HAL
open science

Elaboration contrôlée de membranes à base de chitosane pour le traitement de l'eau

Damien Wlodarczyk

To cite this version:

Damien Wlodarczyk. Elaboration contrôlée de membranes à base de chitosane pour le traitement de l'eau. Génie des procédés. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTS271 . tel-02409712

HAL Id: tel-02409712

https://theses.hal.science/tel-02409712

Submitted on 13 Dec 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**

Préparée au sein de l'école doctorale Gaïa
Et de l'unité de recherche **Institut Européen des Membranes (UMR 5635)**

Spécialité : **Génie des procédés**

Présentée par **Damien Wlodarczyk**

Elaboration contrôlée de membranes à base de chitosane pour le traitement de l'eau

Soutenue le 16 décembre 2015 devant le jury composé de

M Yves Andrès, Professeur, Ecole des Mines de Nantes	Rapporteur
M Christophe Vial, Professeur, UBP Clermont-Ferrand	Rapporteur
M Alexandra Montembault, Maître de conférences, Université Lyon 1	Examinateur
M Denis Bouyer, Professeur, IEM Université Montpellier	Examinateur
Mme Catherine Faur, Professeur, IEM Université Montpellier	Directrice de thèse
M Jean-Pierre Méricq, Maître de conférences, IEM Université Montpellier	Co-encadrant

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE **1**

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS **7**

CHAPITRE I **11**

1. Le chitosane (caractérisation et structure) **13**

1.1 Définition – structure – origine 13

1.2 Caractérisation du chitosane 15

1.3 Propriétés et principales applications 17

2. Les membranes organiques de filtration **21**

2.1 Principe d'un procédé de filtration baro-membranaire 21

2.2 Matériaux membranaires 23

2.3 Caractéristiques et propriétés des membranes 24

3. Elaboration de membranes en chitosane **30**

3.1 Gélification du chitosane 31

3.2 Du gel à la membrane de chitosane 39

3.3 Propriétés fonctionnelles des membranes de chitosane 55

CONCLUSION DU CHAPITRE I **63**

CHAPITRE II **67**

INTRODUCTION **69**

ENZYMATIC GELATION TO PREPARE CHITOSAN GELS: STUDY OF GELATION KINETICS AND IDENTIFICATION OF LIMITING PARAMETERS FOR CONTROLLED GEL MORPHOLOGY **71**

1. Introduction **71**

2. Materials and methods **74**

2.1 Materials 74

2.2 Implementation of enzymatic urea hydrolysis 74

2.3 Gel morphology characterization by Scanning Electron Microscopy (SEM) 77

3. Results and discussion 78

3.1 Urea hydrolysis in non-buffered water 78

3.2 Urea enzymatic hydrolysis in chitosan solution 80

3.3 In-situ monitoring of chitosan enzymatic gelation kinetics 83

3.4 Multi-parametric study of the enzymatic gelation of chitosan 85

3.5 Gel final structure 89

4. Conclusion 90

CONCLUSION DU CHAPITRE II 92

CHAPITRE III 95

INTRODUCTION DU CHAPITRE III 97

MODELLING OF ENZYMATIC CHITOSAN GELATION REACTION KINETICS: TOOLS FOR MONITORING CHITOSAN GELATION AND UREA HYDROLYSIS KINETICS 99

1. Introduction 99

2. Material and Methods 100

2.1 Materials 100

2.2 Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered chitosan solution and in non-buffered water 101

3. Modelling of the chitosan enzymatic gelation kinetics 101

3.1 Chitosan gelation reaction 102

3.2 Urea enzymatic hydrolysis reaction 103

3.3 Chemical equilibrium reactions in aqueous solution 104

3.4 Modelling numerical resolution 106

4. Results 107

4.1 Determination of the kinetics parameters for the enzymatic gelation reaction 107

4.2 Comparison between modelling and experimental results 111

4.3 Enzymatic urea hydrolysis reaction kinetics in water and chitosan media 114

4.4 Monitoring of gelation and urea hydrolysis reaction kinetics in chitosan media 119

4.5 Ammonium/ammonia equilibria and carbon dioxide/carbonate/hydrogen carbonate equilibrium in chitosan media 122

5. **Conclusion** 123

MODELING AND SIMULATION OF CHITOSAN ENZYMATIC GELATION FOR MEMBRANE FORMATION 125

1. **Introduction** 125

2. **Model description** 127
   - 2.1 Modeling strategy 127
   - 2.2 Geometry 128
   - 2.3 Chemical reactions 128
   - 2.4 Thermodynamics 129
   - 2.5 Mass transfer 130
   - 2.6 Heat transfer 132
   - 2.7 Initial and boundary conditions 133
   - 2.8 External transfers 134
   - 2.9 Numerical algorithm 135

3. **Results and Discussion** 135
   - 3.1 Model validation in deep cell geometry 135
   - 3.2 Concentration profiles in deep cell geometry 140
   - 3.3 Simulations in thin film conditions 144

4. **Conclusion** 156

CONCLUSION DU CHAPITRE III 158

CHAPITRE IV 163

INTRODUCTION 165

PREPARATION, FROM CHITOSAN GELS, OF POROUS AND ACID-RESISTANT CHITOSAN FLAT-SHEET MEMBRANES FOR WATER TREATMENT APPLICATIONS 167

1. **Introduction** 167

2. **Materials and methods** 169
   - 2.1 Materials 169

2.2 Preparation of chitosan materials (gels and membranes) 170
2.3 Chitosan gels and membranes characterization 172

3. Results and discussion 174
3.1 Characterization of the reference chitosan flat-sheet gel 174
3.2 Preparation of porous flat-sheet chitosan gel by addition of PEG 176
3.3 Preparation of chitosan membranes 181
3.4 Chitosan membranes characterization: 185

4. Conclusion 190

CONCLUSION DU CHAPITRE IV 191

CONCLUSION GENERALE 195

NOMENCLATURE, ABREVIATIONS ET TABLES 203

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 219

Introduction générale

Au cours de la dernière décennie, les procédés membranaires se sont considérablement développés, avec un taux de croissance d'environ 10% par an, pour représenter aujourd'hui un marché de plusieurs dizaines de milliards de dollars et des applications dans des secteurs industriels très variés (dépollution de l'eau, agroalimentaire, pharmacie, chimie, industrie du textile et du papier, métallurgie…) [1, 2]. Si l'on peut distinguer membranes inorganiques (céramiques) et organiques (polymères), ces dernières représentent aujourd'hui 80% des membranes utilisées dans le domaine du traitement de l'eau. Pour une mise en œuvre au sein d'un procédé de filtration baro-membranaire, les membranes organiques poreuses sont majoritairement fabriquées par séparation de phase à partir d'un système comprenant un ou des polymère(s) associé(s) à un ou un mélange de solvant(s) organique(s). Le système (polymère/solvant) initialement stable est déstabilisé thermodynamiquement (par évaporation du solvant, par mise en contact avec un non-solvant ou par variation de température) de sorte qu'il se sépare en deux phases : une phase riche en polymère qui représentera la membrane après solidification et une phase riche en solvant qui constituera les pores de la membrane après extraction du solvant [3].

Pour tous ces procédés d'élaboration, une utilisation systématique de solvants organiques est nécessaire à la solubilisation du polymère ce qui est en contradiction avec la réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) qui a notamment pour objectif de diminuer les risques liés à l'utilisation de solvants organiques. En effet, ces solvants organiques représentent un danger à la fois pour les salariés lors de leur manipulation mais aussi pour l'environnement puisqu'ils doivent être traités.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de développer un nouveau procédé d'élaboration de membranes polymères **sans solvant organique** à base de chitosane, un polymère qui présente trois caractéristiques intéressantes pour l'élaboration de membranes « vertes » destinées au domaine du traitement de l'eau :

- Le chitosane est un dérivé de la chitine, le second polymère biosourcé le plus abondant après la cellulose.
- Le chitosane a la propriété d'être soluble dans l'eau en milieu acide (pH < 6,2) et de précipiter lorsque le pH devient basique ce qui permet sa gélification en l'absence de solvant organique.

- Le chitosane est un polysaccharide possédant des fonctions amines et hydroxyles le long de sa chaine carbonée, ce qui lui confère des propriétés de sorption vis-à-vis de micropolluants tels que des pesticides, des colorants ou encore des métaux contenus dans l'eau.

A ce jour, des membranes de chitosane ont été obtenues par deux procédés d'élaboration qui sont : (i) le procédé par immersion, majoritairement utilisé, et dans lequel une solution de chitosane est immergée dans une phase aqueuse basique pour générer un gel de structure anisotrope [4] du fait de la présence d'un front de gélification liée à la pénétration rapide du non-solvant basique sur une face de la solution chitosane ; (ii) le procédé par contact avec des vapeurs de non solvant basique, permettant un meilleur contrôle de la structuration membranaire grâce à un ralentissement des transferts mais donnant également lieu à un front de gélification [5] lié à l'entrée des vapeurs de non-solvant. Plus récemment, Chenite et al. (2006) [6] et Yan et al. (2014) [7] ont présenté un procédé original de gélification par voie enzymatique qui pourrait permettre l'obtention d'une morphologie plus homogène et mieux contrôlée due à l'absence de front de gélification dans la mesure où la gélification est réalisée in-situ de la solution de chitosane. Par voie enzymatique, la gélification est en effet induite par la production d'ammoniaque, issue de l'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase, directement au sein de la solution de chitosane.

Cependant, les deux études précédemment citées doivent être complétées avant de permettre l'élaboration de membrane en chitosane par ce procédé de gélification enzymatique original. Il est ainsi nécessaire d'avoir : (i) une meilleure compréhension du système urée-uréase en milieu chitosane et des cinétiques couplées d'hydrolyse enzymatique de l'urée et de gélification du chitosane ; (ii) un contrôle du temps de gélification du chitosane grâce à une identification et une maîtrise des paramètres opératoires clés ; (iii) et, ce procédé de gélification n'ayant été utilisé que pour des applications biomédicales, un passage d'un état gel à une membrane poreuse de filtration en traitement des eaux, par une génération de la porosité et d'une modification chimique pour rendre la membrane complètement insoluble.

L'objectif de ce travail de thèse consiste donc à élaborer par voie enzymatique des membranes en chitosane permettant de traiter des effluents acides chargés en ions métalliques grâce à un couplage des propriétés de filtration de la membrane pour les composés de masse molaire élevée avec les propriétés de sorption du chitosane vis-à-vis des éléments métalliques.

A cette fin, le travail de recherche qui compose cette thèse s'organise en 4 chapitres. Le Chapitre I est une synthèse bibliographique qui permet d'introduire les procédés de filtration membranaire, les principales propriétés du chitosane et les procédés permettant sa gélification. Puis, un état de l'art sur les différentes méthodes permettant de générer la porosité au sein des gels de chitosane et les modifications chimiques pouvant le rendre insoluble en milieu acide sera réalisé. A ce stade, il convient de préciser que dans le cadre de ce travail, le terme « gel plan poreux » sera utilisé pour définir les gels de chitosane pour lesquels une étape spécifique a permis de générer une porosité, et le terme « membrane » correspondra à un gel plan poreux devenu insoluble en milieu acide suite à une modification chimique du chitosane.

Le Chapitre II sera consacré à la caractérisation de la cinétique de la gélification enzymatique du chitosane à l'échelle d'un réacteur volumique semi-fermé de rapport hauteur/diamètre = 0.73 (avec une hauteur de 1,5 cm). Une première partie de ce chapitre présente l'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'urée par l'uréase en milieu aqueux non-tamponné afin de déterminer les paramètres opératoires limitants. Dans une seconde partie, ces paramètres seront ensuite optimisés lors de la gélification enzymatique en milieu chitosane, avec pour objectif de sélectionner les conditions opératoires permettant d'obtenir une morphologie homogène et des gels suffisamment rigides pour être mis en œuvre au sein d'un procédé de filtration.

Le Chapitre III portera sur la mise en place de modèles visant à une meilleure compréhension des mécanismes limitants lors de la gélification enzymatique du chitosane. Les équilibres et les cinétiques réactionnelles seront formalisés, en dissociant la cinétique d'hydrolyse de l'urée et celle de gélification du chitosane. Une comparaison entre un modèle réalisé pour un « système volumique semi-fermé 0D » (qui néglige tout transfert interne ou externe) et un modèle adapté à la mise en forme de gels plans permettra d'identifier l'influence des phénomènes de transfert ainsi que de la mise en forme sur la cinétique de gélification enzymatique du chitosane.

Le Chapitre IV décrira enfin les étapes permettant d'obtenir des membranes de chitosane à partir des gels plans élaborées dans le Chapitre II, en prenant en compte les informations nouvelles acquises au travers de la modélisation (Chapitre III). Une première partie sera consacrée à la génération de la porosité afin d'obtenir des gels plans poreux de perméabilité correspondant au domaine de l'ultrafiltration. Puis, une seconde partie aura pour objectif de rendre les gels plans poreux de chitosane insolubles en milieu acide. Les membranes obtenues seront caractérisées en termes de structure, de propriétés de filtration et de sorption vis à vis d'un élément métallique modèle (Cu(II)).

.

Publication et communications

Ce manuscrit est présenté sous forme de publications scientifiques. La publication correspondant au Chapitre II intitulée «**Enzymatic gelation to prepare chitosan gels: study of gelation kinetics and identification of limiting parameters for controlled gel morphology** » a été soumise à AICHE Journal.

Les publications relatives aux chapitres III et IV seront prochainement soumises dans les journaux internationaux Chemical Engineering Journal, et AICHE Journal (Chapitre III) ainsi que Journal of Membrane Science (Chapitre IV).

Ce travail a par ailleurs fait l'objet d'une présentation orale dans une conférence internationale et de deux communications par affiche dans une conférence nationale et une conférence internationale:

D. Wlodarczyk*, J-P. Mericq, L. Soussan, D. Bouyer et C. Faur, Elaboration of chitosan membrane by an original enzymatic gelation process (communication orale). Membranes for liquid sepration and water treatment : environmental applications and future perspectives, Turin, Italie, 10 – 11 octobre 2013.

D. Wlodarczyk*, J-P. Mericq, L. Soussan, D. Bouyer et C. Faur, Elaboration de membranes « vertes » à base de chitosane par un nouveau procédé de gélification enzymatique (communication par affiche). MEMPRO V, Intégration des membranes dans les procédés, Toulouse, France, 9-11 avril 2014.

D. Wlodarczyk, J-P. Mericq*, L. Soussan, D. Bouyer et C. Faur, Elaboration of "green" chitosan membranes by an original enzymatic gelation process (communication par affiche). European Congress of chemical Engineering (ECCE) 10, Nice, France, 27 septembre – 1er octobre.

CHAPITRE I

1. Le chitosane (caractérisation et structure)

1.1 Définition – structure – origine

La chitine, principalement issue de la carapace des crustacés et de l'endosquelette des céphalopodes, est le second polysaccharide biosourcé après la cellulose. Contrairement à la chitine, le chitosane est rarement présent dans la nature à l'exception de certains champignons, mais il peut être obtenu par désacétylation de la chitine pour une production mondiale de l'ordre de 3 000 à 10 000 tonnes par an [8].

La chitine et le chitosane sont des polysaccharides ayant une structure chimique proche (Figure I. 1) résultant de la répétition d'unités de N-acétyl-β-D-glucosamine (GlcNac) et de D-glucosamine (GlcN), respectivement de masse molaire MM_{GlcNAc} = 221.21 g.mol^{-1} et MM_{GlcN} = 179.17 g.mol^{-1}. Les deux polymères diffèrent par leur degré de désacétylation (noté DDA), représentant le pourcentage d'unités D-glucosamine sur le nombre total d'unités. Il n'existe pas de nomenclature officielle pour différencier la chitine du chitosane mais en pratique, le chitosane est associé à des valeurs de DDA supérieures à 60% et une masse molaire en masse (MM_{Chit}) généralement comprise entre 50 kDa et 2000 kDa [9].

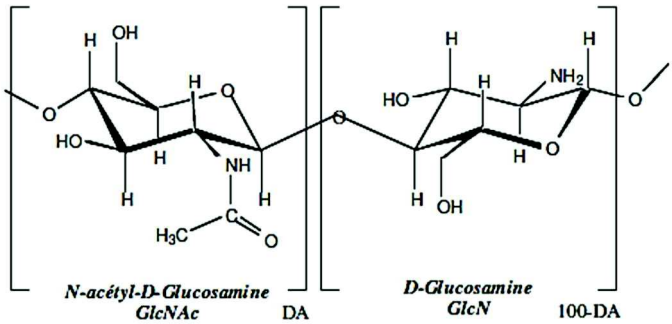

Figure I. 1: Structure chimique de la chitine et du chitosane

Le procédé d'obtention du chitosane par désacétylation de la chitine consiste généralement en une trempe dans une solution alcaline concentrée de NaOH ou de KOH (35-50% w/v) à des températures variant entre 80 et 140°C pendant une durée de 0,5 à 10 heures et avec des rapports 10 :1 (v/v). Les conditions de désacétylation de la chitine conditionnent les propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane obtenu [10].

Le chitosane peut ainsi être considéré comme la forme désacétylée de la chitine, sa structure se distinguant par la prédominance des groupements acétamides et la présence de nombreuses

fonctions hydroxyles qui lui confèrent un fort caractère hydrophile. La principale différence physico-chimique entre la chitine et le chitosane réside par conséquent dans la possibilité de solubiliser le chitosane en solution aqueuse acide diluée où les fonctions amines du chitosane vont se protoner pour donner un polyélectrolyte cationique. La solubilisation du chitosane résulte de l'établissement d'un équilibre entre les ions hydroniums apportés par le milieu acide et les fonctions amines $–NH_2$ du chitosane :

$$\boldsymbol{Chit - NH_2 + H_3O^+ \rightleftarrows Chit - NH_3^+ + H_2O} \qquad \textit{Eq I. 1}$$

Le pK_a des fonctions NH_3^+ est décrit à partir de l'équation de Katchalsky :

$$\boldsymbol{pK_a = pH + log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) = pK_0 - \frac{\epsilon\Delta\Psi(\alpha)}{kT}} \qquad \textit{Eq I. 2}$$

Avec α, le degré de dissociation du polymère donnant la proportion des fonctions amines chargées positivement (NH_3^+) par rapport aux fonctions amines $–NH_2$, pK_0, le pK_a intrinsèque (qui est égal au pK_a pour α = 1), ϵ, la charge de l'électron (ϵ = 1,602.10^{-19} Cb), $\Delta\Psi(\alpha)$ (en volt), la différence de potentiel entre la charge du poly-ions et le potentiel de référence, k, la constante de Boltzmann (k = 1,38.10^{-23} m^2.kg^{-1}s^{-2}K^{-1}) et T(K), la température.

