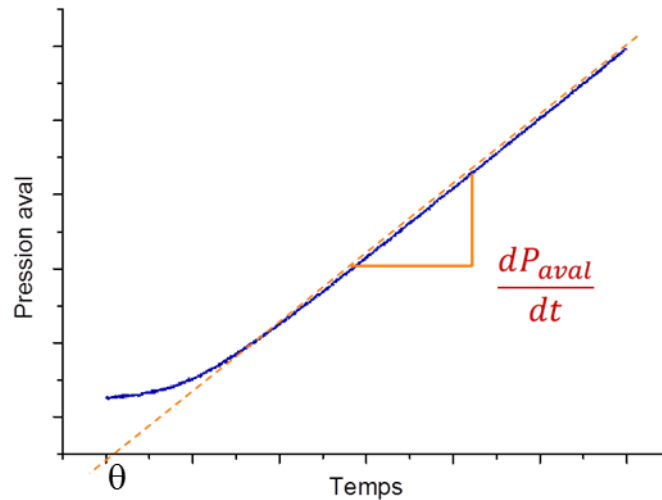


Figure II- 5 Allure d'une courbe expérimentale de perméation gazeuse

Cette courbe permet, par résolution de la deuxième loi de Fick, de déterminer le coefficient de diffusion pendant la phase de régime transitoire et le coefficient de perméabilité quand le régime pseudo-stationnaire est atteint.

L'évolution de la pression pendant le time lag a permis de calculer le coefficient de diffusion à travers la membrane en résolvant analytiquement la deuxième loi de Fick :

$$D \left(\frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \right) = \frac{\delta C}{\delta t} \quad \text{II- 9}$$

La membrane est considérée comme plane et ayant une épaisseur négligeable par rapport au diamètre de l'échantillon testé.

La résolution détaillée de la deuxième loi de Fick a été réalisée par Crank (Crank 1975) et Barrer (Barrer *et al.* 1939). Cette résolution analytique est possible si l'isotherme de sorption obéit à la loi de dissolution de Henry, c'est-à-dire si le coefficient de perméabilité est constant et indépendant de la pression. Dans ce cas C , représentant la quantité de pénétrant absorbée par le polymère, est proportionnelle à la pression P :

$$C = S \cdot P$$

II- 10

Ainsi pour un film d'épaisseur e , de surface A dont les faces amont et aval sont respectivement aux concentrations C_1 et C_2 , il faut poser les conditions aux limites suivantes :

- Initialement, $C(x, 0) = 0$ quelque soit x , le film et les deux compartiments sont sous vide poussé.
- C_1 est constant pendant toute la durée de la mesure.
- $C_2 \ll C_1$.
- A $t = 0$, $\begin{cases} x = 0, C(0, t) = C_1 = S \cdot P_1 \\ x = e, C(e, t) = C_2 = S \cdot P_2 \end{cases}$

Dans ces conditions, la première loi de Fick (Fick 1855) pour un film mince a pour solution l'expression analytique obtenue par Crank (Crank 1975) :

$$C(x, t) = C_1 \left[1 - \frac{x}{e} - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin\left(\pi \frac{x}{e}\right) \exp\left(-D n^2 \frac{\pi^2 t}{d^2}\right) \right] \quad \text{II- 11}$$

La mesure expérimentale nous donne $\frac{dP_2}{dt}$ qui est lié à n , nombre de moles du pénétrant ayant traversé l'échantillon au bout d'un temps t par :

$$\frac{V}{RT} \frac{dP_2}{dt} = \frac{dn}{dt} = -A D \left(\frac{dC}{dx}\right)_{x=e} \quad \text{II- 12}$$

Où V = Volume du compartiment aval (m^3)

A = Surface de l'échantillon du polymère (m^2)

D = Coefficient de diffusion du pénétrant dans le polymère ($m^2 \cdot s^{-1}$)

L'intégration de la relation II- 11 entre les temps 0 et θ donne :

$$P_2 = - \frac{A R T}{V} D \int_0^t \left(\frac{dC}{dx}\right)_{x=e} \cdot dt \quad \text{II- 13}$$

Si $C(x, t)$ est remplacé dans l'équation II- 13 par la valeur obtenue par la relation II- 11 :

$$P_2 = \frac{A R T}{V e} C_1 \left(D t + 2 \frac{d^2}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cos(n \pi) \left[1 - \exp \left(- D n^2 \frac{\pi^2 t}{d^2} \right) \right] \quad \text{II- 14}$$

Avec $\lim_{t \rightarrow \infty} e^{-D n^2 \frac{\pi^2 t}{d^2}} = 0$, l'équation II- 14 devient :

$$P_2 = \frac{A R T}{V e} C_1 \left(D t + \frac{d^2}{6} \right) \quad \text{II- 15}$$

Où $C_1 = S . P$ (loi de Henry)

Pour un gradient de pression important, le time lag s'exprime comme $\theta = \frac{e^2}{6 D}$, ce qui permet de calculer le coefficient de diffusion D :

$$D = \frac{e^2}{6 \theta} \quad (m^2 . s^{-1}) \quad \text{II- 16}$$

Avec e = Epaisseur de la membrane (m)

θ = Time-lag (s)

La perméabilité (coefficient de perméabilité) P_e du matériau est donnée par le produit $S \times D$. La pente de la droite $P_2 = f(t)$ en régime pseudo stationnaire permet de calculer P_e :

$$P_e = S D = \frac{V e}{A R T P_1} \left(\frac{dP_2}{dt} \right) \quad \text{II- 17}$$

Avec P_e = Coefficient de perméabilité ($\text{mol(STP)} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

V = Volume aval de l'appareil (ici $V = 3,74 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3$)

e = Epaisseur de la membrane à tester (m)

A = Surface de la membrane (ici $A = 1,73 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$)

R = Constante de gaz parfait ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T = Température (K)

P_1 = Pression amont (lors de cette étude, deux cas de figure : $2 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ ou $3 \cdot 10^5 \text{ Pa}$)

La sélectivité idéale d'un film polymère pour deux gaz i et j est obtenue par :

$$\alpha (i/j) = \frac{Pe_i}{Pe_j} \quad \text{II- 18}$$

2.7.1. Perméation de mélange Air/CO₂ à humidité contrôlée en mode tangentiel

Dans le cadre de cette thèse, un pilote a été spécifiquement conçu et construit pour étudier l'influence de l'humidité du flux gazeux sur les propriétés de perméation des membranes développées au cours de cette étude. La régulation de l'humidité est basée sur l'évolution de la pression de vapeur saturante de l'eau en fonction de la température. La différence de température entre la zone de contact eau/gaz (à la température T_{contact}) et le reste du système ($T_{\text{système}}$) va engendrer une humidité relative suivant la relation II- 18.

$$\%HR = \frac{Pw_{\text{sat}}(T_{\text{contact}})}{Pw_{\text{sat}}(T_{\text{système}})} \quad \text{II- 19}$$

2.7.1.1. Dispositif expérimental

Le montage de perméation gazeuse en gaz pur et flux frontal est présenté dans la

Figure II- 46 et est constitué de quatre parties :

- L'enceinte thermostatée (Aqualytic, Bioblock Scientific) qui permet de contrôler la température entre 4°C et 40°C. Elle contient la cellule de perméation en acier inoxydable (Millipore). L'étanchéité entre les deux compartiments de la cellule est assurée par un joint torique en viton qui impose la surface des membranes testées à 49,01 cm². Un deuxième joint torique en périphérie de la cellule assure l'étanchéité globale du dispositif. L'étuve contient également les deux capteurs d'humidité (Vaisala Humicap HMT330) qui mesurent l'humidité des flux gazeux amont et aval à la cellule.
- Le panneau de contrôle des gaz qui comprend la régulation de débits des quatre lignes de gaz (Readout & control Electronics 0154 Brooks instrument, débitmètres Brooks mass flow controller 5850, débitmètre 1 : TR series, débitmètre 2 : E series, débitmètres 3 et 4 : S series), les capteurs de pression (Transmetteur de pression piezo résistif Keller PAA 33X, amont 0-5 Bar, aval 0-3 Bar), les 16 vannes de distribution et le déverseur. Les quatre lignes de gaz alimentent à la fois l'amont et l'aval de la cellule. Les lignes 1 et 2 permettent la constitution du mélange amont, la ligne 3 correspond au balayage de toute la zone aval. Ces trois lignes passent par la zone de contact eau/gaz et sont donc à humidité contrôlée. La ligne 4 donne la possibilité de diluer l'effluent avant injection dans

l'analyseur. Le système est alimenté par trois bouteilles de gaz, une de CO₂ (ligne 1), une d'air synthétique (ligne 2) et une d'hélium qui alimente grâce à un double détendeur à la fois les lignes de balayage et de dilution (lignes 3 et 4) ainsi que le balayage du chromatographe et du détecteur. Pour pouvoir sécher l'ensemble du système, le pilote est relié à l'air comprimé (réseau du laboratoire \approx 5Bar) par un détendeur.

- La zone de contact eau/gaz qui permet de réguler l'humidité relative des flux gazeux amont et de balayage. Elle comprend un bain thermostaté constitué d'une cuve alimentée par un cryostat (Lauda WK 230). Le flux amont est mis en contact avec l'eau par l'intermédiaire d'un contacteur (minimodule G542 Membrana). Le CO₂ étant soluble dans l'eau pour éviter de modifier la composition du mélange gazeux, l'eau du contacteur tourne en circuit fermé avec un réservoir en verre et grâce à une pompe (Cole Palmer Gear pump drive 75211-15 équipée d'une tête Micropump 81282). Le flux aval passe par un saturateur en verre suivi d'un piège à eau constitué d'un récipient en verre vide.
- L'analyseur, un chromatographe en phase gazeuse (GC) équipé d'un détecteur catharomètre : Thermal Conductivity Detector (TCD) (Clarus 400 Perkin Elmer). La séparation des gaz se fait par l'intermédiaire de deux colonnes, une Q-Plot (Hayesep 60/80mesh, L=4m, d=1/8", n°1105) qui permet de séparer le CO₂ des autres gaz ; et un tamis moléculaire (TA5A 80/100mesh L=4m, d=1/8", n°1061) qui permet de séparer l'oxygène de l'azote. L'analyseur est branché en ligne sur le pilote de séparation. Les colonnes ne devant pas être exposées à l'humidité, le flux gazeux traverse avant l'injection un récipient en verre rempli de silicagel. La gestion du GC/TCD se fait grâce au logiciel TotalChrom.

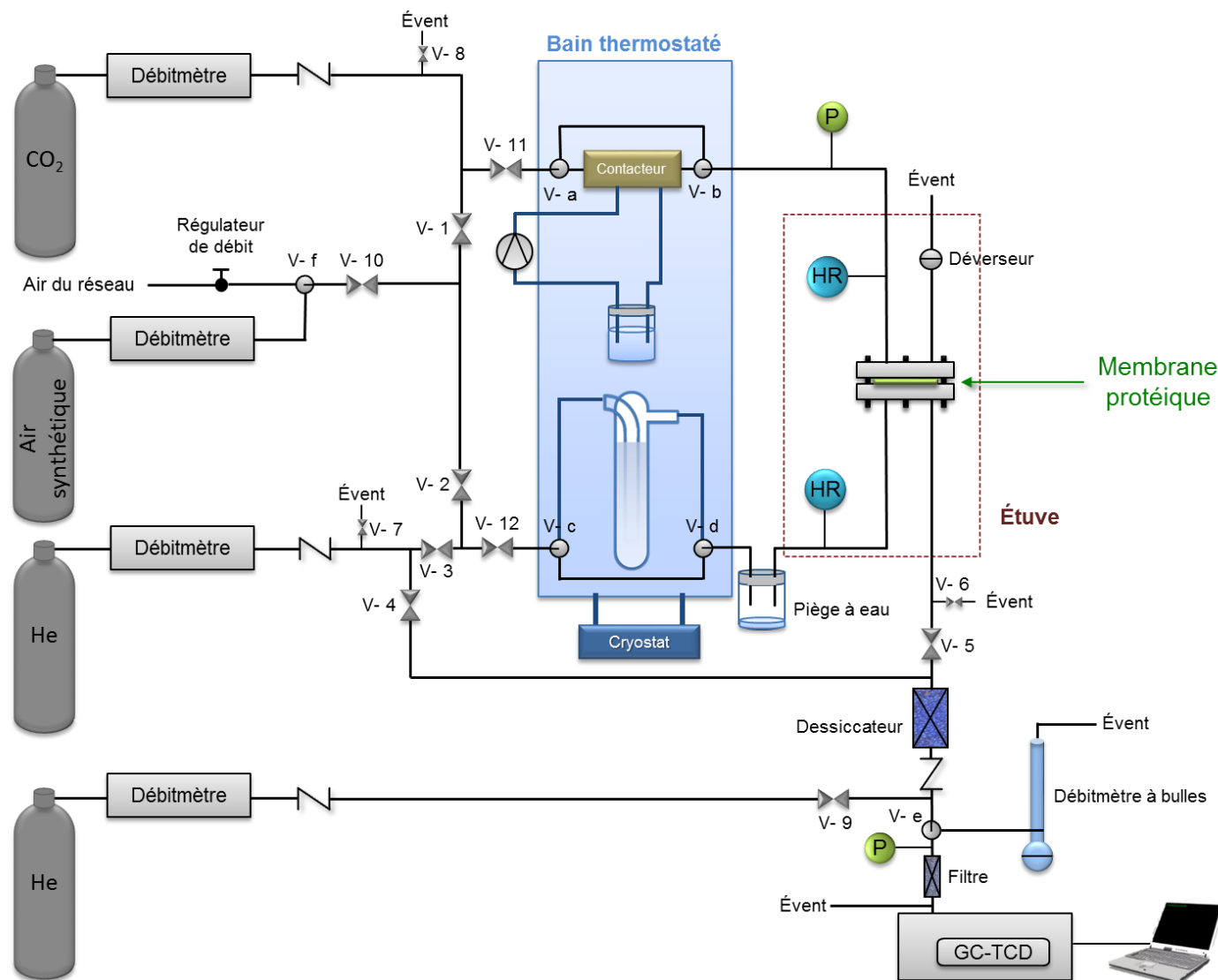


Figure II- 6 Représentation schématique du pilote de perméation en flux tangential à humidité contrôlée

2.7.1.2. Protocole d'expérimentation

Après avoir découpé un échantillon de 9 cm de diamètre de la membrane à tester et mesuré son épaisseur avec un micromètre palmer Mitutoyo (10 points de mesure), celui-ci est placé dans la cellule. Une fois la cellule fermée, on ferme les vannes V6, V7 et V8 (les événements), V2 qui isole les lignes amont et aval, V4 qui permet de bypasser la cellule et V9 si la ligne de dilution n'est pas utilisée. On ouvre les vannes V1 et V10 qui permettent de mélanger les lignes 1 et 2, V3 qui permet d'isoler des compartiments en cas de recherche de fuites, V5, V11 et V12 qui isolent la cellule. On place les vannes Va, Vb, Vc et Vd en position pour que les flux passent par la zone de contact eau/gaz, la vanne Ve dans le sens de l'injection et la vanne Vf sur la position bouteille d'air et non air réseau. Un certain nombre de vannes (V1, V3, V4, V5, V11, V12) a été conçues pour permettre l'étalonnage, le séchage ou l'équilibrage sans utiliser le mélange amont du système. Les protocoles régissant ces opérations ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

On règle les débits souhaités sur le moniteur de contrôle. La plupart des mesures a été effectuée avec un débit de balayage de 100mL/min d'He et un débit de mélange de 100mL/min, CO₂/Air 50/50.

On règle la température du cryostat et de l'enceinte thermostatée pour obtenir l'humidité souhaitée. On allume la pompe du contacteur et on choisit le débit le plus faible. On règle le déverseur pour obtenir une pression transmembranaire de 1,1 Bar. Au-delà le gaz bulle dans le contacteur.

Une fois le système mis en place, il faut attendre l'équilibre, ce qui prend au minimum une semaine suivant la réticulation de la membrane.

Le GC/TCD est branché en ligne sur le pilote et l'injection se fait par l'intermédiaire d'une boucle d'injection sur une vanne 10 voies (Figure II- 7). Les deux colonnes sont nécessaires pour obtenir la séparation des trois gaz. Cependant la colonne tamis ne doit pas être mise en contact avec le CO₂ et la méthode d'analyse doit en tenir compte. En position OFF de la vanne 10 voies, la boucle est chargée. Le passage en position ON envoie le mélange à analyser dans la Q-Plot qui retient plus le CO₂ que l'air qui va à la colonne tamis. Au moment où les deux gaz de l'air sont séparés dans le tamis et avant que le CO₂ ne sorte de la Q-plot, on rebascule la vanne en position OFF. Les trois gaz retraversent la Q-plot puis vont au détecteur où les trois pics sont détectés dans l'ordre : CO₂, N₂ et O₂.

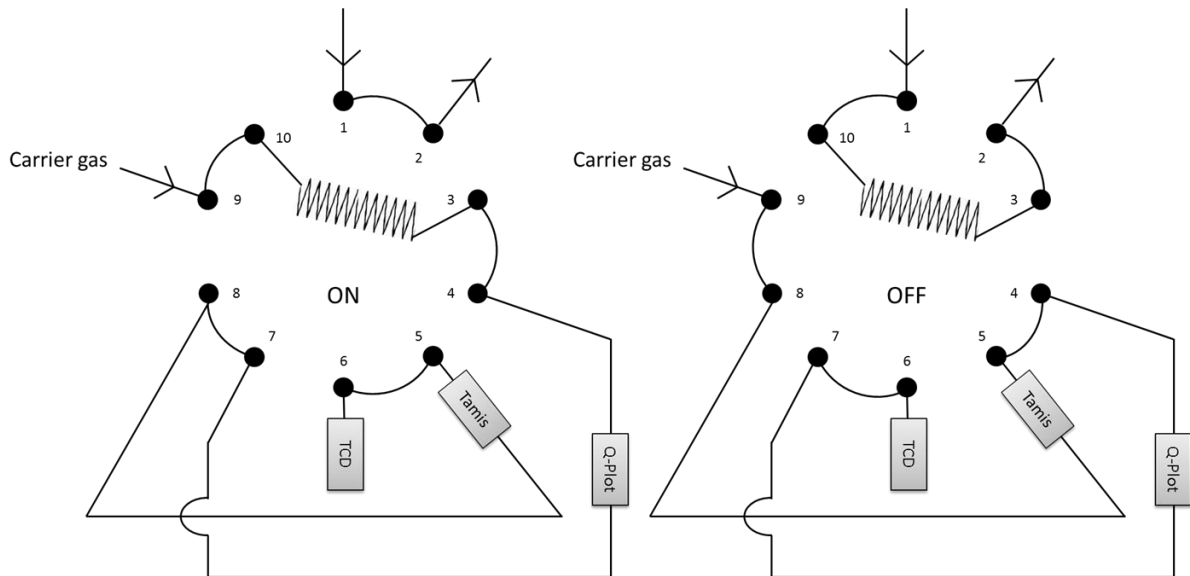


Figure II- 7 Représentation schématique de la vanne 10 voies du GC en position ON et OFF

Les débits au niveau de la boucle d'injection, de l'évent d'injection (qui permet de s'affranchir du contrôle de la pression lors de l'injection) et du déverseur sont mesurés au moment de chaque analyse avec un débitmètre électronique (Meter Flow Mark™ 0.5-500mL/min Perkin Elmer)

2.7.1.3. Détermination expérimentale des coefficients de perméabilité

L'analyse avec le GC/TCD permet d'obtenir la proportion des gaz dans le flux perméant. La mesure des débits permet d'obtenir le débit de gaz perméant :

$$Q_{\text{perméant}} = Q_{\text{boucle injection}} + Q_{\text{évent injection}} - Q_{\text{balayage}} \quad \text{II- 20}$$

La dilution du perméant dans le débit total en aval est donc donnée par :

$$\text{Dilution} = \frac{1}{\frac{Q_{\text{perméant}}}{Q_{\text{boucle injection}} + Q_{\text{évent injection}}}} \quad \text{II- 21}$$

L'aire des pics obtenus avec le GC/TCD corrigée grâce aux droites de calibration (Figure II-8), nous permet d'obtenir la proportion volumique de chaque gaz δ_i suivant la relation II- 22.

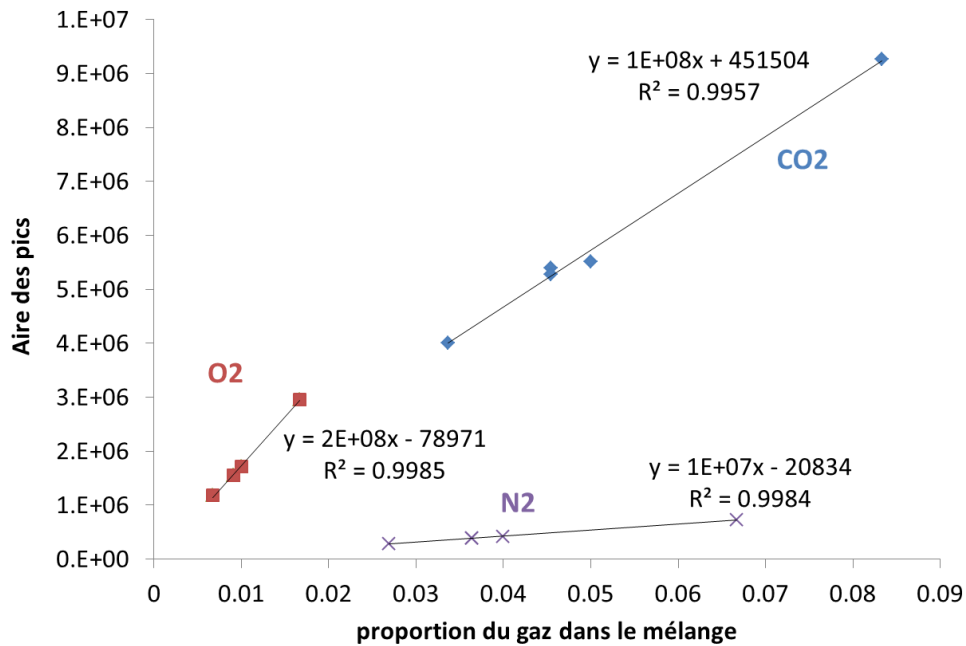


Figure II- 8 Droites de calibration expérimentales du détecteur TCD

$$\delta_i = \text{Aire corrigée pic}_i \cdot \text{Dilution}$$

II- 22

Enfin ces données nous permettent de calculer la perméabilité (P_e) en Barrer de chaque gaz i :

$$P_{e_i} = 3,348 \cdot 10^{16} \frac{Q_{perméat} \delta_i e}{V_m A^2 \Delta P}$$

II- 23

Avec V_m = Volume molaire

e = Epaisseur de la membrane à tester (m)

A = Surface de la membrane

ΔP = Pression transmembranaire

Dans le cas des mélanges de gaz plutôt que d'utiliser la sélectivité pour comparer les comportements des gaz deux à deux, on utilise le facteur de séparation qui est défini suivant la relation II- 24 :

$$\text{Facteur de séparation}_{i,j} = \frac{\delta_{i \text{ aval}}}{\delta_{i \text{ amont}}} \frac{\delta_{j \text{ amont}}}{\delta_{j \text{ aval}}}$$

II- 24

2.8. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les différentes analyses multivariées ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA de Kruskal-Wallis avec un seuil de significativité à $p \leq 0,05$.

Ce test a été choisi pour sa robustesse par rapport aux outliers et sa validité en cas de données ne suivant pas une loi normale.

Procédé d'élaboration des membranes de gélatine

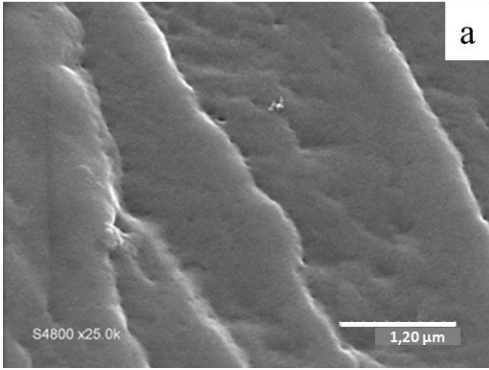
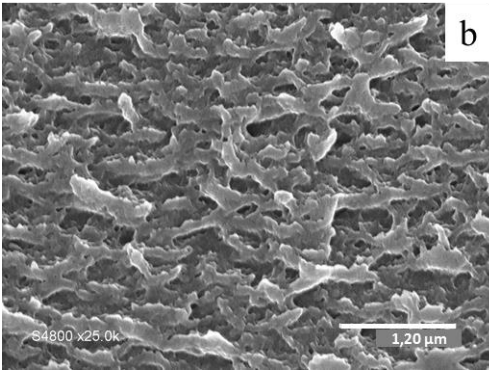
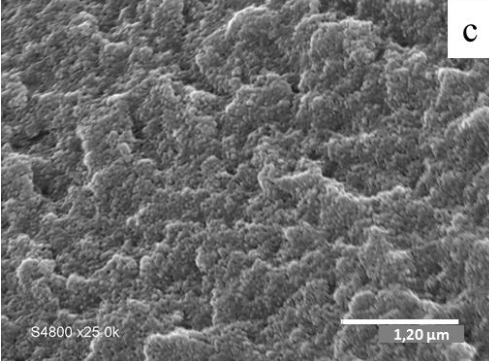
1. Introduction du chapitre III

L'étude bibliographique (chapitre I) a montré les propriétés filmogènes de la gélatine ainsi que l'abondante littérature existante sur la caractérisation de films de gélatine issue de différentes sources (porcs, bovins, poissons). Cependant à notre connaissance, aucune de ces études n'a construit de diagramme de phase établissant l'état thermodynamique d'un mélange gélatine/eau en fonction de la température, ainsi que les transitions entre phases. Pourtant ce diagramme est très utile pour décrire les mécanismes d'élaboration de membranes à base de gélatine et pour permettre le contrôle du procédé de fabrication.

La gélatine est un biopolymère dont les propriétés varient selon ses caractéristiques propres (poids moléculaire, origine, composition en acides aminés...) mais qui globalement se présente sous forme d'un gel à température ambiante. C'est en séchant ce gel qu'une membrane peut être obtenue. Des transitions de phases (solution-gel et gel-film) sont donc impliquées dans le mécanisme d'élaboration. L'objectif de ce chapitre est de mettre en place une méthodologie afin de caractériser ces transitions de phase pour le lot de gélatine utilisé tout au long de cette thèse, elle peut aussi être appliquée à d'autres types de gélatine.

Le chapitre III présente ainsi le procédé de fabrication des membranes de gélatine ainsi que la méthodologie mise en œuvre pour expliciter le chemin d'élaboration depuis la solution de gélatine jusqu'à la membrane. Ce chapitre expose également les caractérisations fonctionnelles des membranes obtenues et notamment l'étude de l'influence de la température sur les perméabilités à 4 gaz (He, CO₂, O₂, N₂). Cette caractérisation nécessitera la plastification des films de gélatine. En effet la méthode mise en œuvre pour mesurer la perméabilité aux gaz, classiquement utilisée pour caractériser les membranes de séparation gazeuse, suit la norme ASTM D 1434-82 (procédure V) et implique une phase de mise sous vide secondaire de 24h. Cette étape entraîne le départ des molécules volatiles et en particulier de l'eau restant après séchage dans les membranes. L'eau étant aussi un plastifiant, cette perte conduit à la formation de films de gélatine cassants qui n'ont pas supporté la mise sous vide et qui se sont rompus dans la cellule. Il a donc été nécessaire de plastifier les membranes. Nous avons choisi d'utiliser des poly(éthylène glycol) et pour cela plusieurs masses molaires ont été testées : PEG200, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG10000. Pour un poids moléculaire supérieur ou égal à 3 000 une séparation de phase a été observée dès la préparation des solutions filmogènes. Entre 1 000 et 2 000, un film opaque au lieu de transparent a été obtenu et la microstructure de la coupe transversale observée au MEB a révélé une morphologie différente des membranes denses obtenues pour des PEG de masse molaire inférieure. De plus une augmentation de la perméabilité a été mesurée pour les films plastifiés avec des PEG1000 comparée au PEG200 (Table III- 1). Il a donc été décidé d'utiliser le PEG200.

Table III- 1 Microstructure et perméabilités aux gaz des membranes de gélatine plastifiées avec PEG200, PEG1000 et PEG2000

PEG	Microstructure (MEB)	Permeabilité (cm ³ .µm/m ² .j.kPa)			
		He	CO ₂	N ₂	O ₂
200		29	29	4	2
1 000		168	220	201	175
2 000		Casse de la membrane pendant la phase de mise sous vide			

Les proportions des solutions ont été dictées par le procédé. Plusieurs fractions massiques de gélatine dans l'eau ont été testées à 10, 15, 20 et 30%. A 30%, les solutions devenant très visqueuses, il aurait été nécessaire d'augmenter la température de préparation des solutions ce qui n'était pas compatible avec notre objectif de développer un procédé « vert » et donc économe en énergie. A 10 et 15%, la solution n'est pas assez visqueuse pour permettre le contrôle de l'épaisseur durant la phase d'étalement : la solution coule d'elle-même. Toutes les membranes ont par conséquent été issues de solution à 20 wt% de gélatine. Le ratio gélatine/PEG200 (0.3 g/g de Gélatine) a été suggéré par Cao et al. (Cao *et al.* 2009) pour obtenir des membranes souples.

L'établissement du diagramme de phase a nécessité la détermination de deux transitions de phase :

(1) Le passage de l'état de solution à celui de gel : la transition sol/gel.

Celle-ci a été déterminée classiquement par rhéologie pour différentes concentrations en gélatine. Cette détermination est nécessaire pour chaque nouveau type de gélatine puisque la transition sol/gel est dépendante de la concentration (Michon *et al.* 1993), de l'origine (Gómez-Estaca *et al.* 2011) et du Bloom de la gélatine (Gekko *et al.* 1991). La Figure III- 1 présente l'allure typique de l'évolution du « damping factor » $\tan\delta = G''/G'$.

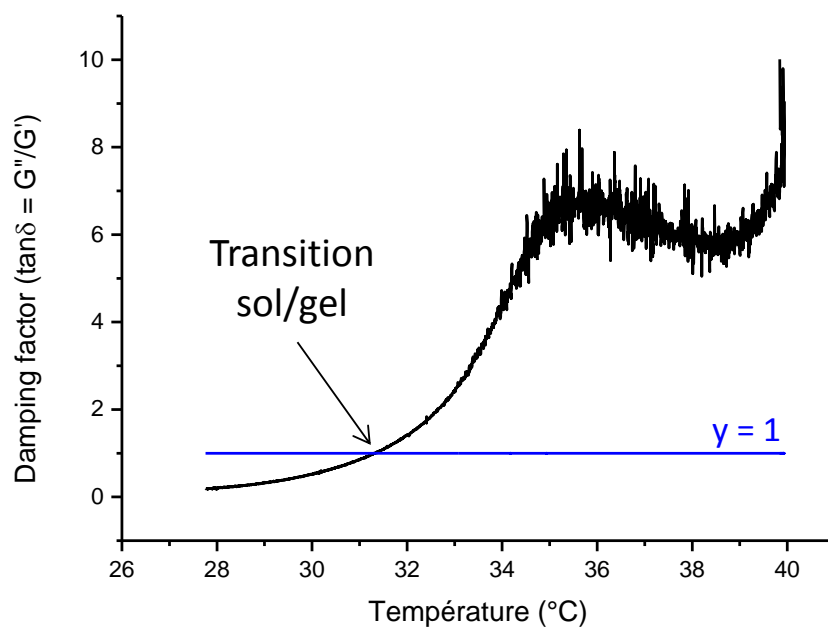


Figure III- 1 Allure typique des courbes obtenues par rhéologie pour la détermination de la transition sol/gel

(2) Le passage du gel à la membrane : transition gel/membrane

L'originalité de cette étude réside dans la méthode mise au point pour suivre les cinétiques de séchage. Une fois la solution étalée, des échantillons ont été prélevés à intervalle de temps réguliers pour être analysés en parallèle en ATG et en rhéologie extensionnelle. L'ATG a permis de mesurer l'eau restant dans la structure ainsi que sa composition en eau libre et en eau liée. Les propriétés mécaniques ont été choisies comme descripteurs de l'état membrane. Lorsque le module d'Young et la contrainte à la rupture se sont stabilisés, on a considéré que le gel était devenu membrane (Figure III- 2).

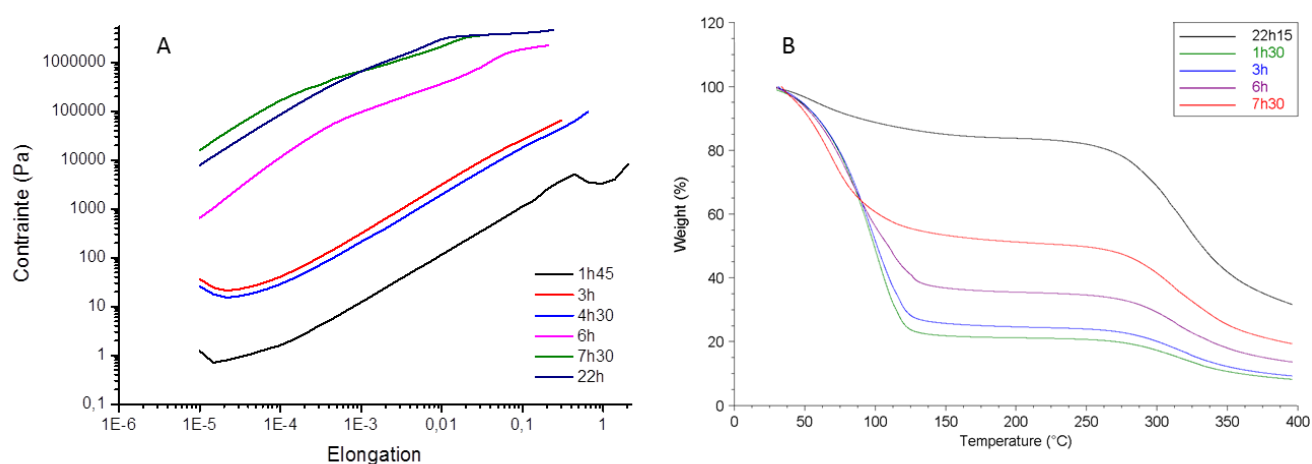


Figure III- 2 Suivi au cours du séchage des propriétés mécaniques (A) et de la teneur en eau par ATG (B), pour un film de gélatine

La publication suivante présente donc le diagramme de phase du système gélatine/eau obtenu dans cette étude. Elle expose également les valeurs de perméation gazeuse pour les gaz He, N₂, CO₂ et O₂ des films gélatine/PEG200.

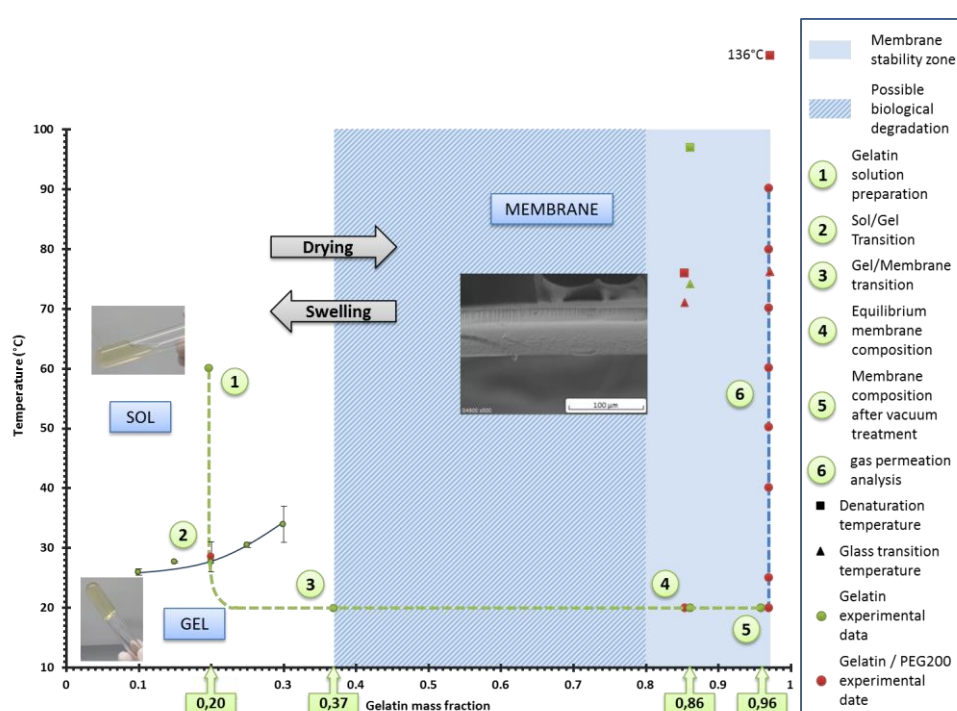
2. Publication 1 :

Preparation of dense self-supported gelatin membranes by combining temperature induced gelation and dry-casting

Jennifer Biscarat, Christophe Charmette, José Sanchez, Celine Pochat-Bohatier*

Journal of Membrane Science (2015) **473**: 45-53.

2.1. Graphical abstract.



2.2. Abstract.

The purpose of this work was to develop a methodology to establish the phase diagram of a binary gelatin/water system in order to study the elaboration process of gelatin membranes. The process involved dry-casting of gelatin solutions, temperature induced gelation (TIG) and membranes drying. The sol/gel transition was measured by rheological measurements and a novel methodology coupling thermogravimetric analyses and extensional rheology was established to determine the gel/membrane transition. By means of this process, called "TIG/Dry-cast", dense gelatin membranes were prepared. Gas permeability values for He, CO₂, N₂ and O₂ of gelatin based films were measured for temperatures ranged between 25°C and 90°C. The relatively low permeability values (< 1.5 Barrer) with interesting selectivity coefficients for CO₂/O₂ of about 10 between 25°C and 40°C made these membranes more suitable for thin layer

deposition onto porous support for gas separation applications. All these results confirmed that gelatin is a promising biobased polymer for membrane preparation. The methodology developed in this paper can be applied to other gelatin/water systems to establish their phase diagram.

Key-words. Membrane; gelatin; phase diagram, gas permeability.

2.3. Introduction

Ideal gas separation membranes consist of a very thin dense layer deposited at the top of a porous sublayer presenting an asymmetric structure (Bernardo *et al.* 2009). The actual selectivity is determined by the thin dense top layer, whereas the porous support provides the necessary mechanical strength while ensuring a low resistance to transfer. Separation is achieved because of differences in the relative transport rates of feed components which depend on differences in solubility and/or diffusivity. The deposition of the thin layer can be achieved by dry-cast process including coating solidification by solvent removal. A solution is prepared by dissolving the polymer in the appropriate solvent and cast into a thin liquid film on a substrate. The solvent is subsequently removed from the polymer solution by evaporation under controlled conditions. When solvent evaporation does not lead to phase separation, the polymer precipitation gives rise to a dense homogeneous membrane. Solvent evaporation influences directly the surface and bulk structure of resulting polymer films affecting then their properties (Mulder 1991). Thin film composite membranes made with synthetic polymers have been studied for a wide range of applications including gas separation (Lau *et al.* 2012). Elaboration and performances of both flat sheet (Wessling *et al.* 2001; Shi *et al.* 2006; Car *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2008) and hollow fiber (Jiang *et al.* 2006) thin film composite membranes have been explored.

Synthetic polymers are the materials of choice for the manufacturing of gas separation membranes at industrial scale (Yampolskii *et al.* 2006). Though, their manufacturing process involves using large quantities of organic solvents which are generally toxic and costly to disposal. In this context, developing membranes with biosourced polymers represents an alternative to petroleum-based materials because they are made from renewable raw materials and many of them can be dissolved in water, avoiding the use of organic solvents. However, as the large use of biopolymers would require intensified farming of energy crops in competition with food production, material developments should be done now in direction of biopolymers like gelatin which is an industrial by-product. Gelatin is obtained by controlled hydrolysis of collagen, a fibrous insoluble protein, which is widely found in nature as the major constituent of skin, bones and connective tissue (Morrison *et al.* 1999). This biopolymer has been extensively used in the food and pharmaceutical industry for its gelling and texturing properties (Djagny *et al.* 2001). However since the Bovine Spongiform Encephalopathy crisis and with the rising consideration of

the religious usages, gelatin in Food Industry tends to be replaced by alginate or agar-agar (Karim *et al.* 2008).

This work focused on investigating the operating conditions for gelatin flat sheet membrane processing by dry-casting. The novelty of this study concerns the determination of the gel/membrane transition. The gas permeability values of the obtained membranes were measured and the influence of temperature on permeation rate was investigated. Gas selectivity (CO_2/O_2 and CO_2/N_2) was determined with the aim of characterizing gelatin dense films as potential thin polymer layers for gas separation membrane after deposition on a porous support.

2.4. *Experimental*

2.4.1. Materials

Porcine skin gelatin (Type A. Bloom 188) was purchased from Sigma and polyethylene 200 (PEG 200) from Merck.

2.4.2. Preparation of membranes

Film-forming solutions were prepared by dissolving 20wt-% gelatin powder in demineralized water at 60°C with mechanical stirring for about 120 min until it was completely dissolved. PEG 200 was added to gelatin solutions at 6wt-%. Membranes were prepared by dry-casting of the gelatin solution at 30°C on flat Teflon coated sheets using a K Control Coater 101 (Erichsen Instruments). The solution was cast at 500µm with an Erichsen Mod.411 0956 casting knife. Drying of gelatin membranes was performed at 20°C under (45 ± 5)% Relative Humidity (RH) during 1 day. The prepared membranes present a composition of 0.3 g PEG/g gelatin, whose ratio was suggested by Cao *et al.* (Cao *et al.* 2009) in order to manufacture soft membranes. All the membranes were stored at ambient temperature in a desiccant box (ca. 25 ± 5 % RH) before subsequent analysis.