Le pK_a du chitosane varie donc en fonction du degré de dissociation α qui est associé à la densité de charge du polymère [11]: le pK_a varie entre 6,2 et 7,1, de sorte que le chitosane devient soluble pour des pH inférieurs à 6 [12] et précipite au-delà de 6 pour former un gel. Par exemple, une dissolution complète est obtenue pour $\alpha \geq 0,5$ et un rapport stœchiométrique [acide acétique]/[groupements amines du chitosane] égal à 0,6 [13].

Généralement, la solubilisation du chitosane est réalisée dans un solvant organique tel que l'acide acétique, l'acide formique ou, après dilution, l'acide lactique, l'acide chlorhydrique et l'acide nitrique. Toutefois, une concentration trop élevée en acide peut entrainer une dégradation des chaînes de polymère par hydrolyse, visible au travers de la diminution de la viscosité du collodion [14, 15]. Tandis que Nguyen et al. (2008) [16] ont mis en évidence l'absence d'effet significatif de la concentration en acide acétique pour des valeurs comprises entre 0,1 et 0,8 M (*P value* ≤ 0,05), Knill et al. (2005) [17] ont observé une diminution progressive de la masse molaire en poids d'au moins un facteur 10 lors de l'ajout d'acide chlorhydrique 12 M dans une solution de chitosane préparée dans l'acide acétique.

La température peut également avoir un effet significatif sur la dégradation du polymère lors de sa solubilisation : pour des solutions de chitosane à 1% w/v dans l'acide acétique à 0,2 M, la vitesse

d'hydrolyse est 4 à 5 fois plus faible à 28°C plutôt qu'à 60°C, et elle est négligeable à 5°C.

1.2 Caractérisation du chitosane

Les propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane étant principalement liées aux caractéristiques structurales que sont le degré de désacétylation (DDA) et la masse molaire (MM_{Chit}), une présentation des techniques de caractérisation permettant d'accéder à ces deux paramètres est réalisée.

1.2.1 Degré de désacétylation (DDA)

Plusieurs techniques d'analyses permettent de déterminer le DDA, les plus couramment utilisées sont présentées ci-dessous classées par précision croissante et par temps de caractérisation décroissant.

1.2.1.1 RMN du proton

Dans cette méthode [18], les protons labiles des fonctions hydroxyles du chitosane doivent d'abord être échangés avec du deutérium par immersion dans de l'acide chlorhydrique à 2 % pendant 1 h à 70°C (Figure I. 2).

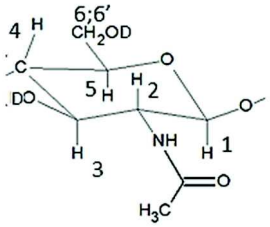

Figure I. 2: Formule chimique d'un motif de chitosane acétylé deutéré

Une fois le chitosane deutéré analysé, le DDA est ensuite calculé comme le rapport des aires des massifs des méthyles des groupements acétamides (I_{CH3}) avec l'aire du massif des autres protons du cycle (I_{H2-6}) [19]:

$$\boldsymbol{DDA}(\%) = \left(\mathbf{1} - \frac{\frac{1}{3}I_{CH3}}{\frac{1}{6}I_{H2-6}}\right) \times \mathbf{100} \qquad \textit{Eq I. 3}$$

1.2.1.2 Dosage potentiométrique

Une quantité connue de chitosane est immergée dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,02 M

pour solubilisation, le collodion obtenu étant agité pendant 24 h de manière à protoner toutes les fonctions amines [20, 21]. Le mélange est ensuite titré par une solution de soude à 0,01 M. Le pourcentage de fonctions amines (ou DDA) est calculé d'après L'Eq I. 4 :

$$\boldsymbol{DDA = \%NH_2 = \frac{M_{NaOH}(V_2 - V_1) \times MM_{GlcN}}{W} \times 100} \qquad \textit{Eq I. 4}$$

Où M_{NaOH} (mol.L^{-1}) est la concentration de la solution de soude ; V_1 et V_2 (L) sont respectivement les volumes de solution de soude pour neutraliser l'excès d'acide chlorhydrique et le volume d'acide servant à protoner le chitosane ; MM_{GlcN} est la masse molaire d'une unité de de D-glucosamine ; W (g) est la masse sèche de l'échantillon de chitosane caractérisé.

1.2.1.3 Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR).

La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourrier (FT-IR) permet de détecter les fonctions chimiques présentes sur l'échantillon analysé. Le DDA est obtenu à partir des mesures d'aire des pics correspondant aux fonctions amides primaires et hydroxyles du chitosane. Domszy et al. (1955) [22] ont montré que pour du chitosane complétement acétylé, le rapport de ces deux aires est de 1/1,33. Le DDA pour du chitosane solide peut ainsi être calculé à partir de l'équation suivante :

$$\boldsymbol{DDA(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}}\right) \times \left(\frac{1}{1{,}33}\right)\right] \times 100} \qquad \textit{Eq I. 5}$$

Où A_{1655} et A_{3450} correspondent respectivement à l'aire du pic des fonctions amides primaires et hydroxyles du chitosane.

1.2.2 Masse molaire

Les deux principales techniques permettant de déterminer la masse molaire du chitosane sont la viscosimétrie et la chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière.

1.2.2.1 Viscosimétrie

Cette méthode, rapide à mettre en œuvre, consiste à déterminer la viscosité intrinsèque η (mL.g^{-1}) et à la relier à la masse molaire moyenne viscosimétrique $\overline{M_v}$ (g.mol^{-1}) qui est en pratique proche de la masse molaire en masse $\overline{M_w}$.

$\overline{M_v}$ est calculée à partir de la relation de Mark-Houwink-Sakurada [20] :

$$\eta = K_{MHS} \times \overline{M_v}^{a} \qquad \textit{Eq I. 6}$$

K_{MHS} et a sont des coefficients qui dépendent de la température de travail, de la concentration en sel et du couple solvant/polymère comme illustré dans le Table I. 1.

Table I. 1: Exemples de paramètres de la relation de Mark-Houwink-Sakurada pour différents couples solvant/polymère à température fixée

Solvant	Température (°C)	K_{MHS} (mL.g-1)	a	Réf.
0,1 M a.acét/0,2 M NaCl	25	1,81×10-3	0,93	[23]
0,1 M a.acét/0,02 M NaCl	25	3,04 ×10-3	1,26	[23]
0,3 M a.acét/0,2 M a.acétNa Da=0,02	25	8,2 × 10-2	0,76	[24]
0,25 M a.acét/0,25 M a.acétNa	25	1,57 × 10-4	0,79	[25]

1.2.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière

La chromatographie d'exclusion stérique (ou SEC) [26] est une technique de chromatographie en phase liquide qui permet de déterminer les masses molaires moyennes des polymères ainsi que la distribution de la masse molaire. Les macromolécules sont séparées en fonction de la dimension des chaines de polymère, les interactions entre l'échantillon et la phase stationnaire (gel) étant minimisées. Le détecteur à diffusion de la lumière situé en sortie de colonne va analyser la phase mobile pour donner un signal directement proportionnel à la masse molaire en poids.

1.3 Propriétés et principales applications

Le chitosane présente des propriétés physico-chimiques et biologiques qui permettent d'envisager son utilisation pour de nombreuses applications dans les domaines du biomédical, la cosmétique, l'agroalimentaire, l'agriculture mais aussi le traitement de l'eau. Une synthèse en est faite dans le Table I. 2.

Table I. 2: Principales propriétés et applications du chitosane

Propriété	Application	Réf.
Biocompatible	Médical : Organes / tissus artificiels, fils de suture, pansements	[27-30]
Biodégradable, antimicrobien	Cosmétique : Agent antistatique, émollient, humectant, conservateur	[31]
Filmogène	Agroalimentaire : emballage	[31, 32]
Bioactif (antifongique)	Agriculture : destruction champignons	[33]
Chelatant, complexant, polycationique	Traitement de l'eau : coagulation, adsorption, modification de membrane	[34-37]

En particulier, les propriétés anti-microbiennes du chitosane permettent d'envisager plusieurs applications dans le domaine biomédical. Son activité antimicrobienne contre certains groupes de microorganismes (bactéries, levures et champignons) [38, 39] se révèle plus importante lorsque le chitosane est transformé sous la forme d'oligomère [40]. Cette transformation est possible par réaction avec de l'hydroxyde de sodium à 90-100°C pendant 3 à 5 h ou par réaction enzymatique avec l'*Aspergillus niger* [41]. Quant à son activité antibactérienne, elle est due au caractère poly-cationique du chitosane qui est capable d'interagir avec la paroi cellulaire des bactéries [42].

Dans le domaine du traitement de l'eau, le chitosane peut être utilisé à l'état liquide ou solide sous forme de poudre, de flocons ou de billes.

Sous forme liquide, lorsqu'il est solubilisé en milieu acide, il peut être mis en œuvre au sein de procédés de coagulation-floculation, ou de sorption par chélation ou complexation. La sorption sur le chitosane soluble peut être suivie d'une étape de séparation par filtration membranaire (ultrafiltration) [43, 44]. Il a également été montré que le chitosane, greffé sur des membranes en polysulfone destinées à être mises en œuvre dans un bioréacteur à membranes, permettait de diminuer le colmatage de la membrane [34].

Sous forme solide, les propriétés chélatantes et poly-cationiques du chitosane en font un matériau intéressant pour la sorption de différents types de polluants : des cations métalliques, des colorants ou encore des composés phénoliques (Table I. 3). Les plus grandes capacités de sorption du chitosane concernent les colorants (> 100 $mg.g^{-1}$) et les métaux Pd, Pb, Hg (> 75 $mg.g^{-1}$). Il permet également une bonne sorption du Cu et Ni (environ 50-60 $mg.g^{-1}$). Dès lors qu'il est utilisé sous forme solide en milieu acide, ce qui est souvent le cas des effluents contenant des ions métalliques, une

modification chimique s'avère nécessaire pour éviter la resolubilisation du chitosane. Elle peut être soit une réticulation des chaines de polymère, les réticulants peuvent être classés en fonction du groupement sur lequel ils vont réagir, que ce soit sur les groupements hydroxyles –OH (sur lesquels réagit l'épichlorohydrine ou l'éthylène glycol diglycidyl éther) ou les groupements amines $–NH_2$ (mobilisés dans les réactions avec le glutaraldéhyde ou la génipine) ; soit une acétylation des groupements hydroxyles par de l'anhydride acétique.

Les intéressantes propriétés de sorption du chitosane, couplées à ses propriétés filmogènes (Table I. 2), permettent d'envisager d'élaborer des membranes en chitosane, destinées à assurer simultanément des opérations de filtration/sorption. Des membranes hybrides de ce type ont déjà été élaborées avec d'autres polymères organiques [37, 45]. A des fins d'élimination des ions métalliques, le polymère utilisé doit présenter à sa surface des groupements fonctionnels $–NH_2$, $-SO_3$ et/ou –COOH [46]. Modrzejewska et al. (1997) et Kaminski et al. (1997) [47, 48] ont élaboré des membranes pour la sorption de métaux de transition. Ils ont montré qu'une étape d'acétylation du chitosane permettait d'obtenir des membranes insolubles en milieu acide.

Table I. 3: Exemple de sorption en fonction du type de soluté et pour différentes mises en forme du chitosane

Type de soluté	Mise en forme	Soluté sorbé	capacité de sorption	Réf.
Métallique	Billes (<250 µm) réticulées par glutaraldéhyde (GA), épichlorohydrine (EPI) ou Ethylène glycol diglycidyl éther (EDGE)	Cu(II)	Chitosane-GA : 59,7 $mg.g^{-1}$ Chitosane-EPI : 62,5 $mg.g^{-1}$ Chitosane-EDGE : 45,9 $mg.g^{-1}$	[49]
	Billes réticulées par EPI et fonctionnalisées par l'hystidine	Ni(II)	55,6 $mg.g^{-1}$	[50]
	Membrane réticulée par GA avec porosité générée par séchage à 50 %	Hg(II)	Chi : 25 $mg.g^{-1}$ Chit-GA : 75 $mg.g^{-1}$	[51]
	Flocons réticulés par GA	Pd(II)	180 $mg.g^{-1}$	[52]
	Flocons réticulés par GA et fonctionnalisés par l'acide citrique	Pb(II)	101,7 $mg.g^{-1}$	[53]
Colorant	Nanoparticules (60-90 nm) réticulées par GA	FD&C Blue 1 FD&C Yellow 5	475,6 $mg.g^{-1}$ 292,1 $mg.g^{-1}$	[54]
	Billes réticulées par EPI	RR 189	1802-1840 $mg.g^{-1}$	[55]
Autre	Poudre tamisée à 420 µm réticulée par GA	*p*-nitrophénol	79,6 $mg.g^{-1}$	[56]
	Poudre à 40 MESH non réticulée ou réticulée par GA dans le collodion	urée	Chi : 47,1 $mg.g^{-1}$ Chi/GA (rapport massique : 1/0.585) : 171,2 $mg.g^{-1}$	[57]

2. Les membranes organiques de filtration

2.1 Principe d'un procédé de filtration baro-membranaire

Les procédés membranaires sont utilisés pour concentrer des molécules ou des ions en solutions, séparer des espèces dissoutes et/ou des particules et microorganismes en suspension dans un liquide, en contrôlant et en orientant les échanges de matière à travers la barrière sélective que constitue la membrane (Figure I. 3).

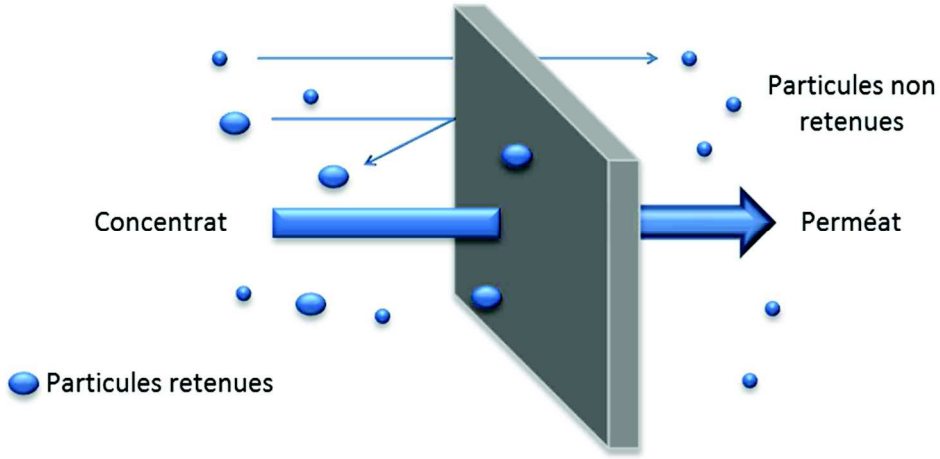

Figure I. 3: Schéma de principe de la filtration membranaire

Une membrane est ainsi définie comme une barrière semi-perméable permettant le transfert de matière de certaines espèces entre deux milieux. La force motrice permettant le transfert de matière transmembranaire peut être : un gradient de température, une différence de potentiel électrique, un gradient de concentration ou un gradient de pression [58] (Table I. 4).

Table I. 4: Classification des procédés principaux membranaires selon la force motrice appliquée [58]

Force motrice	Gradient de pression	Différence de potentiel électrique	Gradient de concentration	Gradient de température et de pression
Procédé associé	- Microfiltration (MF) - Ultrafiltration (UF) - Nanofiltration (NF) - Osmose inverse (OI)	- Électrodialyse	- Dialyse - Contacteur membranaire - Pervaporation - Perméation gazeuse	- Distillation membranaire

Pour notre étude, nous nous intéresserons aux procédés de filtration baro-membranaire. Dans ce type de procédé, la force motrice qui intervient est la pression transmembranaire, c'est-à-dire la différence de pression appliquée de part et d'autre de la membrane.

Les procédés baro-membranaires sont au nombre de quatre : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) qui utilisent des membranes poreuses et l'osmose inverse (OI) qui met en œuvre des membranes denses.

Le type de filtration dépend des caractéristiques de la membrane (taille des pores de la couche sélective) et des conditions de travail (pression transmembranaire, flux moyen) (Table I. 5) :

Table I. 5: Principales caractéristiques des membranes en fonction du procédé de filtration

Opération	Molécules retenues	Taille des pores de la couche sélective (ordres de grandeur en nm)	Pressions transmembranaires moyennes (bar)	Perméabilité à l'eau à 20°C ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)
Microfiltration	Particules (0,05 à 10 mm)	50 à 1000	0,5 à 3	500 à 100 000
Ultrafiltration	Macromolécules (1 000 à 500 000 $g.mol^{-1}$), virus	5 à 50	1 à 5	50 à 500
Nanofiltration	Ions divalents, composés organiques, sucres (1 000 à 500 000 $g.mol^{-1}$)	1 à 5	3 à 30	10 à 100
Osmose inverse	Ion minéraux, petits composés organiques	Pas de pores	30 à 70	3 à 20

L'ultrafiltration, procédé visé dans cette étude, permet la rétention de macromolécules (1 000 à 500 000 $g.mol^{-1}$) avec des pressions opératoires de 1 à 5 bar pour des perméabilités de 50 à 500 $L.h^{-1}.m^{-2}$. Les membranes d'ultrafiltration sont macroporeuse ont des tailles de pores de 5 à 50 nm.

2.2 Matériaux membranaires

Les matériaux utilisés pour élaborer des membranes destinées à des procédés de filtration baro-membranaire peuvent être classés selon leur nature : minérale ou organique (Table I. 6) [58, 59].

Table I. 6: Caractéristiques des membranes selon leur nature

Matériau	Température de travail (°C)	Gamme de pH	Avantages	Inconvénients
Minéral	350 à 900°C	1-14	Très bonne résistance chimique, thermique Stérilisation possible	Prix (3 800 à 7 600 €/m²)
Organique	35 à 100°C	3-8 pour la cellulose et 1-13 pour le polysulfone	Prix (300 à 750 €/m²) Facilité de mise en œuvre	Faible résistance aux oxydants et aux produits chlorés

Les membranes minérales sont constituées de matériaux céramiques (alumine, dioxyde de titane, dioxyde de zirconium), ce qui leur confère de très bonnes résistances chimique et thermique même si ces propriétés sont rarement exploitées dans l'industrie. Leur résistance leur permet d'être stérilisées pour des applications dans le secteur agroalimentaire comme par exemple l'industrie laitière.

Les membranes organiques sont principalement des polymères synthétiques (polysulfone, polyamides aromatiques) ou biosourcés (la cellulose). Elles présentent comme grand avantage d'avoir un faible coût de production et d'être faciles à mettre en œuvre.