2.4.3. Characterization

2.4.3.1. Morphological observation

Samples were metalized by sputter coater SC7620 after been cryo-fractured. Membrane cross-sections were observed by scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S-4800).

2.4.3.2. Measurement of sol/gel transitions

Sol/gel transition for different gelatin solution concentrations were measured using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) with parallel plate system PP50. The ramp temperature was controlled

from 40°C to 25°C with a 0.003°C/s cooling rate with a IMC70 Peltier system. The transition from liquid to soft solid was determined by performing an oscillation test (1Hz frequency, normal force set to 0N) with strain varying from 1 to 0.01% following a logarithmic ramp. The sol/gel transition was defined as the temperature for which the damping factor became lower than 1.

2.4.3.3. Mechanical properties

The mechanical properties of the membranes were evaluated by extensional rheology. These tests were performed using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) using the Universal Extensional Fixture UXF12. The temperature was controlled at 25°C with a CTD180 Peltier system. The samples tested were 4x1 cm² rectangles cut in different parts of the films (at least 3 per formulation). Film thickness was determined using a micrometer (Mitutoyo). The given values are the average of ten measurements at different positions for each sample.

2.4.3.4. Measurements of the gel/membrane transition

The gelatin gel/membrane transition for gel obtained from 20wt-% gelatin solution, was studied by coupling two techniques: thermogravimetric analysis (TGA G500, TA Instruments under nitrogen flow of 100 mL/min) and extensional rheology. The casted membranes were dried in an enclosed space at 20°C and (45 ± 5)% HR. Samples of the four tested drying gels were then regularly analyzed with TGA to control the drying kinetics and with simultaneous extensional rheology to measure the mechanical properties and determine the transition gel/membrane and the equilibrium state. The transition gel/membrane was defined as the gelatin mass fraction for which the mechanical properties stabilized at a given temperature (20°C). The equilibrium state was reached when the gelatin mass fraction got a threshold value during the drying kinetics. This technique has great advantages over classic weight loss monitoring since each point is obtained using a sample which has undergone the real drying conditions and so is reflecting the real evolution of the gelatin properties.

2.4.3.5. Sorption isotherm

Sorption isotherms of gelatin and gelatin/PEG200 membranes were measured at 20°C, for a range of relative humidity varying between 11.3 and 97.6 % by using saturated salt solutions and a gravimetric method. 2x2 cm² membrane samples were exposed to different %RH (Table 1) during 10 days. The water activity was then measured by an Aw-meter (AwLab RS232 RTD 502 Novasina) and the membrane samples weighted by means of a micro-balance (Sartorius CPA225D, with an accuracy of 0.00001 g). The samples were then dried at 100°C for 24h and weighted again. The water content (X_{RH}) was calculated by the following equation:

$$X_{RH} = \frac{(m_{RH} - m_d)}{m_d}$$

With m_{RH} the sample mass after equilibrium with the different %RH, and m_d the mass of the sample after drying at 100°C.

The sorption isotherms were plotted with the measured value of A_w and the corresponding X_{RH} .

Table III- 2.Relative humidity (%) given by saturated salt solutions at 20°C (Greenspan 1977)

Lithium Chloride LiCl	Magnesium Chloride MgCl ₂	Potassium Carbonate K ₂ CO ₃	Magnesium Nitrate Mg(NO ₃) ₂	Sodium Bromide NaBr	Potassium Iodide KI	Sodium Chloride NaCl	Potassium Chloride KCl	Potassium Sulfate K ₂ SO ₄
11.3 ± 0.3	33.1 ± 0.2	43.2 ± 0.3	54.4 ± 0.2	59.1 ± 0.4	69.9 ± 0.3	75.5 ± 0.1	85.1 ± 0.3	97.6 ± 0.5

2.4.3.6. Fast Scan Differential Scanning Calorimetry

Membranes under 45±5% relative humidity and membranes dried after 48h in a vacuum cell at 10⁻² Pa were analyzed with a differential scanning calorimeter DSC 2920 equipped with a cooling accessory RCS90 (TA Instruments). The samples (≈ 6mg) were sealed in an aluminum TA pan. The instrument was calibrated with pure indium ($T_m = 156.6^\circ\text{C}$ and $\Delta H_m = 28.3 \text{ kJ/kg}$), and an empty pan was used as reference. Membranes were cooled from 25°C to -40°C and then heated up to 230°C with a 100°C/min heating rate. This high speed permitted a better peak resolution between the denaturation and the degradation endotherms and to determine glass transition temperature (Figure 1) (Liu *et al.* 2009). The denaturation endotherm is directly related to the denaturation of the collagen like triple helix. By doing the ratio between the gelatin membrane denaturation enthalpy and the value of the denaturation enthalpy of pure porcine skin collagen, $\Delta H_{\text{denat coll}} = 47.8 \text{ J/g}$ (Samouillan *et al.* 2011), the renaturation level can be directly calculated (Achet *et al.* 1995).

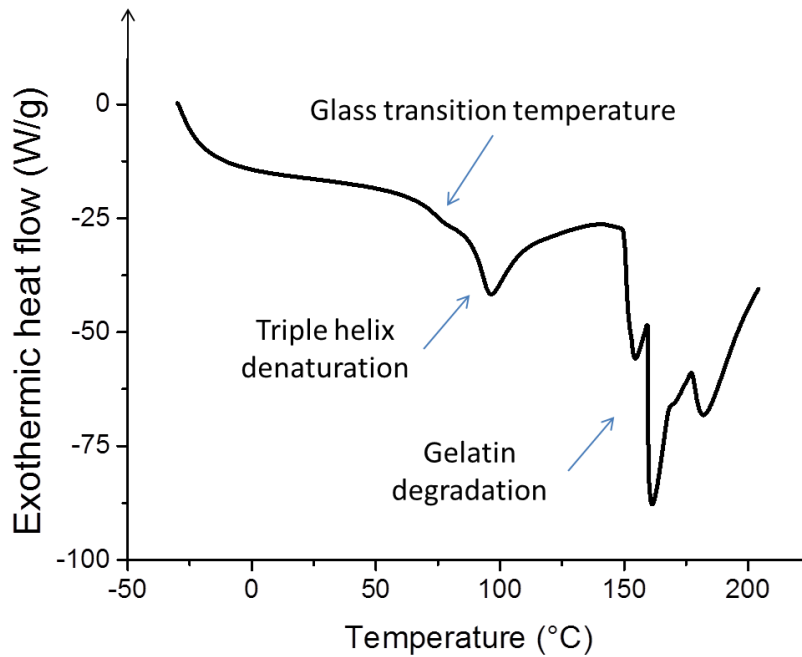


Figure III- 3 Typical thermogram of gelatin/water system for a temperature range from - 25 to 210°C: determination of glass transition temperature and denaturation heat flow.

2.4.3.7. Gas permeation experiments

Permeation experiments were carried out by using the constant-volume and variable-pressure technique in a permeability apparatus at controlled temperature from 25°C to 90°C (298 to 363K) described in the standard ASTM D 1434-82 (procedure V). The apparatus consists essentially of a two compartments permeation cell separated by the tested membrane. The permeability was obtained measuring the pressure increase in the downstream compartment (with a constant volume of $5.25 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) and using different MKS Baratron pressure transducers (range from 0.0 to $1.0 \times 10^5 \text{ Pa}$). The membranes and downstream cell walls were outgassed in situ during 24 hours at high vacuum using a turbomolecular pump (Leybold, Turbovac 50, $50 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$). The permeability experiments were performed using $2.0 \times 10^5 \text{ Pa}$ of upstream pressure and recording the pressure increase in the downstream compartment during 4 hours. For each temperature change, the whole setup was allowed to stabilize during at least 12 hours. The magnitude of purity of gases used (He, CO₂, N₂, O₂) was of 99.95%, they were used without any further purification. A complete description of the apparatus and methodology used was already published (Joly *et al.* 1997). Curves obtained presented only a pseudo steady state region. For calculations of the permeability, the mathematical treatment for thin films based on Fick's second law and reported by Crank was used (Crank 1975). The membrane thickness was determined with a micrometer with an experimental error less than 6 %. The error of permeability

measurements was established to 10%. All the permeation results are reported in Barrer. This unit is defined as follow:

$$1 \text{ Barrer} = 10^{-10} \frac{\text{cm}^3(\text{STP})_{\text{Gaz}} \cdot \text{cm}_{\text{membrane}}}{\text{cm}^2_{\text{membrane}} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}_{\text{Hg}}}$$

2.4.3.8. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the computer program R. Differences between pairs of means were compared using a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test to avoid false positive response in case of non-normal distribution. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

2.5. Results and discussion

2.5.1. Preparation of gelatin dense membranes

2.5.1.1. Determination of the casting temperature

In order to control the thickness during the casting step onto a support, it is necessary to cast a gelatin solution and not a gel. Thus the knowledge of the gelatin sol/gel transition temperature is essential. This will influence the casting operating conditions (polymer solution temperature and support temperature) which have great impact on the obtained gel properties (Kozlov *et al.* 1983). The gelatin sol/gel transition, among others, depends on its concentration (Michon *et al.* 1993), on its origin (Gómez-Estaca *et al.* 2011) and on its Bloom (Gekko *et al.* 1991). Thus the determination of the specific sol/gel transition of each gelatin type is required.

The control of the solution casting thickness is only possible for viscous solutions. In this work, the gelatin mass fraction in the solution ranged from 10 to 30 wt-%.

The results determined from rheological measurements are given in Table III- 3.

Table III- 3. Influence of the gelatin solution concentration on the Sol/Gel transition temperature

Gelatin mass fraction (wt-%)	Sol/Gel transition temperature (°C)
10	25.9 ± 0.5
15	27.7 ± 0.2
20	27.8 ± 0.3
25	30.5 ± 0.4
30	34 ± 3

It can be noticed that sol/gel transition temperatures are very close to standard ambient temperature (usually between 20 and 25°C). Indeed, at room temperature all studied systems are in a gel state. Between 15 and 20 wt-% sol/gel transition temperatures remain constant around 28°C. For gelatin mass fractions smaller than 15 wt-%, the solution casting was difficult due to the low viscosity and it was not possible to form a film. The easiest way to produce films was the use of 20 wt-% mass fraction. So, membranes were prepared with 20 wt% gelatin such as the resulting sol/gel transition of the system was $(27.8 \pm 0.3)^\circ\text{C}$.

It has been previously shown that the mechanical properties of films made from gelatin gels cured above and below the triple helix melting temperature (denaturation temperature) differ, with hot-cast films typically being more brittle than cold-cast films (Bradbury *et al.* 1952; Fraga *et al.* 1985). To prepare gas separation membrane, the best way would be to produce non-brittle cold-cast films, meaning that the casting has to be carried out below the gelatin denaturation temperature. This temperature has been measured with Fast Scan DSC to be $96.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$ for 20wt-% gelatin. Thus, the solution had to be casted between the sol/gel transition (ca. 28°C) and the denaturation temperature (ca. 97°C). The solutions were casted on Teflon sheet warmed at 30°C which is just above the sol/gel transition.

2.5.1.2. Gelatin gel/membrane transition: drying

After the casting of the solutions, drying at 20°C moves the gelatin/water system in the gel domain by a simultaneous effect of the cooling and gelatin concentration rising. The obtained gels were then dried by evaporating water under natural convection at 20°C and 45±5% RH. Under these conditions dense membranes were obtained.

In the previous part, the sol/gel transition was determined by the well-known rheological procedure measuring the elastic and the loss moduli. In this part, TGA/extensional rheology coupled analyses were proposed to determine the gel/membrane transition. Samples were taken off with time along the drying process. Some samples were analyzed periodically by thermogravimetric analysis (TGA), whereas some others were tested in extension rheology to characterize their tensile parameters (Young's modulus and tensile stress at break). TGA curves were processed to determine the degradation temperature, the total water content, the bound and free water of the membranes (Figure III- 4).

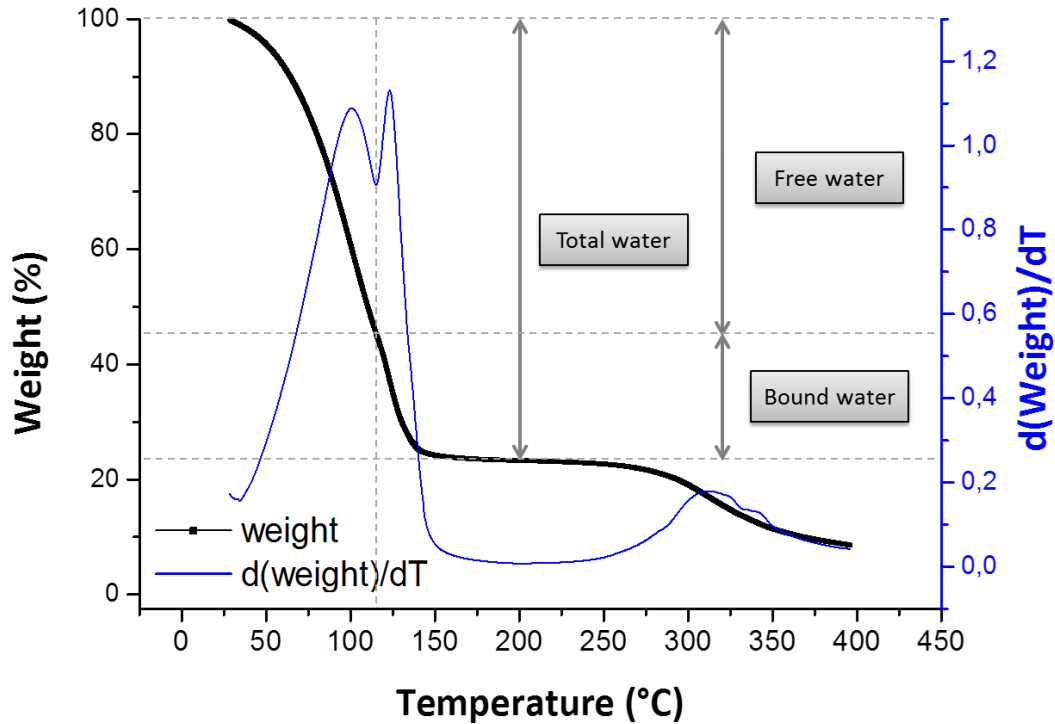


Figure III- 4 Typical TGA curve of gelatin/water system for a temperature range from 0 to 450°C: determination of total water, bound water and free water.

The interest of using TGA compared to conventional gravimetric measurements is the possibility to determine the separate evolution of free water and bound water with gelatin mass fraction during the drying process (Figure III- 5). For gelatin the distinction between free and bound water is crucial since the bound water is directly involved in the structuration of the triple helical conformation. The free water content decreased steadily from $(1.5 \pm 0.2) \text{gWater/gGelatin}$ to $(0.05 \pm 0.007) \text{gWater/gGelatin}$ in function of gelatin mass fraction while bound water content stayed stable at $(0.2 \pm 0.03) \text{gWater/gGelatin}$ until gelatin mass fraction reached 0.66 (g/g). After this point, bound water decreased to reach $(0.08 \pm 0.005) \text{gWater/gGelatin}$. It is important to notice, that a full drying of gelatin membrane, with elimination of bound water, gives brittle material (Gekko *et al.* 1991). Since the gelatin's bound water has such specific interactions, only free water fraction will be used to construct the drying kinetics curves at 20°C and 45±5% RH. In Figure III- 6, the evolution of the free water content versus time (Figure III- 6.a) and drying rate versus free water content (Figure III- 6.b) can be observed. During the beginning of the drying process, only free water was evaporated because of the strong interactions between bound water and the gelatin's polymer chains and especially the triple helices. At one point of the drying process after obtaining 0.66 gelatin mass fraction, free water became at least as difficult to evaporate as bound water and the later began to evaporate. Even when the stable state is

attained, not all free water is gone. It could be due to entrapment of water molecules inside the gelatin polymeric matrix.

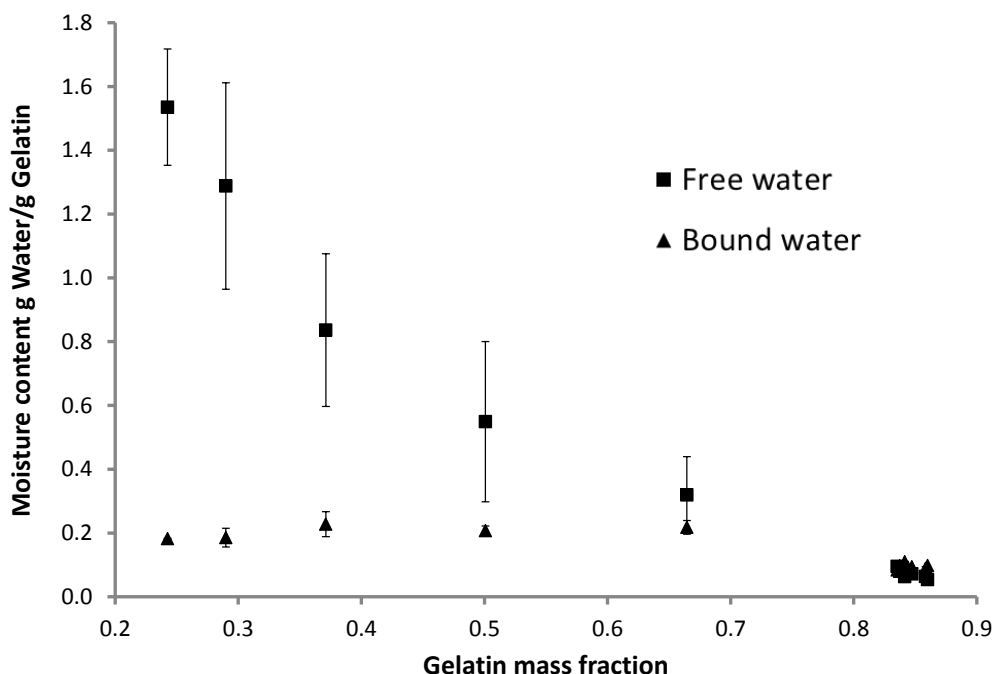


Figure III- 5 Evolution of free and bound water, determined by TGA analyses, with gelatin mass fraction during the drying of gelatin membrane at 20°C and 45±5 %RH

The gelatin showed a classical free convection drying pattern with the three steps: lag phase, constant rate and falling rate drying periods (Berk 2013) (Figure III- 6). The point D represents the time when gelatin reached its equilibrium moisture content after about 10 hours at 20°C and under (45± 5) % HR. The point C represents the boundary between the constant drying rate period and the falling drying rate period and corresponds to a gelatin mass fraction of 0.37 ± 0.09.

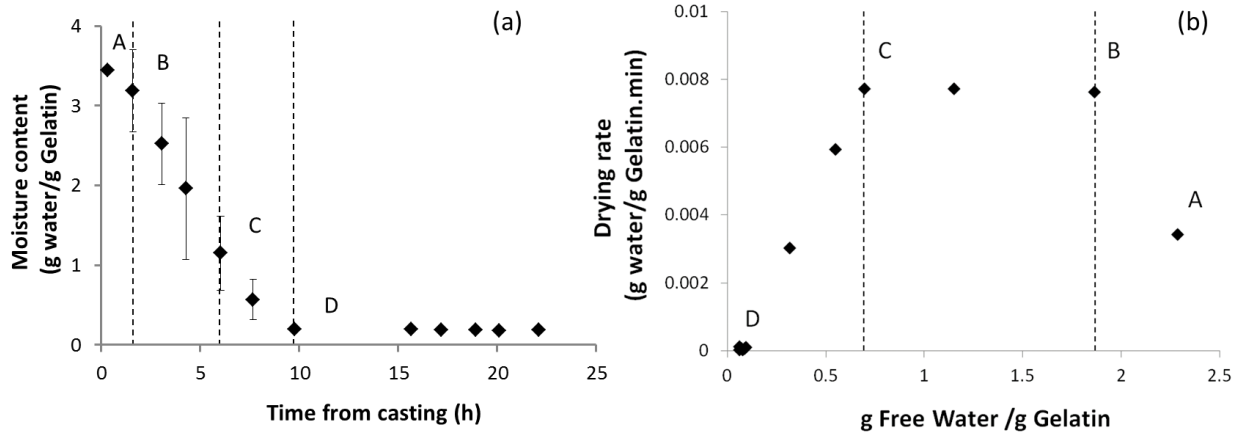


Figure III- 6 Drying kinetics of gelatin at 20°C and 45±5% HR with natural convection. AB: lag period, BC: constant rate period, CD: first falling rate period, after D: equilibrium plateau.

Mechanical properties of gelatin/water system were determined with time along the drying process. Figure III- 7 presents the evolution of Young's modulus and tensile stress at break with gelatin mass fraction. Reporting the dashed lines B, C and D corresponding to different boundaries between the drying periods on Figure III- 7, displayed that tensile parameters followed the same 3 evolution states as the drying kinetics. The point C corresponds to the transition from the constant to first falling drying rate and also to the moment when the mechanical properties reached their equilibrium values. Indeed, in this state, even if the membrane water content does not correspond to the equilibrium, the gelatin membrane already presents the mechanical properties of the final membrane. The point C (gelatin mass fraction = 0.37 ± 0.09) is thus defined as the gel/membrane transition.

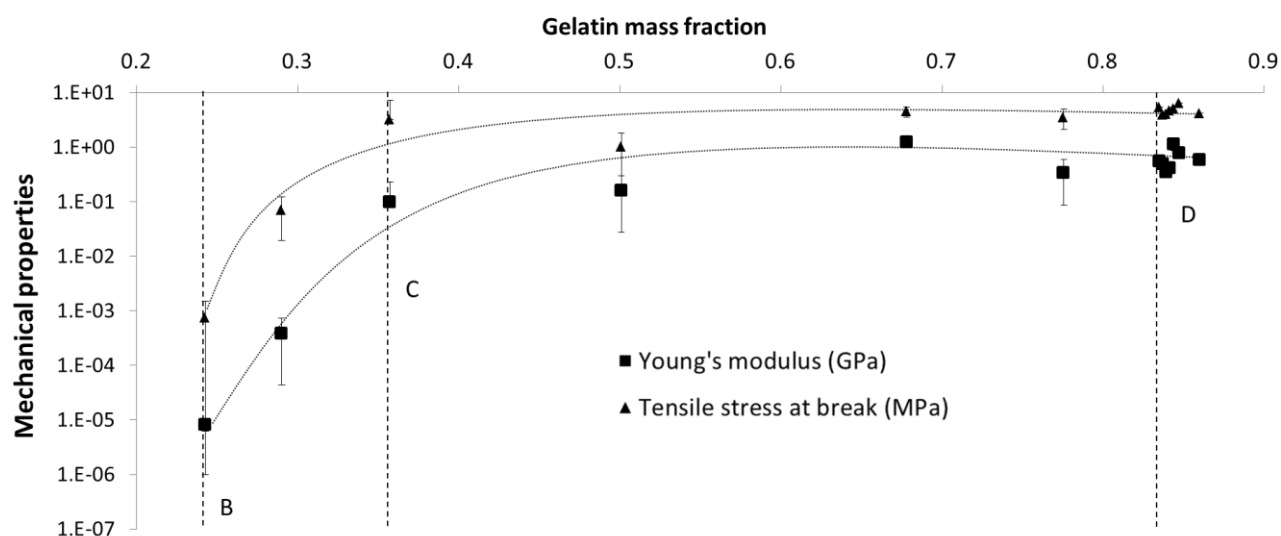


Figure III- 7 Evolution of the mechanical properties gelatin/water system with gelatin mass fraction during drying at 20°C and 45±5% RH under natural convection

2.5.1.3. Membrane stability domain

As a protein, gelatin is known to be hydrophilic and sensible to biological degradation. The sorption isotherm at 20°C of a gelatin membrane has been determined in order to establish the degree of water sensitivity and the stability domain of gelatin membranes (Figure III- 8). First it can be noticed that for water activity (a_w) between 0.3 and 0.65, the water uptake is only 0.08 g water/g gelatin. An increase is observed for higher a_w values in agreement with the study of Broyart *et al.* (Broyart *et al.* 2007) which showed that water sorption by gelatin increase drastically for $a_w > 0.75$. The complexity of the protein material explains the diversity of potential interactions between the membrane and water. Water reacts as a plasticizing agent, by interacting with numerous polar amino acids residues, such as glutamine, asparagine, arginine and lysine. The strong water solubility rise at high activity may be attributed to clustering phenomena, i.e. to the self-association of water molecules to form aggregates as it was already described for chitosan films (Despond *et al.* 2001) and for ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) films (Zhang *et al.* 1999). In the case of gelatin, it would be particularly interesting to study to what extent the sorption of water molecules under high relative humidity by clustering phenomena can modify the triple helical conformation and thus the crystallinity ratio of the polymeric matrix. Indeed, a modification of gelatin structure would have significant impact on gas permeability but also on mechanical properties. Water clustering phenomenon could increase polymer-water interactions to the detriment of polymer-polymer interactions thus reducing density and intensity of physical junctions (containing hydrogen bondings and/or hydrophobic

interactions). This progressively moves the gelatin/water system from the membrane to the gel domain (for $X > 0.63$ kgwater/kg dry matter).

Gelatin membranes were not undergoing large variation of water content for atmospheric conditions variation between 0.3 and 0.65 and remained far from the critical water activity of 0.88 which corresponds to the gel/membrane transition.

Concerning the biological degradation, numerous studies have been published on the influence of the water activity on the type of biological degradation possibly occurring in the material (Scott 1953; Al-Muhtaseb *et al.* 2002; Rahman 2008). For gelatin, the main concerns are bacterial, yeast and mold growth. Growth of all of these three biological entities is considered drastically reduced for $a_w < 0.65$ (Van den Berg *et al.*). This means that for RH in the range of 0.3 and 0.65, gelatin membrane are neither sensitive to humidity nor biological degradation under these atmospheric conditions. Furthermore, this makes gelatin durable for membrane separation applications with dry gases.

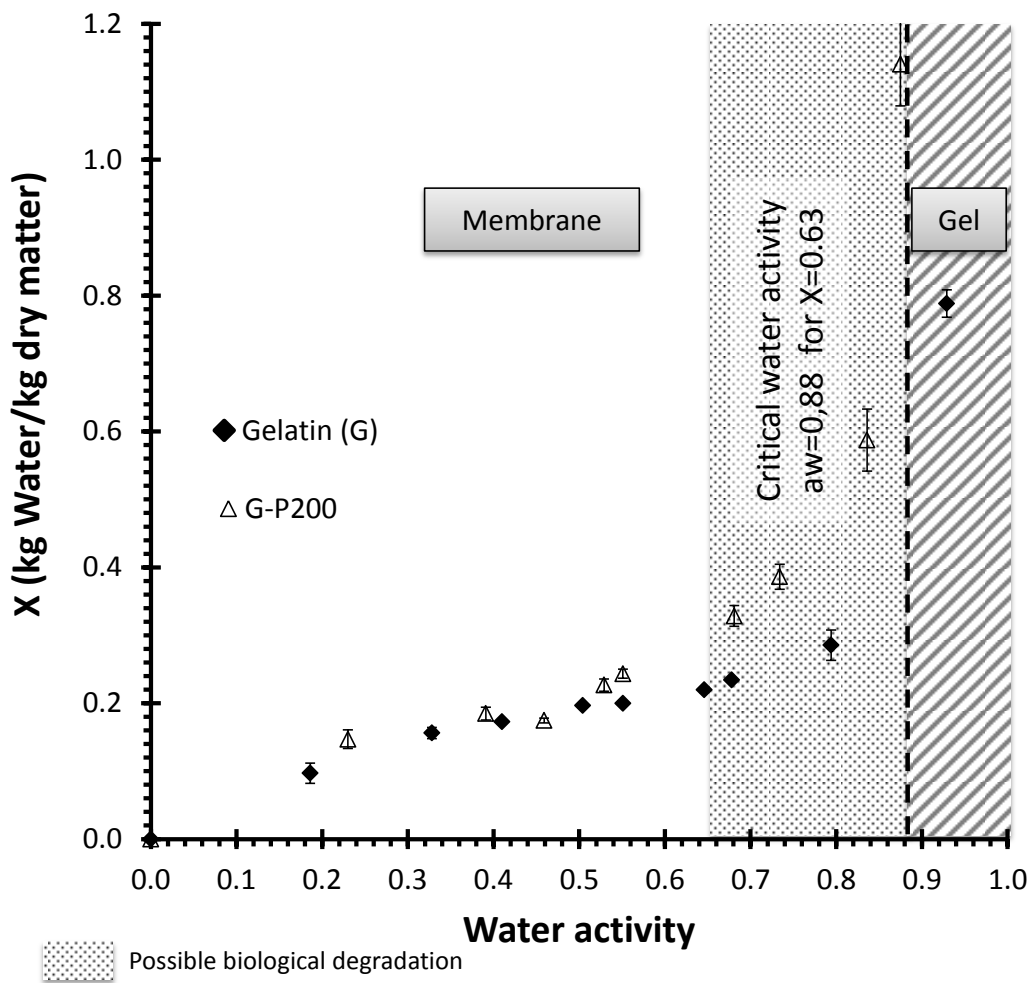


Figure III- 8 Sorption isotherms of gelatin based membrane

2.5.1.4. Temperature Induced Gelation/Dry-cast process

The present results allowed us to propose a partial representation of the phase diagram of the binary system gelatin/water (Figure III- 9). The solution and the gel domain are delimited by the sol-gel transition temperature between $(25.9 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ and $(34 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ for gelatin mass fraction between 0.1 and 0.3. The gel/membrane transition is crossed for gelatin mass fraction higher than 0.37 at 25°C . Thus the reduction of temperature and the concentration by evaporation of a cast gelatin solution lead to the preparation of a membrane, which can be handled as soon as gelatin mass fraction is higher than 0.37. The membrane is stabilized if gelatin mass fraction is higher superior to 0.8.

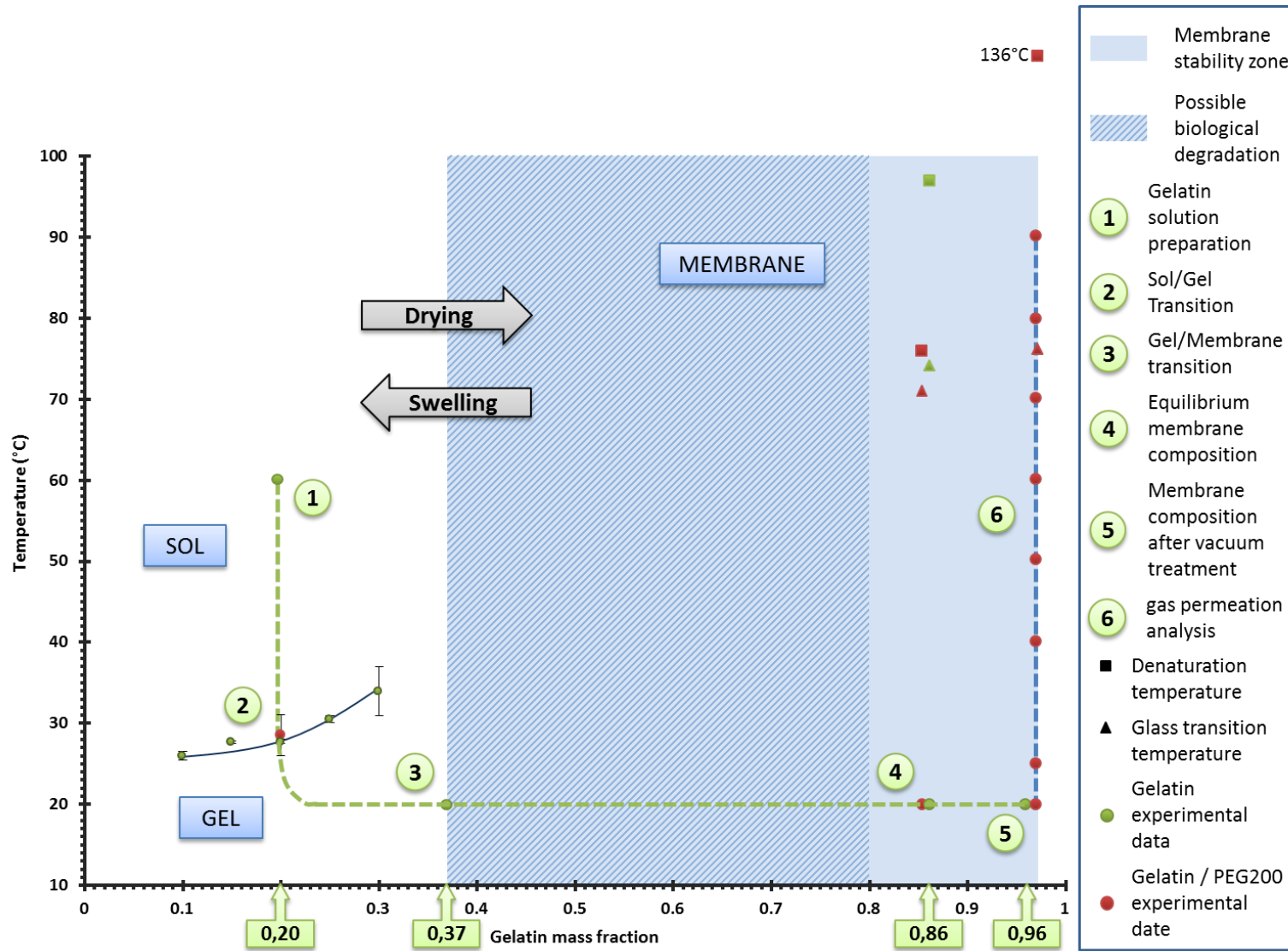


Figure III- 9 Gelatin phase diagram and membrane stability domain

In conclusion, the elaboration of gelatin membranes is based on the casting of a gelatin solution prior to a temperature induced gelation followed by a drying step. By analogy with other membrane elaboration processes like the dry-cast process or the TIPS (Temperature Induced Phase Separation) process, we propose to name this gelatin membrane preparation technique Temperature Induced Gelation/Dry-cast process (TIG/Dry-cast process).

2.5.2. Addition of a plasticizer

As it has been explained above, gas permeation experiments are carried out after a preliminary phase of strong outgassing of the membranes under vacuum. The first tests with gelatin membranes were unsuccessful because these membranes broke during the outgassing phase. As far as this behavior could be related to the membrane flexibility, the addition of plasticizer could enhance some mechanical properties like the flexibility. The plasticizing effect of polyethylene glycol (PEG) on gelatin film has been already demonstrated (Cao *et al.* 2009; Vieira *et al.* 2011). It was attributed to the reduction of the gelatin-gelatin interactions by the introduction of PEG polar groups (-OH) present at both extremities of the molecular chains. Hydroxyl groups are expected to develop gelatin-PEG hydrogen bonds. PEGs of low molecular weight would be more efficient as plasticizers since they exhibit a larger number of hydroxyl groups per mole than PEG of high molecular weight. PEG 200 was thus chosen in this study (0.3 g PEG/g gelatin). By blending PEG 200 to gelatin membranes (G-P200) which maintained their mechanical integrity during gas permeation tests could be prepared. The PEG200 presence was confirmed by FTIR measurements on the membranes.

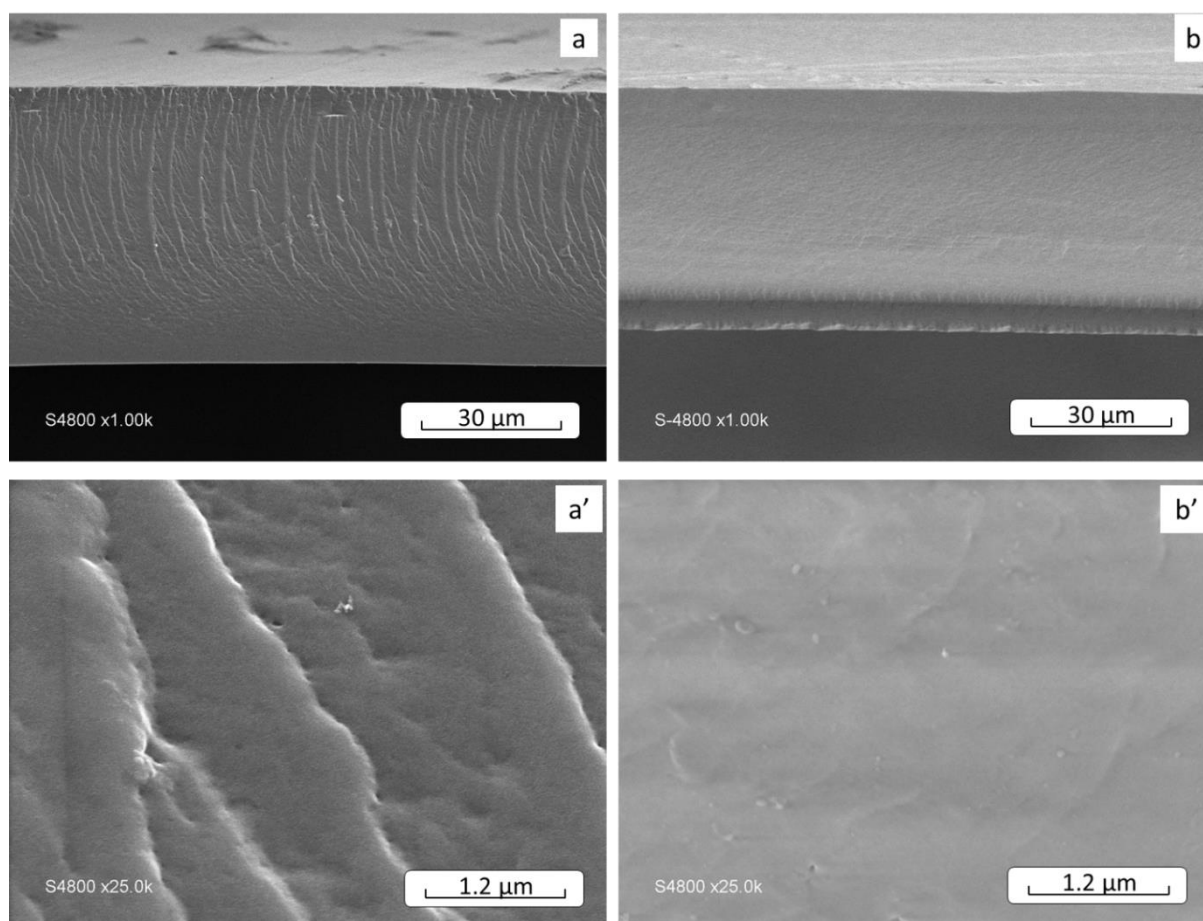


Figure III- 10. Cross-section morphology of gelatin membranes (a, a') and gelatin/PEG200 membranes (b, b')

Several material characterizations were done on G-P200 to insure that the study on the processing of gelatin membrane is transferable to the blend gelatin/PEG200. First the adding of PEG 200 changed neither the macroscopic aspect nor the structure of the membrane obtained. Both formulations gave smooth, homogeneous, transparent membranes with a dense structure (Figure III- 10). Secondly, as shown in Table III- 4, while tensile strain displayed little difference, the Young’s modulus and tensile stress at break of both membrane types were not significantly different ($p > 0.05$) neither were the sol/gel transition temperature and the water content at the equilibrium (Figure III- 9). Moreover the water uptake of the two formulations was similar for $a_w < 0.65$ which is the range of interest (Figure III- 8).

Table III- 4 Influence of PEG200 on mechanical properties of gelatin films determined at 25°C

	Thickness ¹ (μm)	Young’s modulus ² (GPa)	Tensile stress at break ² (MPa)	Tensile strain at break ² (%)
Gelatin (G)	57 ± 6	1.0 ± 0.2^a	5.2 ± 0.5^a	29 ± 6^a
G/PEG200	68 ± 11	1.1 ± 0.2^a	6 ± 1^a	20 ± 4^b

Values are given as average \pm standard deviation determined on ⁽¹⁾ 10 points, ⁽²⁾ 3 samples.

Glass transition and denaturation temperatures of both gelatin and gelatin/PEG200 membrane have been determined with fast scan DSC for equilibrated membranes and for gelatin/PEG200 after vacuum treatment in the permeation cell (Figure III- 9). Glass transition temperature of gelatin and G-PEG200 membranes were found to be $(74 \pm 1)^\circ\text{C}$ and $(71 \pm 2)^\circ\text{C}$ respectively. Below this temperature, the amorphous regions within the semi-crystalline gelatin materials can be considered in a relatively hard and brittle state, whereas above, they move into a rubber-like state. These transition temperatures corroborated the obtained tensile parameters measured at 25°C with relatively low tensile strain at break (respectively 29 and 20% for gelatin and G/PEG200). Moreover, the addition of PEG200 did not impact the Young's modulus indicating that the gelatin polymeric matrix was in a stiff conformation.

2.5.3. Gas permeability

The gelatin membranes plasticized with PEG200 allowed carrying out permeation experiments in order to determine the gas permeability of permanent gases: He, N₂, O₂ and CO₂. The permeability values and ideal selectivities for temperatures ranged from 25°C to 90°C (298-363K) are shown in Table III- 5. The relationship between the permeability and temperature was established and shown in Figure III- 11. It can be noticed that generally the permeability values are rather low (between 0.07 and 1.4 Barrer) in spite of their enhancement with the temperature.