2.3 Caractéristiques et propriétés des membranes

2.3.1 Morphologie

2.3.1.1 Les membranes symétriques

Les membranes symétriques sont composées d'un même matériau et présentent une porosité sensiblement uniforme dans toute l'épaisseur. Elles peuvent être denses (absence de pores) ou poreuses (Figure I. 4). Dans ce cas, toute l'épaisseur de la membrane joue le rôle de couche sélective. Les membranes organiques de microfiltration fabriquées par inversion de phase sont symétriques ou faiblement asymétriques. Les couches sélectives des membranes d'osmose inverse peuvent également être considérées comme des membranes symétriques denses.

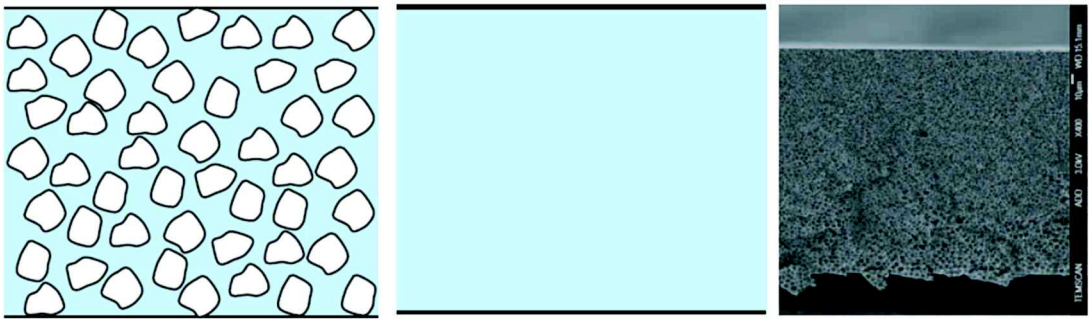

Figure I. 4: Représentation de membranes symétriques (a : membrane isotrope poreuse ; b : membrane dense ; c : photographie MEB d'une membrane de filtration faiblement asymétrique) [59]

2.3.1.2 Les membranes asymétriques

Les membranes asymétriques (ou anisotropes) ont une porosité variable dans l'épaisseur de la membrane. Deux parties peuvent être distinguées : la peau dense et la sous-couche poreuse (Figure I. 5).

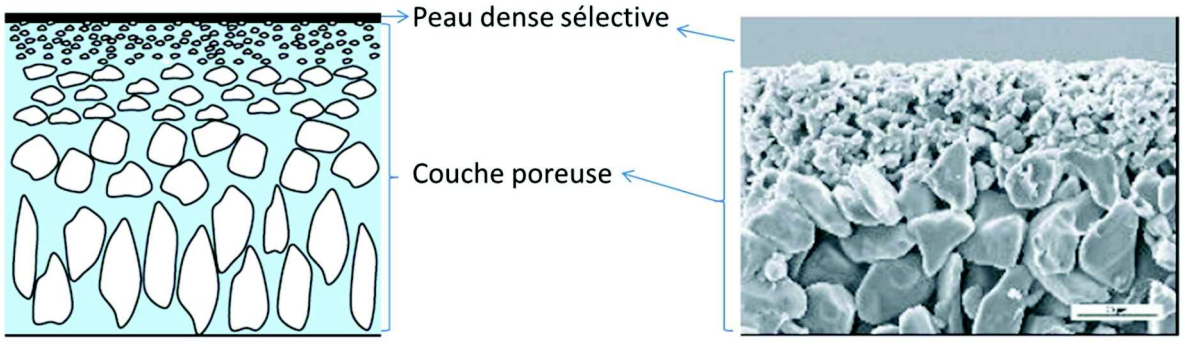

Figure I. 5: Représentation des membranes asymétriques (a : représentation schématique d'une membrane asymétrique ; b : membrane asymétrique en céramique) [59]

La peau dense constitue la partie sélective de la membrane. De porosité fine, son épaisseur est très faible devant celle de la membrane : de l'ordre de 1 µm ou moins pour des membranes d'épaisseur variant de 100 à 300 µm. Cette peau de faible épaisseur permet d'obtenir une sélectivité associée à une perméabilité élevée de la membrane. Elle sera mise directement en contact avec le fluide à filtrer. La sous-couche poreuse, qui constitue la plus grande partie de la membrane, possède une porosité souvent importante (60 à 80 %), associée à des pores de grandes dimensions (à l'échelle du micromètre). Elle n'offre pas de sélectivité et n'influe pas sur la perméabilité. Son rôle est d'assurer la résistance mécanique de la membrane.

En pratique, une membrane doit associer une haute perméabilité à une haute sélectivité ainsi qu'à une très bonne résistance thermique, chimique et mécanique. Ces propriétés dépendent du procédé d'élaboration mais aussi du matériau utilisé.

2.3.2 *Propriétés fonctionnelles*

2.3.2.1 La perméabilité hydraulique (L_p)

Les membranes poreuses, peuvent être considérées comme des milieux poreux idéaux avec un écoulement laminaire, ce qui permet d'utiliser la loi de Darcy qui se traduit par une évolution linéaire de la densité de flux J (L.h^{-1}.m^{-2}) en fonction de la pression appliquée ΔP (bar) :

$$\boldsymbol{J = L_p . \Delta P} \qquad \textit{Eq I. 7}$$

L_p (L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}) est définie comme étant la perméabilité hydraulique de la membrane. C'est une propriété intrinsèque de la membrane qui permet de comparer les matériaux entre eux. Elle dépend du fluide traité, et est notamment influencée par la viscosité du fluide et donc la température.

L_p peut aussi s'exprimer en fonction de la viscosité du perméat µ (Pa.s) et de la résistance hydraulique de la membrane Rm (m^{-1}) :

$$\boldsymbol{L_p = \frac{1}{\mu \times Rm}} \qquad \textit{Eq I. 8}$$

Compte tenu de la variation de la viscosité de l'eau avec la température, le flux J varie d'environ 3 % par degré, pour des températures allant de 10 à 50°C [60].

2.3.2.2 Sélectivité et seuil de coupure

La sélectivité d'une membrane [61] est généralement caractérisée par le taux de rétention (aussi appelé taux de rejet noté TR) d'un sel, d'une macromolécule ou d'une particule selon le type de filtration :

$$\boldsymbol{TR = 1 - \frac{C_p}{C_0}} \qquad \textbf{Eq I. 9}$$

Avec C_0, la concentration massique de l'espèce à retenir dans la solution et C_p, La concentration massique de la même espèce dans le perméat.

Le taux de passage, couramment utilisé dans la littérature, peut également être défini :

$$\boldsymbol{TP = \frac{C_p}{C_0} = 1 - TR} \qquad \textit{Eq I. 10}$$

A partir de l'étude du taux de rétention d'une macromolécule modèle (par exemple du dextran) en fonction de sa taille, il devient possible de calculer le seuil de coupure de la membrane [62]. Celui-ci

est défini comme la masse molaire minimale de la macromolécule retenue à 90 (ou 95 % selon les études) par la membrane. L'évolution du taux de rétention de molécules de traceurs en fonction de leur masse molaire est appelée courbe de sélectivité (Figure I. 6).

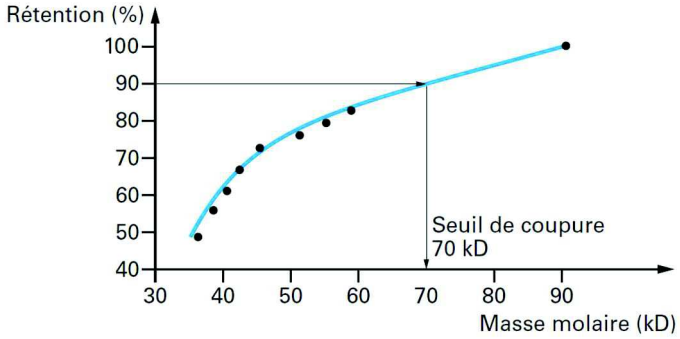

Figure I. 6: courbe de sélectivité permettant de déterminer le seuil de coupure [62]

2.3.2.3 Colmatage

Les phénomènes responsables du colmatage d'une membrane peuvent se produire sur la surface externe de la membrane ou bien à l'intérieur des pores. Les différents types de colmatage sont [63] :

- Par formation d'un gâteau : il s'agit d'un empilement de particules à la surface de la membrane, ce type de colmatage est en général réversible. Elle peut être nettoyée à l'aide d'un décolmatage physique par des moyens mécaniques tels que l'injection de bulles d'air à la surface de la membrane ou par des rétrolavages.
- Par adsorption : c'est un phénomène irréversible dû aux interactions entre le soluté et la membrane. Une ou plusieurs couches molécules se forme à la surface de la membrane et/ou à l'intérieur des pores, ce type de colmatage est irréversible. Le soluté peut être éliminé à l'aide d'un décolmatage chimique, la solution de nettoyage est choisie en fonction du soluté à éliminer.
- Par blocage des pores : il s'agit d'une obstruction mécanique des pores conduisant à une diminution du nombre de pores disponible pour la membrane, ce type de colmatage n'est pas toujours réversible puisque les particules bloquantes peuvent être plus grosses que la taille des pores et donc facilement nettoyées par un décolmatage physique à moins que les particules aient une taille voisine du diamètre des pores.
- Par bouchage des pores : c'est un colmatage irréversible dans lequel la taille des particules est suffisamment faible par rapport à la taille des pores pour rentrer à l'intérieur des pores et les boucher progressivement.

Le colmatage est une résistance à l'écoulement. En présence de colmatage, l'Eq I.11 fait alors intervenir R, la résistance global au transfert (m^{-1}), pour déterminer L_{pc}, la perméabilité de la membrane en présence de colmatage [64] :

$$\boldsymbol{L_{pc} = \frac{1}{\mu \times R}} \qquad \textit{Eq I. 11}$$

La résistance globale est définie comme étant la somme des résistances entre la résistance hydraulique qui caractérise la membrane « propre » Rm et Rf, la résistance de colmatage (Eq I. 12) :

$$\boldsymbol{R = Rm + Rf} \qquad \textit{Eq I. 12}$$

Le colmatage peut devenir un problème sanitaire lorsque celui-ci est d'origine organique, puisqu'il constitue alors un apport nutritif pour les micro-organismes, favorisant ainsi la formation d'un biofilm, on parle alors de « biofouling ».

2.3.3 Les procédés d'élaboration de membranes organiques par séparation de phase

L'élaboration des membranes organiques repose majoritairement sur des procédés mettant en œuvre une séparation de phase, c'est-à-dire la déstabilisation thermodynamique d'une solution initialement homogène contenant un mélange de polymère et de solvant, nommée « collodion ». Cette séparation de phase peut-être induite par un changement de concentration, de température, ou l'intrusion d'un non-solvant (Figure I. 7). A l'issue de la démixtion induite par déstabilisation thermodynamique, la phase riche en polymère constituera le squelette de la membrane tandis que la phase pauvre en polymère, après lavage, constituera sa porosité.

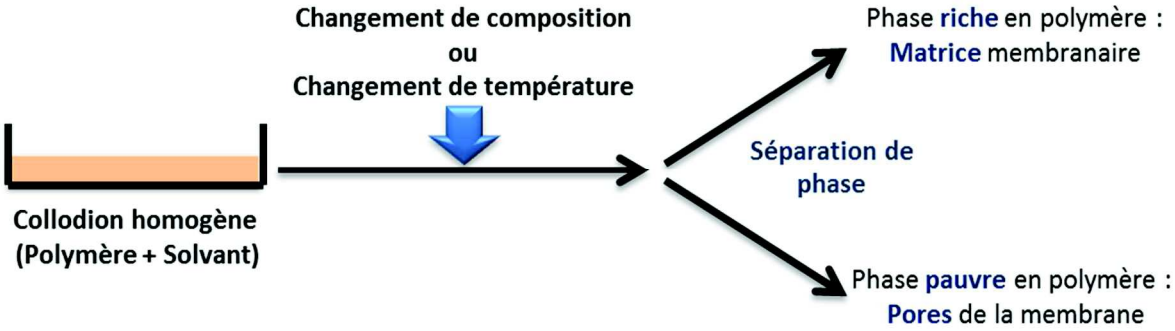

Figure I. 7: principe de la séparation de phase

Il est ainsi possible de définir trois types de procédé de séparation de phase : le procédé de séparation de phase (i) par évaporation (ii) par variation de température (iii) par intrusion d'un non-solvant.

2.3.3.1 Séparation de phase par évaporation (dry-casting)

Dans le cas du procédé dry-casting [32, 65], le polymère est mis en solution dans un mélange de solvant et de non-solvant moins volatil que le solvant. Au cours de l'évaporation, l'évaporation majoritaire du solvant aura pour effet d'enrichir le mélange en non-solvant et en polymère. La précipitation du polymère va avoir lieu dès lors que la concentration en solvant ne permet plus de solubiliser le polymère.

2.3.3.2 Séparation de phase induite par une variation de température

Plus couramment appelé procédé « TIPS » (Temperature Induced Phase Separation) [66-68], ce procédé repose sur une démixtion induite par une variation de la température. Il peut se faire soit par diminution de température (système UCST, Upper Critical Solution Temperature) soit par augmentation de température (système LCST, lower Critical Solution Temperature) en fonction du mélange polymère solvant considéré. Seul le procédé UCST-TIPS est utilisé par les industriels (Akzona Inc, 3M ou Millipore) : le collodion est préparé à température élevée (de 80 à 300°C en fonction du système polymère/solvant) puis la séparation des phases polymère/solvant est réalisée par refroidissement du mélange.

2.3.3.3 Séparation de phase par intrusion d'un non-solvant

Ce procédé, également appelé procédé « NIPS » (Non-solvent Induced Phase Separation) est le principal procédé utilisé à l'échelle industrielle. Il consiste à ajouter un non-solvant au mélange initial (polymère + solvant). Si le non-solvant est sous forme liquide, on parle de wet-process (ou procédé par immersion) mais le non-solvant peut aussi être présent à l'état de vapeurs dès lors qu'il est suffisamment volatil, on parle alors de VIPS (Vapour Induced Phase Separation) process.

Le Table I. 7 présente les principaux solvants utilisés pour différents polymères synthétique (avec l'eau comme non-solvant).

Table I. 7: Principaux solvants utilisés pour l'élaboration des membranes polymères à base de polymères synthétiques (non-solvant = eau)

Polymère	Solvant	Référence
Acétate de cellulose (CA)	Acétone	[69]
Polysulfone (PSU)	N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) N,M-diméthylformamide (DMF) Diméthylacétamide (DMAc)	[70] [71] [72]
Polydifluorure de vinyle (PVDF)	Diméthylacétamide (DMAc) N,M-diméthylformamide (DMF)	[73] [73]
Poly(étherimide) (PEI)	N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)	[74]
Polyacrylonitrile (PAN)	N,M-diméthylformamide (DMF)	[75]

L'utilisation de ces solvants organiques est en contradiction avec la règlementation européenne REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) qui vise à diminuer les risques liés à leur manipulation mais aussi à leur stockage et traitement. Contrairement aux polymères couramment utilisés pour élaborer des membranes, le chitosane présente l'avantage de ne pas utiliser de solvants organiques au cours de l'étape de séparation, du fait de sa solubilité en milieu aqueux. Il permettrait ainsi de produire des membranes allant dans le sens des concepts de chimie verte et de la règlementation REACH.

3. Elaboration de membranes en chitosane

Plusieurs étapes doivent être maitrisées pour élaborer des membranes de chitosane : la gélification, le contrôle de la porosité du gel et enfin une modification chimique du chitosane pour qu'il devienne insoluble dans le milieu acide contenant les éléments métalliques. Dans ce manuscrit, les termes suivants ont été utilisés : le « gel plan poreux » correspond au gel pour lequel la porosité est maîtrisée et la « membrane » correspond au gel plan poreux chimiquement modifié de sorte à permettre la filtration d'un effluent acide.

3.1 Gélification du chitosane

L'élaboration de gels de chitosane consiste à mettre en contact du chitosane soluble en milieu acide avec un milieu basique : lorsque le pH devient supérieur au pKa du chitosane, les fonctions amines protonées du chitosane sont neutralisées et il précipite sous forme de gel dès lors que la concentration en polymère en solution est suffisante.

Un gel est un solide souple ou matériau semi-solide [76], comprenant deux ou plusieurs composants parmi lesquels une phase liquide (l'eau dans le cas des hydrogels). La transition de l'état liquide vers gel se caractérise en rhéologie par l'égalité du module élastique (G') et du module visqueux (G'') du mélange lorsqu'il est soumis à une fréquence d'oscillation (ω) constante. Le module élastique G' ou module de stockage caractérise l'énergie élastique absorbé par le gel (composante solide du gel) tandis que le module visqueux G'' ou module de perte caractérise l'énergie visqueuse dissipée à cause des forces de cisaillement internes (composante liquide du gel) [77].

3.1.1 Gélification par immersion dans un non-solvant

Le plus souvent, la solution de chitosane est immergée dans une solution aqueuse basique (bain de non-solvant) (Figure I. 8). La source alcaline peut être une solution de soude de concentration comprise entre 1 et 1,5 M ou une solution d'ammoniaque de concentration comprise entre 0,3 et 13 M [4, 78, 79]. La concentration en chitosane est généralement comprise entre 2 et 4% w/v de manière à permettre l'étalement de la solution de chitosane (au-delà de 4%, la solution devient trop visqueuse) et obtenir un gel suffisamment résistant. Les gels de chitosane obtenus par le procédé par immersion présentent une structure asymétrique et chaotique de type macro-vides, du fait de la rapidité des échanges entre le solvant et le non-solvant [4].

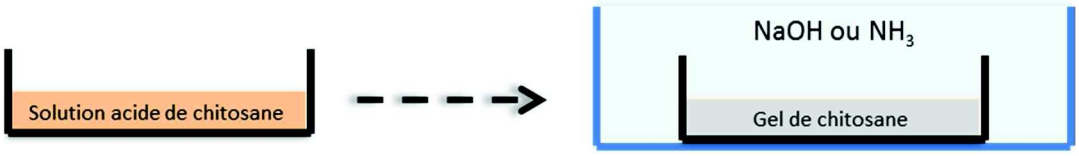

Figure I. 8: Schéma d'élaboration de gels de chitosane par immersion dans un non-solvant basique

3.1.2 Gélification par contact avec des vapeurs de non-solvant

La source alcaline permettant la gélification de la solution de chitosane se présente sous la forme de vapeurs générées à partir d'une solution basique (Figure I. 9) d'un composé volatil tel que l'ammoniaque [80, 81].