Table III- 5 Influence of temperature on gas transport properties on gelatin/PEG200 film

Temperature (°C/K)	Permeability (Barrer)				Selectivity	
	He	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂ /O ₂	CO ₂ /N ₂
25/298	0.2	0.08	0.03	0.007	11	3.1
40/313	0.6	0.3	0.09	0.03	10	3.0
50/323	0.7	0.4	0.1	0.1	4.1	3.4
60/333	0.6	0.6	0.2	0.1	4.6	2.6
70/343	0.7	0.9	0.3	0.2	5.5	2.7
80/353	1.3	1.4	0.8	0.8	1.8	1.8
90/363	1.3	1.4	1.1	0.9	1.5	1.3

Permeability values are the average of at least 3 measurements.

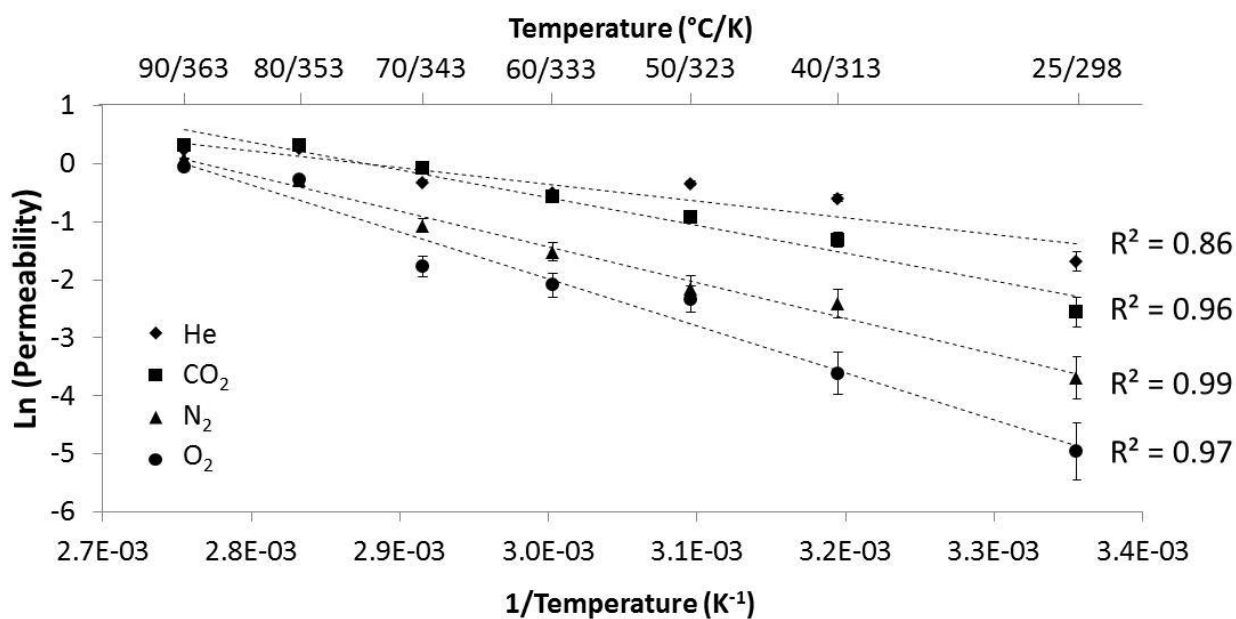


Figure III- 11 Fitting of the gas permeability values to the Arrhenius' law.

The obtained values were tested to calculate their fit to a simple predictive model based on Arrhenius' law (Figure III- 11). A good fitting was achieved for N₂ and CO₂ but not for He, the smallest tested gas. This type of behavior has been well established for synthetic polymers (Klopffer *et al.* 2001). However few studies can be found on the gas transport properties of

biopolymer especially for gases other than O₂. Arvanitoyannis et al. (Arvanitoyannis *et al.* 1998a) showed for starch/gelatin blends that the gas permeability values followed two Arrhenius' laws with a slope rupture at the glass transition temperature. However in our case G/PEG200 transition temperature was measured at $(71 \pm 2)^\circ\text{C}$ (344 K) and no slope rupture was observed at this temperature indicating that the increasing permeability might be only due to the increasing molecular agitation and not to a conformational change in the membrane.

Nevertheless, after vacuum treatment the denaturation temperature increased from 70°C to 136°C (343K to 409K) (Figure III- 9), meaning that at 90°C (363 K) (the highest gas flux temperature tested) the collagen like triple helices were still present and thus the crystallinity. Moreover it can be noticed that G/PEG200 membranes have quite low permeability values inferior to 1.4 Barrer at 90°C (363 K) and then could be used to develop barrier materials. These low permeability values have to be related to the semi-crystalline character of the membranes. It is well known that in a semi-crystalline polymer, like gelatin, both mechanisms involved in the gas transport, sorption and diffusion, take place exclusively in the amorphous regions. (Michaels *et al.* 1959; Michaels *et al.* 1961b, a) The crystalline regions stop the molecular diffusion. In the case of gelatin, the crystallinity corresponds to the protein chains which rearrange into collagen like triple helical conformation. This phenomenon, the renaturation, can be quantified by DSC measurement. (Achet *et al.* 1995) Renaturation level of G/PEG200 was calculated on membranes after vacuum for a residual humidity of 3%. Since to avoid the influence of water, gas permeation experiments were realized under vacuum, the thermal properties of G/PEG200 after vacuum were determined. The remaining water level decreased from 14.6% to 3% which is under the minimum of water necessary to structure the triple helices (Yakimets *et al.* 2005). Based on this observation the renaturation level of the membrane after vacuum should be dramatically diminished since most of the collagen like helices should have lost their crystalline structure. Nevertheless, DSC analysis indicated no significant differences between renaturation levels after $(42 \pm 3\%)$ and before gas permeation analysis $(40 \pm 2\%)$. This, according to Achet et al. (Achet *et al.* 1995), indicated that under these conditions the gelatin strands do not have enough mobility to recover the random-coil state. So the helices collapse on the spot with the memory of their triple helical conformation retained.

In a previous work, our group realized a study on ferulic acid cross-linked gelatin films (Biscarat *et al.* In press) and determined their gas permeability values at 25°C for 3 Bar upstream pressure feed. The permeability values were lower than what we obtained for this study with a 2 Bar pressure feed and the CO₂/O₂ selectivities distributed between 5 and 14.5. Studying the influence of temperature showed that gelatin/PEG200 films presented interesting selectivities for CO₂/O₂ of about 10 that was maintained between 25°C (298K) and 40°C (313K). This combine with the low permeability values make gelatin a promising option for breathable barrier material.

2.6. Conclusions

In this work, the elaboration process of gelatin membranes was studied in details and called "TIG/Dry-cast" method. The novelty of this approach was to propose a methodology to establish a phase diagram giving the different thermodynamic states of the system gelatin/water versus temperature and gelatin mass fraction. Classically, the sol/gel transition was measured by rheological measurements, but more original, the gel/membrane transition was determined by TGA/extensional rheology. Data presented in this paper concern one gelatin type but the methodology can be applied to others gelatin or biopolymers, characterized by a gel state. The phase diagram built is a convenient tool to describe the structuring mechanisms during membrane elaboration and allow drawing the composition path of the elaborating system, as it has been already proposed for synthetic polymers like PVA. (M'barki *et al.* 2014)

The phase diagram was designed in relation with the elaborating conditions used in this study. Indeed, it has been chosen to produce non-brittle cold-cast films, by casting the gelatin solutions inside a temperature range between the sol/gel transition (ca. 28°C) and the denaturation temperature (ca. 97°C) at 30°C. The drying was conducted under natural convection at 20°C and 45±5% RH. The prepared films presented relatively low permeability values (between 0.007 and 1.4 Barrer) in spite of the gas transfer enhancement with the temperature. Indeed, gelatin membranes can be rather considered for gas barrier applications. Furthermore, as far as gelatin films are relatively hydrophilic their application for barrier purposes will need the addition of other type of plasticizers able to enhance the hydrophobicity. The present procedure can be used to coat gelatin very thin films onto porous supports in order to couple the good CO₂/O₂ selectivity of gelatin/PEG200 with higher permeation fluxes. However, in order to increase the gelatin membranes permeability, different composition paths could also be investigated by using different drying procedures in relation with the resulting membrane crystallinity. At last, gelatin membranes were found to be stable between 25 and 90°C without microbial attacks or brittleness, meaning that this biopolymer could be a promising alternative to synthetic polymers

3. Conclusions du chapitre III

Nous avons établi le diagramme de phase du système gélatine/eau utilisé dans cette thèse et mis en place une méthodologie transposable à d'autres types de gélatine. L'étude s'est focalisée sur le contrôle du séchage et de la transition gel/membrane. Pour compléter ce diagramme de phase, il serait nécessaire d'examiner d'autres conditions de séchage afin d'emprunter d'autres chemins d'élaboration.

Les membranes obtenues ont pu après plastification avec le PEG200 être testées en perméation gazeuse. Le mélange gélatine/PEG200 a montré des sélectivités intéressantes CO_2/O_2 d'environ 10 entre 25 et 40°C. De plus l'étude en température a montré l'adéquation avec le modèle d'Arrhenius, ce qui pour un biopolymère n'est pas trivial.

Le problème majeur que posent ces membranes est leur stabilité vis-à-vis de l'eau, qu'elle soit liquide ou sous forme d'humidité dans le milieu gazeux. En effet la gélatine est soluble dans l'eau ce qui permet d'utiliser un procédé sans solvant mais ce qui implique la nécessité d'une étape de réticulation. Le chapitre IV est donc consacré à l'étude de la réticulation chimique de la gélatine avec le choix, l'étude et le contrôle de celle-ci. De plus ce projet s'inscrivant dans le cadre de la chimie verte, le choix des réticulants s'est orienté vers des composés peu ou pas toxiques et si possible biosourcés.

Réticulation chimique de la gélatine

1. Introduction

Le caractère hydrosoluble de la gélatine permet la préparation de membranes par un procédé sans solvant. Cependant il compromet la résistance à l'eau et la stabilité dans le temps des matériaux produits à base de cette protéine. Le glutaraldéhyde est le réticulant le plus classiquement utilisé mais sa cytotoxicité le disqualifie pour la production de membranes "vertes". Même si Martucci (Martucci *et al.* 2012) et Bigi (Bigi *et al.* 2001) ont montré qu'avec de faibles quantités de glutaraldéhyde le film produit ne présentait pas de toxicité, à l'échelle d'une production industrielle, la volatilité de ce réticulant expose les opérateurs de production à de grandes quantités cumulées. Il est donc important d'étudier des réticulants alternatifs moins toxiques et si possible biosourcés pour répondre aux principes de la Chimie Verte.

Cette étude sur la réticulation de films à base de gélatine a donc démarré par la recherche de réticulants alternatifs, leur mise en œuvre et la comparaison des propriétés des films obtenus avec celles des films réticulés par le glutaraldéhyde qui a été considéré comme réticulant témoin.

Ce chapitre est divisé en trois parties :

(1) La première constitue un screening des différents réticulants identifiés comme potentiellement intéressants pour la gélatine. Trois réticulants ont été testés : l'acide férulique, le N-hydroxysuccinimide et un N-hydroxysuccinimide ester le Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)₉). Le BS(PEG)₉ a été sélectionné pour son caractère non toxique et pour sa chaîne de neuf polyéthylène glycol. Sa structure particulière est compatible avec la gélatine et pourrait également augmenter les volumes libres dans la matrice de gélatine et donc favoriser la perméabilité des gaz. Le N-hydroxysuccinimide est la partie réactive du BS(PEG)₉, il a été testé comme témoin pour le BS(PEG)₉. La réactivité de l'acide férulique avec la gélatine a déjà été démontrée. Toutefois, son étude dans le cadre d'une application en séparation gazeuse n'avait jamais été réalisée. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le *Canadian Journal of Chemical Engineering*.

(2) La deuxième partie de ce chapitre s'intéresse plus spécifiquement à la compréhension de l'effet de la réticulation par l'acide férulique sur la structuration des films de gélatine réticulée et ses propriétés de perméation gazeuse. Ces travaux ont été soumis à *Journal of Polymer Science Part B*.

(3) La troisième partie propose un procédé de réticulation basé sur un nouvel agent original pour la gélatine, le téréphthalaldéhyde, qui en plus de ses capacités en tant que réticulant introduit dans la matrice polymérique un agent hydrophobe. Ces travaux font l'objet d'une publication soumise à *International Journal of Biological Macromolecules*.

2. Publication 2:

Development of a new family of food packaging bioplastics from cross-linked gelatin based films

Jennifer Biscarat, Christophe Charmette, José Sanchez, Céline Pochat-Bohatier

Canadian Journal of Chemical Engineering. DOI: 10.1002/cjce.22077

2.1. *Abstract*

The purpose of this work was to develop green bioplastic preparation process from gelatin by using solvent-free approach with efficient use of resources. Film plasticizing was achieved by adding polyethylene glycol ($M_w = 200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Different cross linking agents – glutaraldehyde (GTA), N-hydroxysuccinimide (NHS), Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)9) and ferulic acid (FA) were tested to obtain water resistant films suitable for gas permeability characterization. Functional properties (mechanical and gas transfer properties) of gelatin-based films were determined. Gelatin films cross-linked with FA presented very good gas barrier properties (48 and $175 \text{ cm}^3\cdot\mu\text{m}/\text{m}^2\cdot\text{day}\cdot\text{kPa}$ respectively for O_2 and CO_2), compared to synthetic polymers, equivalent to polar polymer like nylon 6 or polyethylene terephthalate and better than non polar polymers like high density or low density polyethylene. Swelling ratio measurements in water displayed gelatin/FA films resisted to water without breaking during 4 h compared to 1.5 h for pure gelatin films. Films could support saturated water vapor environment at 20°C during 15 days without breaking. Gelatin/PEG200 films presented very good permselectivity towards CO_2 and O_2 (14.5). This value was reduced to 8 when cross-linked with FA, and to 4 after PEG200 addition, presenting still interesting level. All these results confirmed that gelatin is a promising biobased polymer to prepare food packaging films.

Keywords: Biobased polymer, Gelatin, Cross-linkers, Gas transfer properties, Mechanical properties

2.2. *Introduction*

With the petroleum resource shortage, there is an increasing need in finding new generations of biosourced polymers. Biobased polymers represent a sustainable alternative for packaging materials. There are usually classified in three categories: (i) natural polymers, directly extracted from the biomass such as starch, cellulose and proteins; (ii) polymer chemically synthesized from bio-derived monomers, such as polylactate and (iii) polymer naturally produced by

microorganisms, such as polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate (Imre *et al.* 2013). Polymers from natural raw materials can act as substitute of petroleum-based polymer for packaging materials, but their large use would require intensified farming of energy crops in competition with food production. Actually, gelatin is an attractive choice since it represents a good equilibrium between human food consumption and valorization of industrial by-products. It is obtained by controlled hydrolysis of collagen, a fibrous insoluble protein, which is widely found in nature as the major constituent of skin, bones and connective tissue. (Gómez-Guillén *et al.* 2011) This biopolymer has been extensively used in the food and pharmaceutical industry for its gelling and texturing properties. (Djagny *et al.* 2001) However since the Bovine Spongiform Encephalopathy crisis and taking into consideration the religious usages, gelatin in Food Industry tends to be replaced by alginate or agar-agar. (Karim *et al.* 2008) In that social context, the use of gelatin in non-food applications becomes relevant.

On the contrary to polysaccharides, which are monotonous polymers, proteins have specific structure which confers large potential functional properties; one of which is the crosslinking capacity. The water solubility of gelatin permits a solvent-free approach but consequently induces water sensibility for materials application. For food packaging application, gelatin cross-linking becomes essential to maintain film stability under humid conditions. Indeed, fresh food products are characterized by high moisture content, water mass transfer occurs spontaneously from the product to the atmosphere enclosed in the packaging, increasing by this way the relative humidity. Glutaraldehyde (GTA) is a widely used cross-linker for proteins and especially for gelatin, (Bullón *et al.* 2000; Bigi *et al.* 2001; Bigi *et al.* 2004; Martucci *et al.* 2012) however this compound presents a drawback: its cell and systemic toxicity. (Bonnard *et al.* 2010) In order to comply with the growing trend to replace synthetic and toxic agents with more natural and innocuous ones, this work studied the alternative use of different cross-linkers: N-hydroxysuccinimide (NHS), Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)₉) and ferulic acid (FA). Gelatin film plasticizing was achieved by using polyethylene glycol 200. (Cao *et al.* 2009) This study aims at developing green bioplastic preparation process from gelatin by using solvent-free approach and at measuring film potential use in food packaging application by measuring mechanical and gas transport properties.

2.3. *Experimental*

2.3.1. Materials

Gelatin (G) (Type A, Bloom 188) was purchased from Sigma. Polyethylene glycol (PEG 200) was purchased from Merck. Acetic acid 100% was obtained from VWR. Glutaraldehyde (GTA), N-hydroxysuccinimide (NHS) and ferulic acid (FA) were supplied by Aldrich. Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol) (BS(PEG)₉) was purchased from Fisher scientific. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was provided by Panreac.

2.3.2. Film preparation

Film-forming solutions were prepared by dissolving 20wt-% gelatin powder in demineralized water at 60°C, with mechanical stirring for about 120 min until it was completely dissolved. Acetic acid 2wt-% was added to reduce the pH to 4 and to avoid micro-organism growth on the obtained films. PEG 200 was added to gelatin solutions at 6wt-%. Films were prepared by dry-casting of the gelatin solution at 30°C on flat Teflon coated sheets thanks to a K Control Coater 101 (Erichsen Instruments). The solution was cast at 500 µm with an Erichsen Mod.411 0956 casting knife. Gelatin films were allowed to dry at 20°C under (45 ± 5)% Relative Humidity (RH) during 1 day. Films prepared present a composition of 0.3 g PEG/g gelatin, this ratio was suggested by Cao et al.(Cao *et al.* 2009) for obtaining very soft films.

Four cross-linking agents were tested. FA (40mg/g of gelatin) was added directly to the PEG/gelatin system in solution at 50°C and stirred for 2 hours before casting. NHS and BS(PEG)₉ were first dissolved in DMSO and then added to the PEG/gelatin solution at 30°C, such as residual DMSO content in gelatin solution is less than 0.1%. NHS or BS(PEG)₉ addition in the gelatin solution was carried out to reach the cross linker/gelatin ratio of 1µg/g and 7µg/g respectively, which both correspond to a concentration of 0.01 µmol/g gelatin. This method could not be used for GTA cross-linking because GTA reacts very fast and inhibits controlling the casting step. So GTA cross-linking was carried out directly on the composite films by plunging the film in an aqueous solution 0.25 v/v% GTA saturated with Na₂SO₄ as described by Catalina et al.(Catalina *et al.* 2011) All the membranes were stored at 20°C in a desiccant box (ca. 25 ± 5 %RH) before subsequent analysis.

2.3.3. Morphological observation

Samples were metalized by sputter coater SC7620 after been cryo-fractured. Membrane cross-sections were observed by scanning electron microscopy (Hitachi S-4800).

2.3.4. Mechanical properties

The mechanical properties of the membranes were evaluated by extensional rheology. These tests were performed using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) using the Universal Extensional Fixture UXF12. The temperature was controlled at 25°C thanks to CTD180 Peltier system. The samples tested were 4x1cm² rectangles cut in different parts of the films (at least 3 per formulation). The protocol of these measurements followed 3 steps:

Table IV- 1 Extensional rheology protocol

Duration of each step	Variable	Profile setting	Variation range
0.05s	Torque (mN m)	Linear ramp	0-1
0.3s	Deflection angle (°)	Linear ramp	0-10
No time limit ; stopped after 34 points	Elongation (%)	Logarithmic ramp	0.001-300 Frequency fixed: 1Hz

The thickness depends on the nature of the film and is indicated for each sample in Table IV- 4.

2.3.5. Swelling kinetics

The films were cut in 2x2 cm² pieces and desiccated à 50°C at least 48 h. They were weighted and left at ambient temperature in 30 ml of deionized water. The swelling kinetics were evaluated, until the sample lost its mechanical integrity, by periodically measuring the weight of the films by means of a micro-balance (Sartorius CPA225D, with an accuracy of 0.00001 g), after gently blotting the surface with a tissue.

The swelling ratio was evaluated as:

$$SR = \frac{\text{weight film} - \text{weight dry film}}{\text{weight dry film}}$$

All data shown are the average value of four replicates.

2.3.6. Gas permeation experiments

Permeation experiments were carried out by using the constant-volume and variable-pressure technique in a permeability apparatus at 25°C, described in the standard ASTM D 1434-82 (procedure V). The apparatus consists essentially of a two compartments permeation cell separated by the tested membrane. The permeability was obtained measuring the pressure increase in the downstream compartment (with a constant volume of 5.25 × 10⁻⁵ m³) and using different MKS Baratron pressure transducers (range from 0.0 to 1 × 10⁵ Pa). The films and

downstream cell walls were outgassed in situ during 15 h at high vacuum using a turbomolecular pump (Leybold, Turbovac 50, 50 l.s⁻¹). The permeability experiments were performed using 3.0×10^5 Pa of upstream pressure and recording the pressure increase in the downstream compartment during 4 h. The values presented are the mean of 3 repetitions.

2.3.1. Statistical analysis



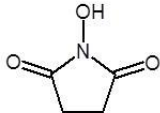
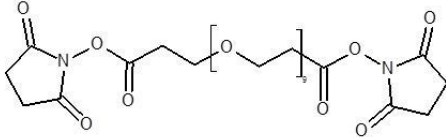
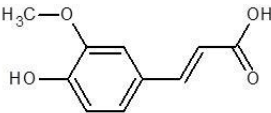
Statistical tests were performed using the computer program R. Differences between pairs of means were compared using a Kruskal-Wallis test to avoid false positive response given by one-way analysis of variance in case of non-normal distribution. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

2.4. Results and discussions

2.4.1. Cross-linkers selection

Table IV- 2 presents the hazards identification and origin of compounds considered in this study to cross-linked gelatin. As previously mentioned, GTA has both acute and systemic toxicity. However, because of its good reactivity with proteins and its moderate price, GTA is still widely used in the industry. Genipin is bio-sourced and quite popular in the academic community(Nickerson *et al.* 2006; Chiono *et al.* 2008) but its toxicity(Wang *et al.* 2011) disqualifies it for our study aiming at selecting innocuous cross-linkers. Indeed material development for food packaging applications must consider chemicals in food contact that might migrate into the food or liquid inside a package. NHS is a well-known protein cross-linker.(Mädler *et al.* 2010) Even if it is petroleum-based, NHS classification as a non-dangerous substance in North America and Europe makes it a good candidate. Using a minimum of compounds in the formulation could also help to develop a lean manufacturing process. With that aim, an alternative cross-linker was chosen: BS(PEG)₉ is a combination of NHS and PEG, and it is expected to associate both cross-linking and plasticizing effects. Moreover BS(PEG)₉ is innocuous. Lastly, as to comply with our search for more natural compounds, FA was also settled on as a bio-sourced cross-linker. Its low toxicity and reasonable price make it a good option.

Table IV- 2 Hazards identification and origin of cross-linkers

Cross-linker		Hazards identification*	Origin
<i>Well-known cross-linker</i>			
Glutaraldehyde (GTA)		<ul style="list-style-type: none"> • Long term health hazards (carcinogenicity and respiratory sensitisation) • Corrosive • Toxic • Dangerous to the environment 	Petroleum-based
Genipin		Toxic	Bio-sourced
N-hydroxysuccinimide (NHS)		This substance is not classified as dangerous	Petroleum-based
<i>Alternative cross-linker</i>			
Bis(succinimidyl) nona(ethylene glycol) (BS(PEG) ₉)		This substance is not classified as dangerous	Petroleum-based
Ferulic acid (FA)		Caution (less serious health hazards like skin irritation)	Bio-sourced

*Hazardous Substances Data Bank (US National Library of Medicine)

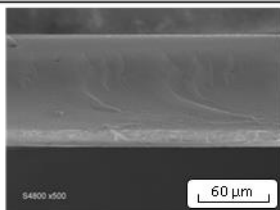
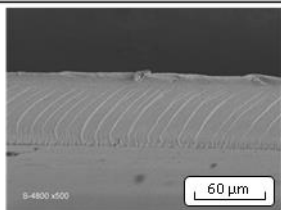
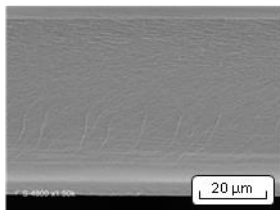
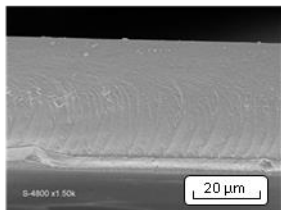
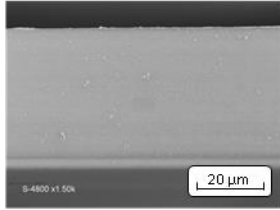
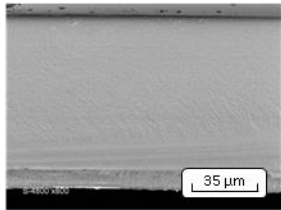
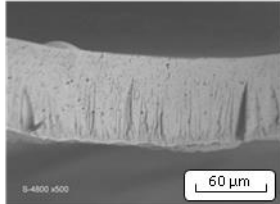
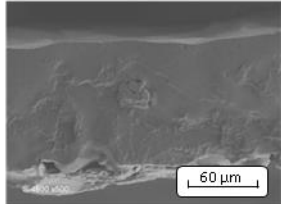
2.4.2. Film morphology

Gelatin uncross-linked films (with or without PEG) are smooth, transparent and flexible. The cross-linking method had a drastic effect on the film aspect. GTA gave really stiff and brittle materials, and conferred a yellowish color. Moreover, after the GTA post-treatment, an important shrinkage led to crinkled films. During film preparation, the immersion of gelatin films in GTA solution may not lead to homogeneous cross-linking. Indeed, GTA may probably react first with the amino groups at the surface of the film, making then difficult its diffusion in the matrix. The cross-link reaction must therefore be more efficient on the external surfaces of the film and explain the shrinkage observed at macroscopic scale after drying. NHS cross-linked films were heterogeneous and fell apart and so could not be further investigated. Using BS(PEG)₉ to cross-link unplasticized gelatin gave heterogeneous in color (some parts white, others transparent) and in texture (granulated texture) but flexible material. Besides during their storage in a desiccant box, numerous water droplets appeared on their surface. Adding PEG improved the mixing

between gelatin and BS(PEG)₉. Both plasticized and unplasticized FA cross-linked films were easy to handle, very transparent and more flexible than the uncross-linked gelatin films.

Except NHS cross-linked films, all the cross-sections microstructure were investigated by SEM and the micrographs are shown in the Table IV- 3.

Table IV- 3 Influence of cross-linker and plasticizer on the cross-section film morphology. G: gelatin, G/PEG200: gelatin/PEG200 blend

Cross-linker	G	G/PEG200
No cross-linker		
GTA		
FA		
BS(PEG) ₉		

The morphology of the gelatin-based film section cross-linked with GTA or FA with or without PEG 200 corresponds to a dense and homogeneous structure as already observed with film only prepared with gelatin. Self-standing films are obtained without pinholes. The absence of pinholes or defect was confirmed by measuring the gas permeability. On the contrary, the cross-section of gelatin films cross-linked with BS(PEG)₉ obtained without PEG200 presents a porous microstructure, but with PEG200 the film morphology is dense. It seems thus that phase separation phenomenon occurred during drying such as gelatin and BS(PEG)₉ were no longer miscible. This led to the presence of pores in the film cross-section, as observed by MEB, and gave rise to the water migration at the surface during the film storage, as evidenced by the presence of water droplets. The good affinity between PEG200 and BS(PEG)₉ in the one hand,

and PEG200 water solubility in the other hand, favor the gelatin/BS(PEG)₉ miscibility and thus cross-linking reaction.

2.4.3. Film Mechanical properties

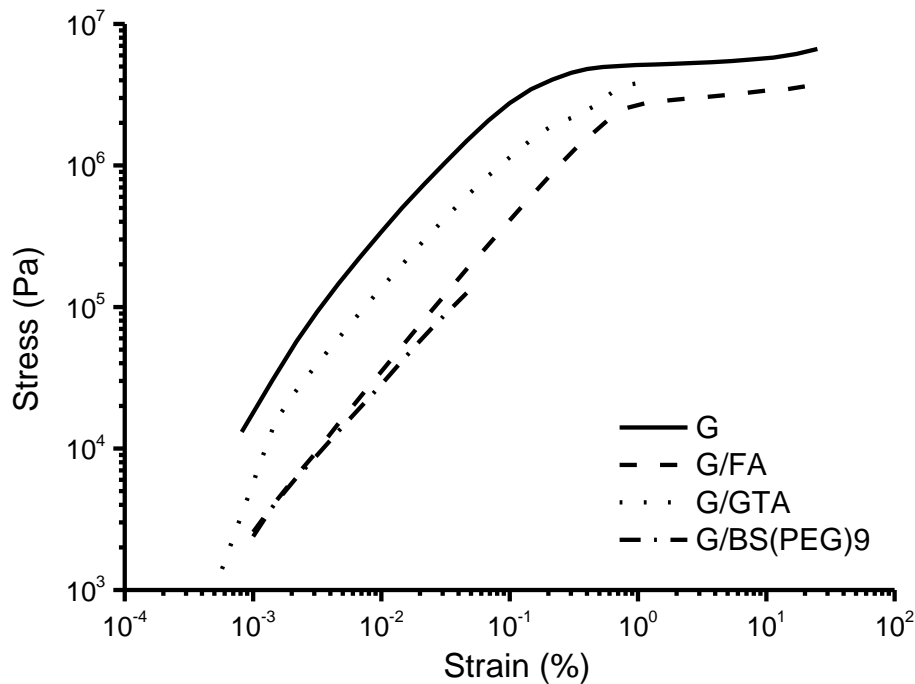


Figure IV- 1 Cross-linker influence on gelatin stress-strain curves

Figure IV- 1 presents the stress-strain curves of cross-linked gelatin films without PEG addition compared to gelatin film (G). G/BS(PEG)₉ broke without plastic deformation, and G/GTA films were more rigid, whereas G and G/FA films gave close behavior. Table IV- 4 shows the effects of cross-linking and PEG200 addition on thickness, Young's modulus, tensile stress at break (TS) and elongation at break (EB). All the formulated solutions were cast at the same thickness (500µm) but after drying, solutions with PEG gave thicker films because of the corresponding increase in the initial dry matter (+6wt-%). G/BS(PEG)₉ films thickness were more important because of the presence of macrovoids induced by phase separation. Adding PEG200 improved the miscibility between gelatin and BS(PEG)₉, but the obtained network seemed to be more loose compared to single gelatin film.

A plasticizing effect of PEG incorporated in the gelatin matrix was expected and could be attributed to the reduction of the gelatin-gelatin interactions by the introduction of PEG polar groups (-OH) present at both extremity of the molecular chains. Hydroxyl groups are expected to

develop gelatin-PEG hydrogen bonds.(Cao *et al.* 2009) However, considering the experimental error, the present rheological testing did not show a really impact of PEG addition on mechanical properties.

It has already been mentioned that GTA cross-linked films were stiffer than FA and BS(PEG)₉ cross-linked ones. This is confirmed by the higher values obtained for Young Modulus and the reduction of the TS and the EB. This is the consequence of the film cross-linking. FA addition decreased slightly TS value, whereas Cao *et al.*(Cao *et al.* 2007) and Mathew *et al.*(Mathew *et al.* 2008) respectively on gelatin and starch/chitosan films observed that adding FA on their systems increased TS while decreasing EB.

Gelatin/BS(PEG)₉ films had really poor mechanical properties since only 1/20 films could be tested. This means that the cross-linking reaction was not correctly achieved. Water vapor evaporation during drying probably induced phase separation between gelatin and BS(PEG)₉ before the cross-linking reaction was enough to insure mechanical properties to the film, and thus limited drastically the cross-linking reaction. Adding PEG200 allowed improving the resistance of the films thanks to a better mixing of BS(PEG)₉ with gelatin but their poor mechanical properties are not compatible with an application as single polymer packaging material.

Table IV- 4 Influence of formulation on mechanical properties of gelatin films

	Thickness* (μm)	Young's modulus** (GPa)	Tensile stress at break** (MPa)	Elongation at break** (%)
Gelatin (G)	57 \pm 6 ^a	1.0 \pm 0.2 ^a	5.2 \pm 0.5 ^a	30 \pm 6 ^a
G/PEG200	68 \pm 11 ^a	1.1 \pm 0.2 ^a	6 \pm 1 ^a	20 \pm 4 ^b
G/GTA	67 \pm 12 ^a	4.5 \pm 0.3 ^b	3.9 \pm 0.4 ^a	11 \pm 2 ^c
G/PEG200/GTA	68 \pm 11 ^a	4.2 \pm 0.6 ^b	5.1 \pm 0.5 ^a	17 \pm 1 ^b
G/FA	60 \pm 10 ^a	1.1 \pm 0.8 ^a	4.0 \pm 0.4 ^a	25 \pm 1 ^a
G/PEG200/FA	100 \pm 7 ^b	1 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.2 ^a	29 \pm 6 ^a
⁺ G/BS(PEG) ₉	241 \pm 33 ^c	0.3 ^c	0.1 ^b	0.05 ^d
G/PEG200/BS(PEG) ₉	188 \pm 33 ^d	0.4 \pm 0.2 ^c	1.1 \pm 0.5 ^c	2 \pm 2 ^e

Values are given as average \pm standard deviation determined on ^(*) 10 points, ^(**) 3 samples. ($p \leq 0.05$)

⁺ Only one sample on the 20 tested did not break immediately

2.4.1. Water resistance

On the basis of morphology and mechanical properties, FA was selected as bio-based cross-linker for gelatin to characterize film gas permeability. Previously, in order to get the extent of gelatin cross-linking, swelling ratio of gelatin and gelatin/FA cross-linked films were determined in water (Figure IV- 2). Single gelatin film broke apart after 1.5 h whereas G/FA resisted during 4 h. The swelling process occurs as a result of the breaking of the hydrogen bondings between gelatin macromolecules. The extent of the swelling ratio is limited by the cross-links of the network. Maximun swelling ratio is 1550 % for gelatin film and 1200 % after cross-linking with FA. It can thus be deduced that the cross-linking degree with FA is low but enough to allow G/FA films to resist to water 4 h. Besides experiments in thermostated closed vessel with saturated potassium sulfate solutions showed that G/FA films supported humid conditions (98% RH at 20°C) during 15 days without breaking. The corresponding water vapor absorption ratio was 55 %.

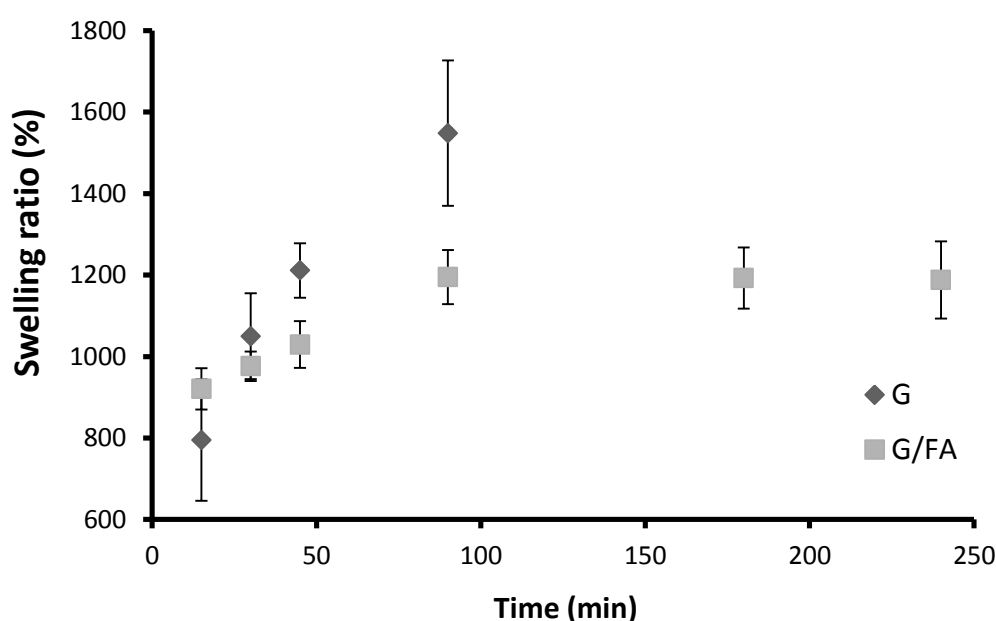


Figure IV- 2 Influence of the FA cross-linking on the swelling ratios. Data are represented until the samples broke apart.

2.4.2. Films gas transfer properties

The influence of FA cross-linking and PEG200 addition on gas transfer properties are presented in Table IV- 5. The tests performed on gelatin films, and on films cross-linked with GTA or BS(PEG)₉ were not successful because films broke during experiments. Actually, in order to resist to the drastic and instantaneous pressure variation occurring during gas permeation tests, materials

have to present not only good mechanical properties but also some plasticity. However, the vacuum outgassing phase removed all the residual water which is a well-know plasticizer. PEG 200 addition to gelatin without cross-linker (G/PEG200) permitted to maintain the film mechanical integrity during gas permeation tests and to get values thanks to the weak interactions developed with gelatin. This indirectly confirms the plasticizing effect depicted in the literature and not observed through mechanical testing. The permeability results reached with G/PEG200 film for O₂ presented a very low permeability (2 cm³.µm/m².day.kPa), whereas CO₂ reached 29 cm³.µm/m².day.kPa (Table IV- 5). The obtained permeability values are close to those reported for gelatin/chitosan/water composite films (48 cm³.µm/m².day.kPa for CO₂) by Arvanitoyannis et al.(Arvanitoyannis *et al.* 1998b) The higher permeability of CO₂ through gelatin compared to O₂ can be explained by the sorption of CO₂ as a result of the interactions between this gas and the free amine groups of the gelatin.(Pochat-Bohatier *et al.* 2006) Using PEG as plasticizer could also enhance the CO₂ transport. Indeed CO₂ presents a quadrupole moment which favors strong interactions with polyether bonds present in PEG or polyethylene oxide (PEO).(Lin *et al.* 2005) Generally block-polymer or co-polymers PEO based films present interesting performances in terms of CO₂ permselectivity and the results from the literature have shown that CO₂ permselectivity strongly depends on the PEO content.(Charmette *et al.* 2004; Charmette *et al.* 2009) Furthermore, the G/PEG200 film presents a high CO₂/O₂ selectivity of 14.5. This result is due to the very low O₂ permeability.

Regarding O₂ permeability, the values obtained in this study are also quite similar to those obtained by Chiou et al.(Chiou *et al.* 2008) for 5wt-% gelatin films or to the 4 to 8 wt-% gelatin/glycerol films of Nur Hanani et al.(Nur Hanani *et al.* 2012b) These authors measured respectively an O₂ permeability of 4.8 and 0.6 compared to 2 cm³.µm/m².day.kPa determined in our study (Table IV- 5). Compared to the uncross-linked gelatin/PEG200 films, values of FA cross-linked films gas permeability are higher. Moreover G/FA and G/PEG200/FA present good CO₂/O₂ selectivity of respectively 8 and 4.

Table IV- 5 Influence of formulation on gelatin films gas permeabilities (lower case letters indicate the statistical significance for columns and upper case letters for lines)

Permeability (cm ³ .µm/m ² .day.kPa)	Gelatin (G)	G/PEG200	G/AF	G/PEG200/FA
CO ₂	break	29 ± 3 ^{aA}	292 ± 29 ^{aB}	175 ± 18 ^{aC}
O ₂	break	2 ± 0.2 ^{bA}	36 ± 4 ^{bB}	48 ± 5 ^{bB}
Permselectivity CO ₂ /O ₂	-	14.5	8	4

The comparison of the CO₂ and O₂ permeabilities with hydrocarbon-based films and other bio-based films (Figure IV- 3) enhances the great barrier properties of the gelatin-based films in the

dry state. Indeed G/PEG200 films barrier properties are quite competitive compared to those of commercial synthetic and bio-sourced polymers like LDPE (Low Density Polyethylene), HDPE (High Density Polyethylene), PET (polyethylene terephthalate), Nylon 6 and PLA (Polylactic Acid). Uncross-linked gelatin films display lower permeability values than nonpolar and polar polymers. Moreover gelatin based films present really interesting selectivity, from 4 to 14.5 depending on the formulation, which is higher or equal to the other usual polymers even after cross-linking. Selectivity lowering induced by FA might be due to the conjugated effect of limited NH_2 function's cross-linking which reduced the interaction with CO_2 (Tin *et al.* 2003) and to the addition of an aromatic ring which split the polymeric chains and facilitated the gas diffusion. But, selectivity levels still present interest for breathable films to package fresh products. They have to be related first to the low cross-linking degree of gelatin with FA as evidenced by swelling measurements in water and secondly to the complex gelatin structure and composition which offers large potential for CO_2 interactions with amino acids.(Pochat-Bohatier *et al.* 2006)

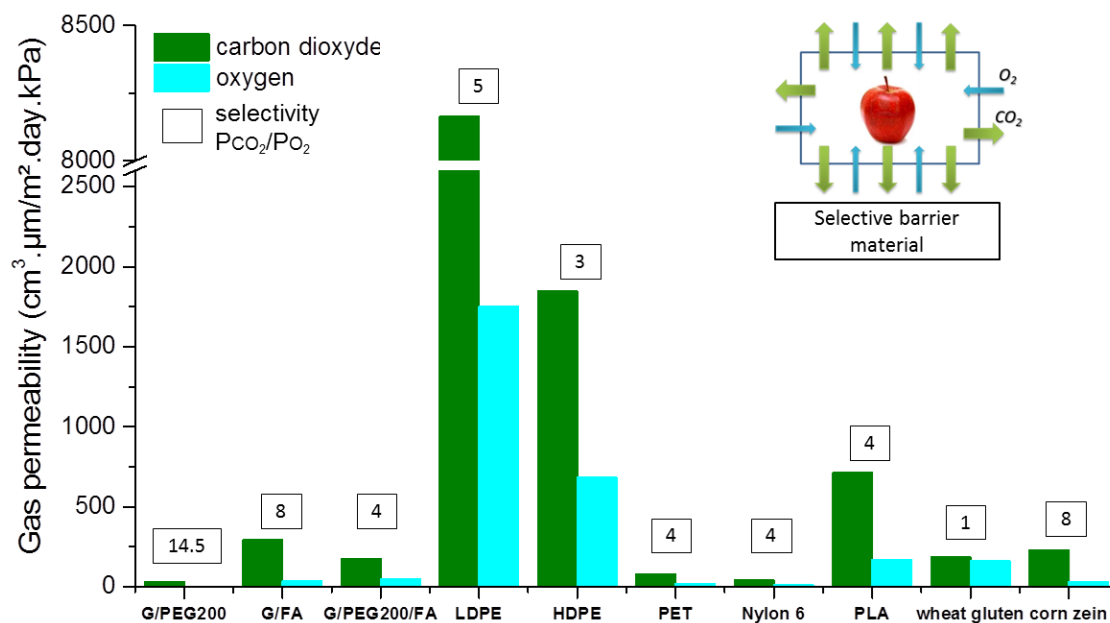


Figure IV- 3 Carbon dioxide and oxygen permeabilities ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{kPa}$) and CO_2/O_2 permselectivity of gelatin-based films compared with various films (data for 0% RH).(Park *et al.* 1995; Mujica-Paz *et al.* 1997; Bao *et al.* 2006; Yam 2009)

2.5. Conclusion

Gelatin-based films were prepared and the potential use of four different cross-linkers was investigated: NHS, BS(PEG)₉, GTA and FA. Among them, FA permitted to prepare flexible films without using toxic agent and following a solvent-free elaboration process. Very high gas barrier properties were reached with G/PEG200 film which presents CO_2 permeability (29

$\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{kPa}$) and high CO_2/O_2 selectivity of 14.5. FA cross-linked films led to less rigid and brittle materials than GTA. Even if FA increased O_2 and CO_2 permeabilities values, films prepared with the blend gelatin/PEG200 still present very good barrier properties (48 and 175 $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{kPa}$ respectively) and interesting gas permselectivity (4) ideal for food packaging application. Films prepared with BS(PEG)₉ displayed insufficient mechanical properties to stand alone because of phase separation occurring after drying.. These results confirm that gelatin is a promising bio-based materials and more specifically as food packaging films. Gelatin use complies with the aim to offer new lean and green bioplastic preparation processes by using solvent-free approach with efficient use of resources.

3. Introduction de la publication 3

A l'issue de ce premier screening, l'acide férulique s'est révélé le plus prometteur des réticulants testés car c'est le seul qui a abouti à des membranes qui ont permis de réaliser des mesures en perméation gazeuse. C'est pourquoi une publication a été consacrée à l'étude des liens entre les propriétés de perméation gazeuse et la structuration de la gélatine en présence d'acide férulique. Deux paramètres ont été particulièrement suivis, le taux de réticulation et le degré de renaturation de la gélatine.

Le taux de réticulation a été déterminé à partir d'un dosage des amines primaires libres avec l'acide trinitrobenzène sulfoxide (TNBS) selon une méthode adaptée des travaux de Bigi et al. (Bigi *et al.* 2001).

Le degré de renaturation a été déterminé par Differential Scanning Calorimetry (DSC). En effet la dénaturation des triples hélices de la gélatine se traduit en DSC par une endotherme entre 74°C et 125°C avant celles qui retranscrivent la dégradation de la protéine. La dégradation peut engendrer suivant la formulation de multiples pics présentant des épaulements. Le premier pic apparaît entre 140°C et 172°C. Au vu de la complexité d'analyse de la dégradation avec la DSC, on privilégiera l'ATG (analyse thermogravimétrique) pour identifier ce phénomène. L'enthalpie de cette endotherme de dénaturation est comparée avec celle du collagène natif qui est lui constitué de 100% de triples hélices pour obtenir le degré de renaturation. Pour voir cette endotherme de dénaturation il faut avoir une bonne séparation des pics. En effet les mesures effectuées en DSC avec une rampe de température de 10 ou 20°C/min n'avaient pas permis ni l'observation de la transition vitreuse, ni la séparation des différents événements thermiques. Les mesures en DSC modulée n'ont pas été non plus concluantes. Ce sont finalement des essais à hautes vitesses (100°C/min) qui ont permis d'étudier la structuration de la gélatine. La gélatine utilisée pendant cette étude n'a pas été préparée au laboratoire à partir du collagène natif mais achetée chez Sigma-Aldrich. Cela implique que nous n'avons pas accès directement à l'enthalpie de dénaturation du collagène. La valeur utilisée au cours de cette étude est issue de la littérature et a été sélectionnée car elle correspond au collagène de type I, qui est le plus commun et est celui constituant la peau des mammifères dont est issue notre gélatine.

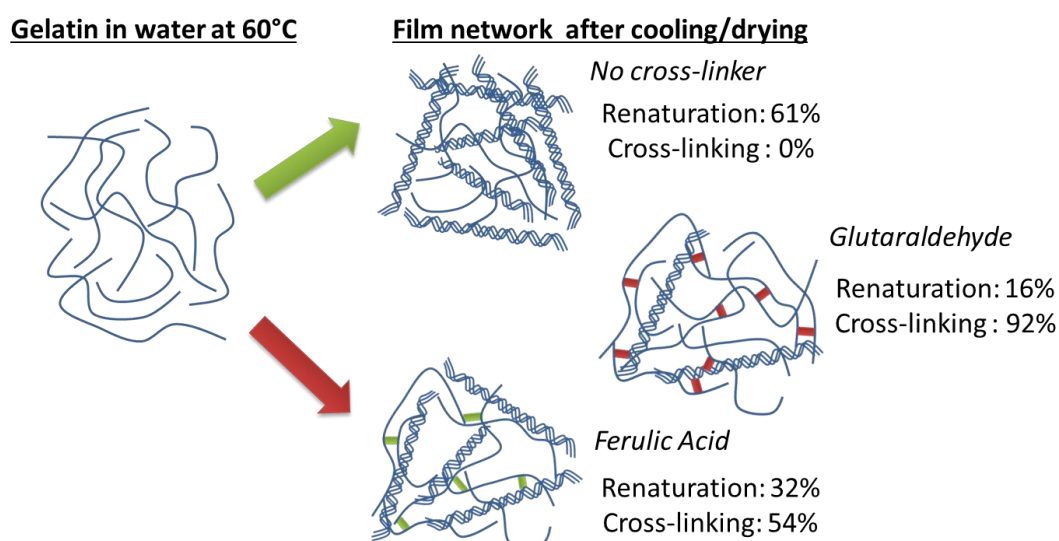
4. **Publication 3:**

Cross-linking of gelatin membranes with ferulic acid or glutaraldehyde: relationship between gas permeability and renaturation level of gelatin triple helices

Jennifer Biscarat, Christophe Charmette, Nathalie Masquelez, José Sanchez, Celine Pochat-Bohatier*

Soumise à Journal of Polymer Science Part B

4.1. TOC



KEYWORDS : Gelatin, Membrane, Gas permeability, Mechanical properties, Structure

4.2. Abstract

This paper presents the elaboration of gas separation membranes made with gelatin, cross-linked with ferulic acid (FA) and blended with PEG 200, by using a solvent-free procedure. Gas permeation properties (He, N₂, O₂ and CO₂) of these "green membranes" are investigated and discussed in relation with their structure. DSC measurements are carried out to determine the gelatin triple helical renaturation level. The lowest permeability values (He and CO₂ permeability (4.5 10⁻² Barrer) with CO₂/O₂ selectivity of 14.5) are reached with gelatin/PEG 200 uncross-linked membranes showing the highest renaturation level (40%). Cross-linking with FA leads to less rigid and brittle materials than GTA and to ten times more permeable membranes compared to uncross-linked membranes. Membranes cross-linked with glutaraldehyde break during gas

permeation measurements. Results tend to demonstrate that higher gas permeability values are closely related to lower renaturation level of gelatin.

4.3. Introduction

With the future petroleum resource shortage, there is now a rising interest in the use of bio-based polymers to manufacture membranes either for gas separation, effluent filtration or packaging materials. Among the different polymers directly extracted from the biomass, proteins are very interesting materials because they have filmogenic properties resulting from their disordered structure with various functional groups and a poly-dispersed molecular weight (Mw). Gelatin is an attractive choice to manufacture membranes since it comes from the valorization of abundant and low-cost industrial by-products. Gelatin is obtained by controlled hydrolysis of collagen, a fibrous insoluble protein, which is widely found in nature as the major constituent of skin, bones and connective tissue (Gómez-Guillén *et al.* 2011). This last decade, the potentiality of using gelatin films for different applications has been established and films preparation already studied (Bergo *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008a; Rivero *et al.* 2010; Nur Hanani *et al.* 2012b; Ortiz-Zarama *et al.* 2014). The water solubility of gelatin permits a solvent-free membrane preparation avoiding the use of any harmful organic solvent. However it makes also necessary a cross-linking step to insure membrane stability during storage and use in case of contact with water. Glutaraldehyde (GTA) has been widely used to cross-link proteins and was already employed for gelatin (Bullón *et al.* 2000; Bigi *et al.* 2001; Bigi *et al.* 2004; Martucci *et al.* 2012), but this compound presents a drawback: its cell and systemic toxicity (Bonnard *et al.* 2010). New security regulations impose to evaluate the impact of the compound toxicity on the environment but also on the manufacturers' health (Parliament 2006). In order to comply with the growing trend to replace synthetic and toxic agents with more natural and innocuous ones, our group undertook a study on different cross-linkers for gelatin films (Biscarat *et al.* In press). On the basis of the mechanical properties and gas permeability results, we selected a bio-based compound, ferulic acid (FA). FA is a phenolic acid derivative existing ubiquitously in the vegetal kingdom (Figure IV- 4a).

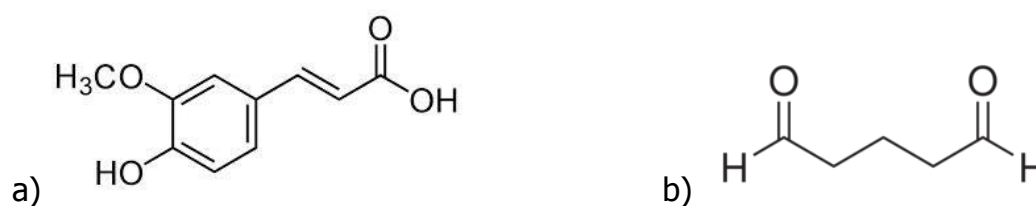


Figure IV- 4 Chemical structure of a) Ferulic Acid and b) Glutaraldehyde

The cross-linking reaction of FA with proteins is rather complex and can follow three different mechanisms depending on the operating conditions (Ou *et al.* 2005). When FA is oxidized under its quinone form, this one can react with the amino and thiol functions of the proteins (Figuroa-Espinoza *et al.* 1999; O'connell *et al.* 2001). A second mechanism consists in producing resonance-stabilized intermediate free radicals (Oudgenoeg *et al.* 2001; Hopkins *et al.* 2003). The as-formed free radicals can react with tyrosine, lysine, cysteine and with itself to produce diferulic acid and form bridges between protein molecules (Oudgenoeg *et al.* 2001; Vansteenkiste *et al.* 2004). Under non-oxidative conditions, thanks to its carboxylic acid group, FA can be esterified with the hydroxyl functions of amino acid like serine. The as-formed complexes are stabilized on the one hand by hydrophobic interactions between the FA phenolic group and the protein chains and on the other hand by hydrogen bonds developed between FA hydroxyl function and amino acids (Chen *et al.* 2004). In the case of direct addition of FA in gelatin solution under non-oxidative conditions, the cross-linking reaction follows this last mechanism. Cao. et al (Cao *et al.* 2007) investigated in details the influence of FA cross-linking on the mechanical properties, the swelling properties and the water vapor permeability films of the gelatin films. But, to the best of our knowledge there is no study in the literature dealing with the influence of FA cross-linking on the gelatin films structure in relation with their permeation properties to common gases (He, N₂, CO₂ and O₂). Considering gelatin as a base polymer for gas separation membrane to replace synthetic polymers implies mechanical properties supporting different operating conditions such as working under high pressure gradient. Preliminary experiments of gelatin membranes outgassing with high vacuum resulted in too brittle films for experiments in a gas permeation cell. The addition of a plasticizer was therefore necessary to maintain the films integrity and softness. For this purpose, an innocuous compound-known for its plasticizing effect on gelatin films, was used, the polyethylene glycol (PEG) (Cao *et al.* 2009; Vieira *et al.* 2011). PEG plasticizing properties were attributed to the reduction of the gelatin-gelatin interactions by the introduction of PEG polar groups (-OH) present at both extremity of the molecular chains. Hydroxyl groups are expected to develop gelatin-PEG hydrogen bonds. PEGs of low molecular weight would be more efficient as plasticizers since they exhibit a larger

number of hydroxyl groups per mole than PEG of high molecular weight. This led in this study to blend gelatin to polyethylene glycol 200 (PEG200) to plasticize the gelatin membranes. The results available in the literature dealing with O₂ permeability of protein films for packaging applications display rather lower gas permeability when compared to most of the synthetic polymers (Wihodo *et al.* 2013). The general low permeability values have to be related to the semi-crystalline character of the proteins. It is well known that in a semi-crystalline polymer, like gelatin, both mechanisms involved in the gas transport, sorption and diffusion, take place exclusively in the amorphous regions (Michaels *et al.* 1959; Michaels *et al.* 1961b, a). In the case of gelatin, the crystallinity consists of the collagen like triple helical conformation of the protein chains. The rearrangement of the polymer chains in this peculiar conformation, called renaturation, can be quantified by DSC measurement (Achet *et al.* 1995).

The novelty of this study is to consider the gas permeation properties (He, N₂, O₂ and CO₂) of the gelatin membranes, in relation with their structure determined by DSC measurements, and discussed in terms of gelatin triple helical renaturation level. The permeation properties of gases were studied in dry conditions because it is well known that humidity of the environment affects the gas transport properties of protein films (Pochat-Bohatier *et al.* 2006; Wihodo *et al.* 2013). In a first part, gelatin membranes were cross-linked with FA, but also with GTA considered as the reference cross-linker, and their mechanical and thermal properties were investigated. In a second part, PEG200 was blend with gelatin to allow gas permeability measurements. The effects of PEG200 addition and FA cross-linking on mechanical properties and gas permeability were studied in relation with the gelatin renaturation level.

4.4. *Experimental*

4.4.1. Materials

Porcine skin gelatin (Type A, Bloom 188) was purchased from Sigma. Acetic acid 100% was obtained from VWR, and PEG 200 from Merck. Glutaraldehyde solution grade II 25% (GTA) (Sigma-Aldrich) and ferulic acid (FA) (Sigma-Aldrich) were used as cross-linkers without further purification. Na₂SO₄ anhydrous salt was purchased from Merck. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was obtained from Sigma, borax from Fluka and hydrochloric acid from Sigma-Aldrich.

4.4.2. Preparation of membranes

Film-forming solutions were prepared by dissolving 20wt-% gelatin powder in demineralized water at 60°C, with mechanical stirring for about 120 min until it was completely dissolved. PEG 200 was added to gelatin solutions at 6wt-%. Membranes were prepared by dry-casting of the gelatin solution at 30°C on flat Teflon coated sheets using a K Control Coater 101 (Erichsen Instruments). Drying of gelatin membranes was carried-out at 20°C under (45 ± 5)% of relative humidity (RH) during 1 day. All the membranes were stored at ambient temperature in a box (ca. 25 ± 5 %RH) before subsequent analysis. Prepared membranes present a composition of 0.3 g PEG/g gelatin. This ratio was suggested by Cao et al.(Cao *et al.* 2009) for obtaining very soft membranes.

Two cross-linking agents were tested using two different methods. FA (40mg/g of gelatin) was added directly to the PEG/gelatin system in solution at 60°C and stirred for 2 hours before casting. This method could not be used for GTA cross-linking because GTA reacted too quickly and prevented a proper control of the casting step. Therefore, GTA cross-linking was carried out directly on the membranes by plunging the membrane in an aqueous solution of GTA and Na₂SO₄ as described by Catalina et al.(Catalina *et al.* 2011). Gelatin membranes were then dried at 20°C as previously described. The description of the membrane sample coding is presented in Table IV- 6.

Table IV- 6 Membrane sample coding

Sample coding	Cross-linker	Additive
G-NC	No cross-linking	-
G-GTA	Glutaraldehyde	-
G-FA	Ferulic acid	-
G-P200-NC	No cross-linking	PEG 200
G-P200-GTA	Glutaraldehyde	PEG 200
G-P200-FA	Ferulic acid	PEG 200

4.4.3. Water vapor sorption

Water vapor sorption by G-NC and G-FA membranes was determined at 20°C, for a range of relative humidity (RH) by using saturated salt solutions and a gravimetric method. 2x2 cm² membrane samples were exposed to different %RH (Table IV- 7) during 10 days. RH was then measured (AwLab RS232 RTD 502 Novasina) and the membrane samples weighted by means of a micro-balance (Sartorius CPA225D, with an accuracy of 0.00001 g). The samples were then

dried at 100°C for 24h and weighted again. The water content (X) was calculated by the following equation:

$$X = \frac{(m_{RH} - m_d)}{m_d}$$

With m_{RH} the sample mass after equilibrium with the different %RH, and m_d the mass of the sample after drying at 100°C.

Table IV- 7 Relative humidity (%) given by saturated salt solutions at 20°C (Greenspan 1977)

LiCl	MgCl2	K2CO3	Mg(NO3)2	NaBr	KI
11.3 ± 0.3	33.1 ± 0.2	43.2 ± 0.3	54.4 ± 0.2	59.1 ± 0.4	69.9 ± 0.3

4.4.4. Mechanical properties

The mechanical properties of the membranes were evaluated by extensional rheology. These tests were performed using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) with the Universal Extensional Fixture UXF12. The temperature was controlled at 25°C with a CTD180 Peltier system. The samples tested were 4x1 cm². Film thickness was determined using a thickness gage (Mitutoyo). The given values are the average of ten measurements at different positions for each sample. The thickness depends on the nature of the film and is indicated for each sample in Table IV- 9 and Table IV- 10.

4.4.5. Cross-linking ratio: TNBS assays

Determination of residual amino groups in gelatin was performed by the method Bigi et al. (Bigi *et al.* 2001) described with some modifications. 0.5 mg of uncross-linked and cross-linked 24h old gels were solubilized in 6mL of Borax. Then 6 mL of 10% v/v TNBS solution was added. The solution was then stirred and heated at 30°C for 1 hour. In order to stop the reaction 12 mL of 1M HCl was added and the solution was set aside for 30 minutes. The absorbance of the solutions (Abs) was determined spectrophotometrically at 347 nm after suitable dilution. The absorbance of control samples of uncross-linked gelatin (Abs_G) and TNBS/Borax/HCl only solution (Abs_{TNBS}) were also determined to provide the reference values necessary to calculate the cross-linking ratio:

$$Cross - linking\ ratio = 100 \left[1 - \frac{100 (Abs - Abs_G)}{Abs_G - Abs_{TNBS}} \right]$$

All data shown are the average value of three replicates.

4.4.6. Thermal properties

Thermal properties were determined both on membranes stored under 25 ± 5 % RH at 20 ± 2 °C and on membranes after 48h in a vacuum cell at 10^{-2} Pa. Their residual humidity was measured by thermogravimetric analysis (TGA) performed on a TA Instruments, TGA G500, under nitrogen flow of 100 mL/min. The membranes were then analyzed with a differential scanning calorimeter DSC 2920 equipped with cooling accessory RCS90 (TA Instruments). The samples (≈ 6 mg) were sealed in aluminum TA pan. The instrument was calibrated with pure indium ($T_m = 156.6^\circ\text{C}$ and $\Delta H_m = 28.3$ kJ/kg) and used an empty pan as reference. Membranes were cooled from 25°C to -40°C and then heated up to 230°C with a $100^\circ\text{C}/\text{min}$ heating rate. This high speed enabled a better peak resolution between the denaturation and the degradation endotherms and to determine glass transition temperature (T_g).

4.4.7. Infrared spectra measurements

Membrane infrared spectra were recorded on a Nicolet 710 Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer, using a Thermo-Electron attenuated total reflectance (ATR) accessory with a diamond crystal. For each spectrum, 128 scans were collected with a resolution of 4 cm^{-1} .

4.4.8. Gas permeation experiments

Permeation experiments were carried out by using the constant-volume and variable-pressure technique in a permeability apparatus at controlled temperature at 25°C . The apparatus consists essentially of a two compartments permeation cell separated by the tested membrane. The permeability was obtained measuring the pressure increase in the downstream compartment (with a constant volume of $5.25 \times 10^{-5}\text{ m}^3$) and using different MKS Baratron pressure transducers (range from 0.0 to 1×10^5 Pa). The membranes and downstream cell walls were outgassed in situ during 24 hours at high vacuum using a turbomolecular pump (Leybold, Turbovac 50, $50\text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$). The permeability experiments were performed using 2.0×10^5 Pa of upstream pressure and recording the pressure increase in the downstream compartment during 4 hours. The magnitude of purity of gases used (He, CO_2 , N_2 , O_2) was of 99.95%, they were used without any further purification. A complete description of the apparatus and methodology used was already published (Joly *et al.* 1997). Obtained curves presented only a pseudo steady state region and thus the time lag method could not be applied to experimentally determine the diffusion coefficients. For calculations of the permeability, the mathematical treatment for thin films based on Fick's second law and reported by Crank (Crank 1975) was used.

4.4.9. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the computer program R. Differences between pairs of means were compared using a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test to avoid false positive response in case of non-normal distribution. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

4.5. Results and discussions

4.5.1. Influence of cross-linking method on gelatin membrane characteristics

Preliminary uncross-linked gelatin membranes (G-NC) were prepared at different initial gelatin concentrations. Attempts showed that for gelatin concentrations smaller than 20 wt%, the thickness control of the cast solution onto a plate was difficult due to a very low viscosity. This mass fraction was thus retained for this study to prepare flat sheet membranes. Cross-linked gelatin membranes (G-GTA and G-FA) were prepared by using the procedures presented in the experimental section. As explained earlier, GTA direct addition in the polymer solution was not possible. At this high gelatin concentration, as soon as GTA was in contact with gelatin, it reacted locally preventing any homogeneous mixing of the solution and thus any controlled casting. Therefore, G-GTA membranes were cross-linked by immersion in the GTA solution of the G-NC membranes. On the contrary, the direct addition of FA in the gelatin solution was possible and allowed the preparation of membranes using the same experimental route than G-NC membranes.

Table IV- 8 Water sorption on G-NC and G-FA membranes at 20±2°C.

G-NC	RH (%)	19	33	41	50	55	65	68
	$X^{(1)}$		0.097 ± 0.015	0.156 ± 0.008	0.173 ± 0.001	0.197 ± 0.003	0.200 ± 0.001	0.220 ± ±0.004
G-FA	RH (%)	17	34	42	51	55	65	72
	$X^{(1)}$		0.174 ± 0.014	0.166 ± 0.009	0.182 ± 0.003	0.209 ± 0.009	0.230 ± 0.007	0.298 ± 0.015

⁽¹⁾ $\text{kg}_{\text{water}}/\text{kg}_{\text{dry matter}}$

After drying at 20°C and (45 ± 5)% RH, TGA measurements on G-NC, G-GTA and G-FA indicated that the water mass fraction of the membranes at equilibrium were not significantly different regardless of the cross-linking method, and was 14 ± 1 wt-%. The membranes were then stored in a box at 20±2°C and 25±5 %RH. In order to point out the influence of the atmospheric conditions on the water mass fraction of the membranes, water sorption measurements were carried out at 20±2°C. Results obtained between 17 and 72% RH at equilibrium (Table IV- 8)

displayed a low dependence of the membrane water content with RH. That means that the water content variation of the membrane can be considered negligible along experiment duration realized under atmospheric conditions. The mechanical properties of these membranes (table 4) were then measured under atmospheric conditions in order to describe the extent of the cross-linking reaction of GTA or FA on gelatin. Young's modulus of G-NC and G-FA are not significantly different whereas G-GTA membranes display higher values. In the same way, tensile strain and tensile stress at break are lower for G-GTA. These tensile parameters show that G-GTA membranes are more rigid than G-NC and G-FA membranes and that cross-linking reaction is probably more advanced with GTA compared to FA. To state this assumption, TNBS assays were conducted to determine the cross-linking ratio of the membranes (Table IV- 9). Whereas 92% of the gelatin available amino groups are cross-linked with GTA only 54% were cross-linked with FA. In addition, the thermal properties of the membranes show that the denaturation temperature (T_d) of the G-GTA (110°C) membranes is higher than the G-FA one (99°C), itself higher than the G-NC one (96°C). A modification of the endotherm heat flow (ΔH_d) values can also be noted. The increased thermal stability and decreased of the endotherm heat flow have been ascribed to a reduction of hydrogen bonds, which break endothermically, and to a simultaneous increase in the extent of covalent crosslinks, which break exothermically (Bigi *et al.* 2001). These results thus display that the extent of GTA cross-linking reaction is more developed than with FA, and are in agreement with TNBS assays. GTA is a small molecule with two aldehyde groups, separated by a flexible chain of 3 methylene bridges (Figure IV- 4b). The potential for cross-linking is great because these two -CHO groups can combine with any amino group of the protein. On the opposite, for FA only one -COOH group can react under non-oxidative conditions.

Gas permeability measurements were then conducted on these membranes.

Table IV- 9 Mechanical properties, cross-linking ratio and thermal properties of uncross-linked and cross-linked gelatin membranes stored at 25% RH and 20°C.

	G-NC	G-FA	G-GTA
<u>Mechanical properties</u>			
Thickness (μm)	57 \pm 6	60 \pm 10	67 \pm 12
Young's Modulus (GPa)	1.0 \pm 0.2 ^{aA}	1.1 \pm 0.8 ^{aA}	4.5 \pm 0.3 ^{bA}
Tensile strain at break (%)	30 \pm 6 ^{aA}	25 \pm 1 ^{aA}	11 \pm 2 ^{bA}
Tensile stress at break (Mpa)	5.2 \pm 0.5 ^{aA}	4.0 \pm 0.4 ^{aA}	3.9 \pm 0.4 ^{aA}
<u>Cross-linking ratio (%)</u>	0 ^a	54 \pm 3 ^b	92 \pm 2 ^c
<u>Thermal properties</u>			
Tg ($^{\circ}\text{C}$)	74 \pm 1 ^a	72 \pm 1 ^{ab}	68 \pm 2 ^b
Td ($^{\circ}\text{C}$)	96 \pm 1 ^a	99 \pm 1 ^b	110 \pm 1 ^c
ΔHd (J/g)	29 \pm 3 ^a	14 \pm 2 ^b	8 \pm 2 ^b

"a" comparison on the same line, "A" comparison between gelatin and blend gelatin/PEG200 membrane (Table IV- 10) $p \leq 0.05$

4.5.2. Effect of polyethylene glycol 200 addition

G-NC and G-GTA membranes broke during the preliminary vacuum outgassing phase of the gas permeation measurements. However, G-FA membranes which are much less cross-linked were able to resist to the high vacuum of the permeation cell and then gas permeation experiments were conducted with these membranes. As the membrane breaking is related to the membrane flexibility, it was decided to add a plasticizer to all membrane formulations in order to increase the flexibility and then to avoid membrane breaking during the outgassing step. Blending PEG 200 to a gelatin solution without cross-linker or with FA permitted to prepare membranes (G-P200-NC and G-P200-FA respectively) which maintained their mechanical integrity during gas permeation tests.

The mechanical properties of the membrane are presented in Table IV- 10 under atmospheric conditions in order to study the influence of PEG 200 addition. Here again, membrane cross-linked with GTA are more rigid compared to the others. The observation of the tensile parameters shows that there is no significant difference with or without PEG 200.

Table IV- 10 Effect of PEG 200 addition on mechanical properties and water mass fraction of membranes stored at 25% RH and 20°C.

	G-P200-NC	G-P200-FA	G-P200-GTA
<u>Mechanical properties</u>			
Thickness (μm)	68 \pm 11	100 \pm 17	68 \pm 11
Young's Modulus (GPa)	1.1 \pm 0.2 ^{aA}	1 \pm 0.2 ^{aA}	4.2 \pm 0.6 ^{bA}
Tensile strain at break (%)	20 \pm 4 ^{aA}	29 \pm 6 ^{aA}	17 \pm 1 ^{bB}
Tensile stress at break (MPa)	6 \pm 1 ^{aA}	4.0 \pm 0.2 ^{aA}	5.1 \pm 0.5 ^{aB}
<u>ATG</u>			
Water mass fraction	14.6	11.5	14.6

"a" comparison on the same line, "A" comparison between gelatin and blend gelatin/PEG200 membrane (Table IV- 9) $p \leq 0.05$

During the soaking stage, GTA reacted with gelatin by forming covalent bonds. In the uncross-linked membrane, gelatin and PEG only interact through hydrogen bonds. These interactions are weaker than those occurring between gelatin and GTA. In the GTA solution, the matrix formed by covalently bonded gelatin and GTA had much fewer interactions with PEG. So, it might be possible that a part of the water-soluble PEG molecules leave the biopolymer matrix to the cross-linking solution during the soaking step leading thus to the reduction of the plasticizing effect.

To support this assumption, FTIR measurements were realized on G-NC, G-GTA, G-P200-GTA membranes, and compared with PEG 200 spectrum obtained with the KBr method (Figure IV- 5).

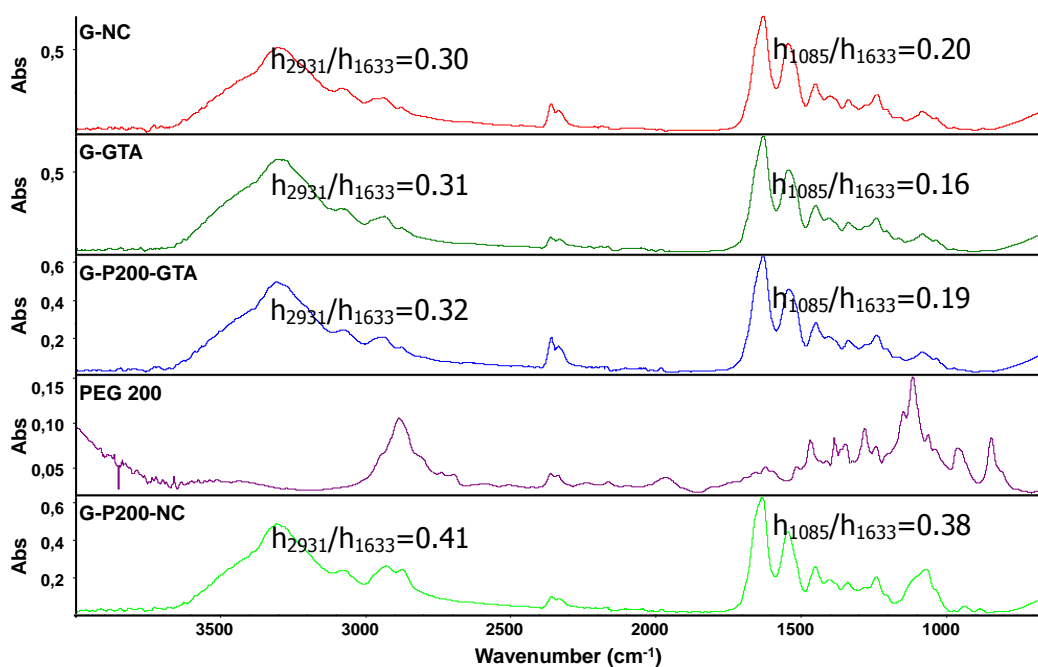


Figure IV- 5 Effect of PEG200 addition on infrared spectra in ATR mode of gelatin-based membranes

For the analysis, the amide I band ($\nu_{C=O}$, ν_{NH}) at 1633 cm^{-1} was taken as reference peak of gelatin (Staroszczyk *et al.* 2012) and the alkane stretch (ν_{C-H}) band at 2931 cm^{-1} and the ether group (ν_{C-O-C}) at 1085 cm^{-1} as reference peaks of PEG 200. It should be noted that gelatin is a complex association of amino acids with a large variety of chemical groups. Therefore PEG characteristic groups such as alkane and ether are also present in gelatin. Moreover the alkane stretch band is also characteristic of GTA. But, the intensity ratio between the maximum height of the absorbance peaks at 2931 cm^{-1} and 1633 cm^{-1} (h_{2931}/h_{1633}), and at 1085 cm^{-1} and 1633 cm^{-1} (h_{1085}/h_{1633}) give a relative indication on the PEG200 presence in the membrane. Lower ratio values imply less PEG200 molecules in the polymer matrix. It can be observed that G-NC, G-GTA and G-P200-GTA spectra present very similar values ($h_{2931}/h_{1633} = 0.31 \pm 0.1$ and $h_{1085}/h_{1633} = 0.18 \pm 0.2$) compared to G-P200-NC spectrum which displays significantly higher ratios ($h_{2931}/h_{1633} = 0.41$ and $h_{1085}/h_{1633} = 0.38$) giving evidence of the presence of PEG200 in the membrane composition (Figure IV- 5). Indeed, FTIR measurements confirmed thus the loss of PEG200 and their plasticizing effect during the membrane immersion in the GTA aqueous solution. This explained why the gas permeability of gelatin membrane cross-linked with GTA using this procedure could not be determined.

4.5.3. Gas permeability

Gas permeability measurements could thus be carried out only on G-FA, G-P200-NC and G-P200-FA. On the basis of TGA measurements which gave the water mass fraction (Table IV- 10), the composition of these membranes was then calculated (Table IV- 11).

Table IV- 11 Composition, gas permeability and renaturation level of G-P200-NC, G-FA and G-P200-FA membranes

	G-P200-NC	G-FA	G-P200-FA
Composition (wt-%)			
Gelatin	65.7	82.7	66
PEG200	19.7	0	19.8
Water (TGA)	14.6	14	11.5
FA	0	3.3	2.6
Permeability (Barrer)			
He	4.5±0.4 E-02	2.6±0.3 E-01	2.5±0.2 E-01
CO ₂	4.5±0.4 E-02	4.5±0.4 E-01	2.7±0.3 E-01
O ₂	3.1±0.3 E-03	5.5±0.5 E-02	7.4±0.7 E-02
N ₂	6.2±0.6 E-03	7.6±0.8 E-02	2.9±0.3 E-01
P CO ₂ /P O ₂	14.5	8.2	3.6
P CO ₂ /P N ₂	7.3	3.6	4.8
Renaturation level (%)⁽¹⁾	40±2 ^a	32±4 ^b	35±2 ^b

Lower case letters represents the statistical significance within a line, p≤0.05

⁽¹⁾ Before vacuum outgasing

Globally, the gas permeability values observed for all samples are relatively low when compared with classical petrochemical polymers. However, a difference of one decade could be observed in gas permeability between G-P200-NC and G-P200-FA or G-FA (Table IV- 11). Uncross-linked blend PEG200/gelatin membranes gave the lowest permeability values. As explained in the introduction, these low permeability values reflect the semi-crystalline nature of the gelatin related to the renaturation of collagen like triple helices.

Even if the permeability values are relatively low the results obtained with all gelatin-based membranes display some interesting selectivity values reached between CO₂ and O₂, and CO₂

and N₂. The CO₂ /O₂ selectivity can be explained taking into consideration that the diffusion of gases through a dense biopolymer is the result of two contributions: the kinetic contribution which is given by the diffusion and directly related with the kinetic diameter of the gas and the sorption which is related with the thermodynamic contribution and gives an indication of the interactions between the dense matrix and the gas (Charmette *et al.* 2004; Charmette *et al.* 2009). Looking at the kinetic diameter of the tested gases: He, 0.26 Å; CO₂, 0.33 Å; O₂, 0.346 Å and N₂, 0.364 Å (Breck 1973), He is the smallest one and should diffuse faster than O₂, and N₂. These last two gases have the biggest kinetic diameter and show also the lowest permeability. By comparing CO₂ and He permeability, CO₂ and He present similar values in spite of their difference in size. This result could be explained by other factors than diffusion. For instance the transport may be enhanced by the interactions between CO₂ and some groups of the gelatin matrix and PEG. Actually, the permeability of CO₂ through gelatin may be explained by the sorption of CO₂ as a result of the interactions between this gas and the free amine groups. Indeed, it has been already showed that CO₂ solubility was higher in wheat gluten proteins than in water (Pochat-Bohatier *et al.* 2006).

Results obtained on membranes cross-linked with FA display higher permeability values than uncross-linked membranes. Dissimilar result could have been expected because cross-linked polymers have in principle less chain mobility and the gas penetrant diffusion is more difficult. However, adding FA might modify the interactions in the gelatin matrix and thus the conformation of the polymer chains leading to an enhancement of the diffusion coefficient. These results show that the cross-linking with FA acts directly on the molecular diffusion favoring the kinetic contribution of the gas permeation. Moreover, the covalent bridge formed by esterification between FA and gelatin is present only on one side of the FA molecule. The whole structure is thus not completely stiffed and keeps a part of mobility and can explain why G-FA membranes did not break under vacuum in the permeation cell.

As the permeability values are strongly related to the gelatin renaturation level, they were determined by DSC measurements using the method developed by Achet *et al.* (Achet *et al.* 1995). and are presented in Table IV- 11. They were calculated on membranes at the equilibrium state for residual humidity about 14% (determined by TGA). The denaturation endotherm is directly related to the denaturation of the collagen like triple helix. By doing the ratio between the gelatin membrane denaturation enthalpy and the value of the denaturation enthalpy of pure porcine skin collagen, $\Delta H_{\text{denat coll}} = 47.8 \text{ J/g}$ (Samouillan *et al.* 2011), the renaturation level can be directly calculated. In order to elucidate the effects of hydration level on DSC results, membrane samples (G-P200-NC samples) were vacuum-conditioned and then tested with a DSC overtime.

The Figure IV- 6 shows the evolution of the DSC signal with the water uptake. It can be seen that there is no significant modification of the signal but that a shift can be observed. This shift is compatible with the increase of water content, water which is a well-known plasticizer of gelatin.

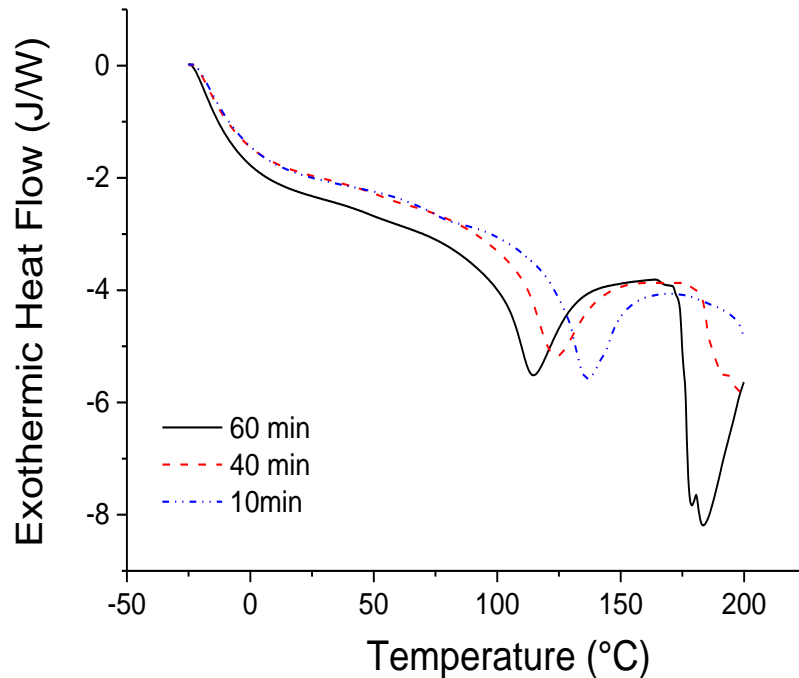


Figure IV- 6 DSC thermogram of G-P200-NC membrane stored under vacuum and then tested after 10, 40 and 60 min.

The calculation of the denaturation enthalpy from these different DSC signals (Table IV- 12) showed that the hydration level of the membrane has no significant impact but it only impacts the denaturation temperature.

Table IV- 12 Influence of re-hydration of G-P200-NC membrane on the thermal properties after vacuum conditioning

Time ⁽¹⁾ (min)	Water content ⁽²⁾ (%)	Denaturation temperature (°C)	Denaturation enthalpy (J/g)
10	3	136	22.3
40	-	124	21.1
60	9	115	22.6

(1) after vacuum conditioning

(2) determined by TGA

As already mentioned, to avoid the influence of water, gas permeation experiment were carried out under vacuum. The thermal properties of G-P200-NC after vacuum were also determined to check if the gelatin structure had undergone modification in the permeation cell. The remaining water level decreased from 14.6% to 3% which is under the minimum of water necessary to structure the triple helices (Yakimets *et al.* 2005). Based on this observation the renaturation level of the membrane after vacuum should be dramatically diminished since most of the collagen like helices should have lost their crystal structure. Nevertheless, DSC analysis indicated that renaturation level of G-P200-NC membrane after analysis in the permeation cell, and thus after vacuum, was not significantly different ($42\pm 3\%$) compared to those before gas permeation analysis ($40\pm 2\%$). According to Achet *et al.* (Achet *et al.* 1995), under these conditions the gelatin strands do not have enough mobility to recover the random-coil state. So the helices collapse on the spot with the memory of their triple helical conformation retained. Thus the renaturation level calculated with DSC measurements were representative of the apparent crystalline state of gelatin during gas permeation analysis. Films made only with gelatin showed renaturation level about 61%. Adding FA reduced the triple helical part to $32\pm 4\%$. By increasing the colloidal phase ratio, FA reduced the rigidity of the film and favored the film's resistance under vacuum. Moreover renaturation level results (Table IV- 11) presented a tendency in agreement with the gas permeability values. The highest ratio was obtained for the less permeable membranes which is in total agreement with the observation done on synthetic semi-crystalline polymers that the permeability increases with the amorphous phase ratio.