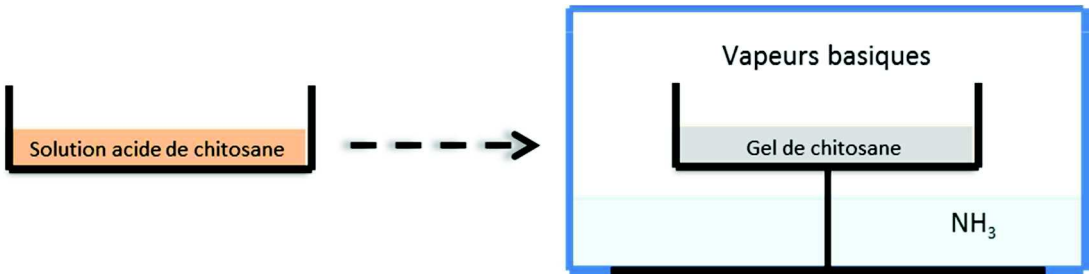

Figure I. 9: Schéma d'élaboration de gels de chitosane par intrusion de vapeurs basiques

La gélification du chitosane par le procédé VIPS est plus lente que par le procédé par immersion, du fait de cinétiques de transfert moins rapides des vapeurs de non-solvant à l'interface gaz-liquide. Ce ralentissement permet d'éviter la formation de macro-vides, mais la présence résiduelle d'un front de gélification à partir de la surface en contact avec les vapeurs basiques confère aux membranes obtenues par le procédé VIPS une structure asymétrique sans peau dense [5].

3.1.3 Gélification par voie enzymatique

De récents travaux [6, 7] ont montré qu'il était possible de gélifier des solutions de chitosane par production enzymatique in-situ d'ammoniaque (la source alcaline) grâce à l'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase.

Par rapport aux procédés de gélification classiques, au sein desquels l'interface de la solution de chitosane est placé au contact d'un agent alcalin liquide ou gazeux ce qui donne lieu à un front de gélification, le procédé de gélification enzymatique présenterait l'avantage de permettre une gélification plus homogène (car isotrope) et un contrôle de la cinétique de gélification au travers des paramètres limitants de la réaction enzymatique et de la gélification tels que la température, la concentration en chitosane et le rapport des concentrations [urée]/[uréase].

3.1.3.1 Réaction d'hydrolyse de l'urée par l'uréase en milieu aqueux

La réaction d'hydrolyse mise en œuvre (Figure I. 10) est obtenue par ajout d'urée (le substrat) et d'uréase (l'enzyme) à la solution de chitosane.

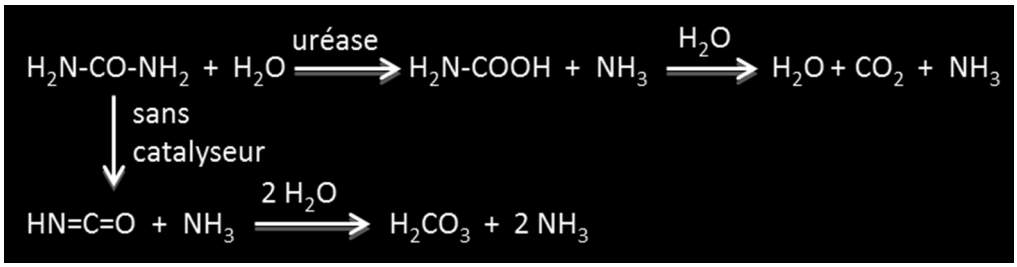

Figure I. 10: réaction d'hydrolyse de l'urée avec et sans uréase

L'uréase est une enzyme présente en grande quantité dans la nature parmi les plantes, les bactéries, les algues et les invertébrés. Malgré l'existence de différentes structures protéiques en fonction de la souche, l'uréase exerce une fonction catalytique unique consistant à catalyser l'hydrolyse de l'urée pour donner comme produits finaux de l'acide carbonique et de l'ammoniaque (Figure I. 10) [82]. En l'absence d'uréase, le temps de demi-vie de l'urée est de 3,6 ans à 38°C dans la gamme de pH 2-12 [83] ce qui en fait un composé très stable.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons à l'uréase extraite du haricot provenant du *Canavalia ensiformis*, souche communément utilisé. L'uréase du *Canavalia ensiformis* est composée de 840 acides aminés [84] et comporte deux ions nickel par site actif qui sont impliqués dans le mécanisme d'hydrolyse de l'urée en présence d'eau.

L'« activité enzymatique » correspond au nombre de micromoles de substrat transformé en une minute par mole d'enzyme, dans des conditions expérimentales données de température et de pH.

La majorité des études sont ainsi réalisées dans des conditions de pH tamponné. Selon les enzymes, le pH peut n'avoir aucun effet sur l'activité ou avoir une forte influence sur celle-ci. Dans ce deuxième cas, il existe généralement une zone étroite de pH où la vitesse de réaction de l'enzyme est maximale. A l'extérieur de cette zone, la vitesse décroit fortement en lien avec trois phénomènes indépendants :

- Une dégradation irréversible aux pH extrêmes qui vont soit dénaturer l'enzyme (par rupture des liaisons non covalentes et modification de sa structure spatiale) soit rompre des liaisons covalentes ;
- Une modification de l'état d'ionisation du substrat ;

- Une modification de l'état d'ionisation de l'enzyme.

Dans le cas de l'uréase, comme le montre la Figure I. 11, Krajewska et al. (2005) [85] ont reporté l'influence du pH sur v_{max} (Figure I. 11), définie comme étant la vitesse initiale maximale atteinte lorsque toutes les molécules d'enzymes sont impliquées dans la réaction et qu'il devient impossible d'augmenter la vitesse de réaction par ajout de substrat. Cette étude a été menée à pH tamponné entre 5,0 et 9,55 à l'aide de solutions tampons organiques non-inhibitrices.

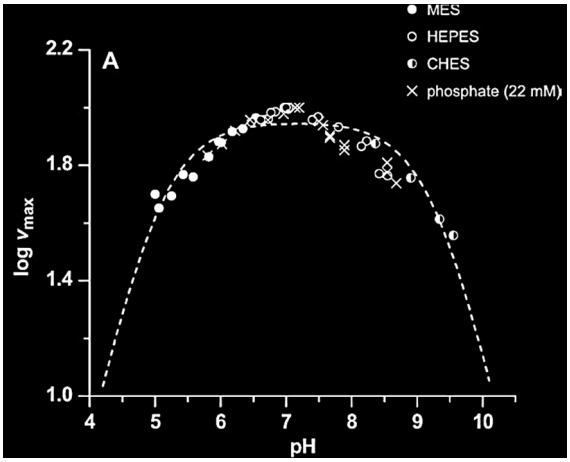

Figure I. 11: Influence du pH sur l'activité de l'uréase Canavalia Ensiformis pour différents tampons pH ((2-acide acétique amino-cyclohexyle) : CHES ; (*N*-[2-hydroxyéthyl]piperazine-*N*2-[acide 2-éthanesulfonique) : HEPES ; (2-[*N*-morpholino] acide éthanesulfonique) : MES) et un tampon inhibiteur inorganique (phosphate) [85]

D'après cette courbe, l'uréase *Canavalia Ensiformis* présente une activité optimale pour un pH de 7,2, ce qui peut être mis en relation avec ses pKa 5,3/6,6/9,1. Les pKa de 5,3 et 6,6 sont associés à des groupements carboxyle et imidazole, tandis que le pKa de 9,1 correspond à un hydroxyde de nickel participant à la réaction d'hydrolyse. Ces valeurs de pKa permettent de calculer la valeur de pH (autour de 7) à laquelle la charge globale de l'enzyme est minimale, ce qui peut être mis en lien avec l'activité optimale de l'enzyme observé pour à un pH 7,2.

La température peut également avoir une influence sur l'activité d'une enzyme, ce qui se traduit généralement par la courbe caractéristique activité vs température (Figure I. 12). Pour une température inférieure à une température optimale T_{opt}, l'activité croit avec la température en accord avec la loi d'Arrhenius :

$$\boldsymbol{v_{max} = k_0 e^{-\left(\frac{Ea}{RT}\right)}} \qquad \textit{Eq I. 13}$$

- Quelle que soit l'enzyme, la loi d'Arrhenius montre que pour une augmentation de température de 10°C, la vitesse peut être multipliée d'un facteur 2 à 3 [86] ;

- Au-delà de la température optimale, l'enzyme présente une baisse d'activité due à sa dénaturation irréversible. Pour l'uréase, cette température optimum est située autour de 37-40°C.

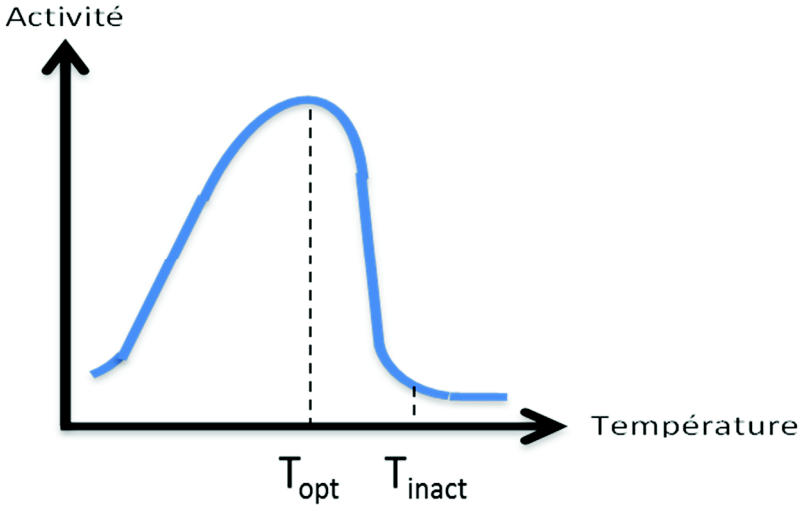

Figure I. 12: Effet de la température sur l'activité d'une enzyme

Chaque enzyme est donc caractérisée par sa température optimale et sa température d'inactivation T_{inact}, température pour laquelle l'activité de l'enzyme devient nulle. Qin et al. (1994) [87] ont montré qu'il existe une relation linaire entre v_{max} et $1/T$ jusqu'à 40°C ; au-delà de cette température, la dénaturation de l'enzyme est observée. Ils ont obtenu 0,200 mol de NH_3 s^{-1} g^{-1} uréase et 29,1 $kJ.mol^{-1}$ respectivement pour k_0 et Ea. Cette valeur de Ea est légèrement inférieure à celles obtenues par Martins et al. (1987) [88], Huang et al. (1991) [89] ou Fidaleo et al. (2003) [90] qui valent respectivement 32,6, 35,8 et 35,3 $kJ.mol^{-1}$. En travaillant avec une concentration initiale en urée de 25 mM, pour une température de 25°C et une solution tamponnée à pH 7, Fidaleo et al. (2003) [90] ont montré que la vitesse de réaction augmente proportionnellement à la quantité d'uréase jusqu'à une concentration de 0,2 $g.L^{-1}$. En milieu aqueux non-tamponné. Qin et al. (1994) [87] ont obtenu une vitesse de réaction proportionnelle à la concentration en uréase pour une gamme de concentrations de 0,4 à 10 $mg.L^{-1}$ en travaillant à 25°C. La constant de Michaelis K_M associée du système enzyme-substrat correspondant à l'urée-uréase varie entre 2,9 10^{-3} et 3,6 10^{-3} $mol.L^{-1}$ [82] selon la pureté de l'enzyme et les conditions de pH/température utilisée pour la déterminer. K_M est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum, K_M dépend de la température et du pH [91].

Au-delà d'une certaine concentration en urée, un excès de substrat par rapport au nombre de sites actifs de l'enzyme inhibe l'activité de l'uréase. Cet excès de substrat a pour conséquence son

orientation anormale sur le site actif de l'enzyme ce qui empêche l'occurrence de la réaction (Figure I. 13). Le mécanisme d'inhibition de l'uréase par l'urée est un mécanisme de type anti-compétitif. Une constante d'inhibition K_S entre 3 et 6.4 mol.L^{-1} est reportée dans la littérature [82, 87, 92].

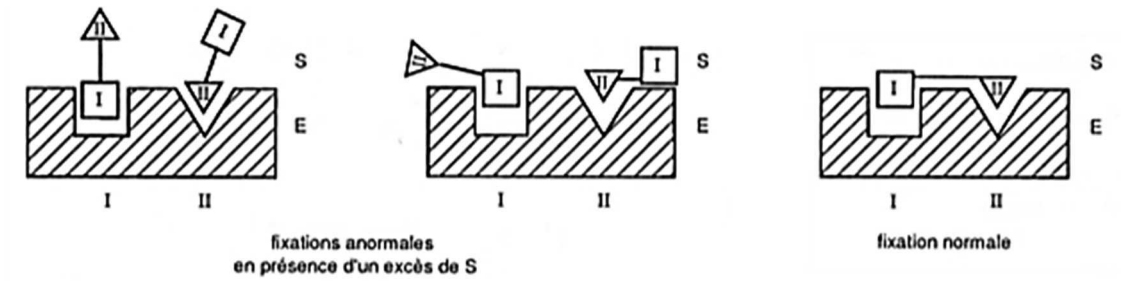

Figure I. 13: Schéma de l'inhibition de l'enzyme par excès de substrat avec S le substrat, E l'enzyme et I et II les sites actifs du substrat et de l'enzyme se fixant dans leur forme respective

Un mécanisme d'inhibition non-competitive par le produit ammonium (issu de l'équilibre ammoniaque-ammonium en solution aqueuse) a également pu être observé. La constante d'inhibition K_P associée varie entre 2 10^{-3} et 118 10^{-3} mol.L^{-1} [82, 90, 93]

En couplant, l'influence des différents paramètres présentés précédemment (pH, température, urée, uréase, ammonium) sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique, Qin et al. (1994) et Fidaleo et al. (2003) ont mis en place un modèle décrivant la vitesse de réaction d'hydrolyse en milieux aqueux qui peut être mis sous la forme suivante :

$$r_{hydro} = \frac{v_{max}[(NH_2)_2CO]}{\left(K_M+[(NH_2)_2CO]+\frac{[(NH_2)_2CO]^2}{K_S}\right)\left(1+\frac{[NH_4^+]}{K_P}\right)} \qquad \textit{Eq I. 14}$$

L'Eq I. 14 fait intervenir v_{max}, $[(NH_2)_2CO]$, $[NH_4^+]$, K_M, K_S et K_P correspondent respectivement à la vitesse la vitesse maximale de l'enzyme (mol.L^{-1}.min^{-1}), les concentration en urée et en ions ammonium (mol.L^{-1}), la constante de Michaelis (mol.L^{-1}), les constantes d'inhibition (mol.L^{-1}) par le substrat (l'urée) et par le produit (l'ammonium) sur l'enzyme.

3.1.3.2 Gélification du chitosane par voie enzymatique

Chenite et al. (2006) [6] ont mis en œuvre la réaction d'hydrolyse de l'urée par l'uréase à des fins de gélification in situ du chitosane. Ils ont déterminé par rhéologie les temps de gélification (correspondant à l'égalité du module élastique (G') et du module visqueux (G'') [77]) en fonction de paramètres influençant l'activité de l'uréase :

- La température
- La concentration en urée
- La concentration en uréase

Une solution de chitosane 2,25% w/v est préparée en dissolvant le chitosane dans l'acide chlorhydrique 0,1 M, puis l'uréase est ajoutée. Le mélange est ensuite refroidi à 4°C de manière à inhiber l'activité de l'enzyme. L'urée est ensuite ajoutée à cette solution qui est agitée vigoureusement pendant 30 min à une température allant de 15 à 45°C. Les concentrations en urée et en uréase variaient de 23,4 à 71,4 mM et de 9 à 67,8 mg.mL^{-1} respectivement. Dans ces conditions, le pH initial était égal à 5,2 et évoluait (sans contrôle) au cours du temps suite à la formation d'ammoniaque et à sa réaction avec le chitosane.

La Figure I. 14a montre, sur la gamme de températures étudiée (15-45°C), que le temps de gélification diminue lorsque la température augmente. Sachant que l'activité de l'uréase est maximale pour une température comprise entre 37 et 40°C en milieu aqueux [87, 94], ceci laisse supposer qu'au-delà de 40°C, ce sont les mécanismes de transfert qui favoriseraient le processus de gélification par rapport à l'hydrolyse enzymatique. L'évolution du temps de gélification avec la température suit une loi d'Arrhenius, correspondant à une énergie d'activation Ea de 59,8 kJ.mol^{-1}.

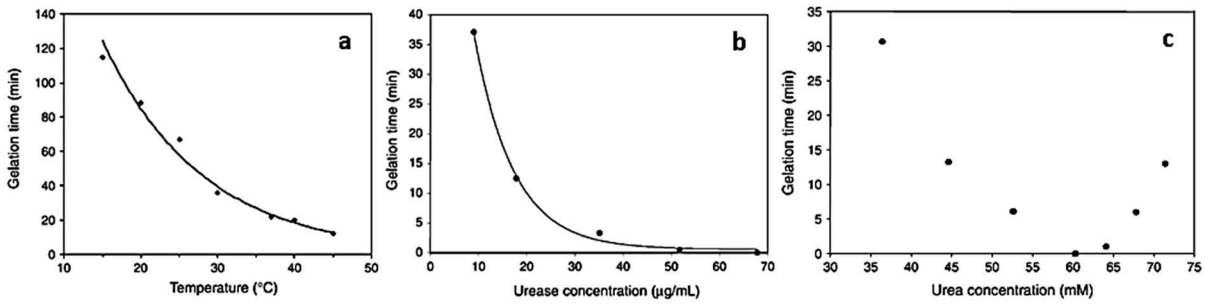

Figure I. 14: Influence de la température pour [uréase] = 17,2 µg.mL^{-1} et [urée] = 43 mM (a), de [Uréase] à 37°C et [urée] = 43 mM (b) et de [Urée] à 37°C et [uréase] = 17,2 µg.mL^{-1} (c) sur le temps de gélation enzymatique.[chitosane] = 2% w/v

La hausse de la concentration en uréase, étudiée à 37°C (Figure I. 14b), induit également une baisse du temps de gélification, avec une gélification quasiment instantanée au-delà de 40 µg.mL^{-1} en uréase pour une concentration initiale en urée de 43 mM. Ce paramètre semble donc déterminant pour l'optimisation du temps de gélification.

A 37°C et 17,2 µg.mL^{-1} en uréase, une augmentation de la concentration en urée (Figure I. 14c) accélère la vitesse de gélification jusqu'à atteindre un maximum pour une concentration en urée de

60 mM. Au-delà de cette teneur en urée, l'excès de substrat inhibe l'activité de l'uréase ce qui se traduit par un ralentissement de la gélification.

En complément des mesures rhéologiques, Yan et al. (2014) [7] ont effectué à intervalles de temps réguliers de 30 s des tests de retournement de la solution de chitosane, parallèlement au suivi de l'évolution du pH. Le but du test de retournement est de caractériser le temps nécessaire à l'obtention de gels suffisamment résistants pour être utilisés en ingénierie tissulaire ou autres applications. Les essais ont été menés à température ambiante, pour une concentration en chitosane de 1,5 % (mass).