4.1. Conclusion

Gelatin-based membranes were prepared without using toxic agent and following a solvent-free elaboration process. Low permeability values were reached with gelatin/PEG 200 uncross-linked membranes which present similar He and CO₂ permeability ($4.5 \cdot 10^{-2}$ Barrer). These results were explained by the semi-crystalline nature of the gelatin and a high renaturation level (40%) as underlined by DSC experiments. Meanwhile high CO₂/O₂ selectivity (14.5) was obtained and can be explained by the contribution of interactions between the CO₂ and the free amine groups of the gelatin on one side and ether groups of PEG on the other side. Concerning the gelatin cross-linking, it can be concluded that FA gave better results to produce gas separation membranes compared to GTA which formed stiff and brittle materials. The cross-linking ratio of gelatin amino groups obtained with FA reached 54 % and the renaturation level was around 32%, meaning that a non-negligible part of the structure remained uncross-linked and in an amorphous state, allowing polymer mobility and the diffusion of the gas penetrant. Gelatin can constitute the building polymer of gas separation membranes, offering a bio-based character. To increase gas

permeability, it could be interesting to add a synthetic polymer with an elastomeric behavior to reduce even more the membrane crystallinity and thus favor the gas permeability. Meanwhile the very low gas permeability of the gelatin membranes cross-linked with FA obtained in this study, associated to their natural origin, make these materials especially interesting not only for packaging applications in food industry but also for pharmaceuticals development.

5. Introduction de la publication 4

L'acide férulique a permis de réticuler la gélatine. Il a plus que doublé la durée de résistance des membranes immergées dans un bain d'eau en passant de 100 à 250 minutes avant que le gonflement important (respectivement 1500 et 1200%) n'entraîne la dégradation du matériau (Figure IV- 2). La réticulation avec l'acide férulique permet de plus de tester la gélatine en perméation gazeuse. L'innocuité de l'acide férulique associée aux résultats obtenus permettent de dire que les membranes gélatine/acide férulique sont de bonnes candidates pour des applications en emballage.

Cependant les mécanismes de réticulation de l'acide férulique sont complexes. L'utilisation de l'acide férulique dans son état natif, où seule la réaction d'estérification peut avoir lieu, ne permet, dans nos conditions d'élaboration, d'atteindre qu'un taux de réticulation de 54%. De plus les ponts de réticulation créés sont asymétriques puisqu'un coté est lié de façon covalente alors que l'autre dépend d'interactions physiques. De ce fait la résistance des films réticulés par l'acide férulique en contact avec l'eau liquide reste insuffisante dans cette étude, malgré l'amélioration significative par rapport à la gélatine seule. Les films se dégradent dans l'eau et l'intégrité dans le temps de ces membranes dans le cadre d'un procédé avec des effluents gazeux aux humidités relatives proches de la saturation n'est pas garantie.

Pour répondre spécifiquement aux problèmes de contrôle de la réticulation, en terme cinétique, avec pour objectif une intégration de l'étape de réticulation dans le procédé d'élaboration des membranes, et afin d'augmenter le taux de réticulation de la gélatine un autre réticulant a été testé. En effet, nous avons vu que le glutaraldéhyde était trop réactif et que l'acide férulique ne permettait dans nos conditions d'élaboration qu'un taux de réticulation de 54 %. Pour augmenter la réactivité du réticulant et pour mieux comprendre et contrôler la réticulation, le but est d'utiliser un dialdéhyde comme le glutaraldéhyde, dont les mécanismes de réticulation sont plus simples que ceux mis en œuvre par l'acide férulique. De plus le choix d'une molécule plus grande pourrait permettre d'augmenter les volumes libres. Le téréphthalaldéhyde avec son noyau aromatique est un bon candidat. De surcroît, il est classé comme non toxique et il offre l'avantage par rapport au glutaraldéhyde de ne pas être volatile. Pour une application industrielle l'emploi de composés volatiles impose des installations spécifiques coûteuses pour la sécurité des opérateurs.

On s'intéressera d'abord à la mise en place du procédé de réticulation inédit entre le téréphthalaldéhyde et la gélatine ainsi qu'aux propriétés mécaniques et à la résistance à l'eau et à l'humidité des films. Ensuite on discutera brièvement, sur le modèle de la partie IV.3, des

propriétés de perméation des films gélatine/téréphthalaldéhyde en relation avec le degré de renaturation.

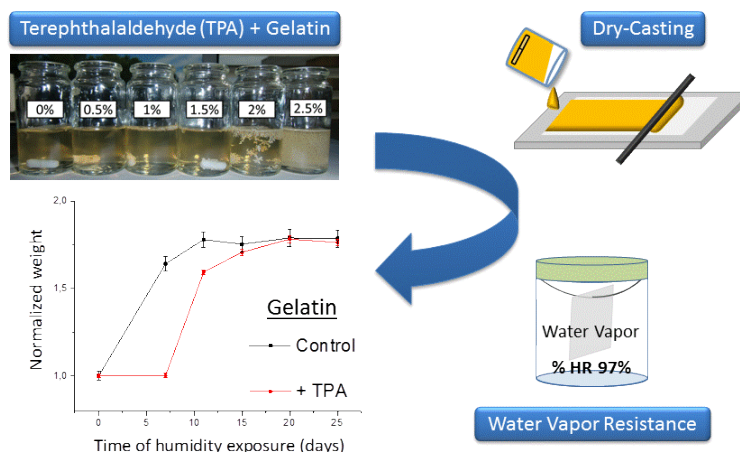
6. Publication 4:

Effect of chemical cross-linking on gelatin membrane solubility with a non-toxic and non-volatile agent: terephthalaldehyde

Jennifer Biscarat, Benjamin Galea, José Sanchez, Celine Pochat-Bohatier*

Soumise à International Journal of Biological Macromolecules

6.1. TOC



Keywords: Gelatin, Terephthalaldehyde, Cross-linking, Rheology, Water solubility

6.2. Abstract

In this paper, terephthalaldehyde (TPA) is proposed as non-toxic and non-volatile gelatin cross-linker. Optimal cross-linking parameters (TPA/gelatin ratio, temperature) were first determined from in-situ rheological measurements on gelatin solutions and from chemical tests with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS assays) on gelatin gel. The highest cross-linking ratio was achieved for a concentration of 0.005 g TPA/g gelatin at 60°C. The impact of TPA cross-linking on gelatin membrane functional properties (water swelling ratio, water vapor sorption and mechanical properties) was measured. TPA cross-linking increased 17 times the liquid water resistance duration of gelatin films, and delayed the entry of vapor water in the polymer matrix for 7 days, indicating that TPA increased the hydrophobic character of the gelatin matrix.

6.3. Introduction

Bio-sourced polymers present advantages over synthetic polymers in terms of biocompatibility, biodegradability and sustainability. Among the natural polymers, gelatin displays physico-

chemical characteristics which confer enormous potential in the field of tissue engineering upon this protein (Van Vlierberghe *et al.* 2011). Indeed gelatin is composed of a large variety of side chains and chemical functions and is water soluble. It is composed of a unique sequence of amino acids, with a high content of glycine, proline and hydroxyproline. Proline and hydroxyproline content is particularly interesting in terms of gelling effect (Gómez-Guillén *et al.* 2011). Cross-linking of gelatin for biomaterial applications is essential because of its sol-gel temperature around 30°C, lower than body temperature. Physical (Wihodo *et al.* 2013), enzymatic (Teixeira *et al.* 2012) and chemical cross-linking methods have already been reported for gelatin. In most cases bifunctional reagents including glutaraldehyde (Jayakrishnan *et al.* 1996), diisocyanates (Olde Damink *et al.* 1996b), carbodiimides (Ofner *et al.* 1996) genipin (Butler *et al.* 2003; Nickerson *et al.* 2006; Lien *et al.* 2009), polyepoxycompounds (Sung *et al.* 1996) and acyl azides (Petite *et al.* 1990) have been used. Due to the complex nature of gelatin as a polymer, especially the diversity of present functional groups, controlling the cross-linking step is challenging. In the case of dialdehyde, gelatin derivatization occurs mostly *via* the amine groups of lysine and hydroxylysine (Aoki *et al.* 2004). Glutaraldehyde is a widely used cross-linker for proteins and especially for gelatin (Bullón *et al.* 2000; Bigi *et al.* 2001; Chiou *et al.* 2008; Catalina *et al.* 2011) but it presents a drawback: its cell and systemic toxicity (Sung *et al.* 1999). Martucci *et al.* (Martucci *et al.* 2012) and Bigi *et al.* (Bigi *et al.* 2001) showed that at low concentration the glutaraldehyde toxicity does not represent a hazard in the final product. But, new security regulations impose to evaluate the impact of the compound toxicity on the environment but also on the manufacturers' health (Parliament 2006). GTA volatility assigns manufacturers to install specific equipment like extractor fans. There is thus a need in finding non-volatile cross-linker to simplify the operating procedures.

Gelatin based films have been successfully prepared by solution drying at temperatures lower than sol-gel temperature (Sobral *et al.* 2001b; Thomazine *et al.* 2005; Bergo *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2008a; Rivero *et al.* 2010). However, a cross-linking step is needed to maintain mechanical integrity of films/membranes. It has been reported that the use of highly reactive glutaraldehyde as cross-linker for membrane preparation results in heterogeneous material since in this case relatively high concentration of gelatin are used (20wt-%) (Biscarat *et al.* In press). This anisotropy is due to the lack of control of the cross-linking kinetics. Thus, the use of a less reactive cross-linker is necessary to get a better control of the film structuring mechanisms. The novelty of this work concerns the development of a method to cross-link gelatin with a less reactive cross-linker and above all non-toxic, to comply with biomaterial applications. Terephthalaldehyde (TPA) is a dialdehyde as GTA and can react with amine functions to form imines (Natansohn *et al.* 1991) via Schiff base formation (Weng *et al.* 2007). TPA has already been used as cross-linker for polyvinyl alcohol (Jackson *et al.* 1967; Qiao *et al.* 2005) and

chitosan (Chu *et al.* 2013) with which it forms imines *via* Schiff base formation. TPA innocuousness lies on the absence of alpha hydrogen on the aldehyde functions contrary to GTA. Indeed, it has been reported (Migneault *et al.* 2004; Farris *et al.* 2009) that the specific position alpha of hydrogen in the molecule permits to GTA to undergo aldol-reactions giving rise to aldol-form intermediates. TPA safe attribute is explained by its inability to form these intermediates combined to its non-volatility. From our knowledge, no thorough study of TPA as gelatin cross-linker is available. This work focuses on the integration of the chemical cross-linking reaction along gel or membrane preparation by adding TPA directly in gelatin solution in order to favor homogeneous cross-linking. In a first part, the cross-linking reaction was studied through rheological measurements on gelatin solutions to depict cross-linking kinetics according to the temperature and the TPA concentration. Cross-linked gelatin percentages under gel state were then determined through the determination of residual amino groups by using TNBS assays. In a second part, cross-linking achievement on gelatin was measured by studying the behavior of cross-linked films directly immersed in water or in acetic acid, or exposed to water vapor. Finally, the mechanical properties of uncross-linked and cross-linked films were compared.

6.4. Experimental section

6.4.1. Materials.

Porcine skin gelatin (Type A, Bloom 188) and polyethylene glycol (PEG) 200 were purchased from Fluka and Sigma-Aldrich, respectively. Terephthalaldehyde (TPA, Aldrich) was used as cross-linker without further purification. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was obtained from Sigma, borax solution ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) from Fluka and hydrochloric acid from Sigma-Aldrich.

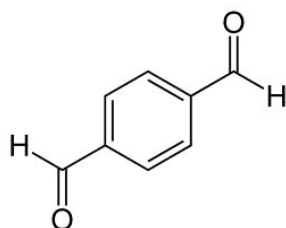


Figure IV- 7 Chemical structure of terephthalaldehyde (TPA)

6.4.2. Preparation of gels and films.

Gelatin solutions were prepared by dissolving 20wt-% gelatin powder in demineralized water at 60°C, with mechanical stirring for about 120 min. PEG 200 was added to solutions at 6wt-%. The cross-linker, TPA (from 0.005 to 0.025g/g of gelatin) was first dissolved in DMSO and then

added to the gelatin or gelatin/PEG systems in solution at 30°C, 40°C or 60°C and stirred for 1 hour before casting, such as residual DMSO content in gelatin solution remained less than 0.1%. Films were prepared by dry-casting of the gelatin solution at 30°C on flat Teflon coated sheets using a K Control Coater 101 (Erichsen Instruments). Gelatin films were allowed to dry at 20°C under (45 ± 5)% of relative humidity (RH) for 2 days. All the membranes were stored at ambient temperature in a box (ca. 25 ± 5 %RH) before subsequent analysis.

6.4.3. Thickness measurement.

Film thickness was determined using a thickness gage (Mitutoyo). The given values are the average of ten measurements at different positions for each sample.

6.4.4. Rheological analysis.

Cross-linking kinetics at different temperatures and cross-linker concentrations were determined using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) with parallel plate system PP50. The temperature was controlled at 25°C with a IMC70 Peltier system. The transition from liquid to soft solid was determined using an oscillation test (1Hz frequency, normal force set to 0N) with strain varying from 1 to 0.01% following a logarithmic ramp.

The same equipment was used to determine the sol/gel transitions for gelatin. The ramp temperature was controlled from 40°C to 25°C with a 0.003°C/s cooling rate thanks to the IMC70 Peltier system. The transition from liquid to soft solid was determined thanks to an oscillation test (1Hz frequency, normal force set to 0N) with strain varying from 1 to 0.01% following a logarithmic ramp. The sol/gel transition was defined as the temperature for which the damping factor ($\tan\delta$) became lower than 1.

The mechanical properties of the films were evaluated by extensional rheology. These tests were performed using a rheometer MCR 301 (Anton Paar) using the Universal Extensional Fixture UXF12. The temperature was controlled at 25°C with a CTD180 Peltier system. The samples were tested in triplicate on 4x1 cm² specimens.

6.4.5. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assays.

Determination of residual amino groups in gelatin was performed by the method described by Bigi et al. (Bigi *et al.* 2001) with some modifications. 0.5 mg of uncross-linked and cross-linked 24h old gels were solubilized in 6mL of borax solution. Then 6 mL of 10% v/v TNBS solution was added. The solution was then stirred and heated at 30°C for 1 hour. In order to stop the reaction 12 mL of 1M HCl was added and the solution was set aside for 30 minutes. The absorbance of the solutions (Abs) was determined spectrophotometrically at 347 nm after suitable dilution. The

absorbance of control samples (uncross-linked gelatin - Abs_G and TNBS/Borax/HCl only solution - Abs_{TNBS}) were also determined to provide the reference values necessary for cross-linking ratio calculation:

$$Cross - linking\ ratio = 100 \left[1 - \frac{100 (Abs - Abs_G)}{Abs_G - Abs_{TNBS}} \right]$$

All data shown are the average value of three replicates.

6.4.6. Water content.

Actually, the films qualified as dried have reached a thermodynamic equilibrium after drying at 20°C under (45 ± 5)% RH and a subsequent storage at (20±2)°C under (25 ± 5) % RH. The measurement of water residual amount in dry films was performed by thermogravimetric analysis (TGA G500, TA Instruments under nitrogen flow of 100 mL/min) with a temperature ramp of 10°C/min.

6.4.7. Swelling kinetics.

The films were cut in 2x2 cm² pieces and desiccated at 50°C for at least 48 h. They were weighted and left at ambient temperature in 30 ml of deionized water. The swelling kinetics were determined, until the samples lost their mechanical integrity, by periodically measuring the weight of the films by means of a micro-balance (Sartorius CPA225D, with an accuracy of 0.00001 g), after gently blotting the surface with a tissue.

The swelling ratio was evaluated as:

$$SR = \frac{weight\ film - weight\ dry\ film}{weight\ dry\ film}$$

All data shown are the average value of four replicates.

6.4.1. Water vapor resistance.

Controlled humidity enclosed space were prepared with K₂SO₄ saturated solutions (97.6 ±0.5% at 20°C). 2x2 cm² membrane samples, desiccated at 50°C for 48h, were weighted before being exposed to humidity. The controlled humidity enclosed spaces containing the gelatin membrane samples were then stored at 20°C. Samples were weighted again after one week and then every 5 days until mass values reached a plateau giving evidence of a thermodynamic equilibrium. All data shown are the average value of three replicates.

6.4.2. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the computer program R. Differences between pairs of means were compared using a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test to avoid false positive response in case of non-normal distribution. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

6.5. Results and discussion

6.5.1. Cross-linking reaction in gelatin solutions

6.5.1.1. Effect of the solution temperature

The cross-linking phenomenon can be followed *in situ* by rheology since it is characterized by a sol-gel transition. In sol state the elastic storage modulus G' is lower than the viscous loss modulus G'' and in gel state G' is higher than G'' . The crossover of G' and G'' curves can be defined as the cross-linking point. At this point, the transition from liquid phase dominated to a solid phase dominated, viscoelastic behavior occurs, also indicating also a three-dimensional (3-D) network formation. This type of material behavior is characteristic of hydrogels formed through physical but also chemical cross-linking (Sahiner *et al.* 2006; Weng *et al.* 2007).

The influence of gelatin solution temperature on the cross-linking process has been investigated through isothermal gelation rheology (Table IV- 13) with 0.005g TPA/g gelatin. The temperature of the reaction during the cross-linking process with TPA had a major impact. At 30°C cross-linking did not occur for all the gelatin samples tested. At 40°C, the crossover between G' and G'' curves had been observed for only half of the samples tested. Finally at 60°C, the temperature at which the gelatin is dissolved in the as-described processing route, cross-linking always occurred. Besides, the sol/gel transition temperature of the gelatin solutions has been measured at $(27.8 \pm 0.3)^\circ\text{C}$. Below this temperature, a physical gel is formed. This means that either at 40°C or 60°C, temperature higher than the sol/gel transition temperature, the gel formation observed (when $\tan\delta$ became lower than 1) has to be attributed to a chemical gel formation. The 3D network has to be related to the cross-linking bridges established in the gelatin matrix by TPA.

Table IV- 13 Influence of the temperature on the chemical cross-linking of gelatin solutions and time needed to obtain a gel, (data were obtained on 8 samples).

Temperature (°C)	% of experiments with sol-gel transition	Time needed to obtain a gel (min)
30	0%	-
40	50%	51 ± 15

60

100%

25 ± 7

Isothermal time dependence of elastic storage modulus (G') and viscous loss modulus (G'') for gelatin solution cross-linked with 0.005g TPA/g gelatin at 30°C, 40°C and 60°C is depicted in Figure IV- 8.

At 30°C, G' was much higher than G'' at the beginning of the gelation process, which means that the samples were already in a gel state before the cross-linker addition. The physical gel was already formed and disfavored the chemical cross-linker action. Indeed the triple helix were already formed limiting the macromolecular dynamic of gelatin chains and thus the formation of covalent bonds (Giraudier *et al.* 2004).

At 40°C and 60°C, when the cross-linking occurred, i.e. when G'/G'' curves crossover was observed, the buildup rate of G' was much higher than that of G'' due to the formation of the elastic hydrogel by crosslinking through Schiff reaction between the aldehyde functions of TPA and the amine functions of gelatin. Van Den Bulcke et al. studied the viscoelastic properties of cross-linked methacrylamide-modified gelatin films and have shown that the hydrogels with high G' values are formed because of the structuration of the protein chains into triple helices (Van Den Bulcke *et al.* 2000). G'' is more complex to analyze since it depends not only on polymer concentration but also on network defects like free chains and dangling ends (Joly-Duhamel *et al.* 2002).

The cross-linker used, TPA, is not soluble in water. It had to be dissolved in a small quantity of DMSO to be mixed in the gelatin solutions. The non-reproducibility of the cross-linking process at 40°C might be due to an alteration of the miscibility between TPA solved in DMSO and gelatin aqueous solution.

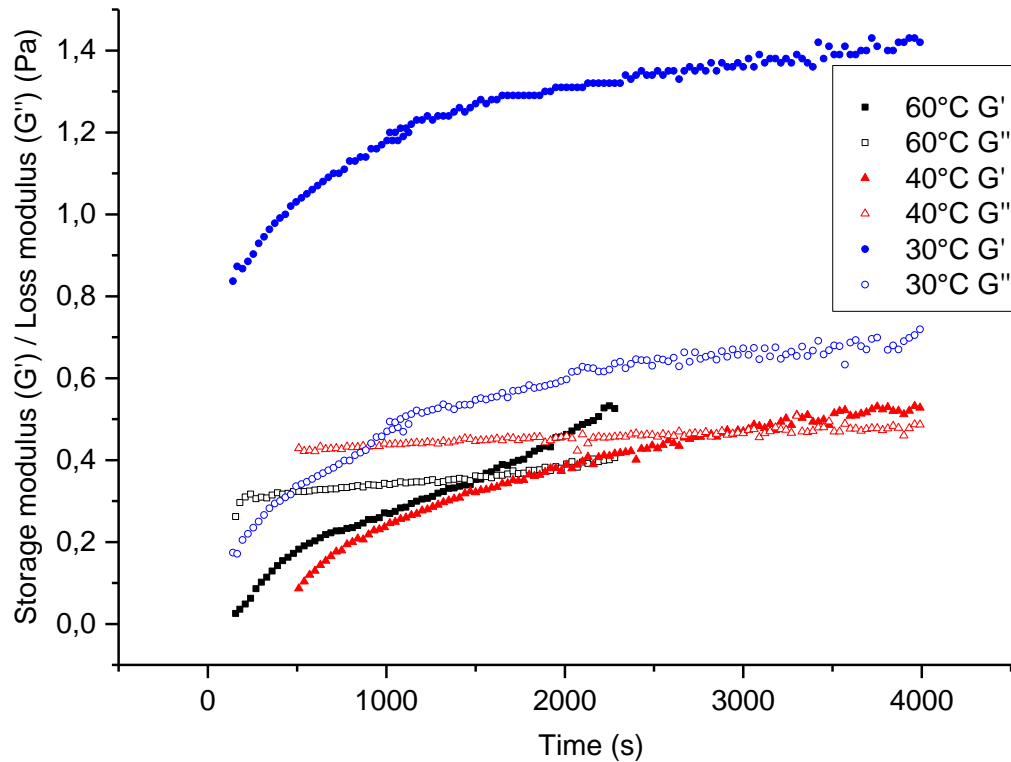


Figure IV- 8 Influence of solution temperature on cross-linking kinetics with 0.005g TPA/g gelatin (the curves are representations of mean data)

Cross-linking reaction with 0.005g TPA/g gelatin can thus be conducted at 60°C right after gelatin dissolution at this temperature during 35 min before solution casting. Next experiments were thus conducted at 60°C and the effect of the TPA concentration on the time needed to complete the cross-linking reaction was studied.

6.5.1.2. Influence of TPA concentration

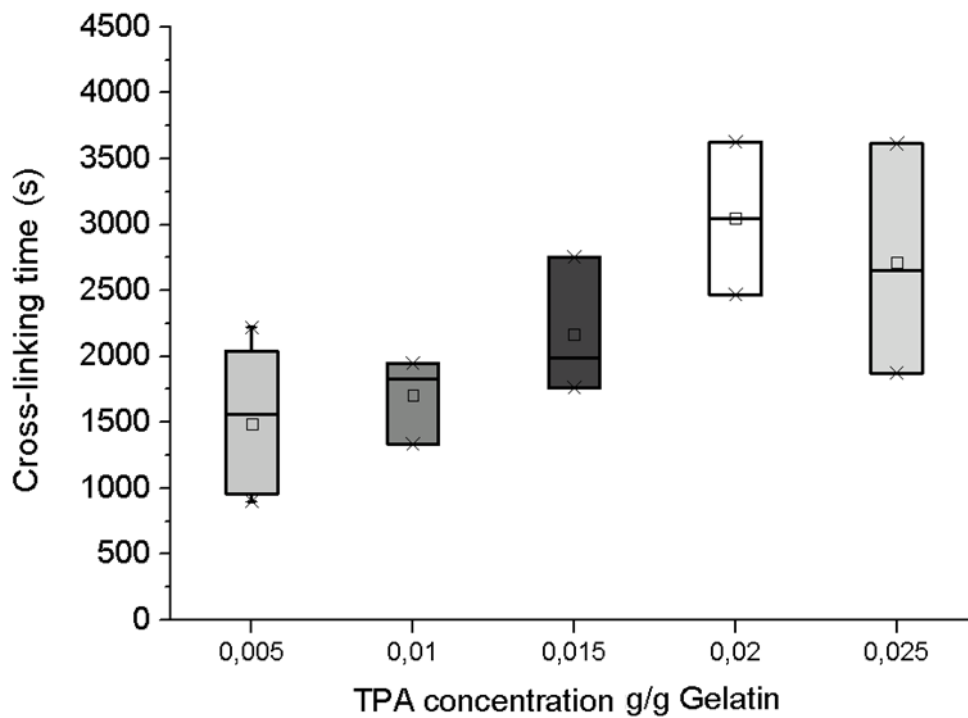


Figure IV- 9 Influence of TPA concentration (g/g of gelatin) on cross-linking kinetics at 60°C

Figure IV- 9 shows the influence of TPA concentration in the gelatin solution on the cross-linking kinetics. All the experiments were carried out at 60°C in order to be exonerated from the competition with the physical gel formation. Even if globally these results tend to show that rising TPA concentration seems to increase the cross-linking time, statistical analyses showed that concentration has no significant impact ($p > 0.05$) on time.

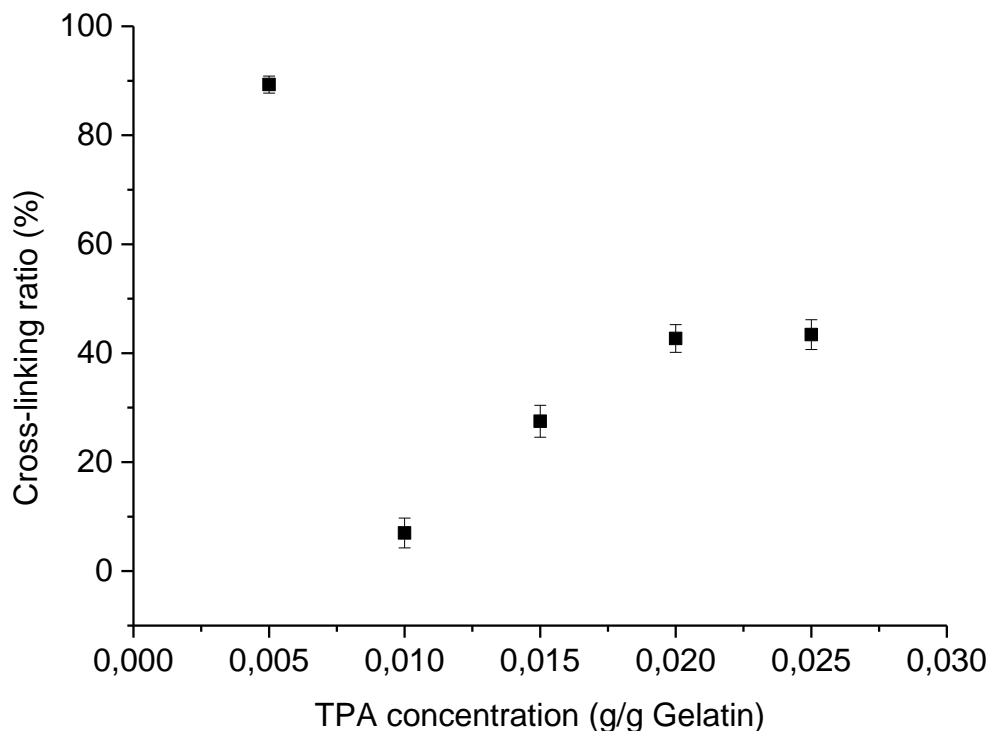


Figure IV- 10 Cross-linking ratio at 60°C determined by TNBS assays (Values are given as average \pm 1.96 x standard deviation determined on 3 samples).

However the concentration of TPA had a drastic effect on the cross-linking ratio achievable as depicted on Figure XXX. The extent of cross-linking was determined by TNBS assays (Figure IV-10). The gel samples were prepared 24 hours before the TNBS assays to ensure the completion of cross-linking process. The cross-linking ratio achieved varied from 7 to 89%. The highest ratio corresponded to a concentration of TPA of 0.005g/g Gelatin. Surprisingly, higher TPA concentration did not lead to more cross-linking. On the contrary, 0.01g/g Gelatin of TPA gave a really lower ratio of cross-linking (7%).

The behavior from 0.01g/g Gelatin until 0.025g/g Gelatin is conventional; the increase of the cross-linker concentration increased the cross-linking ratio until the saturation of the protein/dialdehyde system led to the apparition of a plateau. Saturation has been already observed for dialdehyde/protein system by Rhim et al. (Rhim *et al.* 1998). They stated that reaching the saturation point did not necessarily indicate that all reactive sites on the protein were fixed by the aldehyde but that steric hindrances prevented the aldehydic groups from reaching every available reactive amino acid group on the protein chains.

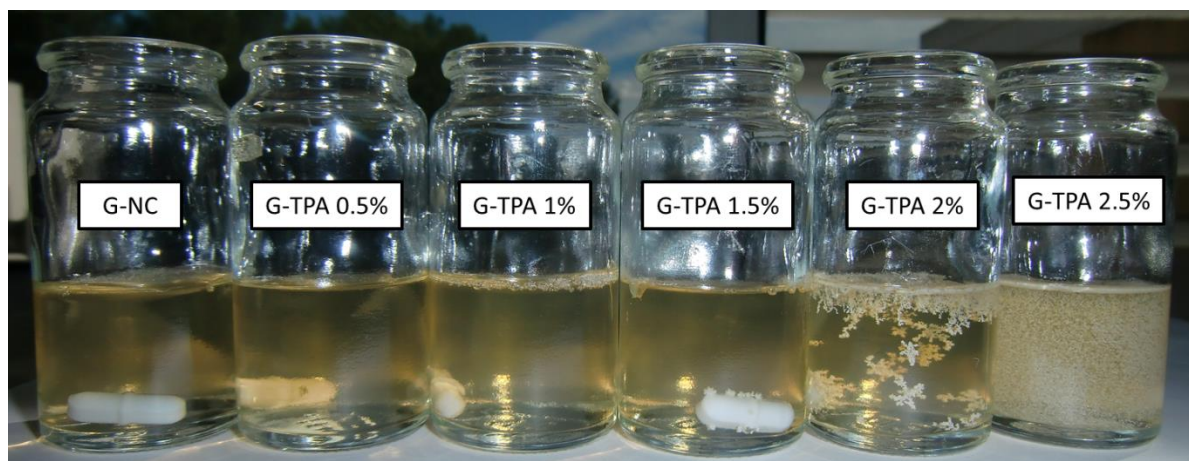


Figure IV- 11 Influence of TPA concentration on 7 days old cross-linked gelatin gels

The saturation phenomenon implies that all the TPA is not involved in the cross-linking reaction. This hypothesis was strengthened by the observation of the gel aging (Figure IV- 11). Indeed crystals of TPA could be observed after a few days in cross-linked gels. Moreover, higher TPA concentration led to more crystals.

Several phenomena may explain the peculiar results obtained for a concentration of 0.005g TPA/g Gelatin. First, it can be related again to a problem of miscibility between the TPA solved in DMSO and the aqueous solution of gelatin.

Secondly, TNBS assays quantify the remaining unreacted primary amine functions. Since this test does not qualify the reaction itself, it does not discriminate the one-sided reaction from the two-sided, *i.e.* if the TPA reacted with one or two amines. With a small concentration of TPA the probability of having two TPA molecules reacting with adjacent amines is low. Thus this favors the two-sided reaction which decreased more efficiently the number of free amines and increased the cross-linking ratio calculated. This might explain the drop of cross-linking ratio between 0.005 and 0.01 g/g Gelatin.

These experiments confirmed that gelatin solutions can be successfully cross-linked with 0.005g TPA/g Gelatin. This quite low concentration combined to TPA harmlessness is thus suitable for product development following the green chemistry principles.

6.5.2. Influence of TPA cross-linking on gelatin membranes properties

The previous study on gelatin solutions clearly showed that the optimal cross-linking parameters were the addition of 0.005g TPA/g gelatin at 60°C with a chemical cross-linking completion after around 35 min. The present part aims at studying the effect of TPA cross-linking and its efficiency on membrane functional properties.

Moreover the effects of polyethylene glycol (PEG 200) addition were also investigated. Indeed, our group has already worked on gelatin-based membrane development and PEG 200 acted as a good plasticizer of gelatin, essential for gas permeability determination (Biscarat *et al.* In press). In this study, it was thus useful to determine the compatibility of PEG 200 addition with TPA cross-linking and its effect on membrane properties.

6.5.2.1. Swelling kinetics

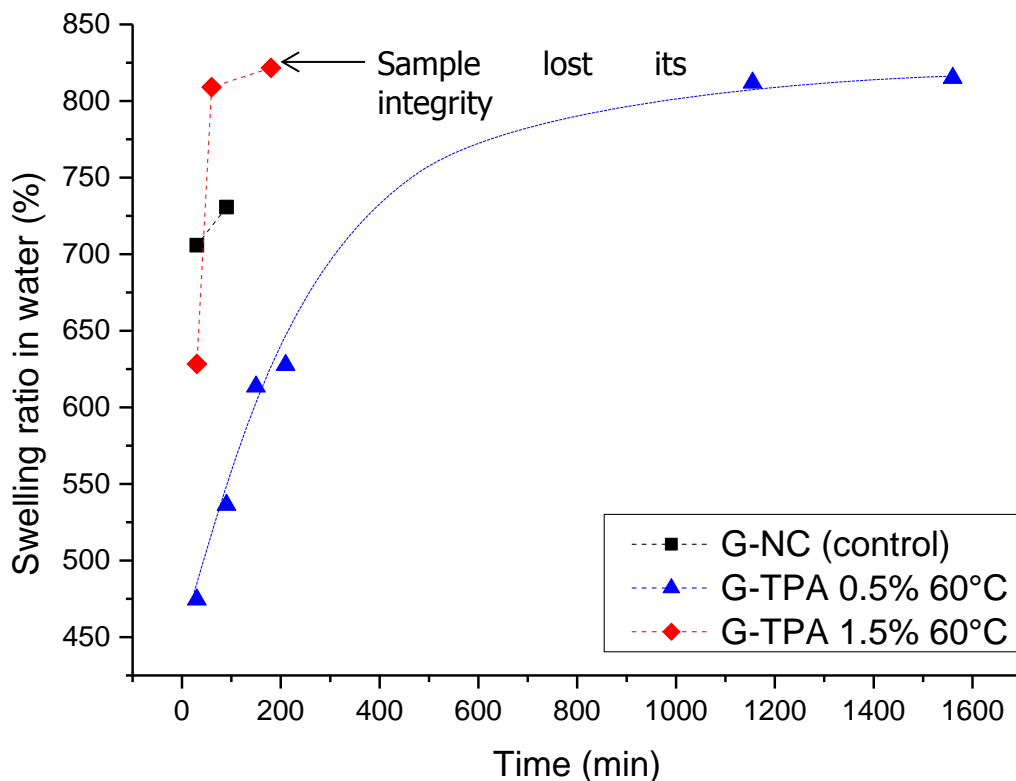


Figure IV- 12 Influence of plasticizing and cross-linking on swelling ratio of gelatin membranes in water. All the sample plasticized with PEG (cross-linked and uncross-linked) lost their integrity before the first weighting. (Values are given as average determined on 4 samples. For lisibility issues standard deviations are not represented) G-NC: uncross-linked gelatin film, G-TPA 0.5% (2.5%): gelatin film cross-linked with 0.005 (0.025)gTPA/g Gelatin

Water solubility of gelatin membranes cross-linked at 60°C was evaluated by immersing them in water. The swelling ratios are presented in Figure IV- 12. Results obtained with films plasticized with PEG 200 do not appear on Figure IV- 12 because all samples lost their integrity before the first weighting at 30 minutes regardless of the cross-linking. This fast disintegration in water of gelatin films in water with PEG 200 may be explained first by a facilitated transport of water in

the gelatin matrix by means of hydrophilic interactions and then by the PEG departure from the polymer matrix due to the higher affinity of PEG with water compared to gelatin.

Indeed, the mechanism of gelatin hydration is a capillary phenomenon of water molecules penetrating the tiny interstices of triple-helical fibrils in the gelatin matrix.(Lai *et al.* 2010). Plasticizing with PEG 200 splits the polymer chains and enlarges the interstices between the fibrils, increasing the water uptake.

TPA addition should slow down the water entrance by increasing the global hydrophobicity of the system; first by bringing an aromatic ring and also by reacting with the amine function. Indeed, the amine functions are hydrophilic and when the primary amines are involved in cross-linking reaction, they are not any more available to interact with water.

This hypothesis is strengthened by swelling ratio measured after 30 min, right after the film immersion in water. Control samples of gelatin alone presented the highest water uptake while the water quantity swelled in the structure diminished with the extent of cross-linking. Indeed, at 60°C with 0.005 g TPA/g gelatin, 90% of gelatin is cross-linked (Figure IV- 10) and the swelling ratio is about 475 % (Figure IV- 12), whereas only around 43% gelatin is cross-linked with 0.025 g TPA/g gelatin leading to a swelling ratio of 625 %.

To conclude, these high swelling ratios measured in water display how gelatin is a hydrophilic polymer, but they also show that un-plasticized gelatin films cross-linked with TPA can resist to water dissolution up to 26 hours.

6.5.2.2. Water vapor resistance.

As expected gelatin is a highly hydrophilic polymer but TPA cross-linked films can resist to water dissolution one full day when immersed in a bath. Experiments were then conducted to measure the water vapor resistance in close box at 20°C with high relative humidity of $97.6 \pm 0.5\%$.

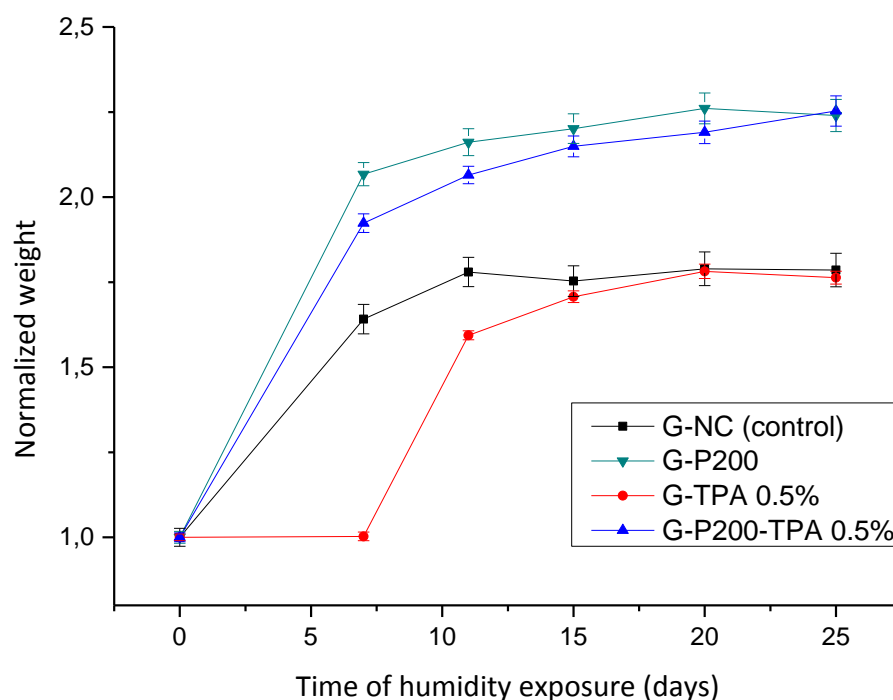


Figure IV- 13 Water vapor sorption isotherms of gelatin films at 20°C prepared at 60°C (values are given as average $\pm 1.96 \times$ standard deviation determined on 3 samples). G-NC: uncross-linked gelatin film, G-P200: uncross-linked and plasticized with PEG200 gelatin film, G-TPA 0.5%: gelatin film cross-linked with 0.005gTPA/g gelatin, G-P200-TPA 0.5%: gelatin film plasticized with PEG 200 and cross-linked with 0.005gTPA/g gelatin

Comparing to the control sample of only gelatin G-NC, cross-linking the gelatin with TPA did not change the water uptake obtained at the thermodynamic equilibrium but it delayed the beginning of the water sorption of at least 7 days. This can be only explained by the hydrophobic contribution of TPA to the polymeric matrix with its aromatic ring and reactions with hydrophilic primary amines.

PEG 200 addition increased the water uptake at thermodynamic equilibrium, due to the hydrophilic nature of its ether functions favoring the interaction with water and thus the overall water quantity in the matrix. Cross-linking a PEG plasticized gelatin film did not lower the thermodynamic equilibrium to the value obtained with single gelatin film. However by looking at the speed of water uptake (Table IV-14), it can be seen that adding TPA to G-P200 membranes slightly slowed down the water uptake from 0.1525 to 0.1319 g/day. The cross-linking of single gelatin membranes increased the water uptake speed after the delayed water entrance phase.

Table IV- 14 Speed of water uptake.