En faisant varier la concentration en urée et en uréase, des temps de gélification (Figure I. 15a) variant de 3,5 ± 0,5 min (pour 60 $u.mL^{-1}$ d'uréase et 60 mM d'urée) à 163 ± 15 min (pour 3,75 $u.mL^{-1}$ d'uréase et 30 mM d'urée) ont été obtenus. Si l'augmentation de la concentration en enzyme induit une baisse du temps de gélification, la concentration en substrat a une influence non significative sur la gamme [37,5 ; 60 mM], alors qu'elle devient limitante pour la plus faible concentration de 30 mM, induisant une forte diminution du temps de gélification. Un calcul de la vitesse initiale sur les 5 premières minutes à partir de l'évolution du pH au cours du temps (Table I. 8) a confirmé que seule la concentration en uréase avait un impact sur les vitesses initiales alors qu'une variation de la concentration en urée avait peu d'influence.

Les courbes montrant l'évolution du pH au cours de la réaction (Figure I. 15b) mettent par ailleurs en évidence que la concentration initiale en urée va en revanche influencer significativement le pH final du gel.

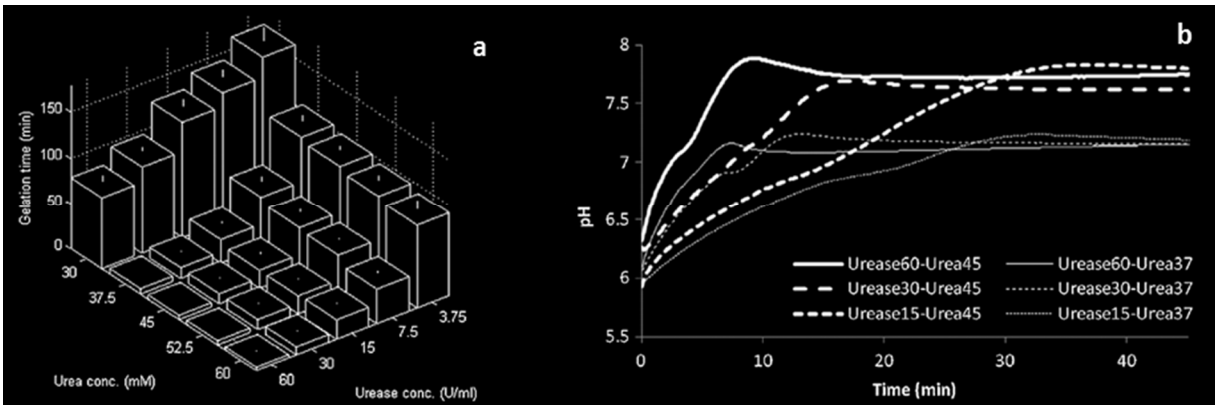

Figure I. 15: (a) Temps de gélification en fonction de la concentration en urée et en uréase ; (b) Evolution du pH au cours du temps avec Ureasex-ureay, x et y correspondant respectivement à la concentration en urée (mM) et en uréase ($u.mL^{-1}$)

Table I. 8: Vitesse initiale calculée à partir des 5 premières minutes d'évolution du pH au cours du temps. Uréasex-Uréey, x et y correspondant respectivement à la concentration en urée (mM) et en uréase (u.mL^{-1}) [7].

Uréasex-Uréey	Vitesse initiale (u.min-1)
Uréase60-Urée45	0,18
Uréase30-Urée45	0,12
Uréase15-Urée45	0,10
Uréase60-Urée45	0,17
Uréase30-Urée45	0,14
Uréase15-Urée45	0,08

Les gels obtenus ont été lyophilisés pour être observés et comparés au Microscope Electronique à Balayage (MEB) (Figure I. 16) même si les auteurs précisent que cette étape de préparation affecte la porosité absolue des hydrogels. Ces photographies MEB ont montré que la taille moyenne des pores est fonction de la concentration en uréase puisqu'elle varie de 100 µm pour la concentration en enzyme la plus élevée (60 u.mL^{-1}) à 20 µm pour les concentrations les plus faibles (15 et 30 u.mL^{-1}) sans que cette variation ne soit expliquée par les auteurs.

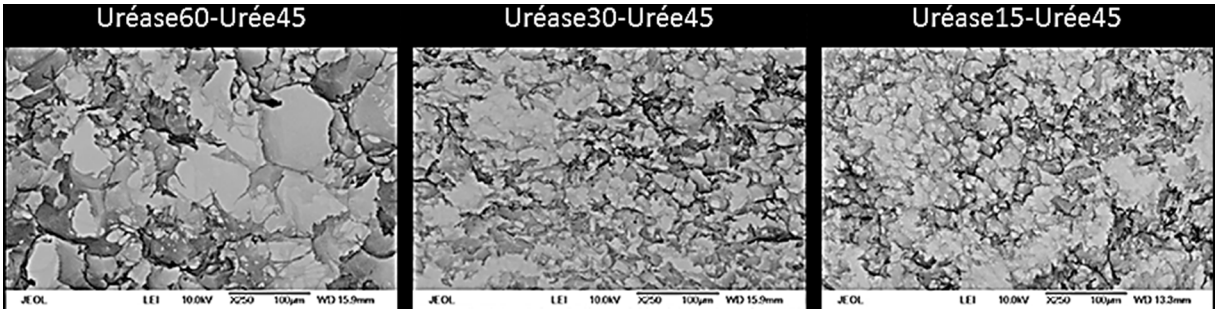

Figure I. 16: Photographie MEB de la section de gels élaborés par voie enzymatique avec Ureasex-ureay, x et y correspondant respectivement à la concentration en urée (mM) et en uréase (u.mL^{-1}) [7].

Les comportements observés quant aux paramètres influents pour le procédé de gélification enzymatique sont ainsi similaires à ceux qui ont pu être mis en évidence dans le milieu aqueux tamponné conventionnellement utilisé pour l'étude de l'activité enzymatique.

3.2 Du gel à la membrane de chitosane

Dans la littérature, l'obtention de « gels plans poreux » est réalisée soit par une étape de séchage

partiel entre l'étalement de la solution de chitosane et la gélification, soit par ajout d'un agent porogène dans le collodion, cet agent étant ensuite extrait après l'étape de gélification. Dans tous les cas, le procédé de gélification repose sur l'immersion du collodion étalé dans une solution basique.

Pour rappel, le terme « membrane » sera utilisé dans ce manuscrit dès lors que le « gel plan poreux » élaboré est devenu insoluble en milieu acide par modification chimique du chitosane, la principale application envisagée étant l'élimination d'ions métalliques contenus dans des effluents industriels acides.

3.2.1 Du gel dense au gel plan poreux

3.2.1.1 Mesure de la porosité

La porosité d'une membrane est définie comme le volume de vide (c'est-à-dire le volume de pores) divisé par le volume total. Plusieurs méthodes quantitatives ont été mises en œuvre dans la littérature pour caractériser la structure de « membranes » ou de gels poreux de chitosane : en comparant la masse volumique d'une membrane poreuse à celle d'une membrane dense [95] ou les taux de gonflement d'une membrane obtenue avec et sans porogène [96] ; à l'aide d'un prosimètre à mercure, permettant alors la détermination directe de la porosité [97] mais présentant néanmoins le défaut d'une sorption du mercure par le chitosane [51, 98-101].

Du fait de l'usage de ces différentes méthodes, il a été difficile de comparer les valeurs de porosité obtenues par différents auteurs. Cependant, il reste possible de comparer l'influence d'un paramètre (temps de séchage, taille du porogène ou quantité de porogène par exemple) pour une même méthode.

3.2.1.2 Séchage partiel

Après étalement, le séchage de la solution de chitosane jusqu'à évaporation totale du solvant suivi de l'immersion dans un bain de soude permet d'obtenir un gel dense (Figure I. 17).

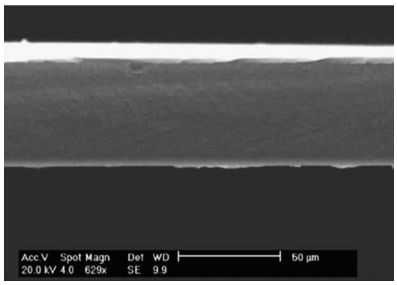

Figure I. 17: Photographie MEB d'un gel dense réalisé à partir du séchage total d'une solution chitosane/acide acétique avant immersion dans un bain de soude

Par contre, si la solution de polymère est séchée partiellement avant d'être immergée dans le bain de soude, un gel poreux et asymétrique est obtenu, constitué d'une peau sélective (communément nommée « couche dense ») surmontant une structure microporeuse. Hong et al. (2007) [102] ont élaboré ces gels pour la régénération tissulaire et Mi et al. (2001) [103] afin d'obtenir des pansements. Comme le montre la Figure I. 18, les gels plans poreux obtenus sont constitués de 3 couches : une couche dense, due à l'évaporation rapide en surface ayant pour effet une forte concentration en polymère ; une couche microporeuse ($d_p \approx$ 1-2 µm) et une couche macroporeuse ($d_p \approx$ 15-60 µm) dues au ralentissement du transfert de solvant une fois la couche dense formée.

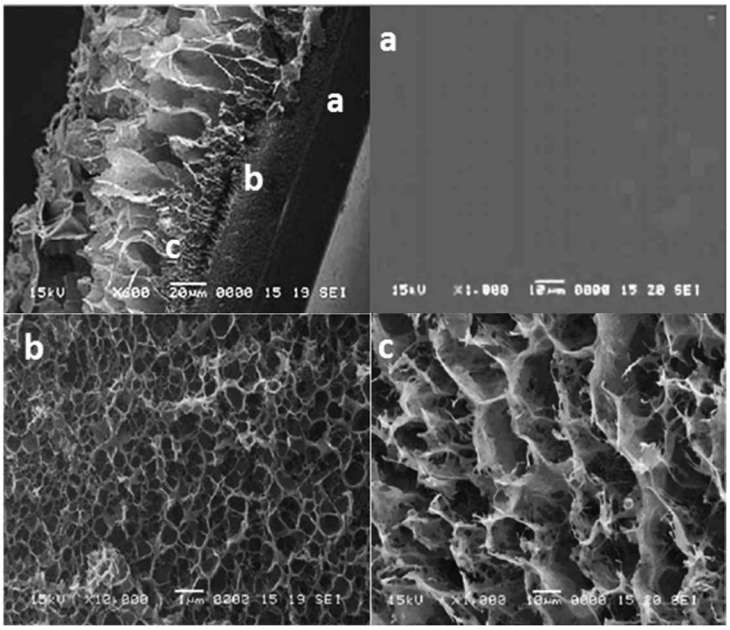

Figure I. 18: Photographies MEB d'un gel plan poreux asymétrique obtenu par séchage partiel avant immersion dans un bain de soude [102]. La couche dense (a) ; la couche microporeuse (b) et la couche macroporeuse (c) [102]

Mi et al. (2001) [103] ont étudié l'influence de la durée de l'étape de séchage partiel sur l'asymétrie de la structure des gels plans poreux de chitosane. Pour une température de 50°C, ils obtiennent des gels asymétriques d'épaisseur diminuant de 443 à 51 µm lorsque le temps de séchage augmente de

10 à 60 min (Table I. 9).

Table I. 9: Influence de la durée de l'étape de séchage à 50°C sur la morphologie de gels plans poreux de chitosane [103]

Durée de séchage	10 min	20 min	40 min	60 min
Epaisseur totale (µm)	443	278	62	51
Epaisseur de la peau dense (µm)	~10,0	~6,5	~3,5	~1,0

3.2.1.3 Porogènes

Les agents porogènes utilisés pour générer des pores dans les gels de chitosane doivent présenter la propriété d'être soluble dans au moins un non-solvant du chitosane, pour pouvoir être extraits une fois le gel poreux formé. Avec cette contrainte, trois types de porogènes sont utilisés pour créer la porosité : des PolyEthylène Glycols (PEG), des particules de silice ou des particules de NaCl.

- ***Le poly(éthylène glycol) (PEG) et le Polyvinylpyrrolidone (PVP)***

Le poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure I. 19) est un polymère qui est utilisé pour jouer le rôle de porogène puisqu'il est inerte au cours de l'élaboration du gel poreux de chitosane, et soluble dans l'eau chaude à pH neutre, contrairement au chitosane.

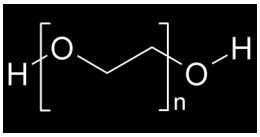

Figure I. 19: Formule chimique du poly(éthylène glycol)

Le PEG est dissous avec le chitosane dans l'acide acétique. Cette solution est étalée puis le solvant est totalement évaporé à une température comprise entre 50 et 80°C. Un gel plan est ensuite formé par immersion dans une solution de soude à 2% w/v à température ambiante pendant 30 min puis lavé à l'eau jusqu'à pH neutre. Le PEG est finalement extrait par immersion dans l'eau à 80-90°C pendant 8 à 10 h et ainsi former un gel plan poreux. L'ensemble de la procédure est synthétisée Figure I. 20.

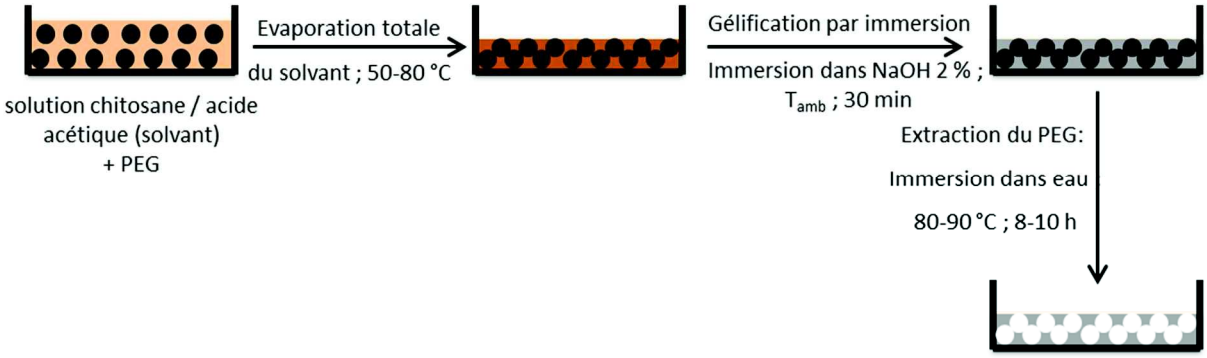

Figure I. 20 : Schéma d'élaboration de gels plans poreux de chitosane par ajout de PEG dans le collodion [104-106].

Des analyses thermogravimétriques (ATG) couplées à la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC) avant et après l'étape de lavage à l'eau chaude, pour des gels de chitosane élaborés avec et sans PEG, ont permis de montrer qu'une fraction du chitosane se solubilise partiellement dans l'eau chaude (environ 15 % pour le gel ne contenant pas de PEG, qui correspondraient aux oligomères du chitosane). Par ailleurs, 15 à 20% w/v du PEG ne sont pas extraits lors de l'étape de lavage à l'eau chaude [104-106]. L'efficacité de cette étape de lavage semble inversement proportionnelle aux interactions entre le chitosane et le porogène. M.F. Zeng et al. 2004 [105] ont comparé l'ajout de deux porogènes différents, PEG et polyvinylpyrrolidone (PVP), pour générer la porosité de gels de chitosane. A l'issue de l'étape de lavage, l'observation MEB des gels plans obtenus à partir du mélange chitosane/PVP n'ont montré aucune porosité (Figure I. 21). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a montré que les interactions chitosane/PVP sont trop importantes, bien que la PVP soit soluble dans l'eau chaude, pour permettre son extraction lors de l'étape de lavage.

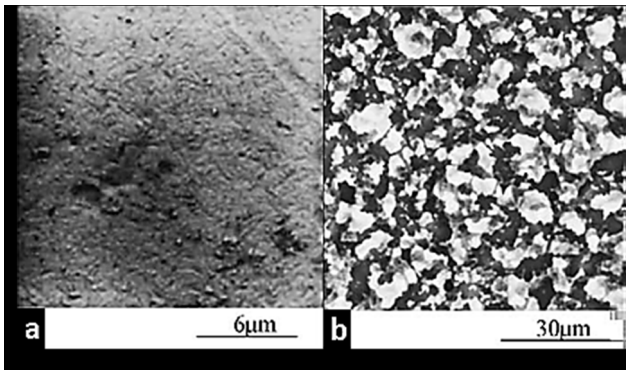

Figure I. 21: Image MEB de la section de gels plans poreux obtenus à partir de mélanges de rapport massique 1/1 : (a) chitosane/PVP et (b) chitosane/PEG [105]

M.F. Zeng et al. 2004 [104] ont montré que la masse molaire du PEG (2 000, 4 000, 6 000, 10 000 et 20 000 g/mol) et le rapport massique chitosane/PEG (2/1 et 1/1) ont également une influence sur la taille des pores, la porosité et la perméabilité des gels poreux obtenus. Des observations MEB ont

permis d'observer une augmentation logique de la taille des pores avec l'accroissement de la masse molaire du PEG (Figure I. 22).

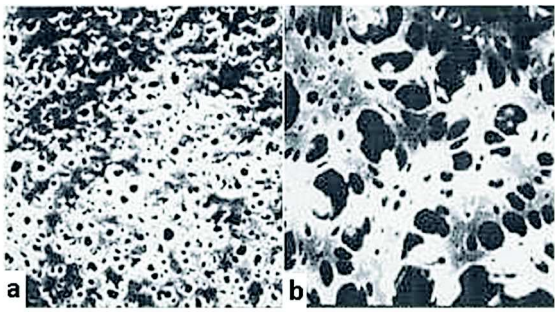

Figure I. 22: Image MEB de la surface de gels plans poreux obtenus à partir d'un mélange chitosane/PEG pour un rapport massique 1/1 avec : (a) PEG 2000 et (b) PEG 20000 [104]

Table I. 10: Influence de la taille du PEG sur la porosité [104]

Gels poreux CS/PEG : 1/1	PEG20000	PEG10000	PEG6000	PEG4000	PEG2000
Porosité (%)	61,3	52,2	54,3	58,6	65,5
Perméabilité ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	780	115	100	90	221

La masse molaire du PEG n'a pas en revanche un effet linéaire sur la porosité. Les porosités les plus élevées sont ainsi obtenues à la fois pour la masse molaire la plus élevée mais aussi de façon surprenante pour la plus faible masse molaire, M.F. Zeng et al. 2004 [104] justifie ce résultat par la porosité obtenue avec le PEG 200 (65,5 %) qui est la plus élevé. Cette différence de morphologie a une incidence directe sur la perméabilité, les flux les plus importants étant logiquement obtenus pour les gels poreux obtenus à partir des PEG 2 000 et PEG 20 000 (Table I. 10).

- ***Particules de silice***

Les particules de silice de formule chimique SiO_2 (qui seront notées Si par la suite) sont utilisées comme porogène pour former des gels plans poreux en chitosane destinés à des applications biomédicales [107-109] ou des colonnes de chromatographie [110].

Ces particules de Si ont la propriété d'être insolubles dans la solution acide de chitosane à laquelle elles sont ajoutées. Après étalement et évaporation totale du solvant entre 50-80°C, les particules de Si sont solubilisées par immersion dans une solution de soude 1 M pendant 12 h à température ambiante ou à 80°C [107, 108, 110] (Figure I. 23).

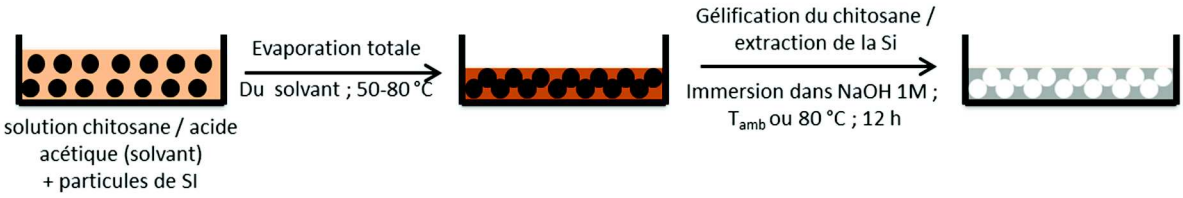

Figure I. 23: Schéma d'élaboration de gels poreux par ajout de silice dans le collodion [107, 108, 110].

Zeng et al. (1996) [110] ont montré que les conditions de séchage (température ambiante pendant 18 h, sous une hotte ventilé à t_{amb} pendant 6 h ou dans une étuve à 80°C pendant 5 h) n'ont pas d'impact significatif sur la perméabilité à l'eau des gel poreux finaux. En revanche, la taille des particules de Si a un effet significatif sur la taille des pores et la perméabilité des gels poreux élaborés. En comparant, pour un même rapport massique chi/Si de 1/8, les gels poreux créés avec trois gammes de particules de Si (i) calibrées entre 15 et 40 µm, (ii) de taille moyenne 10 µm ou (iii) de taille moyenne 5 µm, les particules les plus grandes ont logiquement permis d'obtenir des tailles de pores plus élevées avec respectivement 19,5 µm ± 13,0 ; 6,6 µm ± 3,7 et 2,5 µm ± 1,2 de diamètre moyen.

Le rapport chi/Si a également une influence sur la morphologie du gel plan poreux (Figure I. 24). Une augmentation du rapport massique chi/Si permet de passer d'un gel poreux asymétrique présentant une surface supérieure dense et une surface inférieure macroporeuse à un gel poreux symétrique présentant deux surfaces supérieure/inférieure macroporeuses. Cela peut s'expliquer par un phénomène de décantation des particules de silice dans le mélange chi/Si pendant l'étape de séchage ce qui a pour effet de rapprocher les particules vers le support d'étalement et ainsi générer un gel poreux asymétrique.

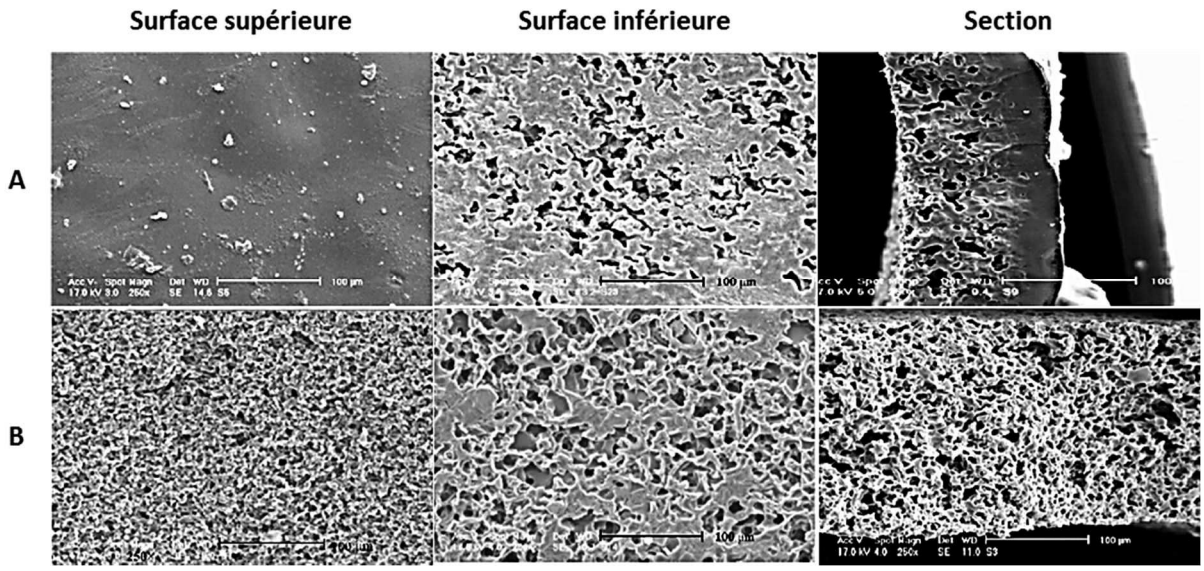

Figure I. 24: Image MEB montrant l'influence du rapport chi/Si sur la morphologie des gels plans poreux avec de la silice de 15 à 40 µm et des rapports chi/Si de 1/1 (A) ; 1/3 (B) pour une concentration initiale en chitosane de 3% w/v [95].

Le rapport massique chi/Si permettant d'élaborer des gels plans poreux symétriques varie selon les auteurs. Par exemple, Mei et al (2012) [108] ont montré que ce rapport seuil est de 1/1 tandis que Ghaee et al. (2010) [95] affirment que ce rapport doit être de 1/3. Cette différence est à relier à l'origine du polymère (et donc ses caractéristiques) et à la taille de la silice. Même si la littérature ne donne pas systématiquement la masse molaire du chitosane, il a été montré que la viscosité de la solution de polymère diminue avec la masse molaire du chitosane ce qui entraine une décantation plus rapide des particules de silice dans la solution étalée au moment de l'étape de séchage.

La morphologie du gel plan poreux obtenu a un impact direct sur la perméabilité puisque selon Zeng et al. (1996) [110], une augmentation rapide du débit de perméat est obtenue lorsque le rapport massique chitosane/silice passe de 1/1 à 2/1. Cependant lorsque ce rapport massique chitosane/Si continue d'augmenter, le débit de perméat n'augmente que légèrement car le gel poreux est plus facilement comprimé sous l'effet de la pression.

Il convient de noter que Santos et al. 2008 [109] ont travaillé sur l'élaboration de gels plans poreux asymétriques pour le domaine biomédical par un procédé alternatif (Figure I. 25). Pour cela, un mélange chitosane/silice est coulé sur une solution de chitosane à 1,5% w/v préalablement étalée et séchée, puis séché à son tour avant d'être immergé dans un bain de soude à 1,25 M pendant 4 h à 60°C pour extraire le porogène et former un gel plan macroporeux. Par ce procédé, ils arrivent à maintenir une morphologie asymétrique tout en faisant varier le rapport massique chi/Si de 1/2 à 1/6, l'objectif étant d'augmenter la proportion de la couche macroporeuse tout en maintenant la

couche dense grâce au séchage initial de la solution de chitosane.

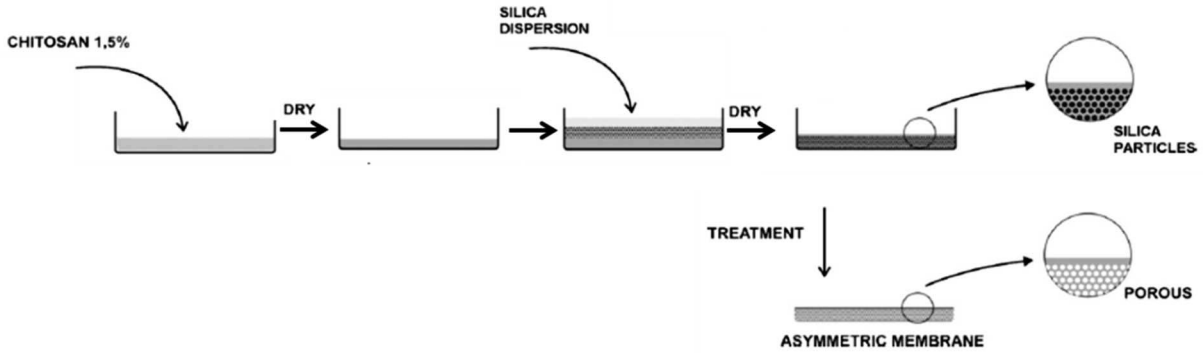

Figure I. 25: Schéma d'élaboration de gels poreux asymétrique selon Santos et al. 2008 [109].

- ***Des particules de chlorure de sodium (NaCl)***

Les particules de chlorure de sodium, peu couteuses et aisément solubles dans la soude, n'ont pourtant été utilisées que par Chao et al. (2006) [97]. Les particules sont tamisées pour des tailles comprises entre 150 et 250 µm et mises en solution pour obtenir les rapports massique finaux chitosane/NaCl suivants : 1/1 ; 1/4 ; 1/8 ; 1/12 et 1/16.

Le porogène est ajouté à la solution de chitosane à 4% w/v préparée dans l'acide acétique à 5 % (vol.), puis la solution est étalée et séchée à température ambiante pendant 10 h pour évaporer le solvant (Figure I. 26). L'immersion dans un bain de soude 1 M pendant 2 h permet la formation du gel plan poreux, la porosité étant générée par dissolution du NaCl dans ce même bain de soude. Le gel plan poreux est lavé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre.

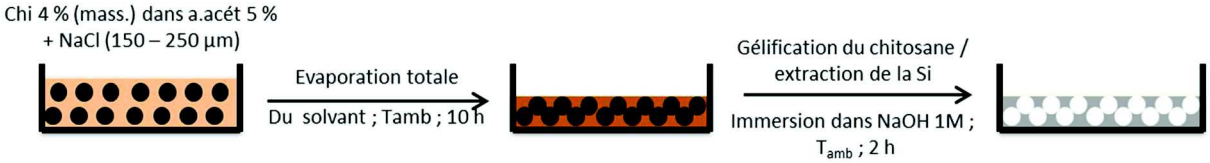

Figure I. 26: Protocole d'élaboration de gels plans poreux à l'aide de particules de NaCl utilisées comme porogène [97].

Les propriétés physiques des gels poreux formés ont été étudiées en faisant varier le rapport massique polymère/NaCl de 1/4 à 1/16, les gels obtenus pour le rapport 1/20 présentant des fissures en surface. Le Table I. 11 montre qu'une augmentation du rapport chitosane/NaCl augmente la porosité et le diamètre des pores mais la perméabilité de ces gels poreux n'a pas été caractérisée. Cependant, les tailles de pores obtenues sont trop importantes pour une application en

ultrafiltration.

Table I. 11: Tableau récapitulatif de l'influence du rapport massique chi/NaCl sur les propriétés physiques de gels plans poreux de chitosane. Chi-NaCl x où x représente le rapport massique chi/NaCl [97]

Gels poreux de chitosane	D_{pore} (µm)	Porosité sur gels poreux secs (%)	Gonflement (%)	Cristallinité (%)
Chi-NaCl 4	74,14	32,75	202	50,02
Chi-NaCl 8	111,18	46,48	241	47,70
Chi-NaCl 12	120,34	55,88	295	45,39
Chi-NaCl 16	153,38	59,16	324	43,07

Pour les trois porogènes présentés, il semble possible d'influencer la taille des pores et le débit de perméat (à l'exception du NaCl qui n'a pas été utilisé en filtration) en fonction du choix du porogène, de sa taille et du rapport massique chitosane/porogène. En accord avec les tailles de porogène utilisés, le PEG donnera les pores de plus petits diamètres (de l'ordre du micromètre) suivi des particules de silice (de 2 à 20 µm) et enfin du NaCl qui induit la taille de pore la plus importante (de 74 à 153 µm). Vu que dans le cadre cette thèse, l'objectif est d'élaborer des membranes qui se situent dans le domaine de l'ultrafiltration, ce sont les PEG qui seront privilégiés car ils permettent d'obtenir une taille de pores et des flux adaptés à cette gamme de filtration.

3.2.2 Du gel poreux à la membrane

Le chitosane étant soluble pour des pH inférieurs à 6,5, il est nécessaire de le modifier pour renforcer les propriétés mécaniques des membranes d'une part, et permettre l'utilisation des membranes pour le traitement d'effluents acides chargés en ions métalliques d'autre part. Les modifications chimiques sur le chitosane sont de deux types : réticulation des chaines de chitosane ou acétylation des groupements amines. L'étape de réticulation consiste à créer une structure réticulée grâce à l'utilisation d'agents de pontage qui permettent de relier les chaînes entre elles et de créer ainsi un réseau macromoléculaire tridimensionnel irréversible. Les agents réticulants utilisés sont principalement les dérivés aldéhydiques (formol, glutaraldéhyde) et les agents époxy (épichlorohydrine, éthylène glycol diglycidyl éther). L'acétylation du chitosane se fait par réaction de l'anhydride acétique sur les groupements amines du chitosane.

3.2.2.1 Réticulation des chaines du chitosane

Dans le cas le plus courant, la réticulation chimique du chitosane est irréversible, basée sur la création de liaisons covalentes. Les réticulants peuvent être classés par rapport au groupement chimique avec lequel ils vont créer un pont. Chaque unité de monomère glucosamine présente trois fonctions susceptibles de réagir avec un réticulant (Figure I. 27).

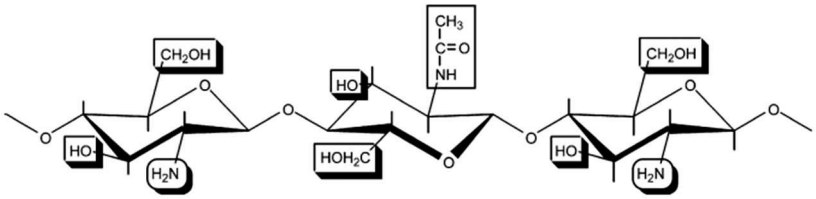

Figure I. 27: Fonctions du chitosane susceptibles d'être utilisées pour la réticulation

La réticulation du chitosane, permettant le passage des « gels plans poreux » aux « membranes », peut se faire soit par réaction en phase homogène (ajout du réticulant dans le collodion) soit par réaction en phase hétérogène (immersion du chitosane sous forme solide ou gel dans un bain de réticulant). La première méthode nécessite le contrôle des cinétiques de réticulation et de gélification ; en effet, l'ajout du réticulant dans le collodion peut provoquer la formation d'un gel chimique due à la formation de liaison chimique avant la gélification induite par changement de pH. Le second procédé est le plus couramment utilisé. Une simple immersion dans le réticulant suivie d'une étape de lavage pour éliminer le réticulant résiduel va permettre de « figer » la structure du gel plan poreux une fois que celui-ci est formé sans avoir à prendre en compte la concomitance éventuelle des cinétiques de gélification et de réticulation.

- ***Le glutaraldéhyde***

Le glutaraldéhyde (GA, Figure I. 28a) est le réticulant le plus couramment utilisé avec le chitosane malgré sa toxicité élevée (LD_{50} de 900 $mg.kg^{-1}$). La réticulation peut être réalisée soit en phase homogène, le GA étant introduit dès la formation du collodion, soit en phase hétérogène, en immergeant le gel de chitosane dans un bain de GA. Dans les deux cas, le GA réagit avec les fonctions amines du chitosane pour former des fonctions imines (Figure I. 28b). Baroni et al. (2008) [111] ont mis en évidence, suite à l'étape de réticulation du chitosane par le GA, une atténuation du pic à 1100 cm^{-1} caractéristique des fonctions amines et l'apparition d'un pic à 1655 cm^{-1} due à la formation de liaisons imines (C=N).

Le GA est un composé très réactif, susceptible de réagir avec lui-même lors d'une réaction de condensation aldolique (réaction de condensation entre un alcool et un aldéhyde) à des pH compris

entre 8 et 13 pour donner des composés de taille comprise entre 12 000 et 20 000 g.mol^{-1} [112].

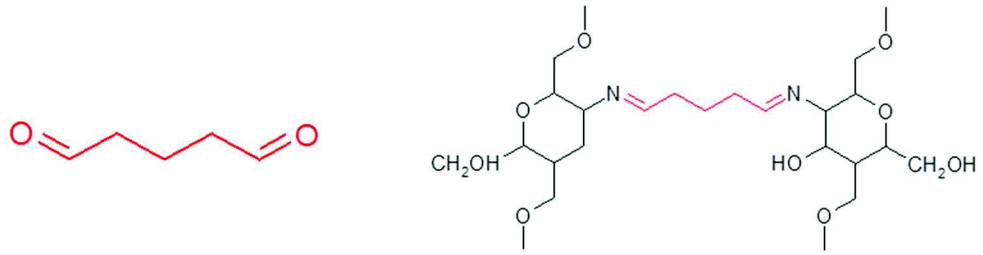

Figure I. 28 : Formule chimique du glutaraldéhyde (a) ; représentation schématique de la réticulation entre le glutaraldéhyde et chitosane (b)

Monteiro et al. (1999) ont réalisé des gels chimiques en phase homogène par ajout de GA, de concentration allant de 0,1 à 10 mol.L^{-1}, dans une solution de chitosane / acide acétique. La solution ainsi obtenue est agitée 30 s puis laissée au repos 1 h à température ambiante avant d'être neutralisée jusqu'à pH 6-7 par une solution de soude à 0,2 mol.L^{-1}. L'augmentation de la concentration en GA fait varier la couleur du produit obtenu qui passe du blanc (en l'absence de GA) au rouge foncé.

Malgré la toxicité du GA, la littérature témoigne de l'efficacité de sa réticulation avec le chitosane, sa grande réactivité peut néanmoins limiter son utilisation dans le cas de la gélification enzymatique. En effet, des études relatives à la fonctionnalisation de membranes ou à la fabrication de colles montrent qu'il est susceptible de réagir avec l'uréase [113] ou avec l'urée [114] sur leurs fonction carbonyles et pourrait donc nuire à la réaction de gélification.