G-NC: uncross-linked gelatin film, G-P200: uncross-linked and plasticized with PEG200 gelatin film, G-TPA 0.5%: gelatin film cross-linked with 0.005gTPA/g gelatin, G-P200-TPA 0.5%: gelatin film plasticized with PEG 200 and cross-linked with 0.005gTPA/g gelatin

Speed of water uptake (g/day)	
G-NC	0.0916 ± 0.005 ^a
G-P200	0.1525 ± 0.004 ^b
G-TPA	0 then 0.1478 ± 0.005 ^b
G-P200-TPA	0.1319 ± 0.003 ^c

6.5.2.3. Mechanical properties

Table IV- 15 Influence of plasticizing, cross-linking and humidity conditioning on mechanical properties (values are given as average ± standard deviation determined on ⁽¹⁾ 10 points, ⁽²⁾ 3 samples). "a" represents the comparison within values in the same column (p≤0.05) "A" between dry and humid state.

sample condition	Thickness ¹ (μm)			Young's Modulus ² (GPa)		Tensile stress at break ² (MPa)		Elongation at break ² (%)	
	dry	humid	Swelling (%)	dry	humid	dry	humid	dry	humid
G-NC	73 ± 3 ^{aA}	140 ± 5 ^{aB}	92 ± 14 ^a	1.0 ± 0.2 ^{aA}	0.006 ± 0.004 ^{aB}	7.2 ± 0.5 ^{aA}	1.4 ± 0.3 ^{aB}	30 ± 6 ^{aA}	32 ± 1 ^{aA}
G-P200-NC	83 ± 2 ^{ba}	196 ± 6 ^{bb}	136 ± 12 ^b	1.1 ± 0.2 ^{aA}	0.003 ± 0.004 ^{aB}	6 ± 1 ^{abA}	0.6 ± 0.6 ^{aB}	20 ± 4 ^{aA}	59 ± 16 ^{abB}
G-TPA 0.5% 60°C	66 ± 3 ^{ca}	103 ± 6 ^{cb}	56 ± 16 ^c	0.8 ± 0.1 ^{aA}	0.03 ± 0.02 ^{bb}	5.6 ± 0.4 ^{ba}	1.0 ± 0.4 ^{aB}	30 ± 8 ^{aA}	30 ± 14 ^{aA}
G-P200-TPA 0.5% 60°C	75 ± 4 ^{aA}	137 ± 7 ^{aB}	83 ± 18 ^a	0.21 ± 0.03 ^{ba}	0.006 ± 0.003 ^{aB}	4.9 ± 0.5 ^{ba}	1.5 ± 0.9 ^{aB}	21 ± 6 ^{aA}	90 ± 23 ^{bb}

Table IV- 15 presents the thickness, Young's modulus, tensile stress at break (TS) and elongation at break (EB) of uncross-linked gelatin films and TPA cross-linked films with the optimal condition determined previously. The "humid" films were tested after 30 days humidity exposure in the experimental setup used for water vapor resistance (relative humidity: 97.6 ± 0.5%). The "dry" films are at the thermodynamic equilibrium along storage at (20±2)°C and under (25±5)%RH. The residual water of the "dry" films measured by thermogravimetric analysis were (14 ± 1)% for uncross-linked films and (7± 1)% for TPA cross-linked films, respectively, regardless of the presence or not of PEG. In the dry state, cross-linking with TPA reduced significantly (p≤0.05)

the thickness of both un-plasticized and plasticized films. Indeed, the created cross-links tighten the polymer network.

Cross-linking with TPA also reduced significantly ($p \leq 0.05$) the thickness swelling of both un-plasticized and plasticized films. Indeed the swelling ratio decreased from 92% to 56% and from 136% to 83%, respectively. Moreover, in both cases, cross-linked and uncross-linked, the addition of PEG increased the swelling ratio. Thus adding hydrophilic PEG increased the water uptake while adding TPA decreased it.

In the dry state, only the addition of both PEG and TPA decreased significantly the Young's modulus. It seems that each additive alone, could not enough hinder the renaturation of the gelatin to make the films less stiff. Water is a well-known plasticizer and thus humid samples had their Young's modulus decreased of three orders of magnitude except for G-TPA0.5% (two orders). The cross-linking reduced the water uptake and thus the water plasticizing effects.

Adding PEG did not modify the tensile stress at break of dry films while cross-linking did. This effect could not be related to a modification of the renaturation level since the Young's moduli were not impacted for dry G-TPA0.5%. After humidity exposure the tensile stress at break values were divided by factors from 2.4 to 10 and no statistically significant difference was observed for all the formulations.

In the dry state, all the elongation at break values were similar. After the humidity exposure, the driven parameter is not the cross-linking but the plasticizing. The elongation values of un-plasticized films were not impacted while the formulation with PEG have theirs increased.

The mechanical properties confirm the cross-linking reaction and corroborate the effect of cross-linking with TPA on the behavior of "humid" gelatin based films already observed with the water vapor swelling tests.

6.6. Conclusion

Gelatin was successfully cross-linked with TPA, an innocuous agent. The cross-linking conditions were studied in terms of TPA concentration and reaction temperature using in-situ rheological characterizations on gelatin solutions and TNBS chemical assays on gelatin gel. The cross-linking process was more efficient at 60°C when all the polymer chains are in a triple helix free solution state. In addition, the optimal TPA concentration was 0.005 g/g Gelatin both in terms of cross-linking kinetic and achievable ratio. Increasing the cross-linker quantity only degraded the performance of the cross-linking reaction.

Gelatin membranes were prepared from cross-linked gels following a solvent free elaboration process. TPA not only contributed to gelatin cross-linking but also to increase the hydrophobicity of the gelatin matrix modifying by this way the membrane functional properties. TPA cross-linking increased 17 times the liquid water resistance time of gelatin films, and delayed the entry of vapor water in the polymer matrix for 7 days. TPA can be considered as a good candidate as "safe" gelatin cross-linker especially in applications where material toxicity is an important concern like tissue engineering. Additionally, TPA is a non-volatile agent allowing a simplification of the chemical safety procedures in industry.

7. Complément à la publication 4 : Relation perméation/structure des films de gélatine réticulés avec le téréphthalaldéhyde

Les membranes obtenues avec le procédé de réticulation décrit précédemment, c'est-à-dire 5mg de téréphthalaldéhyde par g de Gélatine dans une solution de gélatine à 60°C pendant 60 minutes avant étalement de la membrane à 30°C, ont été testées en perméation gazeuse pour quatre gaz à 25 et 90°C (Table IV- 16). Comme avec la gélatine seule, les membranes non plastifiées avec le PEG 200 n'ont pas pu être testées, elles ont cassé durant la phase de mise sous vide.

Table IV- 16 Influence de la réticulation de la gélatine avec le téréphthalaldéhyde sur les coefficients de perméabilité de He, CO₂, N₂ et O₂ à 25 et 90°C (les lettres représentent les différences significatives avec p < 0,05)

Membrane	Temperature (°C)	Permeability (Barrer)				Selectivity	
		He	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂ /O ₂	CO ₂ /N ₂
Gélatine-PEG200	25	0,2 ^a	0,08 ^a	0,03 ^a	0,007 ^a	11	3
	90	1,3 ^b	1,4 ^b	1,1 ^b	0,9 ^b	2	1
Gélatine-PEG200-TPA	25	0,5 ^c	0,4 ^c	0,2 ^c	0,1 ^c	4	2
	90	1,6 ^b	2,2 ^b	1,0 ^b	0,9 ^b	2	2

Il n'y a pas de différence significative entre les deux membranes réticulées ou non avec le TPA pour les valeurs de perméation obtenues à 90°C alors que la réticulation augmente la perméabilité à 25°C. Ces différences peuvent être théoriquement attribuées à deux phénomènes : une différence de cristallinité ou de quantité de volume libre. La mesure en DSC des degrés de renaturation (Table IV- 17) montre que les différences de perméabilité ne sont pas dues à une différence de cristallinité puisqu'ils ne sont pas significativement différents. Cela laisse penser que l'introduction du téréphthalaldéhyde et de son noyau aromatique, en s'intercalant entre les chaînes de gélatine, augmente le volume libre. En augmentant la température, le volume global du polymère (réticulé ou non) augmente du fait de l'accroissement de la mobilité des chaînes, et les différences de perméabilité entre les deux formulations s'estompent. Pour démontrer cette hypothèse il faudrait réaliser des analyses d'annihilation de positrons ce qui n'a pas été possible au cours de ce projet.

Table IV- 17 Propriétés thermiques des membranes réticulées avec le téréphthalaldéhyde

Membrane	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Degré de renaturation (%)
Gélatine-PEG200	71 \pm 2	76 \pm 1	19 \pm 1	40 \pm 2
Gélatine-TPA	75 \pm 2	102 \pm 2	20 \pm 2	43 \pm 5
Gélatine-PEG200-TPA	68 \pm 1	97 \pm 1	20 \pm 1	43 \pm 3

8. **Conclusions du chapitre IV**

La réticulation chimique des protéines est un sujet complexe du fait de la multiplicité des interactions possibles. Nous avons cependant montré que l'acide férulique est un réticulant approprié pour des applications en séparation gazeuse et son caractère biosourcé et peu toxique le rend attractif pour des applications en emballage alimentaire.

Nous avons également mis en place une méthode de réticulation inédite pour la gélatine avec le téréphthalaldéhyde, un dialdéhyde aromatique qui contrairement au glutaraldéhyde est classé comme non toxique. Nous avons déterminé les conditions optimales qui conduisent au plus haut taux de réticulation et établi les cinétiques de réticulation correspondantes. Le choix du téréphthalaldéhyde a permis d'améliorer la maîtrise du procédé de réticulation dans le cadre du contrôle des mécanismes d'élaboration. L'ajout du téréphthalaldéhyde a augmenté faiblement les coefficients de perméabilité.

Les deux réticulants étudiés sont tous les deux prometteurs et présentent des caractéristiques pouvant trouver des applications dans des domaines différents. La Table IV- 15 résume ces caractéristiques :

Table IV- 18 Caractéristiques comparées de l'acide férulique et du téréphthalaldéhyde

	Acide Férulique	Téréphthalaldéhyde
Origine	Biosourcé	Synthétique
Risque	Irritant	Non classé
Hydrosoluble	Oui	Non : nécessité de le pré-dissoudre dans un solvant organique (DMSO,..)
Ajout de réactif complémentaire	Oui : pour maximiser le potentiel de réticulation il faut se placer en conditions oxydantes	Non
Fonctions réticulables	Amines, thiols, acides carboxylique, hydroxyles (suivant les conditions oxydantes ou non)	Amines
Mécanismes de réticulation	Molécule plurifonctionnelle, 3 mécanismes possibles, contrôle plus difficile des mécanismes, en particulier en cas de mélange protéine/polymère synthétique. Mais plus de possibilité en termes de polymères réticulables.	Molécule homofonctionnelle, réaction de Schiff, contrôle plus facile des cinétiques de réticulation
Résistance à l'eau	≈ 4h dans l'eau liquide pour une réticulation en condition non oxydante Résistance à 80% RH > 15 jours (arrêt du test et non dégradation)	≈ 27h dans l'eau liquide Retarde de 7 jours l'entrée de l'eau sous forme de vapeur. Résistance à 80% RH > 3 mois (arrêt du test et non dégradation)

Toutes les valeurs de coefficients de perméabilité obtenues pour la gélatine sont trop faibles pour envisager une application en séparation gazeuse. La production de membranes formulées à partir du mélange de la gélatine avec des élastomères a donc été considérée.

Elaboration de membranes gélatine/polyéther amine

1. **Introduction**

Les chapitres III et IV ont montré que la réticulation et l'ajout de PEG200 à la gélatine permettait d'obtenir des films aux propriétés plutôt barrières aux gaz. Pour une application en séparation gazeuse, les perméabilités obtenues sont trop faibles. L'ajout d'un élastomère a été envisagé afin de modifier la structuration des membranes et leur cristallinité, favorisant ainsi la perméation. L'objectif de ce chapitre est de mélanger la gélatine avec un élastomère CO₂-phile pour augmenter plus spécifiquement la perméabilité des membranes au CO₂ par rapport aux autres gaz afin de donner de bonnes valeurs de sélectivité. Les propriétés de transport gazeux des membranes obtenues ont été étudiées afin de démontrer la pertinence de l'utilisation de la gélatine dans le domaine des membranes.

Nous avons choisi de travailler avec la famille des polyéther amines (PEA), une famille d'élastomère qui présente le même squelette que les polyéther oxyde (PEO) reconnus pour leur CO₂-philie (Charmette *et al.* 2004; Lin *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005). De plus les fonctions amine terminales de ces polymères permettent de les réticuler avec le même dialdéhyde que la gélatine : le téréphthalaldéhyde (TPA). Nous avons au cours de cette thèse testé cinq PEA différents. Cependant dans ce manuscrit ne seront décrit que les résultats concernant le D600 et la T3000 puisque ce sont eux qui ont permis d'obtenir les membranes les plus solides et homogène macroscopiquement.

Ce chapitre est divisé en trois parties :

(1) La première partie étudie l'influence de la température entre 298K et 353K du flux gazeux sur les coefficients de perméabilité de trois gaz (CO₂, He et N₂) pour six formulations de mélange PEA/gélatine. Nous avons testé deux PEA, une diamine et une triamine, pour trois compositions massiques.

(2) La deuxième partie concerne un complément à la publication où sont montrés les coefficients de diffusion obtenus par la méthode du time-lag.

(3) La troisième partie présente les premiers résultats obtenus avec le pilote permettant de mesurer la perméation de mélange de gaz en conditions humides. La membrane testée est G-T3000-100 (1g de T3000/g de gélatine réticulée avec le TPA) qui s'est révélée, suite à l'étude en température, la plus prometteuse.

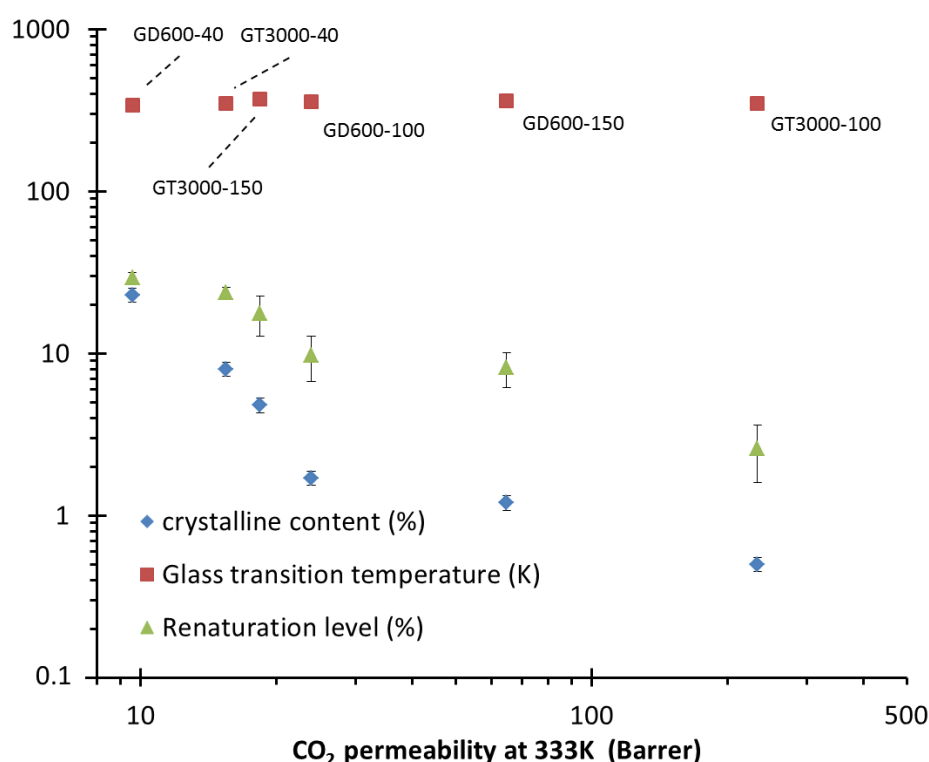
2. Publication 5:

Gas permeability properties of gelatin/polyetheramine blend membranes made without organic solvent

Jennifer Biscarat, Christophe Charmette, José Sanchez, Celine Pochat-Bohatier*

En préparation pour une soumission à Separation and Purification Technology.

2.1. Graphical abstract



2.2. Abstract

This study aims at developing bioartificial blend membranes using gelatin as the filmogenic agent and a green processing route. Two water-soluble, CO₂-phile, polyetheramine (PEA) synthetic polymers were added to gelatin to prepare the membranes. This present work focusses on the temperature effect on the gas permeability properties of PEA/gelatin blend membranes cross-linked with a non-toxic chemical (terephthalaldehyde - TPA). The permeability coefficients were related to the structural characteristics of the membranes. Increasing the gas flux temperature from 298 to 353K raised the CO₂ permeability up to 19 times. CO₂, N₂ and He permeability increased steadily with diamine content while they showed an optimum for the triamine, with CO₂ permeability up to 250 Barrer, linked to the semi-crystalline nature of both gelatin and PEAs. The

highest CO₂/N₂ selectivities were observed for the highest permeability values. However, the overall selectivity values remains too low for gas separation application but the growing trend of using “green” materials demands the study of the gas transport properties of alternative bio-based membrane.

Key-words. blend membrane, gas permeability, CO₂, biopolymer, polyetheramine

2.3. Introduction

The manufacturing of membranes with synthetic polymer implies using large quantities of organic solvents which are generally toxic and costly to disposal since they have to be eliminated from effluents. Developing gas separation membranes with biosourced polymers represents an alternative to petroleum-based material. These polymers become really interesting when they can be dissolved in water, avoiding the use of large quantities of organic solvents. As the large use of polymers from natural raw materials would require intensified farming of energy crops in competition with food production, material developments should be done now in direction of biopolymers coming from industrial by-products. Gelatin is an attractive choice since it represents a good equilibrium between human food consumption and valorization of industrial by-products. It is obtained by controlled hydrolysis of collagen, a fibrous insoluble protein, which is widely found in nature as the major constituent of skin, bones and connective tissue (Gómez-Guillén *et al.* 2011). This biopolymer has been extensively used in the food and pharmaceutical industry for its gelling and texturing properties. However since the Bovine Spongiform Encephalopathy crisis and taking into consideration the religious usages, gelatin in Food Industry tends to be replaced by alginate or agar-agar.

The main drawback of gas separation membranes from biopolymers is the low gas permeability of these materials which makes them incompatible with gas treatment processes but more attractive for packaging applications (Pochat-Bohatier *et al.* 2006). Indeed, gelatin is a semi-crystalline polymer which crystallinity is consisting of the organization of protein chains in collagen like triple helices. This peculiar structure hinders the gas diffusion and makes gelatin a barrier material (Biscarat *et al.* 2015; Biscarat *et al.* In press). The phenomenon of folding/unfolding the triple helices is called renaturation/denaturation of gelatin.

One interesting way to improve permeability fluxes is the addition of a second polymer or elastomer and to rather prepare bioartificial blend membranes, even if the addition of synthetic polymers reduces the “green concept” of gas separation membrane made only from biopolymers. One way to keep as possible the environmental friendly character of the process is to avoid using organic solvents by adding hydrosoluble synthetic polymers.

Gelatin and low molecular weight polyetheramine (PEA) are water soluble; while this characteristic permits to develop a solvent free process, it could become a drawback if the membranes are in contact with water during their use. Thus the membranes have to be cross-linked. The most used cross-linker for gelatin is the glutaraldehyde, a highly reactive dialdehyde (Bullón *et al.* 2000; Bigi *et al.* 2001; Catalina *et al.* 2011; Martucci *et al.* 2012). It reacts with the amine function of gelatin via several mechanisms (Migneault *et al.* 2004). Polyethylene oxide polymers (PEO) are known for their CO₂-phily (Charrette *et al.* 2004; Lin *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005). PEAs have the same backbone functions than PEOs with amine terminal functions which make them cross-linkable by dialdehydes. However glutaraldehyde is a toxic compound (Bonnard *et al.* 2010), it was thus replace by a non-volatil and innocuous dialdehyde, terephthalaldehyde (TPA). This compound is known to form imine via Schiff base reaction with the amine function of chitosan (Chu *et al.* 2013). TPA can thus create cross-links between gelatin and gelatin, gelatin and PEA, PEA and PEA. In our best knowledge there is not reference in the literature to the use of this cross-linker with gelatin.

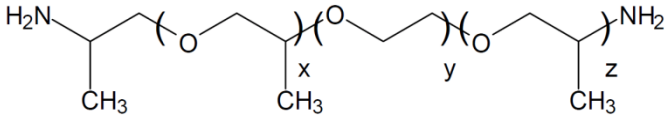
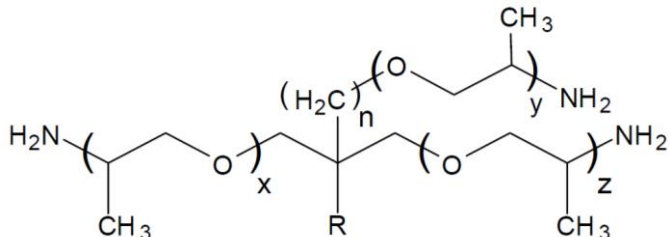
This present work focusses on the effect of the temperature and formulation on the gas permeability of bioartificiel PEA/gelatin blend membranes cross-linked with TPA and prepared without organic solvent.

2.4. *Experimental*

2.4.1. Materials

Gelatin (Type A, Bloom 188) was purchased from Sigma. Terephthalaldehyde (TPA, Aldrich) was used as cross-linker without further purification. Two polyether amine synthetic polymers (D600, T3000, Table V- 1) were kindly supplied by Huntsman Holland BV.

Table V- 1 Formulae and molecular weight of the synthetic polymers

Name	Formulae	Mw (g/mol)
D600		≈ 600
T3000		≈ 3 000

2.4.2. Preparation of membranes

Film-forming solutions were prepared by dissolving 20wt-% gelatin powder in demineralized water at 60°C, under stirring until complete dissolution. Bioartificial blend membranes were prepared by adding directly to the solution, D600 or T3000 at 0.4, 1 and 1.5 g/g of gelatin in gelatin solutions and then stirred à 60°C for 1 hour. The cross-linking process was integrated in the formulation step. TPA (0.005g/g of gelatin) was first dissolved in DMSO and then added to the gelatin/PEG or gelatin/PEA systems in solution at 50°C and stirred for 1 hour before casting, such as residual DMSO content in gelatin solution is less than 0.1%. Films were prepared by dry-casting of the gelatin solution at 30°C on flat Teflon coated sheets thanks to a K Control Coater 101 (Ericksen Instruments). The solution was cast at 500µm with an Ericksen Mod.411 0956 casting knife. Gelatin and blend films were allowed to dry at 20°C under (45 ± 5)% relative humidity (RH) during 2 days. All membranes were stored at 20°C in a desiccant box (ca. 25 ± 5 % RH) before subsequent analysis.

Table V- 2 Composition of studied membranes

Membranes	Composition	
	gPEA/gGelatin	mol(PO/EO)/g(Gelatin)
GD600-40	0.4	$6.0 \cdot 10^{-4}$
GD600-100	1	$1.5 \cdot 10^{-3}$
GD600-150	1.5	$2.3 \cdot 10^{-3}$
GT3000-40	0.4	$1.3 \cdot 10^{-4}$
GT3000-100	1	$3.2 \cdot 10^{-4}$
GT3000-150	1.5	$4.9 \cdot 10^{-4}$

PO/EO: propylene oxide and ethylene oxide (monomers of PEA)

2.4.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal properties were determined on membranes at $45 \pm 5\%$ humidity. The membranes were analyzed using a differential scanning calorimeter DSC 2920 equipped with cooling accessory RCS90 (TA Instruments). The samples (≈ 6 mg) were sealed in aluminum TA pan. The instrument was calibrated with pure indium ($T_m = 156.6^\circ\text{C}$ and $\Delta H_m = 28.3$ kJ/kg) and used an empty pan as reference. Membranes were cooled from 25°C to -40°C and then heated up to 230°C with a $100^\circ\text{C}/\text{min}$ heating rate. This high speed permitted a better peak resolution between the denaturation and the degradation endotherms and to determine glass transition temperature. The renaturation level of gelatin was calculated from the denaturation endotherm following the method described by Achet et al. (Achet *et al.* 1995).

2.4.4. X-Ray diffraction

The apparent crystallinity was determined by X-ray diffraction (PanAnalytical X'pert-Pro diffractometer). To eliminate the uncertainty due to the gelatin water content, the experiments were conducted in a sealed chamber (Anton Paar HT1200) after 15 hours under vacuum, at room temperature. The crystallinity was determined considering the ratio between the area under the crystalline peak and the area under the amorphous halo following the method used by Charmette et al. (Charmette *et al.* 2009). Gelatin diffractogram shows two peaks: one about 7° and one between 17 to 22° representing respectively the triple-helical crystalline structure and the amorphous part of gelatin (Yakimets *et al.* 2005; Rivero *et al.* 2010; Andreuccetti *et al.* 2011).

2.4.5. Gas permeation experiments

Permeation experiments were carried out by using the constant-volume and variable-pressure technique in a permeability apparatus at controlled temperature from 298 K to 353 K, described in the standard ASTM D 1434-82 (procedure V). The apparatus consists essentially of a two compartments permeation cell separated by the tested membrane. The permeability was obtained measuring the pressure increase in the downstream compartment (with a constant volume of $5.25 \times 10^{-5} \text{ m}^3$) and using different MKS Baratron pressure transducers (range from 0.0 to $1 \times 10^5 \text{ Pa}$). The films and downstream cell walls were outgassed in situ during 15 hours at high vacuum using a turbomolecular pump (Leybold, Turbovac 50, $50 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$). The permeability experiments were performed using $3.0 \times 10^5 \text{ Pa}$ of upstream pressure and recording the pressure increase in the downstream compartment during 4 hours. For each temperature change, the whole setup was allowed to stabilize during at least 12 hours. The magnitude of purity of gases used (He, CO_2 , N_2) was of 99.95%, they were used without any further purification. A complete description of the apparatus and methodology used was already published (Joly *et al.* 1997). For calculations of the permeability, the mathematical treatment for thin films based on Fick's second law and reported by Crank (Crank 1975) was used. The values presented are the mean of at least 2 repetitions. The standard deviations were not represented since they were lower than the error induced by the analysis itself which was evaluated at 10%

2.5. Results and discussions

2.5.1. Influence of temperature on gas permeability

Table V- 3 reports the gas permeability coefficients for He, CO_2 and N_2 between 298 and 353 K for the six different blend membranes. The data show an increase of the permeability coefficients with temperature following an Arrhenius' Law. Permeability coefficient is on average 6 times increased. But depending on the formulation, it can be up to 19 times for CO_2 permeation through G-D600-40 and can reach 250 Barrer at 353K through GT3000-100. Blending PEO backbone polymers with other synthetic polymers greatly increase the CO_2 permeability coefficient. Charmette *et al.* (Charmette *et al.* 2004) showed that producing copolymers poly(ethylene oxide-co-epichlorohydrin) permitted to reach CO_2 permeability up to 95 Barrer and CO_2/N_2 selectivity up to 62.9 at 298K and 3Bar. Liu *et al.* (Liu *et al.* 2013) reviewed the effect of blending PEO with other polymers and referenced a wide range of permeability and selectivity, depending on the nature of the polymer. CO_2 permeability coefficients obtained with the blend membranes were between 5.8 and 896 Barrer with CO_2/N_2 selectivity from 9 to 109. The permeability values obtained in this study are in the range of the properties observed with

synthetic polymer. Moreover, an outstanding increase of the permeability values was obtained compared to those determined in previous studies on gelatin-PEG200 blend membranes (1.4 Barrer at 353 K (Biscarat *et al.* 2015) and 0.045 Barrer at 298 K (Biscarat *et al.* In press)).

The temperature dependence of permeability has been well established for synthetic polymers (Barrer 1937; Comyn 1985; Rowe *et al.* 2010). However few studies can be found on the gas transport properties of biopolymer especially for gases other than O₂. Arvanitoyannis *et al.* (Arvanitoyannis *et al.* 1998a; Arvanitoyannis *et al.* 1998b) showed for starch/gelatin and chitosan/gelatin blends that the gas permeability values followed two Arrhenius' laws with a slope rupture at the glass transition temperature. This type of behavior was not observed for the gelatin/PEA blends in the tested temperature range. Our group studied the temperature dependence of gelatin/polyethylene glycol 200 blends gas permeability, and no slope rupture was observed neither (Biscarat *et al.* 2015). However gelatin is a semi-crystalline polymer but unlike synthetic polymers, the structural rearrangement does not occur at the glass transition temperature but at the denaturation temperature. The denaturation temperature depends on the formulation of the blend membranes (Table V- 4). All the denaturation temperatures measured by DSC are above 353K, the highest temperature used during the permeation experiments, meaning that for all the temperatures tested, all the membranes were in their semi-crystalline state.

Table V- 3 Influence of temperature on gas permeability coefficients for G-D600 and G-T3000 blend membranes for He, CO₂ and N₂

Temperature (K)	Gas permeability (Barrer)								
	GD600-40			GD600-100			GD600-150		
	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂
298	2	1	2	9	3	4	15	12	11
308	7	6	3	9	4	6	19	36	26
333	11	10	5	15	24	14	50	65	30
353	14	19	9	30	25	27	104	113	56
	GT3000-40			GT3000-100			GT3000-150		
	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂
298	3	3	1	36	32	13	14	11	5
308	5	6	2	74	115	30	14	11	8
333	11	15	6	185	233	41	13	18	12
353	14	21	8	194	250	62	24	36	16

the error induced by the analysis setup was evaluated at 10%

Table V- 4 Thermal properties of GD600 and GT3000 blend membranes : glass transition temperature (T_g), denaturation temperature (T_d) and denaturation enthalpie (ΔH_d)

	T _g (K)	T _d (K)	ΔH _d (J/g)
GD600-40	340 ± 1	383 ± 1	14 ± 2
GD600-100	357 ± 4	397 ± 1	5 ± 3
GD600-150	363 ± 1	378 ± 1	4 ± 2
GT3000-40	348 ± 2	389 ± 1	11 ± 4
GT3000-100	350 ± 1	386 ± 1	1 ± 2
GT3000-150	372 ± 5	418 ± 3	9 ± 5

Values are given as average ± standard deviation determined on 3 samples

2.5.2. Influence of formulation on gas permeability

To study the influence of the PEA nature on the gas permeation, two different PEA were tested, a diamine D600 and a triamine T3000, at three concentrations in the PEA/Gelatin blends (Table V-3).

Increasing the diamine content increased all the permeability values of the three gases. The rise of permeability can be due to two contributions: a rise of diffusion and/or solubility coefficients. The increase of the permeability coefficients for He, a small and permanent gas, indicates an increase of the diffusion coefficient that could be related to an increase of free volumes. Concerning CO₂, the combining effect of temperature and PEA addition, allowed increasing the CO₂ permeability coefficient above the helium permeability. Since CO₂ has a higher kinetic diameter (0.33 Å) than He (0.26 Å) (Breck 1973) but also presents a higher permeability through the membrane, this indicates that the interactions between CO₂ and the membranes molecules led to a rise of the solubility coefficient for CO₂. For respectively GD600-40, GD600-100 and GD600-150, the temperature for which the CO₂ permeability exceeds He permeability were respectively 353, 333 and 308K displaying that the higher the PEA content is, the lower the trigger temperature needs to be. These observations are consistent with the well-known interactions between CO₂ and the PO/EO polymers (Charmette *et al.* 2004; Lin *et al.* 2004). Moreover, N₂ permeability coefficients, a gas of similar size with CO₂ (respectively 0.364 Å and 0.33 Å (Breck 1973)), always remained lower than the permeability coefficients of helium. This result confirms that the CO₂ permeability is certainly enhanced by a higher solubility in the membrane material.

Concerning the influence of the triamine content, some phenomena observed are the same that for the D600/gelatin blends, i.e. the CO₂ reaches higher permeability than He whereas N₂ permeability was still lower than CO₂ and He permeability. Nevertheless one of these blend membranes presented a distinctive behavior. Indeed a peak in permeability is observed for GT3000-100. This peak exists for the three gases indicating an influence on the diffusion coefficient. To rule out a unique influence of solubility, the non-linear correlation between the permeability coefficients and the molar content of PO/EO has to be shown. The Figure V- 1 displays the permeability coefficients vs molar PO/EO content for N₂ and CO₂. There is no steady increase of permeability with elastomer content confirming that the increase of solubility is not the only phenomenon involved in the global behavior observed.

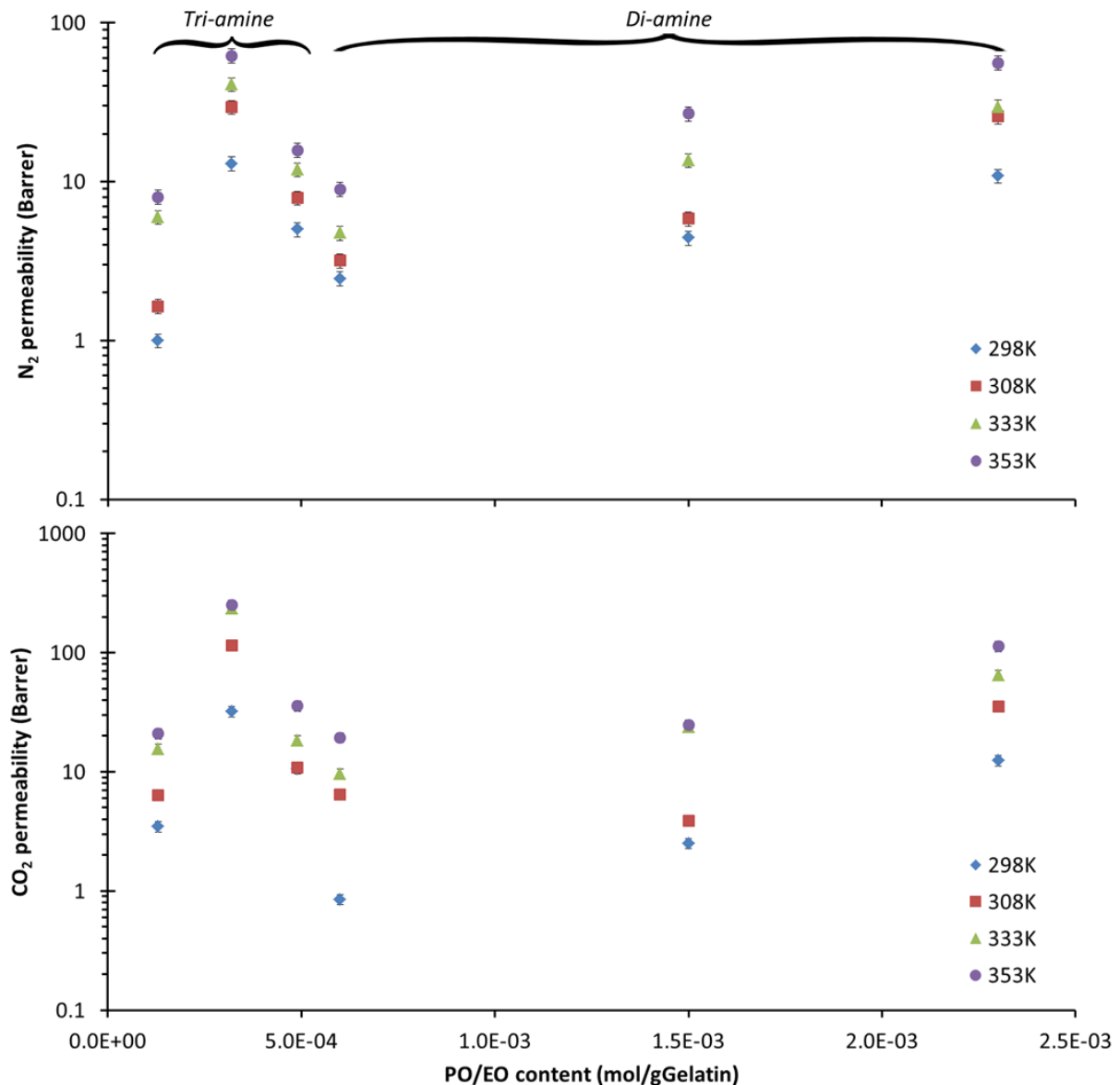


Figure V- 1 Influence of the PO/EO molar content on the CO₂ and N₂ permeability coefficients.

It is worth noting that PEAs depending on their size can be, like gelatin, semi-crystalline polymers. Moreover, the addition of an elastomer like PEA can also modify the gelatin structuration and a modification of the crystallinity cannot be excluded. It is accepted that in a semi-crystalline polymer both mechanisms involved in the gas transport, sorption and diffusion, take place exclusively in the amorphous regions because these regions are rigid and then stop the molecular diffusion necessary for the penetration of gaseous molecules (Michaels *et al.* 1959; Michaels *et al.* 1961b, a). In order to study the crystallinity of the blends, they were characterized by X-Ray diffraction. Furthermore, the contribution of the gelatin to the global crystallinity of blends was studied by determining the renaturation level thanks to DSC measurements using the method developed by Achet *et al.* (Achet *et al.* 1995). The renaturation level of different films was

determined on membranes at the equilibrium state for residual humidity about 14%. The denaturation endotherm is directly related to the denaturation of the collagen like triple helix (Achet *et al.* 1995). The identification of the different thermal events on a typical thermogram obtained in this study is presented in Figure V- 2. Calculating the ratio between the gelatin membrane denaturation enthalpy (Table V- 4) and the value of the denaturation enthalpy of pure porcine skin collagen, $\Delta H_{\text{denat coll}} = 47.8 \text{ J/g}$ (Samouillan *et al.* 2011), allows the determination of the renaturation level of films.

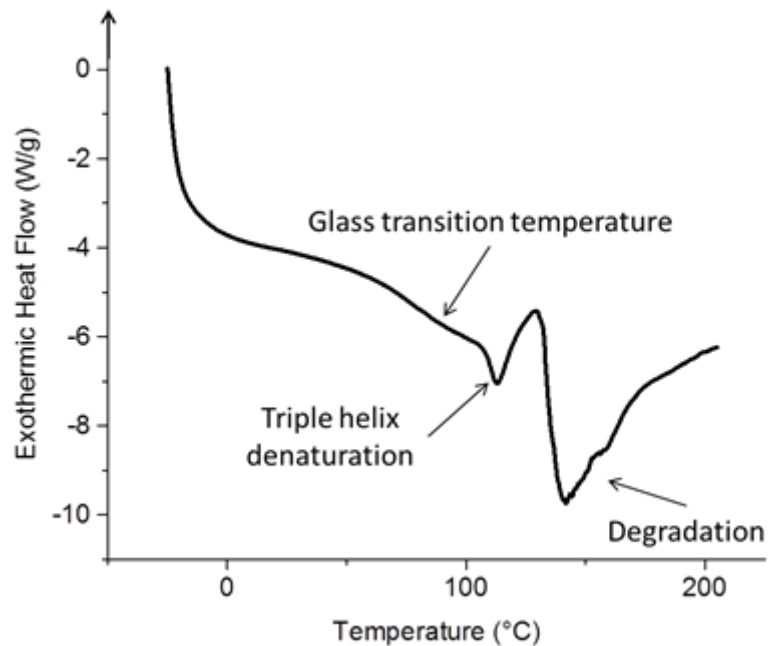


Figure V- 2 Typical DSC thermogram obtained with PEA/gelatin blends and used to determine Tg and denaturation heat flow

Figure V- 3 and V- 4 show the correlation between the gas permeability and the membrane material characteristics; the glass transition temperature and the crystallinity levels: global (crystalline content) and specific of the gelatin (renaturation level). It can be seen that as discussed above, the glass transition temperature has not particular effect on the permeability coefficients. However, the increase of permeability is directly linked to the crystalline content. Both the global crystalline content and the gelatin triple helix content are related to the permeability coefficients values.