- ***L'épichlorohydrine***

L'épichlorohydrine est un autre réticulant couramment utilisé avec le chitosane. Contrairement au GA, la réaction de réticulation ne met pas en jeu les fonctions amines mais les fonctions hydroxyles du chitosane (Figure I. 28). Généralement, une réticulation hétérogène du gel de chitosane est réalisée, par immersion dans un bain de réticulant à pH 10 à 50°C pendant 1 à 2 h [111, 115-117]. Après réaction, la membrane est lavée à l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH neutre, témoin de l'élimination du réticulant. La réticulation par ajout de l'épichlorohydrine dans une solution de chitosane ne peut pas se faire puisque la réticulation est catalysée par un pH basique.

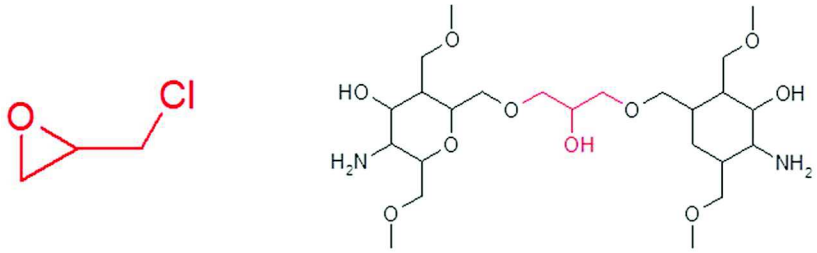

Figure I. 28: Formule chimique de l'épichlorohydrine (a) ; représentation schématique de la réticulation du chitosane par l'épichlorohydrine

La réticulation par l'épichlorohydrine ne crée pas de nouveau type de liaison mais va augmenter l'intensité des pics correspondant aux liaisons hydroxyles -OH (bande large entre 1000 et 1300 cm^{-1}) et éther oxyde C-O-C.

Même si la membrane réticulée deviendra insoluble en milieu acide, le pH acide va avoir pour effet de protoner les fonctions amines libres et ainsi induire de fortes répulsions entre les groupements – NH_3^+ et donc un taux de gonflement important en milieu aqueux [50, 110, 115]. Ces membranes peuvent jouer le rôle de membranes échangeuses d'anions (pour des protéines par exemple) grâce à la protonation des groupements NH_2 pour former des groupements NH_3^+ pour des pH inférieurs à 7,0 (correspondant au pKa). Cependant, la forte toxité de l'EPI pourra être un frein quant à son utilisation.

- ***La génipine***

La génipine (Figure I. 29) est un dérivé du géniposide extrait du fruit du gardénia commun et qui est très utilisé en Asie comme herbe médicinale et colorant alimentaire. La génipine constitue un excellent agent de réticulation du chitosane, des protéines et du collagène. Elle a l'avantage d'être 5 000 à 10 000 fois moins toxique que le glutaraldéhyde.

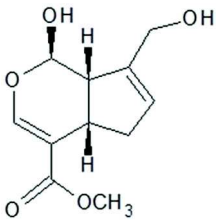

Figure I. 29: Formule chimique de la génipine

Le protocole de réticulation par la génipine consiste soit à incorporer le réticulant à la formulation du collodion soit à immerger le gel plan poreux élaboré dans une solution de réticulant.

Mi et al. (2005) [118, 119] ont montré que la réticulation du chitosane par la génipine était dépendante du pH : lorsque le pH diminue de 13,6 à 7,4, le taux de réticulation croit de 1,4 % à 96 %. Lorsque le pH diminue encore jusqu'à pH 5, le taux de réticulation redevient plus faible, de l'ordre de 40 %. A pH 5, la réaction est défavorisée par la protonation des fonctions amines du chitosane qui deviennent moins réactives pour une attaque nucléophile sur la génipine. A pH basique (13,6), l'ouverture du cycle du génipine induit la formation de monomères par attaque du noyau par OH^- pour former des groupes aldéhydes. Ces monomères peuvent polymériser, ce qui peut être visualisé par un changement de couleur de la solution, du transparent au brun, et une hausse de la viscosité de la solution [120].

Les mécanismes mis en jeu lors de la réticulation sont complexes et mettent en jeu deux réactions [118]. La première réaction est une attaque nucléophile de la génipine par le groupement amine primaire du chitosane, ce qui provoque l'ouverture de son cycle aromatique pour former un groupement aldéhyde intermédiaire. Ce composé peut s'associer en dimère, trimère ou tétramères de génipine et former des ponts qui lieront les chaînes macromoléculaires du chitosane. La deuxième réaction consiste en une substitution nucléophile du groupement ester sur la chaîne de la génipine pour produire de l'éthanol et former un amide secondaire avec le glucosamine du chitosane. Ainsi, les chaînes du chitosane se lient entre elles et finissent par produire un réseau tridimensionnel. Selon qu'un catalyseur acide est présent ou pas en solution, les deux réactions peuvent survenir à la suite ou simultanément.

Cette voie de réticulation ne sera pas retenue pour la suite en raison du coût élevé de la génipine, environ trois cents fois plus élevé que le glutaraldéhyde qui sera privilégié.

3.2.2.2 Acétylation du chitosane

L'acétylation du chitosane, permet, par réaction de l'anhydride acétique avec les groupements NH_2 libres responsables de la resolubilisation du chitosane en milieu acide lorsque protonés, de le rendre insoluble (Figure I. 30). Le gel plan poreux de chitosane peut être acétylé par immersion pendant 1 h à température ambiante dans un bain contenant du méthanol, de l'anhydride acétique (à 97 % vol.) et du N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (agent déshydratant) dans les proportions volumiques suivantes : 100/3/3 [47, 48].

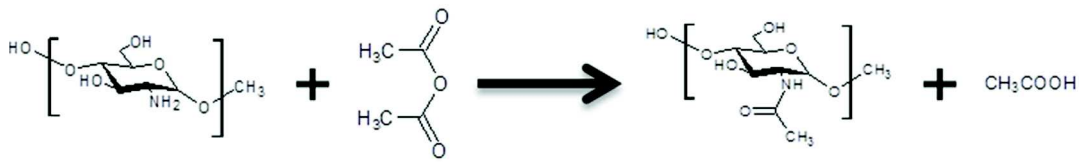

Figure I. 30: Réaction d'acétylation du chitosane par de l'anhydride acétique

East et al. (1993) [121] ont étudié l'influence du temps de réaction et de la température sur le DDA de fibres de chitosane initialement de 84 %, calculé par le rapport N/C obtenu par analyse élémentaire. En travaillant de 20 à 60°C et pour un temps de réaction de 30 min, le DDA le plus faible a été obtenu à 40°C (DDA = 11 %) pour ré-augmenter légèrement lorsque la température augmente. Cette légère augmentation au-delà de 40°C pourrait être due à des réactions secondaires qui consomment de l'anhydride acétique. A 40°C, cette réaction est suffisamment rapide pour passer d'un DDA de 84 à 16 % en 30 min puis diminuer jusqu'à 0 % en 120 min et ainsi acétyler totalement les groupements amines du chitosane.

De plus, L'acétylation du chitosane améliore sa stabilité thermique puisque les fibres des chitosane avec un DDA de 84 % ont une température de décomposition de 313°C tandis que le chitosane complètement acétylé sera stable jusqu'à 357°C.

En plus de rendre les membranes de chitosane insolubles en milieu acide, Zeng et al. (1996) [110] ont montré que l'acétylation a aussi pour effet d'améliorer les propriétés mécaniques des membranes humides ou sèches en augmentant la résistance à la traction de 7,37/0,90 à 9,23/1,09 MPa (membrane humide/sèche).

Quant au flux du perméat à l'eau, il diminue légèrement (10 %) après acétylation ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la cristallinité due à la formation des groupements $-COCH_3$ [110].

3.2.2.3 Caractérisation du taux de réticulation ou d'acétylation

Dans le cas d'une réticulation chimique sur les fonctions amines du chitosane (cas du GA), différentes méthodes de caractérisation du taux de réticulation et de l'acétylation sont présentées dans la littérature :

- Par mesure en spectroscopie UV à 464 nm de l'acide orange VII fixé sur les fonctions amines libres de la membrane [122]. Plus précisément, l'orange II est fixé en milieu acide (pH 3) sur les fonctions amines libres protonées du chitosane ; puis l'échantillon est immergé en milieu basique (pH 12) de manière à libérer l'acide orange II qui sera ensuite dosé par spectroscopie UV visible à 464 nm. Cette méthode nécessite que le taux de réticulation soit

suffisant pour que la membrane soit insoluble à pH 3.

- Par dosage en spectroscopie UV-visible à 570 nm de la ninhydrine ayant réagi avec les fonctions amines libres des membranes préalablement lyophilisées. La glycine est utilisée comme standard [123].
- Par méthode pH-potentiométrique : un morceau de membrane est immergé dans une quantité connue et en excès de HCl 0,02 M pour protoner les fonctions amines [21]. L'excès de HCl est ensuite dosé par NaOH 0,01 M qui est ajouté goutte à goutte avec un intervalle de temps d'environ deux minutes entre chaque ajout pour que la base puisse réagir sur les fonctions amines protonées des membranes. Cette méthode peut être réalisée sur une membrane insoluble ou partiellement soluble.
- Par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourrier. Cette méthode revient à déterminer le degré d'acétylation dans le cas où le glutaraldéhyde est utilisé comme réticulant (Eq I. 5). Dans le cas d'une réticulation chimique sur les fonctions hydroxyles du chitosane, le pic de référence devient alors celui des fonctions amides du polymère. L'incertitude de cette méthode repose sur la mesure de l'aire des pics et notamment sur le tracé de la ligne de base.

Cependant, lors de l'utilisation de l'EPI pour la réticulation chimique sur les fonctions hydroxyles du chitosane, les auteurs n'ont pas quantifié le degré de réticulation mais ils ont caractérisé l'efficacité de la réticulation au travers d'une analyse FT-IR montrant une augmentation de l'intensité des pics correspondant aux liaisons hydroxyles -OH et éther oxyde C-O-C. Cependant une analyse élémentaire pourrait permettre d'évaluer le degré de réticulation en calculant la proportion d'oxygène par rapport à l'azote puisque le composé formé contiendrait une fonction hydroxyle par pontage.

Dans le cas de l'acétylation du chitosane, la modification chimique par l'anhydride acétique, peut être caractérisée par les méthodes présentée en 1.2.1 servant à caractériser le DDA.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les voies de modification chimiques choisis seront la réticulation classique par le glutaraldéhyde et l'épichlorohydrine ainsi que l'acétylation du chitosane. L'EPI présenterait l'avantage de réagir sur les fonctions –OH, ce qui laisse les amines libres pour la sorption d'ions métalliques.

3.3 *Propriétés fonctionnelles des membranes de chitosane*

3.3.1 *La perméabilité*

Le Table I. 12 regroupe de manière exhaustive les 4 formulations permettant d'élaborer des gels plans poreux caractérisés en filtration présents dans la littérature.

Table I. 12: Synthèse des principaux gels poreux caractérisés en perméabilité en fonction du choix du porogène

Collodion	Porogène Ratio chitosane /porogène	Porosité (%)	Diamètre moyen des pores (µm)	Perméabilité ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	Réf.
Chi 1% w/v dans a.acet 1% v/v	Si (15-25 µm) 1/16	75,2	19,8	32 000	[110]
Chi 1% w/v dans a.acet 1% v/v	Si (15-25 µm) 1/16	62	18	4 600	[124]
Chi 1% w/v dans a.acet 1% v/v	Si (15-40 µm) 1/12	63 ± 11	22,0 ± 13,5	570	[107]
Chi 2-3 % dans a.acet 2 %	PEG 2000 1/1	65,5	≈ 0,50	221	[104]

En termes de perméabilité, les gels poreux de chitosane permettent d'atteindre des perméabilités comparables, voire supérieures à celles des membranes en polymères tels que le polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou le polyéthersulfone (PES) (Table I. 13).

Table I. 13: Exemples de membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou en polyéthersulfone (PES)

Polymère	Concentration en polymère (% w/v)	Solvant	Diamètre moyen des pores (nm)	Perméabilité ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	Réf.
PVDF	10	NMP	555	≈ 770	[125]
	16	DMF	50,6	88,2	[126]
PES	16	DMAc	_	67	[127]

3.3.2 *Les propriétés de sorption d'éléments métalliques*

Les capacités de sorption du chitosane s'avèrent être similaires à celles obtenues avec des résines échangeuses d'ions, généralement comprises entre 50 et 100 $mg.g^{-1}$ [128-130]. Elles peuvent cependant être influencées par divers paramètres liés aux caractéristiques du chitosane, aux conditions d'élaboration du matériau sorbant en chitosane, et à ses conditions de mise en œuvre.

3.3.2.1 Les mécanismes de sorption

Les deux principaux mécanismes de sorption d'éléments métalliques par le chitosane sont la chélation/complexation et l'échange d'ion/interaction électrostatique [63, 131], le type de mécanisme dépendant de la charge de l'espèce ciblée.

- ***La chélation/complexation***

Les ions métalliques et plus particulièrement les cations peuvent se fixer sur le doublet non liant libre des fonctions amines du chitosane lorsque celui-ci se présente sous sa forme déprotonée, c'est-à-dire à un pH ≥ 5. D'après la HSAB theory (Hard and Soft acid and Base theory) qui assimile l'interaction entre deux entités à un équilibre acide/base, il est ainsi possible de prévoir l'affinité d'un ligand pour des métaux ciblés. Les ions ou atomes polarisables sont considérés comme « faibles » et ont tendance à former des liaisons à caractère covalent, alors que les métaux possédant une densité de charge plus élevée, du fait d'un nuage électronique moins apte à se déformer, sont considérés comme « forts » et forment des liaisons de type ionique. Les ligands « faibles » se liant préférentiellement avec des métaux « faibles », l'affinité des ligands peut ainsi être prévue (Table I. 14). Les groupements amines sont classés comme des ligands intermédiaires présentant donc une grande affinité pour les cations métalliques de transition (Cu(II), Pb(II), Zn(II)) et les acides « faibles » métalliques (hautement polarisables et faiblement électronégatifs : Hg(II), Cd(II),

Au(II), Ag(II)). Ce type de sorption est contrôlé par le pH de la solution.

Table I. 14: Classification de certains cations métalliques et ligands selon la théorie HSAB

Acides « forts »	Composés intermédiaires	Acides « faibles »
Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Be^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}	Cr^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}	Ag^{+}, Au^{+}, Ti^{+}, Ga^{+}, Cd^{2+}, Hg^{2+},

- ***L'échange d'ion/interaction électrostatique***

Avec un pKa proche de 6,5, les fonctions amines se retrouvent sous leur forme protonée en milieu acide ce qui les rend disponibles pour la fixation d'anions métalliques (et de colorants anioniques) tels que le molybdate [132] ou le vanadate [133] par échange d'ions ou par attraction électrostatique. Dans le cas du mécanisme par échange d'ions, l'effet du pH est lié à la compétition avec le contre-anion apporté par la dissociation de l'acide utilisé pour contrôler le pH et à son impact sur la forme de prédominance du métal visé.

3.3.2.2 Approche expérimentale des propriétés de sorption du chitosane

- ***Caractérisation en système fermé***

Les propriétés de sorption du chitosane sont dans un premier temps évaluées par la mise en œuvre de cinétiques de sorption en système fermé. Pour cela, un volume fixe de solution à épurer est mis en contact avec une masse de chitosane dans des conditions fixées : concentration en soluté, température, pH et l'agitation. Des prélèvements réguliers de la phase à épurer sont réalisés pour déterminer la quantité de soluté fixée à un instant t par différence entre la concentration en polluant entre deux prélèvements.

Les cinétiques de sorption permettent ainsi d'accéder au temps de saturation, qui représente le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique dans des conditions opératoires données. Puis, à la vitesse initiale d'adsorption γ (L.mg^{-1}.min^{-1}), qui est calculée dans les premiers instants de la cinétique et qui s'exprime à partir de l'équation suivante :

$$\gamma = \frac{1}{C_0}\frac{V}{m}\left(\frac{dC(t)}{dt}\right)_{t=0} \qquad \textit{Eq I. 15}$$

Avec V (L) le volume de solution traitée, C_0 (mg.L^{-1}) la concentration initiale en ions métalliques et m (g) la masse de chitosane.

Une fois le temps de saturation déterminé, les isothermes de sorption en réacteur fermé peuvent être réalisées afin de déterminer la concentration en soluté dans la solution à l'équilibre vis-à-vis du soluté testé dans des conditions fixées. Ainsi, une même masse de chitosane est agitée dans des solutions de concentrations variables en soluté à une température fixée. Une fois le temps de saturation atteint, les concentrations résiduelles en soluté sont mesurées ce qui permet de représenter l'isotherme de sorption à partir de la capacité de sorption à l'équilibre en fonction de la concentration en soluté à l'équilibre.

La capacité de sorption à l'équilibre d'un matériau (Q_e en mg.g^{-1}) correspond à la quantité de soluté sorbé par gramme de matériau sorbant. Elle peut être calculée à l'aide d'un bilan matière sur le soluté présent dans la solution à l'équilibre :

$$\boldsymbol{Q_e = \frac{V \times (C_0 - C_e)}{m}} \qquad \textit{Eq I. 16}$$

Avec C_e, la concentration en soluté dans la solution à l'équilibre.

- ***Caractérisation en réacteur continu***

Dans le cas de la filtration en continu d'un effluent contenant un soluté, l'évolution de la concentration en sortie du réacteur d'adsorption est habituellement représentée sous forme d'une courbe de percée. Elle représentant l'évolution du rapport $C(t)/C_0$ au cours de la période de filtration, où $C(t)$ représente la concentration en soluté dans le perméat au temps t et C_0 la concentration initiale dans le rétentat. Le temps de percée est déterminé pour un rapport $C(t)/C_0$ de 0,05 ou 0,1 c'est-à-dire lorsque la concentration en polluant dans le perméat est comprise entre 5 et 10% de la concentration du rétentat. Ce pourcentage est fonction de la qualité de l'eau désirée.

3.3.2.1 Influence des caractéristiques du chitosane sur la sorption

Les propriétés de sorption du chitosane sont principalement liées à son DDA et sa cristallinité. Le DDA caractérise la fraction de groupements amines libres pouvant interagir avec les ions métalliques ; en effet, même si les groupements hydroxyles sont susceptibles de contribuer à la sorption d'éléments métalliques, les groupements amines constituent les principaux sites dans la sorption. Concernant la cristallinité du chitosane, plus elle est faible et meilleure sera sa capacité de sorption puisque la diminution de la cristallinité a pour effet d'améliorer les propriétés de diffusion au sein du matériau et donc l'accessibilité du soluté aux groupements sorbants [63, 131].