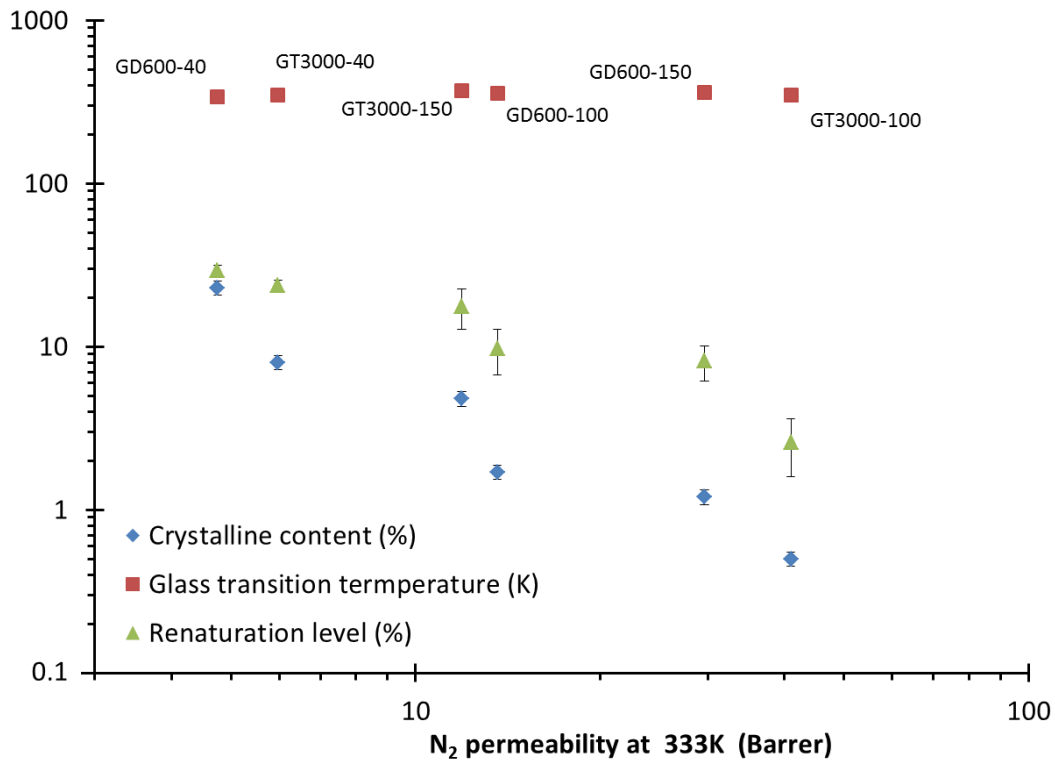


Figure V- 3 Connection between N_2 permeability and material characteristics (values are given as average \pm standard deviation determined on 3 samples)

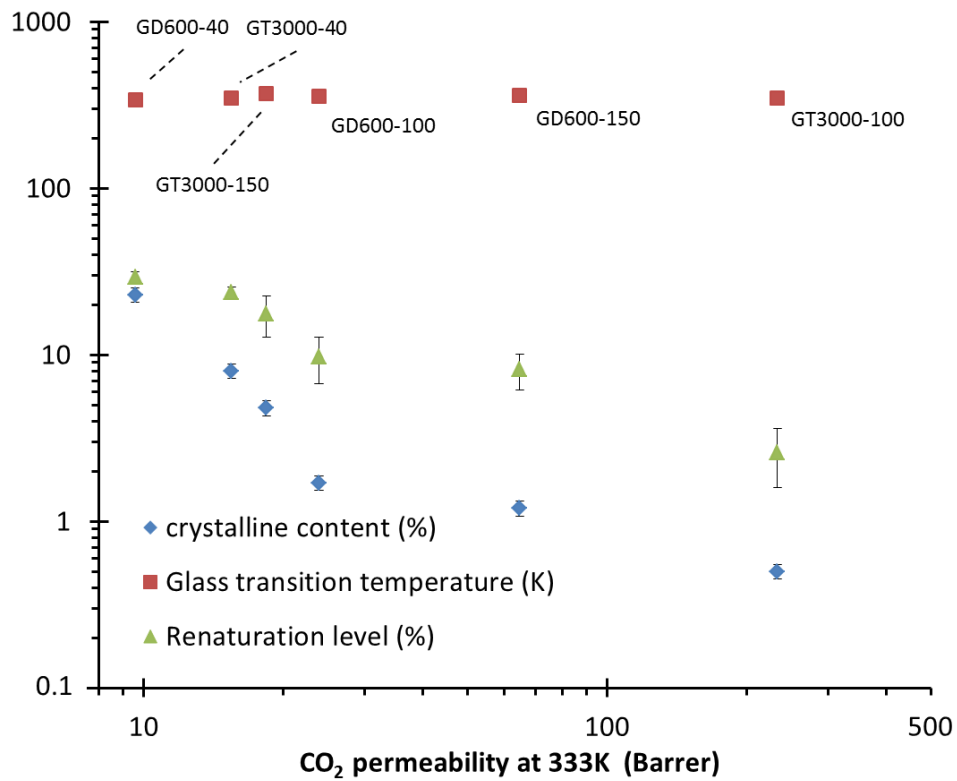


Figure V- 4 Connection between CO_2 permeability and material characteristics (values are given as average \pm standard deviation determined on 3 samples)

As stated previously, the PEA can also be semi-crystalline polymers. Since the addition of elastomers can modify the structuration of gelatin, it is complex to relate the global crystallinity to the triple helix content. Indeed the renaturation level is directly related to the triple helical content of the gelatin fraction. Thus by normalizing the crystalline content and renaturation level with respect to the gelatin content in the blend membranes, the influence of the PEAs on triple helices formation can be seen (Figure V- 5). Indeed if the PEAs do not bring any crystallinity of their own, all the crystalline content would be related to the triple helix content and the values should have a linear relationship. Membranes made exclusively with gelatin were also tested to provide a reference value of crystallinity and renaturation level. For a renaturation level of 61%, the crystallinity was 30%. In this case all the crystalline content is attributed to the gelatin triple helices. The Figure V- 5 shows that for all the blend membranes tested, the addition of PEA reduced both the renaturation level and the global crystallinity which means that the renaturation phenomenon was hindered by the elastomers. Except for GD600-40, the blend membranes values are aligned with the gelatin alone sample indicating that the elastomers are in the amorphous state. For GD600-40, the global crystallinity content is higher that it would have been for the gelatin alone which shows that D600 brought some crystallinity of its own. This observation is confirmed by the X-ray diffractograms. Indeed, only GD600-40 diffractogram displays peaks others than the gelatins ones (Figure V- 6).

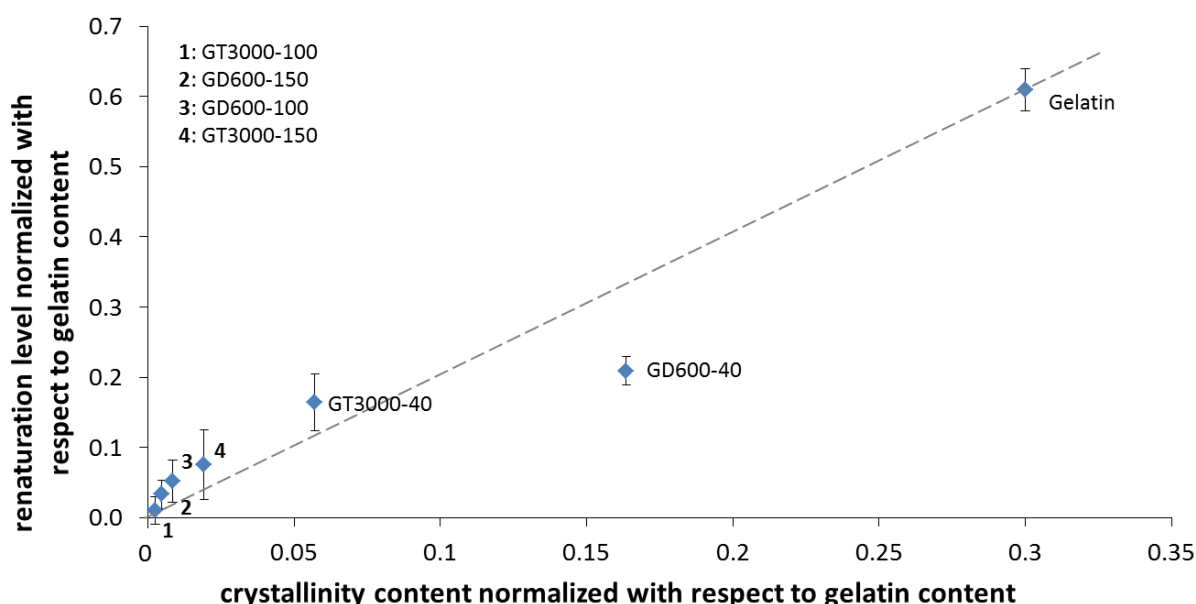


Figure V- 5 Influence of PEAs on the triple helix content/crystallinity relationship (values are given as average \pm standard deviation determined on 3 samples)

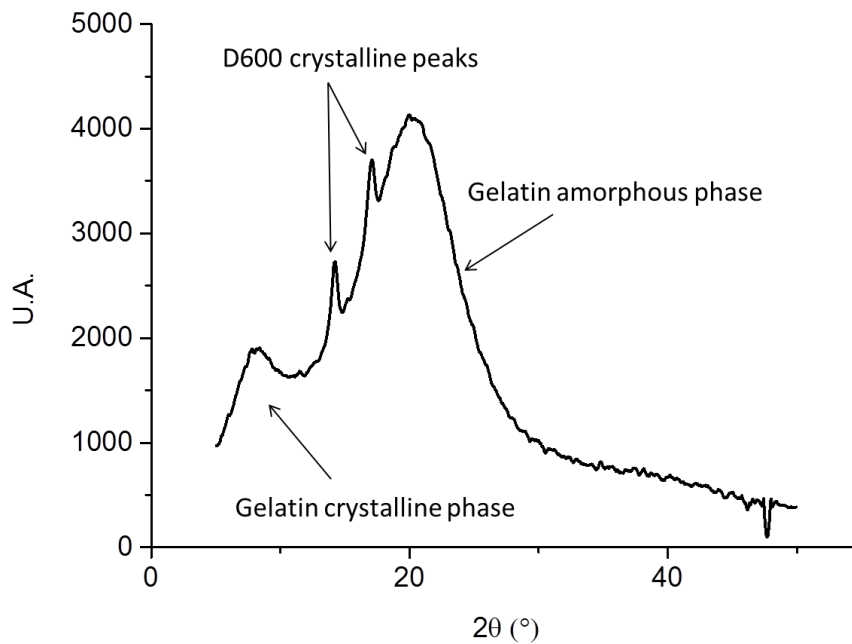


Figure V- 6 X-ray diffractogram of GD600-40 membrane

2.5.3. Selectivity

The Table V- 5 displays the selectivity values for CO₂/N₂ and CO₂/He. First it can be noticed that no clear tendency can be observed concerning the influence of temperature on the selectivity which is relatively low for all pair of gases studied, ranging from 0 to 6 for CO₂/N₂ and 0 to 2 for CO₂/He. For all the GD600 blends, no influence of the diamine content is either seen. Concerning the GT3000 blends, an original behavior was observed. It is very interesting to notice that against the classical permeability-selectivity tradeoff relation formalized by Robeson and Freeman et al. (Robeson 1991; Freeman 1999; Robeson 2008), the highest CO₂/N₂ selectivity values are observed for the highest permeability values for GT3000-100. It is possible that the low crystallinity of GT3000-100 makes accessible a lot of new sites for interaction, increasing the solubility selectivity while allowing an easier diffusion through the free volumes. Indeed, the absence of triple helices increased the polymer chains mobility, decreasing the diffusivity selectivity (Tanaka *et al.* 2006). These higher values of selectivity indicate that the solubility selectivity prevails on the diffusivity selectivity. Adding more T3000 raised the crystalline content and thus the solubility selectivity influence decreased in favor of the diffusivity selectivity. In the case of CO₂/N₂ separation, the two gases having similar size, the diffusivity selectivity has very low impact. This is confirmed by the lower selectivity values of more crystalline membrane for which the diffusivity selectivity prevails.

Table V- 5 Influence of temperature on selectivity coefficient values for G-D600 and G-T3000 blend membranes

Temperature (K)	Selectivity					
	GD600-40		GD600-100		GD600-150	
	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂
298	1	0.3	0.3	1	1	1
308	1	2	0.4	1	2	1
333	1	2	2	2	1	2
353	1	2	1	1	1	2
	GT3000-40		GT3000-100		GT3000-150	
	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /He	CO ₂ /N ₂
298	1	3	1	2	1	2
308	1	4	2	4	1	1
333	1	3	1	6	1	2
353	2	3	1	4	2	2

2.6. Conclusions

In this work we presented new blend "green" membranes prepared without using toxic agent and following a solvent-free elaboration process. These composite membranes were prepared with gelatin, different PEAs and cross-linked with TPA. The combining effects of both temperature and formulation on gas permeability were investigated for He, CO₂, N₂. All the membranes showed a classical evolution of permeability fitting an Arrhenius' law. The permeability coefficients were increased on average 6 times and up to 19 times for GD600-40 by rising the temperature from 298K to 353K, and reached 250 Barrer for GT3000-100. Moreover using PEA instead of PEG permitted to drastically increase the CO₂ permeability (1.4 Barrer at 353 K and 0.045 Barrer at 298 K for gelatin-PEG200 blend membranes).

The addition of the diamine increased monotonously the permeability coefficients while adding the triamine led to an optimum for GT3000-100. This optimum had to be related to the semi-crystalline nature of both gelatin and PEAs. Investigating the structuration of the membranes

confirmed that the addition of PEAs interfered in the renaturation of gelatin hindering the triple helices formation. GT3000-100 was also the membrane presenting the best selectivity which indicated that the solubility selectivity was the prevailing mechanism. However, the overall selectivity values remains too low for gas separation application but the increasing demand for "green" materials makes necessary the study of the gas transport properties of alternative bio-based membrane. In our knowledge this study is the first report on the gas permeability properties of such blend green gelatin-based.

3. Complément à la publication 5: les coefficients de diffusion

Les expériences de perméation menées au cours de l'étude présentée dans la publication 5, ont permis de calculer les coefficients de diffusion avec la méthode du time-lag (Table V- 6). Cependant, cette méthode engendre une grande incertitude suivant l'allure des courbes Pression aval vs. Temps.

Les coefficients de diffusion de l'azote sont inférieurs ou égaux à ceux de l'hélium. Ces résultats sont cohérents au vu de la différence de taille entre les deux molécules (respectivement 0,364 Å et 0,26 Å (Breck 1973)). L'hélium, plus petit, diffuse plus rapidement dans la matrice polymère. Le CO₂ grâce aux interactions qu'il peut établir avec la gélatine et les PEA présente un comportement plus complexe et la seule tendance qui semble s'affirmer est que ses coefficients de diffusion sont supérieurs à ceux de l'azote. Les deux molécules ont des tailles similaires (CO₂ 0,33 Å et N₂ 0,364 Å (Breck 1973)) ce qui ne peut pas expliquer les différences observées. D'autres mécanismes doivent entrer en jeu comme les interactions physico-chimiques.

Table V- 6 Influence de la température sur les coefficients de diffusion déterminés expérimentalement pour les membranes G-D600 and G-T3000 pour He, CO₂ and N₂

Température (K)	Coefficient de diffusion ($10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)								
	G-D600-40			G-D600-100			G-D600-150		
	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂
298	9	20	10	NA	0.1	NA	10	30	3
308	20	80	10	30	NA	NA	10	30	2
333	80	60	30	30	5	4	20	30	3
353	100	90	30	30	10	30	20	4	6
	G-T3000-40			G-T3000-100			G-T3000-150		
	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂	He	CO ₂	N ₂
298	2	NA	1	30	2	0.6	10	6	1
308	2	9	2	7	40	2	10	9	9
333	2	3	3	10	40	3	8	20	20
353	3	4	3	NA	60	3	20	20	20

NA: Le coefficient n'a pas pu être déterminé à partir d'aucune des différentes séries mesurées.

4. Influence de l'humidité relative sur les propriétés de perméation gazeuse

Deux échantillons de G-T3000-100 (#1 et #2) (1g de T3000/g de gélatine réticulée avec le TPA) ont été testés pour différentes humidités relatives. Nous avons montré dans le chapitre IV que la réticulation avec le TPA permet de retarder l'entrée de l'eau dans la structure d'une semaine. Les deux échantillons ont donc été mis dans la cellule de mesure et en contact avec le flux gazeux humide au moins sept jours avant la première mesure. Les mêmes débits de gaz en amont et au niveau du balayage aval ont été utilisés pour l'ensemble des mesures (Table V- 7). L'enceinte thermostatée se trouve à 273K.

Table V- 7 Débits des gaz fixés pour l'ensemble des mesures

Débit mélange amont (mL.min ⁻¹)			Débit balayage aval (mL.min ⁻¹)
O ₂	N ₂	CO ₂	He
10	40	50	100

Pour l'échantillon G-T3000-100#1, le flux de gaz perméant était suffisamment élevé pour être mesuré avec un débitmètre électronique. Les coefficients de perméabilité et les facteurs de séparation ont pu être calculés directement par la méthode décrite dans le chapitre II. Ces résultats sont présentés dans la Table V- 8

Table V- 8. On observe que les valeurs de perméabilité sont beaucoup trop importantes. La membrane ne semble pas être étanche. Cette hypothèse est soutenue par la valeur du facteur de séparation N₂/O₂ proche de 1 qui indique qu'il n'y a pas de séparation entre les deux composants de l'air. Les valeurs concernant le CO₂ sont plus surprenantes puisqu'elle indique que la membrane serait moins perméable au CO₂ qu'aux autres gaz. Au vu des résultats obtenus pour les gaz secs, cette explication n'est pas crédible. Plus plausible est l'hypothèse que la plus grande solubilité du CO₂ dans l'eau doit favoriser des pertes au niveau de la zone de contact gaz/eau ou que le CO₂ forme des carbonates au niveau de la zone de séchage du flux perméant avant injection dans le GC/TCD.

Table V- 8 Coefficients de perméabilité et facteurs de séparation pour la membrane G-T3000-100#1

%HR	ΔP (Pa)	Débit aval mesuré (ml.min ⁻¹)	Perméabilité de chaque gaz (Barrer)			Facteur de séparation		
			mélange	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /O ₂
82	6100	7.4	73560	98445	25179	0.60	0.58	0.98
86	6500	9.6	75505	106961	24478	0.56	0.62	1.09
86	6800	8.6	66725	89300	22840	0.60	0.58	0.98
89	6000	8.6	80382	113671	28069	0.57	0.57	1.01
96	6400	8.6	77713	111719	27657	0.56	0.56	1.01
95	6900	10.7	90555	120844	29693	0.60	0.61	1.02

Table V- 9 Coefficients de perméabilité et facteurs de séparation pour la membrane G-T3000-100#2

%HR	ΔP (Pa)	Proportion dans le flux aval (%)			Dilution corrigée	Proportion finale corrigée (%)			Pourcenta ge total obtenu avec la dilution corrigée	Débit aval déduit (ml/min)	Perméabilité de chaque gaz (Barrer)			Facteur de séparation		
		CO ₂	N ₂	O ₂		CO ₂	N ₂	O ₂			CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /O ₂	N ₂ /O ₂
45	7800	0.024	0.36	0.061	225	5.4	81.2	13.8	100.4	0.44	432	6523	1111	0.05	0.10	1.47
60	8900	0.024	0.37	0.062	223	5.3	81.6	13.9	100.8	0.45	379	5795	987	0.05	0.10	1.47
61	8100	0.024	0.36	0.062	225	5.4	80.6	13.8	99.7	0.44	415	6232	1071	0.05	0.10	1.46
76	8500	0.024	0.37	0.064	220	5.2	81.1	14.0	100.3	0.45	391	6117	1054	0.05	0.09	1.45
77	8200	0.023	0.37	0.062	220	5.1	80.6	13.6	99.4	0.45	402	6303	1065	0.05	0.09	1.48
80	8500	0.024	0.41	0.062	203	4.9	82.7	12.6	100.1	0.49	400	6755	1027	0.05	0.10	1.64
86	8500	0.029	0.37	0.062	218	6.2	80.8	13.5	100.5	0.46	473	6150	1027	0.06	0.12	1.50
85	8600	0.029	0.36	0.062	220	6.4	79.8	13.7	99.8	0.45	476	5945	1018	0.06	0.12	1.46
86	9100	0.035	0.38	0.062	213	7.4	80.3	13.2	100.9	0.47	539	5839	961	0.07	0.14	1.52
85	9500	0.027	0.37	0.062	218	5.9	80.2	13.6	99.7	0.46	404	5460	927	0.06	0.11	1.47
89	7400	0.025	0.35	0.061	228	5.8	79.8	13.8	99.4	0.44	483	6671	1155	0.06	0.10	1.44

%HR	ΔP (Pa)	Proportion dans le flux aval (%)			Dilution corrigée	Proportion finale corrigée (%)			Pourcenta ge total obtenu avec la dilution corrigée	Débit aval déduit (ml/min)	Perméabilité de chaque gaz (Barrer)			Facteur de separation		
		CO ₂	N ₂	O ₂		CO ₂	N ₂	O ₂			CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂ /N ₂	CO ₂ /O ₂	N ₂ /O ₂
89	7400	0.025	0.35	0.061	228	5.8	79.8	13.8	99.4	0.47	483	6671	1155	0.06	0.10	1.44
90	9900	0.039	0.37	0.063	215	8.3	79.2	13.4	100.9	0.47	549	5247	891	0.08	0.15	1.47
90	9300	0.040	0.37	0.062	215	8.5	79.2	13.3	100.9	0.47	599	5582	936	0.09	0.16	1.49
93	8800	0.034	0.37	0.062	216	7.4	79.2	13.5	100.1	0.46	546	5875	1001	0.07	0.14	1.47
97	9000	0.050	0.36	0.062	210	10.6	76.5	13.0	100.1	0.48	791	5704	971	0.11	0.20	1.47
96	9300	0.053	0.36	0.062	210	11.1	75.9	13.0	100.1	0.48	804	5482	941	0.12	0.21	1.46

Lors du test de l'échantillon G-T3000-100#2, il n'a pas été possible de déterminer expérimentalement le flux perméant, les valeurs étant trop faibles. Pour pouvoir malgré cela calculer des coefficients de perméabilité, la dilution a été déduite à partir des proportions finales des gaz ramenées à $(100 \pm 1)\%$. La dilution permet de calculer le débit de gaz perméant et donc les coefficients de perméabilité (Table V- 9). Cette technique de calcul induit une incertitude supplémentaire sur les résultats. Cependant, la proportion finale de CO_2 est très différente de celles des deux autres gaz ce qui permet de penser que les valeurs obtenues sont représentatives des tendances observables.

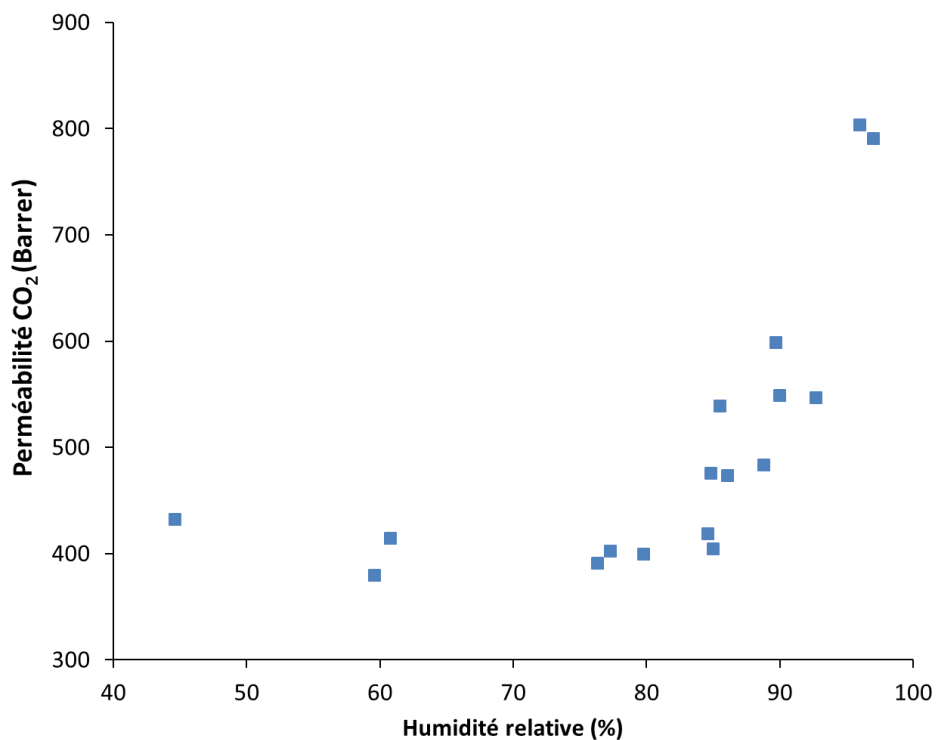


Figure V- 7 Influence de l'humidité relative sur le coefficient de perméation au CO_2 pour la membrane G-T3000-100#2

L'analyse de cette membrane donne plusieurs informations :

- Les valeurs de perméabilité sont beaucoup plus faibles et cohérentes que celles de l'échantillon #1. De plus les valeurs des facteurs de séparation et le faible débit de gaz perméant, laissent penser que la membrane ne présentait pas de fuite. La pression transmembranaire étant plus importante pour l'échantillon #2, $(8800 \pm 500)\text{Pa}$ au lieu de $(6500 \pm 300)\text{Pa}$, la membrane a peut être subi un léger écrasement qui empêché l'apparition de micro-défauts au cours de la mesure.

- L'analyse de cette membrane a duré 3 semaines auxquelles il faut ajouter la semaine d'équilibrage avant les mesures. Malgré les fortes humidités relatives, la membrane ne s'est pas dégradée.
- La perméabilité au CO₂ augmente avec le degré d'humidité contrairement à celle de l'azote et de l'oxygène qui restent stable. La rupture se produit autour de 85% d'humidité (Figure V- 7), ce qui correspond à la zone dans laquelle la sorption de l'eau sur la membrane G-T3000-100 augmente drastiquement (Figure V- 8). Cependant, la réticulation avec le TPA et le mélange avec le PEA T3000 permet de conserver l'intégrité de la membrane puisque celle-ci ne se dégrade pas pendant la mesure. En effet l'ajout du PEA permet de diminuer la sorption de l'eau puisque les teneurs en eau pour des humidités relatives entre 0,3 et 0,8 sont plus faibles pour le mélange gélatine/PEA (ca. 0,095 ± 0,005 kg/kg) que pour les films de gélatine seule et de gélatine réticulée avec le TPA (autour de 0,19 ± 0,01 kg/kg).

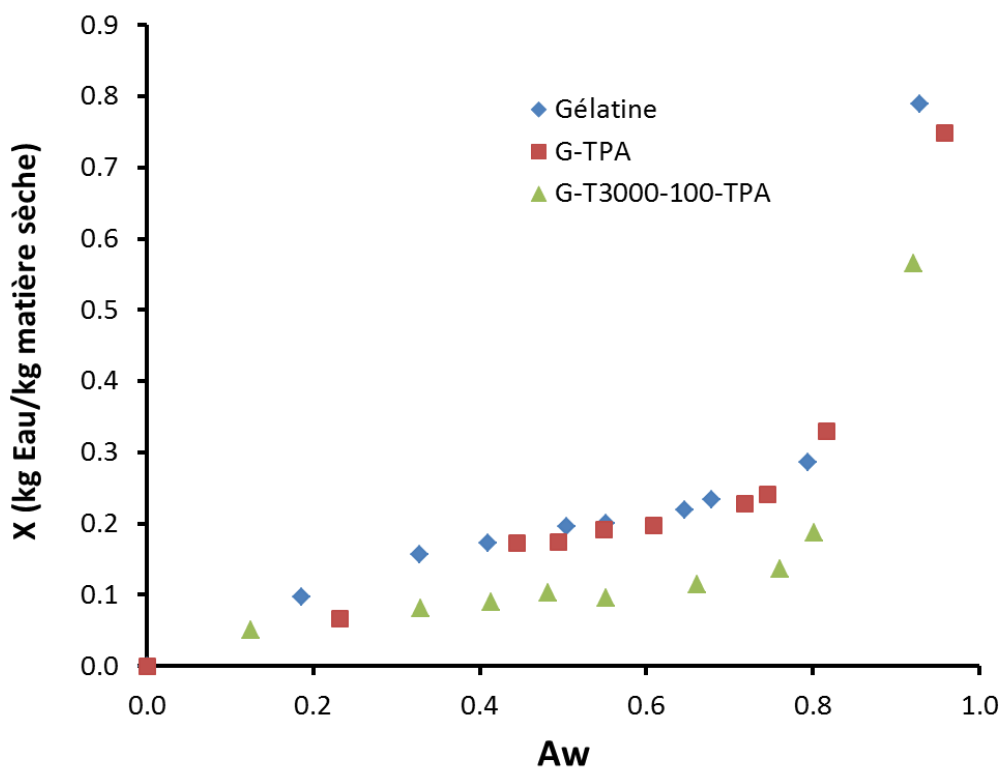


Figure V- 8 Isothermes de sorption à 20°C des films de gélatine seule, de gélatine réticulée avec le TPA et du mélange gélatine/T3000 réticulé avec le TPA

- Comme pour l'échantillon #1, la perméabilité observée du CO₂ est inférieure à celle de l'azote et l'oxygène ce qui confirme un problème de perte du CO₂ dans le pilote. Une

recherche approfondie de la zone de perte et des modifications sont à prévoir avant toute autre analyse.

- Le facteur de séparation N_2/O_2 est supérieur à 1, ce qui signifie que l'azote traverse la membrane plus facilement que l'oxygène. L'azote et l'oxygène étant de taille similaire (respectivement 0,364 Å et 0,346 Å (Breck 1973)), les différences observées ne peuvent pas provenir d'une sélectivité diffusionnelle. De plus ces gaz sont tous les deux peu solubles dans l'eau. Les différences de perméabilité doivent provenir d'une différence au niveau des coefficients de sorption. Le passage privilégié de l'azote par rapport à l'oxygène avait déjà été observé pour les membranes gélatine/PEG (chapitre III et IV). L'azote est un gaz permanent qui ne doit pas établir d'interaction particulière avec la matrice polymère ce qui indiquerait que l'oxygène, qui est lui très réactif, établirait des interactions suffisamment fortes pour gêner son passage à travers la membrane.

Toutes ces observations et conclusions sont à considérer avec précaution au vu du faible nombre d'échantillons testés et des problèmes intrinsèques du pilote soulevés par ses résultats.

5. **Conclusions du chapitre V**

Nous avons élaboré des membranes gélatine/PEA réticulées avec du TPA, homogène, sans défaut et résistante à la vapeur d'eau. Nous avons étudié l'influence de la température sur la perméation gazeuse de six formulations. Ces membranes ont montré des perméabilités beaucoup plus importantes que celle issues de mélange gélatine/PEG (jusqu'à 250 Barrer contre 1.4 Barrer à 353 K). Nous avons également montré la dépendance de la perméabilité vis-à-vis de la cristallinité pour ces systèmes et mis en évidence la contribution de chacun des deux composants dans la cristallinité globale.

La membrane présentant les plus hautes perméabilités, G-T3000-100 a été testée avec le pilote de perméation en conditions humides contrôlées développé spécifiquement pour ce projet. Si peu d'échantillons ont pu être testés et que des modifications restent à faire sur le pilote, nous avons pu néanmoins observer l'augmentation du coefficient de perméabilité du CO₂ avec le degré d'humidité.

Conclusion générale

Conclusions

Cette thèse avait pour objectif l'élaboration de membranes de séparation gazeuse à base d'un biopolymère, la gélatine, tout en respectant le plus possible les principes de la Chimie Verte (Annexe A). Globalement, les résultats obtenus nous permettent maintenant de fournir les arguments nécessaires pour qualifier les matériaux membranaires élaborés de « membranes vertes »:

- le composé principal de nos membranes est biodégradable.
- L'ensemble de l'étude s'est orienté vers le choix de composés, le moins toxiques et dangereux possible.
- La préparation des solutions filmogènes se déroule en milieu aqueux.
- L'élimination des solvants organiques et des composés volatiles, élimine la plupart des risques.
- Nous avons étudié le remplacement du glutaraldéhyde toxique par des composés moins risqués.
- Comme la gélatine, l'acide férulique est un composé biosourcé.
- L'utilisation de procédé de réticulation par incorporation directe dans la formulation plutôt que par trempé élimine la production d'effluent.
- L'élaboration des membranes se fait à pression et température atmosphérique excepté l'étape de préparation des solutions qui se déroule à 60°C, qui reste une température assez faible.

Par ailleurs, ces travaux de thèse ont montré la polyvalence des applications pour lesquelles les films/membranes à base de gélatine pouvaient se montrer utiles. La gélatine s'est révélée un polymère complexe dont la structuration, ou renaturation, est directement liée aux propriétés fonctionnelles des matériaux élaborés. Ces études ont été menées dans le but d'identifier les mécanismes mis en jeu dans la structuration du matériau et d'étudier l'influence de celle-ci sur les propriétés de transport gazeux de ces nouvelles membranes élaborées sans solvant.

Dans un premier temps, nous avons formalisé le mécanisme d'élaboration des membranes de gélatine que nous avons appelé TIG/Dry cast process: Temperature Induced Gelation Dry casting process par analogie avec les autres procédés d'élaboration de membrane. Pour cela nous avons établi le diagramme de phase du système gélatine/eau et mis en évidence les transitions sol/gel et gel/membrane ainsi que le domaine de stabilité des films de gélatine. L'objectif étant de permettre le contrôle de la structuration par le choix d'un chemin d'élaboration adapté comme c'est le cas pour les membranes poreuses, en choisissant comme descripteur le taux de triple

hélice plutôt que la porosité. Nous avons ainsi montré que les films de gélatine non réticulés restaient stables et sans risque de dégradation biologique pour une utilisation entre 30 et 65% d'humidité relative. Nous avons développé une méthode originale pour déterminer la transition gel/membrane qui couple un suivi cinétique de l'évaporation par analyses ATG avec la mesure des propriétés mécaniques par rhéologie extensionnelle.

Les films de gélatine n'étant pas assez souples pour supporter la mise sous vide préliminaire à toute mesure de perméation gazeuse, un plastifiant le PEG 200 a été ajouté et son influence sur les propriétés des films de gélatine analysée. Les films gélatine/PEG200 ont montré des propriétés barrières aux gaz à 25°C (0,2 ; 0,08 ; 0,03 et 0,007 Barrer pour He, CO₂, N₂ et O₂ respectivement) avec une sélectivité CO₂/O₂ autour de 10 entre 25 et 40°C. Nous avons montré que l'augmentation de la température jusqu'à 90°C ne permettait pas d'augmenter les valeurs des coefficients de perméabilité au-delà de 1,4 Barrer. De plus, l'augmentation des coefficients de perméabilité des membranes gélatine/PEG200 suit une loi d'Arrhenius en fonction de la température.

En se plaçant à une température de séchage inférieure à la température de dénaturation, dans un procédé de type « cold-cast », nous avons favorisé l'élaboration de film à haut degré de renaturation, plus résistant d'un point de vue mécanique et, du fait du haut degré de cristallinité, moins perméable au gaz.

Pour favoriser la pérennité en condition humide des membranes à base de gélatine hydrosoluble, nous avons étudié la réticulation chimique de la gélatine. Nous avons eu pour but de chercher des réticulants alternatifs au glutaraldéhyde, toxique et volatil. Plusieurs réticulants présentant peu ou pas de risque sanitaire, dont certains biosourcés, ont été étudiés : le N-hydroxysuccinimide, le bis(succinimidyl)nona(éthylène glycol), l'acide férulique et le téréphthalaldéhyde. Les deux derniers ont montrés les résultats les plus prometteurs et ont donc été étudiés plus spécifiquement ; Leurs caractéristiques respectives n'étant pas adaptées aux mêmes applications.

L'acide férulique permet, dans nos conditions d'élaborations non oxydantes, d'atteindre un taux de réticulation de 54% et ainsi de rendre les films de gélatine résistants à la vapeur d'eau pendant plus de deux semaines. La réticulation obtenue étant asymétrique (liaison covalente d'un côté et interaction physique de l'autre), l'acide férulique n'améliore pas suffisamment la résistance des films à l'eau liquide pour des applications en contact direct avec l'eau. Cependant une optimisation du procédé de réticulation pourrait remédier, au moins en partie à ce handicap. L'acide férulique permet de conserver le caractère barrière des films à base de gélatine, ce qui

combiné à son origine biosourcé fait des films gélatine/acide férulique des candidats intéressants pour des applications dans le domaine des emballages.

Le téréphthalaldéhyde n'avait quant à lui jamais été référencé comme utilisable avec la gélatine mais sa nature dialdéhyde et son potentiel connu comme réticulant du PVA et du chitosan, nous ont laissé penser que son mécanisme réactionnel serait plus simple que celui de l'acide férulique. Nous avons mis au point un protocole d'élaboration de membranes de gélatine réticulées avec le téréphthalaldéhyde (température, durée de la réaction, concentration du réticulant) qui a mené à l'obtention de membrane avec un taux de réticulation de 89% résistant près de 27h dans l'eau liquide et plus de 3 mois à la vapeur d'eau. De plus il retarde la pénétration de la vapeur d'eau dans la matrice polymérique de sept jours grâce à l'augmentation du caractère hydrophobe de la structure due à la fois à l'ajout du composé lui-même hydrophobe et à la diminution des fonctions amines primaires, hydrophiles, qui sont impliquées dans la réaction de réticulation. Enfin la réticulation avec le téréphthalaldéhyde augmente significativement la perméabilité au gaz à 25°C (respectivement de 0,08 à 0,4 Barrer pour le CO₂ et de 0,007 à 0,1 Barrer pour l'O₂). Le taux de renaturation de la gélatine étant dans les deux cas d'environ 40%, une explication plausible de cette augmentation peut résider dans l'augmentation des volumes libres due à l'ajout du noyau aromatique du téréphthalaldéhyde. Si les caractéristiques des films gélatine/téréphthalaldéhyde ne sont plus compatibles avec une application comme film barrière, leurs résistances ainsi que la simplicité du mécanisme de réticulation en font un bon candidat pour élaborer des membranes mixtes bioartificielles.

Pour explorer cette voie, nous avons développé de nouvelles membranes gélatine/polyéther amine sans solvant organique et réticulées avec le téréphthalaldéhyde. Le choix des polyéther amines, des élastomères, a permis de perturber le phénomène de renaturation et d'ainsi de réduire le taux de triple hélice de 61% à moins de 30% et même jusqu'à 2% pour la formulation gélatine/T3000 à 1g de T3000/g gélatine. Cette diminution drastique de la cristallinité dans les membranes a permis d'augmenter considérablement la perméabilité en passant par exemple, pour le CO₂ à 80°C, de 1,4 à 250 Barrer pour G-T3000-100. Nous avons pu, au cours de cette étude, mettre en relation directe l'impact de la cristallinité et du degré de renaturation sur les valeurs des coefficients de perméabilité et également déterminer la contribution de chacun des composés des membranes (gélatine et polyéther amines) sur la cristallinité globale du matériau final. Le choix de deux polyéther amines différents a permis d'étudier l'influence de la nature, diamine ou triamine, des élastomères sur la structuration et les propriétés de transport gazeux des membranes.

La membrane G-T3000-100 présentant les perméabilités pour les flux gazeux secs les plus importantes, ses propriétés de transports gazeux ont été analysées pour des mélanges de gaz en conditions humides. Nous avons pu montrer, malgré les aléas expérimentaux, qu'en augmentant l'humidité relative d'un flux gazeux CO₂/Air, seule la perméabilité du CO₂ augmente passant de 400 à 800 Barrer entre 45 et 97% HR à 20°C.

Les sélectivités obtenues avec ces membranes ne sont pas assez élevées pour une application en séparation gazeuse. Cependant ces travaux de thèse dédiés à l'élaboration de membranes autosupportées, denses, symétriques et monocouches ne constituent qu'une première étape, concentrée sur la compréhension de l'influence des mécanismes de structuration sur les propriétés de transport gazeux. Ils mettent en évidence pour la première fois le potentiel d'un polymère biosourcé directement issu de la biomasse pour des applications dans les procédés membranaires.

Perspectives

Cette thèse a mené à l'exploration de nombreuses pistes qui ouvrent de multiples perspectives à plus ou moins long termes.

A partir de la bonne compréhension des mécanismes d'élaboration et grâce à toutes les méthodes mises en place pour la caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles, on peut envisager l'examen d'autres chemins d'élaboration qui doivent avoir un impact sur la structuration comme par exemple la température d'élaboration et de séchage (cold/hot cast) ; et à terme permettre le contrôle de la nano-structuration du matériau par le choix du chemin d'élaboration adapté.

Les méthodes développées pour l'établissement du diagramme de phase peuvent être également appliquées à l'étude d'autres polymères présentant une transition sol/gel. Ce qui permet d'envisager de nombreuses possibilités de caractérisation de mélanges bioartificielles ou complètement biosourcés.

En ce qui concerne la formulation, la solution de gélatine à la base de toutes les membranes avait toujours la même composition, il serait intéressant de modifier le pH ou la force ionique de la solution pour changer les interactions entre les acides aminés et ainsi modifier la structuration du gel et d'étudier les propriétés fonctionnelles des membranes ainsi obtenues.

Les différents mécanismes de réticulation de l'acide férulique doivent être étudiés. En effet l'avantage de l'acide férulique est qu'il permet de moduler la réticulation (type de liaisons, degré de réticulation) suivant les conditions oxydantes ou non en solution. Cette polyvalence peut être

mise à profit dans différents domaines où une dégradation contrôlée du matériau est recherchée comme en drug-delivering.

Les films de gélatine ont montré des propriétés barrières prometteuses pour le domaine des emballages, cependant leur sensibilité à l'eau limite leur application seuls. Il est envisageable d'inclure la gélatine dans des matériaux multicouches sur le modèle de l'éthylène-alcool vinylique.

En montrant que le mélange de la gélatine avec un polymère synthétique pouvait modifier considérablement les propriétés des deux composants, de nombreuses possibilités d'association sont possibles pour augmenter la perméabilité ou même pour renforcer ses propriétés barrières avec l'élaboration de nanocomposites.

Pour compléter l'étude des propriétés de transport gazeux des membranes de gélatine, il faudrait réaliser des mesures de sorption et d'annihilation de positrons pour pouvoir parfaire la compréhension des liens structure/perméation. Ces mesures seraient particulièrement utiles pour les systèmes dynamiques que représentent les membranes exposées à des taux d'humidité proche de la saturation.

Références bibliographiques

- Abdella, P. M., P. K. Smith and G. P. Royer (1979). "A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications **87**(3): 734-742.
- Achet, D. and X. W. He (1995). "Determination of the renaturation level in gelatin films." Polymer **36**(4): 787-791.
- Ahmad, M., S. Benjakul, T. Prodpran and T. W. Agustini (2012). "Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils." Food Hydrocolloids **28**(1): 189-199.
- Al-Muhtaseb, A. H., W. A. M. McMinn and T. R. A. Magee (2002). "Moisture Sorption Isotherm Characteristics of Food Products: A Review." Food and Bioprocess Processing **80**(2): 118-128.
- Andreuccetti, C., R. A. Carvalho, T. Galicia-García, F. Martínez-Bustos and C. R. F. Grosso (2011). "Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films." Journal of Food Engineering **103**(2): 129-136.
- Aoki, H., T. Taguchi, H. Saito, H. Kobayashi, K. Kataoka and J. Tanaka (2004). "Rheological evaluation of gelatin gels prepared with a citric acid derivative as a novel cross-linker." Materials Science and Engineering: C **24**(6-8): 787-790.
- Arvanitoyannis, I., A. Nakayama and S.-i. Aiba (1998a). "Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water." Carbohydrate Polymers **36**(2-3): 105-119.
- Arvanitoyannis, I. S., A. Nakayama and S.-i. Aiba (1998b). "Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties." Carbohydrate Polymers **37**(4): 371-382.
- Bao, L., J. R. Dorgan, D. Knauss, S. Hait, N. S. Oliveira and I. M. Maruccho (2006). "Gas permeation properties of poly(lactic acid) revisited." Journal of Membrane Science **285**(1-2): 166-172.
- Barrer, R. and E. K. Rideal (1939). "Permeation, diffusion and solution of gases in organic polymers." Transactions of the Faraday Society **35**: 628-643.
- Barrer, R. M. (1937). "Nature of the diffusion process in rubber." Rubber Chemistry and Technology **10**(4): 673-674.
- Bella, J., B. Brodsky and H. M. Berman (1995). "Hydration structure of a collagen peptide." Structure **3**(9): 893-906.
- Bergo, P. and P. J. A. Sobral (2007). "Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films." Food Hydrocolloids **21**(8): 1285-1289.
- Berk, Z. (2013). Dehydration. Food process engineering and technology, Academic Press.
- Bernardo, P., E. Drioli and G. Golemme (2009). "Membrane gas separation: a review/state of the art." Industrial & Engineering Chemistry Research **48**(10): 4638-4663.
- Bertan, L. C., P. S. Tanada-Palmu, A. C. Siani and C. R. F. Grosso (2005). "Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin." Food Hydrocolloids **19**(1): 73-82.
- Bertoldo, M., S. Bronco, T. Gragnoli and F. Ciardelli (2007). "Modification of Gelatin by Reaction with 1, 6-Diisocyanatohexane." Macromolecular Bioscience **7**(3): 328-338.
- Bigi, A., B. Bracci, G. Cojazzi, S. Panzavolta and N. Roveri (1998). "Drawn gelatin films with improved mechanical properties." Biomaterials **19**(24): 2335-2340.
- Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri and K. Rubini (2002). "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin." Biomaterials **23**(24): 4827-4832.
- Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini and N. Roveri (2001). "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking." Biomaterials **22**(8): 763-768.
- Bigi, A., S. Panzavolta and K. Rubini (2004). "Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films." Biomaterials **25**(25): 5675-5680.
- Biscarat, J., C. Charmette, J. Sanchez and C. Pochat-Bohatier (2015). "Preparation of dense gelatin membranes by combining temperature induced gelation and dry-casting." Journal of Membrane Science **473**: 45-53.
- Biscarat, J., C. Charmette, J. Sanchez and C. Pochat-Bohatier (In press). "Development of a new family of food packaging bioplastics from cross-linked gelatin based films." Canadian Journal of Chemical Engineering 10.1002/cjce.22077.

- Bonnard, N., M.-T. Brondeau, D. Jargot, S. Malard, O. Schneider and P. Serre (2010). Fiche toxicologique FT171 : Glutaraldéhyde. INRS.
- Bradbury, E. and C. Martin (1952). "The Effect of the Temperature of Preparation on the Mechanical Properties and Structure of Gelatin Films." Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences **214**(1117): 183-192.
- Breck, D. W. (1973). Zeolite molecular sieves : structure, chemistry, and use. New York, John Wiley and Sons.
- Broyart, B., B. Nourhène, B. Catherine and D. Jean-Dominique (2007). "Modelling of moisture and salt transport in gelatine gels during drying at constant temperature." Journal of Food Engineering **81**(4): 657-671.
- Bullón, J., M. P. Belleville and G. M. Rios (2000). "Preparation of gelatin formed-in-place membranes: effect of working conditions and substrates." Journal of Membrane Science **168**(1-2): 159-165.
- Butler, M. F., Y.-F. Ng and P. D. A. Pudney (2003). "Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **41**(24): 3941-3953.
- Cao, N., Y. H. Fu and J. H. He (2007). "Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid." Food Hydrocolloids **21**(4): 575-584.
- Cao, N., X. Yang and Y. Fu (2009). "Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films." Food Hydrocolloids **23**(3): 729-735.
- Car, A., C. Stropnik, W. Yave and K.-V. Peinemann (2008). "Pebax®/polyethylene glycol blend thin film composite membranes for CO₂ separation: Performance with mixed gases." Separation and Purification Technology **62**(1): 110-117.
- Carvalho, R. and C. Grosso (2006). "Properties of chemically modified gelatin films." Brazilian Journal of Chemical Engineering **23**(1): 45-53.
- Carvalho, R. A. and C. R. F. Grosso (2004). "Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde." Food Hydrocolloids **18**(5): 717-726.
- Carvalho, R. A., C. R. F. Grosso and P. J. A. Sobral (2008a). "Effect of chemical treatment on the mechanical properties, water vapour permeability and sorption isotherms of gelatin-based films." Packaging Technology and Science **21**(3): 165-169.
- Carvalho, R. A., P. J. A. Sobral, M. Thomazine, A. M. Q. B. Habitante, B. Giménez, M. C. Gómez-Guillén and P. Montero (2008b). "Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin." Food Hydrocolloids **22**(6): 1117-1123.
- Catalano, J., T. Myezwa, M. De Angelis, M. G. Baschetti and G. Sarti (2012). "The effect of relative humidity on the gas permeability and swelling in PFSI membranes." International Journal of Hydrogen Energy **37**(7): 6308-6316.
- Catalina, M., G. E. Attenburrow, J. Cot, A. D. Covington and A. P. M. Antunes (2011). "Influence of Crosslinkers and Crosslinking Method on the Properties of Gelatin Films Extracted from Leather Solid Waste." Journal of Applied Polymer Science **119**(4): 2105-2111.
- Chambon, F. and H. H. Winter (1987). "Linear viscoelasticity at the gel point of a crosslinking PDMS with imbalanced stoichiometry." Journal of Rheology **31**(8): 683-697.
- Chang, Z., J. Kuchar and R. P. Hausinger (2004). "Chemical cross-linking and mass spectrometric identification of sites of interaction for UreD, UreF, and urease." Journal of Biological Chemistry **279**(15): 15305-15313.
- Charmette, C. (2007). Membranes en poly(oxyde d'éthylène-co-epichlorohydrine) pour la séparation du CO₂. Relation structure-propriétés de transfert., UM2.
- Charmette, C., J. Sanchez, P. Gramain and N. Masquelez (2009). "Structural characterization of poly(ethylene oxide-co-epichlorohydrin) membranes and relation with gas permeation properties." Journal of Membrane Science **344**(1-2): 275-280.
- Charmette, C., J. Sanchez, P. Gramain and A. Rudatsikira (2004). "Gas transport properties of poly(ethylene oxide-co-epichlorohydrin) membranes." Journal of Membrane Science **230**(1-2): 161-169.
- Chen, Y. and A. E. Hagerman (2004). "Quantitative examination of oxidized polyphenol-protein complexes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(20): 6061-6067.

- Chern, R., W. Koros, H. Hopfenberg and V. Stannett (1985). Material selection for membrane-based gas separations. ACS symposium series, Oxford University Press.
- Chiono, V., E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahluwalia and P. Giusti (2008). "Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications." Journal of Materials Science-Materials in Medicine **19**(2): 889-898.
- Chiou, B.-S., R. J. Avena-Bustillos, P. J. Bechtel, S. H. Imam, G. M. Glenn and W. J. Orts (2009). "Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films." Journal of Food Engineering **95**(2): 327-331.
- Chiou, B.-S., R. J. Avena-Bustillos, P. J. Bechtel, H. Jafri, R. Narayan, S. H. Imam, G. M. Glenn and W. J. Orts (2008). "Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties." European Polymer Journal **44**(11): 3748-3753.
- Chu, L.-Y., R. Xie, X.-J. Ju and W. Wang (2013). Preparation and Properties of Monodisperse pH-Responsive Microgels. Smart Hydrogel Functional Materials, Springer Berlin Heidelberg 10.1007/978-3-642-39538-3_7: 155-170.
- Chua, M. L., L. Shao, B. T. Low, Y. Xiao and T.-S. Chung (2011). "Polyetheramine-polyhedral oligomeric silsesquioxane organic-inorganic hybrid membranes for CO₂/H₂ and CO₂/N₂ separation." Journal of Membrane Science **385-386**(0): 40-48.
- Comyn, J. (1985). Polymer permeability, Springer.
- Coppola, M., M. Djabourov and M. Ferrand (2012). "Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids." Polymer **53**(7): 1483-1493.
- Costello, L. M. and W. J. Koros (1993). "Comparison of pure and mixed gas carbon dioxide and methane permeabilities in polycarbonate: effect of temperature." Industrial & Engineering Chemistry Research **32**(10): 2277-2280.
- Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion, Clarendon Press, Oxford.
- Dai, C.-A., Y.-F. Chen and M.-W. Liu (2006a). "Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry." Journal of Applied Polymer Science **99**(4): 1795-1801.
- Dai, C.-A. and M.-W. Liu (2006b). "The effect of crystallinity and aging enthalpy on the mechanical properties of gelatin films." Materials Science and Engineering: A **423**(1-2): 121-127.
- Dangaran, K., P. M. Tomasula and P. Qi (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. Edible films and coatings for food applications, Springer: 25-56.
- De Gennes, P.-G. (1979). Scaling concepts in polymer physics, Cornell university press.
- Despond, S., E. Espuche and A. Domard (2001). "Water sorption and permeation in chitosan films: Relation between gas permeability and relative humidity." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **39**(24): 3114-3127.
- Dickerson, R. E. and I. Geis (1969). "Structure and action of proteins."
- Djabourov, M., N. Bonnet, H. Kaplan, N. Favard, P. Favard, J. Lechaire and M. Maillard (1993). "3D analysis of gelatin gel networks from transmission electron microscopy imaging." Journal de Physique II **3**(5): 611-624.
- Djagny, K. B., Z. Wang and S. Xu (2001). "Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **41**(6): 481-492.
- El Harfaoui, N. (2007). Gels et films de gélatine : Structure et propriétés fonctionnelles. Doctorat, Université Paris 7.
- Farris, S., J. Song and Q. Huang (2009). "Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(2): 998-1003.
- Fick, A. (1855). "Ueber diffusion." Annalen der Physik **170**(1): 59-86.
- Figueroa-Espinoza, M., M.-H. Morel, A. Surget, M. Asther, S. Moukha, J.-C. Sigoillot and X. Rouau (1999). "Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase." Food Hydrocolloids **13**(1): 65-71.
- Flaconèche, B. (1995). Perméabilité aux gaz de polymères semi-cristallins.
- Flaconèche, B., J. Martin and M. Klopffer (2001). "Transport properties of gases in polymers: experimental methods." Oil & Gas Science and Technology **56**(3): 245-259.
- Flory, P. J. (1953). Principles of polymer chemistry, Cornell University Press.
- Flory, P. J. and E. S. Weaver (1960). "Helix [UNK] Coil Transitions in Dilute Aqueous Collagen Solutions1." Journal of the American Chemical Society **82**(17): 4518-4525.

- Fraga, A. N. and R. J. J. Williams (1985). "Thermal properties of gelatin films." *Polymer* **26**(1): 113-118.
- Freeman, B. D. (1999). "Basis of Permeability/Selectivity Tradeoff Relations in Polymeric Gas Separation Membranes." *Macromolecules* **32**(2): 375-380.
- Frisch, H. (1980). "Sorption and transport in glassy polymers—a review." *Polymer Engineering & Science* **20**(1): 2-13.
- Froimowicz, P., A. Gandini and M. Strumia (2005). "New polyfunctional dendritic linear hybrids from terminal amine polyether oligomers (Jeffamine®): synthesis and characterization." *Tetrahedron Letters* **46**(15): 2653-2657.
- Gekko, K. and M. Fukamizu (1991). "Effect of pressure on the sol-gel transition of gelatin." *International Journal of Biological Macromolecules* **13**(5): 295-300.
- Gheneim, R., C. Perez-Berumen and A. Gandini (2002). "Diels–Alder Reactions with Novel Polymeric Dienes and Dienophiles: Synthesis of Reversibly Cross-Linked Elastomers." *Macromolecules* **35**(19): 7246-7253.
- Giraudier, S., D. Hellio, M. Djabourov and V. Larreta-Garde (2004). "Influence of Weak and Covalent Bonds on Formation and Hydrolysis of Gelatin Networks." *Biomacromolecules* **5**(5): 1662-1666.
- Gómez-Estaca, J., M. C. Gómez-Guillén, F. Fernández-Martín and P. Montero (2011). "Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films." *Food Hydrocolloids* **25**(6): 1461-1469.
- Gómez-Guillén, M., J. Turnay, M. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M. Lizarbe and P. Montero (2002). "Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study." *Food Hydrocolloids* **16**(1): 25-34.
- Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez, M. E. López-Caballero and M. P. Montero (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." *Food Hydrocolloids* **25**(8): 1813-1827.
- Gómez-Guillén, M. C., M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez and P. Montero (2009). "Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films." *Trends in Food Science & Technology* **20**(1): 3-16.
- Gontard, N., R. Thibault, B. Cuq and S. Guilbert (1996). "Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(4): 1064-1069.
- Graham, T. (1866). "The solution-diffusion model." *London Edinburgh Dublin Phil. Mag. Sci. Serie* **32**: 401-425.
- Greenspan, L. (1977). "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions." *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **81**(1): 89-96.
- Hellio Serughetti, D. (2004). *Les gels physiques et chimiques de gélatine : structure et rhéologie*. Doctorat, Université Paris 7.
- Hopkins, M. J., H. N. Englyst, S. Macfarlane, E. Furrie, G. T. Macfarlane and A. J. McBain (2003). "Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children." *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6354-6360.
- Imre, B. and B. Pukánszky (2013). "Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends." *European Polymer Journal* **49**(6): 1215-1233.
- Jackson, J. F. and S. J. Gill (1967). "Elastic properties of crosslinked poly(vinyl alcohol) gels: Network topology." *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* **5**(4): 663-670.
- Jayakrishnan, A. and S. R. Jameela (1996). "Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices." *Biomaterials* **17**(5): 471-484.
- Jiang, L. Y., T. S. Chung and S. Kulprathipanja (2006). "An investigation to revitalize the separation performance of hollow fibers with a thin mixed matrix composite skin for gas separation." *Journal of Membrane Science* **276**(1–2): 113-125.
- Jiang, X., J. Ding and A. Kumar (2008). "Polyurethane–poly(vinylidene fluoride) (PU–PVDF) thin film composite membranes for gas separation." *Journal of Membrane Science* **323**(2): 371-378.
- Joly-Duhamel, C., D. Hellio and M. Djabourov (2002). "All Gelatin Networks: 1. Biodiversity and Physical Chemistry†." *Langmuir* **18**(19): 7208-7217.

- Joly, C., S. Goizet, J. C. Schrotter, J. Sanchez and M. Escoubes (1997). "Sol-gel polyimide-silica composite membrane: gas transport properties." Journal of Membrane Science **130**(1-2): 63-74.
- Jongjareonrak, A., S. Benjakul, W. Visessanguan and M. Tanaka (2006). "Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper." European Food Research and Technology **222**(3-4): 229-235.
- Jridi, M., N. Souissi, A. Mbarek, G. Chadeyron, M. Kammoun and M. Nasri (2013). "Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish." International Journal of Biological Macromolecules **61**(0): 17-25.
- Karim, A. A. and R. Bhat (2008). "Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects." Trends in Food Science & Technology **19**(12): 644-656.
- Klopffer, M., H. and B. Flaconnèche (2001). "Transport properties of gases in polymers: Bibliographic review" Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP **56**(3): 223-244.
- Koros, W. and D. Paul (1978). "CO₂ sorption in poly (ethylene terephthalate) above and below the glass transition." Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition **16**(11): 1947-1963.
- Kosaraju, S. L., A. Puvanenthiran and P. Lillford (2010). "Naturally crosslinked gelatin gels with modified material properties." Food Research International **43**(10): 2385-2389.
- Kosmala, J. D., D. B. Henthorn and L. Brannon-Peppas (2000). "Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials." Biomaterials **21**(20): 2019-2023.
- Kozlov, P. V. and G. I. Burdygina (1983). "The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification." Polymer **24**(6): 651-666.
- Krishna, M., C. I. Nindo and S. C. Min (2012). "Development of fish gelatin edible films using extrusion and compression molding." Journal of Food Engineering **108**(2): 337-344.
- Kumins, C. and T. Kwei (1968). Free volume and other theories, Academic Press, New York. **107**.
- Lai, J.-Y. and Y.-T. Li (2010). "Functional Assessment of Cross-Linked Porous Gelatin Hydrogels for Bioengineered Cell Sheet Carriers." Biomacromolecules **11**(5): 1387-1397.
- Langmaier, F., P. Mokrejs, K. Kolomaznik and M. Mladek (2008). "Plasticizing collagen hydrolysate with glycerol and low-molecular weight poly(ethylene glycols)." Thermochimica Acta **469**(1-2): 52-58.
- Lau, W. J., A. F. Ismail, N. Misdan and M. A. Kassim (2012). "A recent progress in thin film composite membrane: A review." Desalination **287**(0): 190-199.
- Ledward, D. (1986). "Gelation of gelatin." Functional properties of food macromolecules: 171-201.
- Lehninger, A., D. Nelson and M. Cox (1993). "Principles of biochemistry." Worth, New York: 631-632.
- Liang, H. C., W. H. Chang, H. F. Liang, M. H. Lee and H. W. Sung (2004). "Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide." Journal of Applied Polymer Science **91**(6): 4017-4026.
- Lien, S.-M., L.-Y. Ko and T.-J. Huang (2009). "Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering." Acta Biomaterialia **5**(2): 670-679.
- Lin, H. and B. D. Freeman (2004). "Gas solubility, diffusivity and permeability in poly(ethylene oxide)." Journal of Membrane Science **239**(1): 105-117.
- Lin, H. and B. D. Freeman (2005). "Materials selection guidelines for membranes that remove CO₂ from gas mixtures." Journal of Molecular Structure **739**(1-3): 57-74.
- Liu, P., L. Yu, H. Liu, L. Chen and L. Li (2009). "Glass transition temperature of starch studied by a high-speed DSC." Carbohydrate Polymers **77**(2): 250-253.
- Liu, S. L., L. Shao, M. L. Chua, C. H. Lau, H. Wang and S. Quan (2013). "Recent progress in the design of advanced PEO-containing membranes for CO₂ removal." Progress in Polymer Science **38**(7): 1089-1120.
- Liyama, K., T. B. Lam and B. Stone (1984). "Covalent cross-links in the cell wall." Plant Physiology(104): 315-320.
- M'barki, O., A. Hanafia, D. Bouyer, C. Faur, R. Sescousse, U. Delabre, C. Blot, P. Guenoun, A. Deratani, D. Quemener and C. Pochat-Bohatier (2014). "Greener method to prepare porous polymer membranes by combining thermally induced phase separation and crosslinking of poly (vinyl alcohol) in water." Journal of Membrane Science **458**: 225-235.
- Mädler, S., S. Gschwind and R. Zenobi (2010). "Role of arginine in chemical cross-linking with N-hydroxysuccinimide esters." Analytical Biochemistry **398**(1): 123-125.

- Martucci, J. F., A. E. M. Accareddu and R. A. Ruseckaite (2012). "Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde." Journal of Materials Science **47**(7): 3282-3292.
- Mathew, S. and T. E. Abraham (2008). "Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films." Food Hydrocolloids **22**(5): 826-835.
- Meador, M. A. B., V. A. Cubon, D. A. Scheiman and W. R. Bennett (2003). "Effect of Branching on Rod–Coil Block Polyimides as Membrane Materials for Lithium Polymer Batteries." Chemistry of Materials **15**(15): 3018-3025.
- Meares, P. (1954). "The Diffusion of Gases Through Polyvinyl Acetate." Journal of the American Chemical Society **76**(13): 3415-3422.
- Meares, P. (1958). "The solubilities of gases in polyvinyl acetate." Transactions of the Faraday Society **54**: 40-46.
- Michaels, A. S. and H. J. Bixler (1961a). "Flow of gases through polyethylene." Journal of Polymer Science **50**(154): 413-439.
- Michaels, A. S. and H. J. Bixler (1961b). "Solubility of gases in polyethylene." Journal of Polymer Science **50**(154): 393-412.
- Michaels, A. S. and R. B. Parker (1959). "Sorption and flow of gases in polyethylene." Journal of Polymer Science **41**(138): 53-71.
- Michon, C., G. Cuvelier and B. Launay (1993). "Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point." Rheologica Acta **32**(1): 94-103.
- Migneault, I., C. Dartiguenave, M. J. Bertrand and K. C. Waldron (2004). "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking." Biotechniques **37**(5): 790-806.
- Morrison, N., R. Clark, Y. Chen, T. Talashek and G. Sworn (1999). Gelatin alternatives for the food industry Physical Chemistry and Industrial Application of Gellan Gum. K. Nishinari, Springer Berlin / Heidelberg. **114**: 127-131.
- Mujica-Paz, H. and N. Gontard (1997). "Oxygen and Carbon Dioxide Permeability of Wheat Gluten Film: Effect of Relative Humidity and Temperature." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(10): 4101-4105.
- Mulder, M. (1991). Preparation of Synthetic Membrane. Basic Principles of Membrane Technology. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 55-109.
- Natansohn, A., H. X. Yang and C. Clark (1991). "Polyimides from terephthalaldehyde and aliphatic diamines. 1. Synthesis, CP-MAS C-13 NMR-spectra, and thermal analysis." Macromolecules **24**(20): 5489-5496.
- Naylor, T. d. V. (1989). "Permeation properties." Comprehensive polymer science **2**: 643-668.
- Nickerson, M. T., J. Patel, D. V. Heyd, D. Rousseau and A. T. Paulson (2006). "Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin." International Journal of Biological Macromolecules **39**(4-5): 298-302.
- Nur Hanani, Z., Y. Roos and J. Kerry (2014). "Use and Application of Gelatin as Potential Biodegradable Packaging Materials for Food Products." International Journal of Biological Macromolecules.
- Nur Hanani, Z. A., E. Beatty, Y. H. Roos, M. A. Morris and J. P. Kerry (2012a). "Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion." Journal of Food Engineering **113**: 606-614.
- Nur Hanani, Z. A., Y. H. Roos and J. P. Kerry (2012b). "Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties." Food Hydrocolloids **29**(1): 144-151.
- O'connell, J. and P. Fox (2001). "Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review." International Dairy Journal **11**(3): 103-120.
- Ofner, C. M. and W. A. Bubnis (1996). "Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices." Pharmaceutical Research **13**(12): 1821-1827.
- Olde Damink, L., P. Dijkstra, M. Van Luyn, P. Van Wachem, P. Nieuwenhuis and J. Feijen (1996a). "Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide." Biomaterials **17**(8): 765-773.

- Olde Damink, L. H. H., P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis and J. Feijen (1996b). "Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide." Biomaterials **17**(8): 765-773.
- Ortiz-Zarama, M. A., A. Jiménez-Aparicio, M. J. Perea-Flores and J. Solorza-Feria (2014). "Barrier, mechanical and morpho-structural properties of gelatin films with carbon nanotubes addition." Journal of Food Engineering **120**(0): 223-232.
- Ou, S. and K. C. Kwok (2004). "Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods." Journal of the Science of Food and Agriculture **84**(11): 1261-1269.
- Ou, S., Y. Wang, S. Tang, C. Huang and M. G. Jackson (2005). "Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate." Journal of Food Engineering **70**(2): 205-210.
- Oudgenoeg, G., R. Hilhorst, S. R. Piersma, C. G. Boeriu, H. Gruppen, M. Hessing, A. G. J. Voragen and C. Laane (2001). "Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(5): 2503-2510.
- Pace, R. and A. Datyner (1979a). "Statistical mechanical model for diffusion of simple penetrants in polymers. I. Theory." Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition **17**(3): 437-451.
- Pace, R. and A. Datyner (1979b). "Statistical mechanical model for diffusion of simple penetrants in polymers. II. Applications—nonvinyl polymers." Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition **17**(3): 453-464.
- Pace, R. and A. Datyner (1979c). "Statistical mechanical model for diffusion of simple penetrants in polymers. III. Applications—vinyl and related polymers." Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition **17**(3): 465-476.
- Papkovsky, D. B., N. Papkovskaia, A. Smyth, J. Kerry and V. I. Ogurtsov (2000). "Phosphorescent sensor approach for non-destructive measurement of oxygen in packaged foods: optimisation of disposable oxygen sensors and their characterization over a wide temperature range."
- Park, G. S. and J. Crank (1968). "Diffusion in polymers."
- Park, H. J. and M. S. Chinnan (1995). "Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials." Journal of Food Engineering **25**(4): 497-507.
- Park, J. W., W. Scott Whiteside and S. Y. Cho (2008). "Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films." LWT - Food Science and Technology **41**(4): 692-700.
- Parliament, T. E. (2006). Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), Official Journal of the European Union. **(EC) No 1907/2006**.
- Perez-Gago, M. B. and J. M. Krochta (2000). "Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(7): 2687-2692.
- Petite, H., I. Rault, A. Huc, P. Menasche and D. Herbage (1990). "Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium." Journal of Biomedical Materials Research **24**(2): 179-187.
- Piroux, F., E. Espuche and R. Mercier (2004). "The effects of humidity on gas transport properties of sulfonated copolyimides." Journal of Membrane Science **232**(1-2): 115-122.
- Pochat-Bohatier, C., J. Sanchez and N. Gontard (2006). "Influence of relative humidity on carbon dioxide sorption in wheat gluten films." Journal of Food Engineering **77**: 983-991.
- Prigent, S. V., H. Gruppen, A. J. Visser, G. A. van Koningsveld, G. A. de Jong and A. G. Voragen (2003). "Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(17): 5088-5095.
- Qiao, J., T. Hamaya and T. Okada (2005). "Chemically Modified Poly(vinyl alcohol)-Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) as a Novel Proton-Conducting Fuel Cell Membrane." Chemistry of Materials **17**(9): 2413-2421.
- Rahman, M. S. (2008). Food properties handbook, CRC press.
- Ratanavaraporn, J., R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul (2010). "Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats." International Journal of Biological Macromolecules **47**(4): 431-438.
- Rawel, H., J. Kroll and U. Hohl (2001). "Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins." Food/Nahrung **45**(2): 72-81.

- Rhim, J.-W., A. Gennadios, C. L. Weller, C. Carole and M. A. Hanna (1998). "Soy protein isolate–dialdehyde starch films." Industrial Crops and Products **8**(3): 195-203.
- Rivero, S., M. A. Garcia and A. Pinotti (2010). "Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films." Innovative Food Science & Emerging Technologies **11**(2): 369-375.
- Robeson, L. M. (1991). "Correlation of separation factor versus permeability for polymeric membranes." Journal of Membrane Science **62**(2): 165-185.
- Robeson, L. M. (2008). "The upper bound revisited." Journal of Membrane Science **320**(1–2): 390-400.
- Rose, P. I. (1987). "Gelatin." Encyclopedia of polymer science and engineering **7**: 488-513.
- Rowe, B. W., L. M. Robeson, B. D. Freeman and D. R. Paul (2010). "Influence of temperature on the upper bound: Theoretical considerations and comparison with experimental results." Journal of Membrane Science **360**(1–2): 58-69.
- Sahiner, N., M. Singh, D. De Kee, V. T. John and G. L. McPherson (2006). "Rheological characterization of a charged cationic hydrogel network across the gelation boundary." Polymer **47**(4): 1124-1131.
- Samouillan, V., F. Delaunay, J. Dandurand, N. Merbahi, J.-P. Gardou, M. Yousfi, A. Gandaglia, M. Spina and C. Lacabanne (2011). "The use of thermal techniques for the characterization and selection of natural biomaterials." Journal of Functional Biomaterials **2**(3): 230-248.
- Schrieber, R. and H. Gareis (2007a). "Basic chemical/physical principles and technological properties." Gelatin handbook: 45-62.
- Schrieber, R. and H. Gareis (2007b). Gelatine handbook: theory and industrial practice, John Wiley & Sons.
- Scott, W. (1953). "Water relations of Staphylococcus aureus at 30 C." Australian Journal of Biological Sciences **6**(4): 549-564.
- Shi, Y., C. M. Burns and X. Feng (2006). "Poly(dimethyl siloxane) thin film composite membranes for propylene separation from nitrogen." Journal of Membrane Science **282**(1–2): 115-123.
- Sobral, P. J. A. and A. M. Q. B. Habitate (2001a). "Phase transitions of pigskin gelatin." Food Hydrocolloids **15**(4–6): 377-382.
- Sobral, P. J. A., F. C. Menegalli, M. D. Hubinger and M. A. Roques (2001b). "Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films." Food Hydrocolloids **15**(4–6): 423-432.
- Stannett, V. (1968). "Simple gases." Diffusion in polymers: 41-73.
- Staroszczyk, H., J. Pielichowska, K. Sztuka, J. Stangret and I. Kołodziejska (2012). "Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase." Food Chemistry **130**(2): 335-343.
- Stauffer, D., A. Coniglio and M. Adam (1982). Gelation and critical phenomena. Polymer Networks, Springer: 103-158.
- Stern, S. and H. Frisch (1981). "The selective permeation of gases through polymers." Annual Review of Materials Science **11**(1): 523-550.
- Sung, H.-W., H.-L. Hsu, C.-C. Shih and D.-S. Lin (1996). "Cross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds." Biomaterials **17**(14): 1405-1410.
- Sung, H. W., R. N. Huang, L. L. H. Huang and C. C. Tsai (1999). "In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation." Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition **10**(1): 63-78.
- Tanaka, K. and K.-I. Okamoto (2006). Structure and transport properties of polyimides as materials for gas and vapor membrane separation. Materials science of membranes for gas and vapor separation, Wiley.
- Teixeira, L. S. M., J. Feijen, C. A. van Blitterswijk, P. J. Dijkstra and M. Karperien (2012). "Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering." Biomaterials **33**(5): 1281-1290.
- Thomazine, M., R. A. Carvalho and P. J. A. Sobral (2005). "Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol." Journal of Food Science **70**(3): E172-E176.

- Tin, P. S., T. S. Chung, Y. Liu, R. Wang, S. L. Liu and K. P. Pramoda (2003). "Effects of cross-linking modification on gas separation performance of Matrimid membranes." Journal of Membrane Science **225**(1-2): 77-90.
- Turhan, K., F. Sahbaz and A. Güner (2001). "A Spectrophotometric Study of Hydrogen Bonding in Methylcellulose-based Edible Films Plasticized by Polyethylene Glycol." Journal of Food Science **66**(1): 59-62.
- Van Amerongen, G. (1964). "Diffusion in elastomers." Rubber Chemistry and Technology **37**(5): 1065-1152.
- Van den Berg, C. and S. Bruin Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects, Rockland LB, Stewart GF, Water Activity: Influences on Food Quality, 1981, 1-61, Academic Press, New York.
- Van Den Bulcke, A. I., B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen and H. Berghmans (2000). "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels." Biomacromolecules **1**(1): 31-38.
- Van Vlierberghe, S., P. Dubruel and E. Schacht (2011). "Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review." Biomacromolecules **12**(5): 1387-1408.
- Vanin, F. M., P. J. A. Sobral, F. C. Menegalli, R. A. Carvalho and A. M. Q. B. Habitante (2005). "Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films." Food Hydrocolloids **19**(5): 899-907.
- Vansteenkiste, E., C. Babot, X. Rouau and V. Micard (2004). "Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis." Food Hydrocolloids **18**(4): 557-564.
- Vieira, M. G. A., M. A. da Silva, L. O. dos Santos and M. M. Beppu (2011). "Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review." European Polymer Journal **47**(3): 254-263.
- Wang, C., T. T. Lau, W. L. Loh, K. Su and D.-A. Wang (2011). "Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model cells." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **97B**(1): 58-65.
- Wang, L. Z., L. Liu, J. Holmes, J. F. Kerry and J. P. Kerry (2007). "Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films." International Journal of Food Science & Technology **42**(9): 1128-1138.
- Weng, L., X. Chen and W. Chen (2007). "Rheological Characterization of in Situ Crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and N-Carboxyethyl Chitosan." Biomacromolecules **8**(4): 1109-1115.
- Wessling, M., M. Lidon Lopez and H. Strathmann (2001). "Accelerated plasticization of thin-film composite membranes used in gas separation." Separation and Purification Technology **24**(1-2): 223-233.
- Wihodo, M. and C. I. Moraru (2013). "Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review." Journal of Food Engineering **114**(3): 292-302.
- Winter, H. H. and F. Chambon (1986). "Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point." Journal of Rheology **30**(2): 367-382.
- Yakimets, I., N. Wellner, A. C. Smith, R. H. Wilson, I. Farhat and J. Mitchell (2005). "Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state." Polymer **46**(26): 12577-12585.
- Yam, K. L. (2009). Gas permeation of packaging materials. The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology. K. L. Yam, John Wiley & Sons: 551.
- Yampolskii, Y. P., I. Pinnau and B. D. Freeman (2006). Materials science of membranes for gas and vapor separation, Wiley Online Library.
- Yang, L. and A. Paulson (2000). "Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films." Food Research International **33**(7): 563-570.
- Zhang, Z., I. J. Britt and M. A. Tung (1999). "Water absorption in EVOH films and its influence on glass transition temperature." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **37**(7): 691-699.

Annexes

Les principes de la chimie verte ont été développés par Paul Anastas et John C. Warner pour la United States Environmental Protection Agency en 1998 (www2.epa.gov/green-chemistry/basics-green-chemistry#twelve consulté le 20/06/2014)

1. Prévention : il vaut mieux produire moins de déchets qu'investir dans l'assainissement ou l'élimination des déchets.
2. Economie d'atomes : les synthèses doivent être conçues dans le but de maximiser l'incorporation des matériaux utilisés au cours du procédé dans le produit final.
3. Lorsque c'est possible, toute déviation inutile du schéma de synthèse (utilisation d'agents bloquants, protection/déprotection, modification temporaire du procédé physique/chimique) doit être réduite ou éliminée.
4. Les réactifs catalytiques sont plus efficaces que les réactifs stœchiométriques. Il faut favoriser l'utilisation de réactifs catalytiques les plus sélectifs possible.
5. Des méthodologies analytiques doivent être élaborées afin de permettre une surveillance et un contrôle en temps réel et en cours de production avant qu'il y ait apparition de substances dangereuses.
6. Lorsque c'est possible, les méthodes de synthèse doivent être conçues pour utiliser et créer des substances faiblement ou non toxiques pour les humains et sans conséquences sur l'environnement.
7. Les produits chimiques doivent être conçus de manière à remplir leur fonction primaire tout en minimisant leur toxicité.
8. Lorsque c'est possible, il faut supprimer l'utilisation de substances auxiliaires (solvants, agents de séparation, ...) ou utiliser des substances inoffensives.
9. Les besoins énergétiques des procédés chimiques ont des répercussions sur l'économie et l'environnement dont il faut tenir compte et qu'il faut minimiser. Il faut mettre au point des méthodes de synthèse dans les conditions de température et de pression ambiantes.
10. Lorsque la technologie et les moyens financiers le permettent, les matières premières utilisées doivent être renouvelables plutôt que non renouvelables.
11. Les produits chimiques doivent être conçus de façon à pouvoir se dissocier en produits de dégradation non nocifs à la fin de leur durée d'utilisation, cela dans le but d'éviter leur persistance dans l'environnement.
12. Les substances et la forme des substances utilisées dans un procédé chimique devraient être choisies de façon à minimiser les risques d'accidents chimiques, incluant les rejets, les explosions et les incendies.

Elaboration

G	Gélatine
NC	Non réticulé
GTA	Glutaraldéhyde
FA	Acide férulique
TPA	Téréphthalaldéhyde
NHS	N-hydroxysuccinimide
BS(PEG)9	Bis(succinimidyl)nona(ethylene glycol)
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	Polyéthylène oxyde
PEA	Polyéther amine
PO/EO	Propylène oxyde/éthylène oxyde
DMSO	Diméthylsulfoxyde
PBS	Tampon phosphate
TIG	Temperature induced gelation
P200	Polyéthylène glycol 200
D230	Jeffamine D230
D400	Jeffamine D400
D600	Jeffamine ED600
T403	Jeffamine T403
T3000	Jeffamine T3000

Caractérisation

MEB	Microscope électronique à balayage
FTIR	Infra-rouge
DRX	Diffraction aux rayons X
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
ATG/TGA	Analyse thermogravimétrique
GC	Chromatographie en phase gaz
TCD	Thermal conductivity detector

Rhéologie

$\tan \delta$	Damping factor
G'	Module élastique
G''	Module de perte
ω	Fréquence
TS	Contrainte à la rupture
EB	Elongation à la rupture

Calorimétrie

T_g	Température de transition vitreuse
T_m	Température de fonte
ΔH_m	Enthalpie de fonte
T_d	Température de dénaturation
ΔH_d	Enthalpie de dénaturation

$\Delta H_{denat. Coll}$ Enthalpie de dénaturation du collagène

Perméation gazeuse

indice 1 Se rapporte à l'amont de la membrane

indice 2 Se rapporte à l'aval de la membrane

#i Numéro de l'échantillon

D Coefficient de diffusion

φ Fréquence de saut

δ Longueur des sauts

e Epaisseur de la membrane

J Flux de gaz à travers la membrane

c Concentration en gaz

\bar{D} Coefficient de diffusion moyen

S Coefficient de solubilité

P Pression

k_D Constante de Henry

P_e Coefficient de perméabilité

\bar{S} Coefficient de solubilité moyen

$\alpha_{A/B}$ ou PA/PB Sélectivité entre les gaz A et B

α^D Sélectivité de diffusion

α^S Sélectivité de solubilité

T Température

R Constante des gaz parfait

ΔH_s Enthalpie de solubilité

E_D	Energie d'activation de la diffusion
E_p	Energie apparente d'activation de la perméabilité
STP	Conditions standard de température et de pression
θ	Time lag
t	Temps
A	Surface de la membrane
V	Volume du compartiment aval
$P_{w_{sat}}$	Pression de vapeur saturante
Q	Débit
δ_i	Proportion volumique du gaz i dans le perméat
ΔP	Pression transmembranaire
V_m	Volume molaire des gaz

Autres caractérisations

TNBS	Trinitro benzene sulfoxide acid
p	P-value (statistiques)
%HR ou %RH ou RH	Humidité relative
pI	Point isoélectrique
SR	Swelling ratio, taux de gonflement
A_w	Activité de l'eau
$P_{matériau}$	Pression partielle de l'eau à la surface du matériau
P_{eau}	Pression partielle de l'eau pure à la température considérée
m_e	Masse d'eau dans le matériau
m_s ou m_d	Masse sèche du matériau

m_{HR}	Masse du matériau "humide"
X_{HR} ou X	Teneur en eau

Elaboration de membranes "vertes" de séparation gazeuse à base de gélatine : mécanismes de structuration, réticulation et relations structure-propriétés

L'épuisement des ressources d'origine pétrochimique conduit à la recherche de matières premières renouvelables pour l'élaboration des membranes. La gélatine, un biopolymère abondant, sous-produit de l'industrie agroalimentaire, représente grâce à ses propriétés filmogènes un candidat de choix pour l'élaboration de membranes "vertes". L'objectif de cette thèse est l'élaboration de membranes à base de gélatine et l'étude de l'impact de la structure du matériau sur les propriétés mécaniques, thermiques, de résistance à l'eau et de transfert gazeux. Pour cela les mécanismes d'élaboration par TIG-Dry cast process ont d'abord été formalisés par l'établissement du diagramme de phase du système gélatine/eau. Puis des réticulants alternatifs au glutaraldéhyde, toxique, ont été examinés pour augmenter la résistance à l'eau de la gélatine hydrosoluble. L'acide férulique et le téréphthalaldéhyde se sont montrés les plus prometteurs et complémentaires suivant les applications visées. Les films de gélatine se sont révélés barrières aux gaz à cause de la forte cristallinité induite par la renaturation des triples hélices. L'ajout d'un élastomère de la famille des polyéther amines a permis d'augmenter drastiquement les coefficients de perméabilité du CO₂ de 1,4 à 250 Barrer. L'influence de la température et de l'humidité relative des flux gazeux sur les perméabilités a également été étudiée.

Mots clés : Séparation gazeuse, Gélatine, Membrane, Réticulation, Diagramme de phase

Elaboration of gelatin based "green" gas separation membranes: structuring mechanisms, cross-linking and structure-properties relations

Petroleum based raw materials shortage leads to investigate renewable raw materials for membrane elaboration. Gelatin, an abundant, industrial by-product is a biosourced polymer with filmogenic properties which makes it an educated choice for "green" membrane production. This thesis work aims at developing gelatin based membrane and studying the influence of the material structure on mechanical and thermal properties, water resistance and gas transport properties. Thus, the elaboration mechanisms by TIG/Dry-cast process were studied in details by establishing the phase diagram of the gelatin/water system. To improve the water resistance of the hydrosoluble gelatin, crosslinking is necessary. Alternative cross-linkers were tested to replace the glutaraldehyde, classified as toxic. Ferulic acid and terephthalaldehyde were promising and showed complementary characteristics. The high crystallinity level of gelatin films, related to their renaturation level, led to rather gas barrier properties. By adding an elastomer, polyetheramine, the permeability to CO₂ increased from 1.4 to an outstanding 250 Barrer. The influence of the temperature and relative humidity of the gas flux on permeability was also studied.

Keywords: Gas separation, Gelatin, Membrane, Cross-linking, Phase diagram