3.3.2.2 Conditions d'élaboration

- ***Mise en forme du chitosane***

Les matériaux sorbants en chitosane peuvent généralement se présenter sous la forme de poudre, de billes, de gels ou de gels plans. La mise en forme du chitosane a une influence sur ses capacités de sorption notamment au travers de la cristallinité et de la porosité du matériau élaboré [95, 97, 134]. L'utilisation du chitosane à l'état gel sous la forme de billes ou de gel plan peut ainsi améliorer les propriétés de diffusion du matériau car l'expansion du réseau facilite la diffusion du soluté vers les sites de sorption et peut diminuer la cristallinité du matériau si aucune étape de séchage n'intervient lors de l'élaboration du gel [63].

Monteiro et al. (1999) [134] montrent que la gélification du chitosane sous la forme de billes permet d'augmenter ses capacités de sorption vis-à-vis du Cu (II) d'un rapport d'environ 3 (de 9,5 à 28,6 $mg.g^{-1}$) par rapport à la poudre de chitosane. Vieira et al. (2006) [51] ont comparé des gels sous forme de gels plans poreux (porosité générée par un séchage partiel de 50% avant immersion dans la soude) et de billes. Ils ont obtenu de meilleures capacités de sorption vis-à-vis du Hg(II) avec les gels plans poreux qu'avec les billes (capacités de sorption atteignant respectivement 25 et 13,5 $mg.g^{-1}$) et expliquent ce résultat par une meilleure diffusion due à une cristallinité plus faible avec les gels plans poreux.

- ***Porosité***

La génération de la porosité pour les gels plans va influencer significativement les propriétés de sorption ; Ghaee et al. (2010) [95] ont montré qu'il était possible de multiplier par un facteur deux les capacités de sorption de gels plans denses vis-à-vis du Cu(II) (de 3,0 à 5,9 $mg.g^{-1}$) par génération de porosité à l'aide de particules de silice de 15-40 µm pour un rapport massique silice/chitosane de 3 et une porosité finale de 44 %. Cette tendance est similaire à celle observée par Chao et al. (2006) [97] qui ont vu les capacités de sorption de leurs gels plans augmentées de 86 % lors de l'utilisation de silice de 150-250 µm pour un rapport massique silice/chitosane de 16 (en accord avec une hausse de la porosité de 10 à 56 %).

- ***Réticulation***

A priori, lorsque la réticulation par le chitosane se fait à l'aide du GA par réaction avec les fonctions amines mobilisées pour la sorption des éléments métalliques, il est légitime de s'attendre à une baisse des capacités de sorption après l'étape de réticulation du chitosane.

Plusieurs auteurs [49, 111, 134] ont effectivement observé une diminution des capacités de sorption (pour le Cu (II) et le Cr (III)) à pH neutre pour des gels de chitosane suite à une réticulation par GA. Ces résultats leur ont permis de mettre en avant que les groupements amines sont principalement impliqués lors de la sorption de ces éléments métalliques.

En revanche, la tendance inverse est observée lors de la sorption du Hg(II), ce que les auteurs ont justifié par l'implication des groupements imines issus de la réticulation entre le glutaraldéhyde et le chitosane [99].

Lorsque la réticulation n'implique pas les fonctions amines (cas de l'épichlorohydrine qui réagit avec les fonctions hydroxyles), elle peut néanmoins impacter les propriétés de sorption en lien avec son influence sur la cristallinité du matériau. Ainsi, Ngah et al. (2002) [49] montrent qu'une réticulation de billes (gels) de chitosane par l'épichlorohydrine induit une baisse des capacités de sorption de 80,7 à 62,5 $mg.g^{-1}$ par rapport à des billes non réticulées probablement due à une diminution de la cristallinité.

- ***Fonctionnalisation du chitosane par l'histidine***

Il est également possible d'améliorer les propriétés de sorption des membranes de chitosane en y ajoutant des groupements chélatants comme par exemple de l'histidine (Figure I. 31). Ainsi, Beppu al. (2004) [115] ont pu améliorer la capacité de sorption de leurs gels plans poreux (porosité générée par Si 40-60 µm) réticulée par de l'épichlorohydrine en les fonctionnalisant par de l'histidine, ce qui leur a permis d'augmenter leur capacité de sorption de 158 à 190 mg de Cu /g de chitosane.

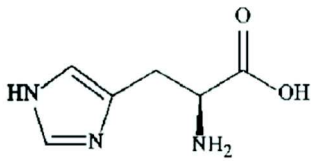

Figure I. 31: formule chimique de l'histidine

3.3.2.3 Influence des conditions opératoires de sorption sur les propriétés de sorption

- ***Le pH***

Le pH a une influence à la fois sur le mécanisme mis en jeu et sur la forme spécifique de l'espèce métallique. Un pH acide sera défavorable pour la chélation/complexation mais favorisera les interactions électrostatiques. Une baisse du pH va défavoriser la sorption par la chélation puisque les groupements amines du chitosane se présentent sous leur forme protonée à pH acide ce qui induit

des répulsions électrostatiques avec les cations métalliques. Par exemple, dans le cas du Cu(II), Ngah et al. (2002) [49] ont montré que la capacité de sorption vis-à-vis du cuivre augmente avec le pH sur une gamme de 1,5 à 6 avant qu'il ne précipite sous la forme d'oxyde de cuivre $Cu(OH)_2$ au-delà de pH 6. De plus, Vieira et al. (2006) [99] ont mis en évidence que le point de charge nul sur une gamme de pH comprise entre 6 et 10 pour leurs gels plans poreux non réticulés ou réticulés soit par GA ou EPI ce qui signifie que cette zone est favorable au mécanismes de sorption par chélation et justifie ainsi le pH optimum de 6 pour la sorption du Cu(II).

- ***La concentration en ions métalliques***

Pour des conditions opératoires fixées lors de la caractérisation des capacités de sorption en réacteur fermé, une augmentation de la concentration en ions métalliques a pour effet d'augmenter la quantité d'ions métalliques sorbée à l'équilibre jusqu'à atteindre un plateau ce qui signifie que tous les sites de sorption accessibles sont alors impliqués pour capter des ions métalliques.

Les valeurs des capacités de sorption d'éléments métalliques sur le chitosane utilisées dans les paragraphes précédents sont présentées dans le tableau suivant pour différentes conditions opératoires :

Table I. 15: Exemples de capacité de sorption d'éléments métalliques sur du chitosane

Métal	Mise en forme du chitosane	Procédé de réticulation	pH	T (°C)	Q_{max} ($mg.g^{-1}$)	Réf.
Cu(II)	Billes (<250 µm)	Réticulation post-gélification par glutaraldéhyde (GA), épichlorohydrine (EPI)	6	20	Chi : 80,7 Chi-GA : 59,7 Chi-EPI : 62,5	[49]
	Membranes poreuse par Si (15-40 µm), Chi/Si : 1 ; 3	Réticulation post-gélification par GA	5	20	Si/Chi (1) : 7,72 Si/Chi (3) : 10,2	[95]
	Membranes poreuse par Si (40-60 µm), Si/Chi : 1 ; 3 fonctionnalisation par l'histidine (hist)	Réticulation post-gélification par épichlorohydrine (EPI)	6	20	Chi : 158 Chi-hist : 190	[115]
	Poudre ou billes	Réticulation en phase homogène par glutaraldéhyde (GA)	6	25	Chi(poudre) : 9,5 Chi : 28,6 Chi-GA : 21,0	[134]
	Membranes poreuse par Si (150-250 µm), Si/Chi : 16	Réticulation post-gélification par Génipine	6	30	Chi : 72,9 Si/Chi (16) : 135,7	[97]
Hg(II)	Membranes poreuse par un séchage à 50 % du collodion avant gélification	Réticulation post-gélification par glutaraldéhyde (GA)	6	25	Chi : 25 Chi-GA : 75	[51]
	Billes (500 µm)	Réticulation post-gélification par glutaraldéhyde (GA)	6	25	Chi : 13,5 Chi-GA : 31,1	[51]
Cr(III)	Membranes poreuse par un séchage à 50 % du collodion avant gélification	Réticulation post-gélification par glutaraldéhyde (GA)	6	25	Chi : 65,7 Chi-GA : 29,5	[111]

Conclusion du chapitre I

Ce premier chapitre bibliographique a mis en évidence l'intérêt potentiel d'utiliser du chitosane pour élaborer des membranes de filtration par rapport aux polymères synthétiques classiques. Le chitosane, polymère biosourcé, présente l'intéressante propriété de gélifier par contact avec une phase aqueuse basique contrairement aux polymères synthétiques classiques qui nécessitent de grandes quantités de solvants organiques peu en accord avec la réglementation REACH.

Un procédé original de gélification enzymatique du chitosane, par production d'ammoniaque, in-situ dans la solution de chitosane, sera utilisé de manière à obtenir des gels de structure homogène contrairement aux procédés classiques de mise en contact avec un non-solvant basique qui induisent un front de gélification ayant pour conséquence une structure asymétrique et non contrôlée des gels formés. Le contrôle de la morphologie joue un rôle clé pour l'élaboration de membranes hybrides de filtration/sorption de manière à obtenir une perméabilité acceptable pour se positionner dans la gamme de l'ultrafiltration tout en favorisant la diffusion pendant la sorption.

Le comportement de l'uréase est généralement étudié en milieu aqueux tamponné. Les principaux paramètres ayant une influence sur l'activité de l'uréase sont : le pH, la température et le rapport des concentrations entre l'urée et l'uréase. En milieu aqueux tamponné, l'activité maximale de l'uréase est observée pour un pH de 7,2 et sa température optimale est située autour de 37-40°C. Cependant, lorsque l'uréase est utilisée en présence de chitosane dans le procédé enzymatique, le milieu est alors non-tamponné dans la mesure où c'est la hausse de pH qui va induire la gélification. Les premières études ont montrées que la même tendance est alors observée concernant l'effet de la température et de la concentration en uréase sur la cinétique de gélification enzymatique du chitosane, ce qui doit être approfondi.

Il a ensuite été montré, en dressant un état de l'art sur les différents moyens de créer des gels poreux de chitosane, que le poly(éthylène glycol) semble être le composé le plus adapté pour créer une porosité au sein des gels de chitosane puisqu'il permet d'obtenir des pores de l'ordre du micromètre et des perméabilités comprises entre 90 et 780 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$. Dans le cadre de ce travail de thèse, les PEG seront donc choisis pour créer la porosité de gels plans de chitosane élaborés par gélification enzymatique. Toutefois, à des fins de comparaison de nos résultats avec la littérature, l'optimisation des propriétés et conditions d'utilisation du PEG (en termes de masse molaire et de

concentration) sera réalisée en utilisant le procédé par immersion (qui servira de procédé de référence).

Une étape de modification chimique du chitosane est nécessaire pour rendre le gel insoluble en milieu aqueux acide. Cette modification peut être réalisée soit par réticulation (par du glutaraldéhyde ou de l'épichlorohydrine) en phase homogène dans le GA ou en phase hétérogène par immersion dans une solution de GA ou EPI, soit par acétylation des fonctions amines du chitosane. Néanmoins, quelle que soit la modification chimique du chitosane, il est possible que ses propriétés de sorption soient affectées notamment dans le cas de l'utilisation du GA pour la réticulation ou de l'acétylation puisque ces réactions mobilisent les groupements amines du chitosane par ailleurs fortement impliqués dans ses propriétés de sorption. Cependant, les capacités de sorption suite à la modification chimique du chitosane restent similaires à celles des résines échangeuses d'ions.

Dans un premier temps, une étude en milieu aqueux non-tamponné a été réalisée de manière à sélectionner les conditions opératoires permettant d'optimiser la gélification enzymatique, à des fins l'élaboration de gels plans. L'étude de l'influence des conditions opératoires sera présentée dans le Chapitre II.

Afin de comprendre les cinétiques réactionnelles intervenant lors de la gélification enzymatique du chitosane, le chapitre III aura pour objectif de mettre en place un modèle décrivant le couplage des réactions d'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase, de gélification du chitosane et des équilibres chimiques. Dans un premier temps, le modèle sera développé pour un système fermé 0D en négligeant tout transfert. Puis les phénomènes de transfert seront ajoutés pour un système 1D.

Enfin, en mobilisant les informations issues des deux précédents chapitres, le chapitre IV portera sur l'élaboration de membranes de chitosane à partir des gels plans élaborés dans le chapitre II. En particulier, ce chapitre décrira le passage des gels plans aux gels plans poreux (par création de la porosité du gel par ajout d'un porogène de type PEG) ; puis celui des gels plans poreux aux membranes poreuses utilisables pour le traitement d'effluents acides contenant des éléments métalliques, par insolubilisation du chitosane par différentes voies (réticulation ou acétylation).

L'articulation des différents chapitres est synthétisée sur la Figure I. 32

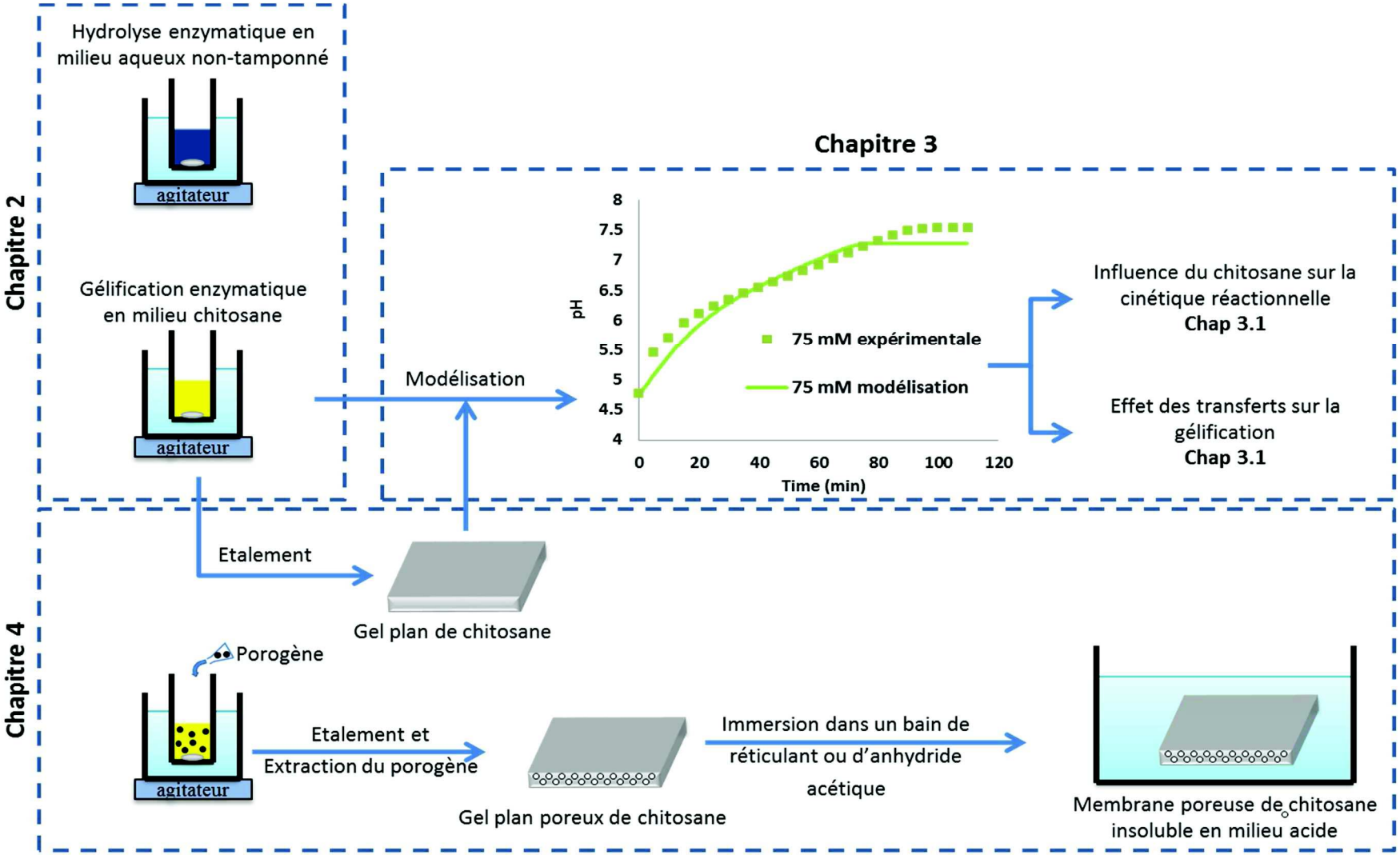

Figure I. 32: organigramme représentant le passage de l'étude de la gélification enzymatique du chitosane dans un réacteur volumique semi fermé vers l'élaboration de membrane

CHAPITRE II

Introduction

Le Chapitre I a montré l'intérêt que pourrait présenter l'élaboration de membranes de chitosane par un procédé original de gélification par voie enzymatique.

En premier lieu, la gélification du chitosane ne nécessite pas de solvant organique contrairement aux procédés de fabrication de membranes polymères synthétiques, ce qui constitue un atout environnemental.

Par ailleurs, le chitosane possède des fonctions amines et hydroxyles intéressantes pour la sorption d'ions métalliques, de sorte que des membranes en chitosane pourraient réaliser simultanément des opérations de filtration/sorption.

Enfin, comparé aux procédés classiques de gélification du chitosane, et notamment le procédé dit « par immersion » dans un solvant basique où une gélification anisotrope est obtenue, ou encore le procédé « VIPS » qui donne lieu à un front de gélification, le procédé par voie enzymatique réalisé in-situ de la solution chitosane permettrait un meilleur contrôle de la cinétique de gélification. Ainsi, il pourrait permettre d'obtenir une morphologie plus homogène, intéressante dans l'optique d'une réalisation simultanée d'opérations de filtration et de sorption d'ions métalliques.

Ce Chapitre II a pour objectif d'étudier la gélification enzymatique du chitosane, première étape vers l'obtention de membranes à base de chitosane par voie enzymatique.

La gélification par voie enzymatique du chitosane reposant sur la production d'ammoniaque lors de l'hydrolyse du substrat urée par l'enzyme uréase, la première partie de ce Chapitre II constitue une étude préliminaire de la cinétique d'hydrolyse de l'urée par l'uréase en milieu aqueux non tamponné. L'influence des paramètres opératoires (température et concentration en urée) sera déterminée afin d'optimiser les conditions de travail en milieu chitosane. L'originalité de cette partie repose sur l'étude de l'influence de ces paramètres sur l'enzyme en milieu aqueux non tamponné puisque dans les conditions standards rencontrées dans la littérature, l'uréase est classiquement étudiée en milieu aqueux tamponné.

La seconde partie de ce Chapitre II étudiera la cinétique de gélification enzymatique du chitosane afin de préciser les conditions opératoires permettant d'obtenir des gels possédant les caractéristiques visées, à savoir une morphologie plus homogène que celle obtenue avec les procédés classiques de

gélification et suffisamment rigides pour être mis en œuvre au sein d'un procédé de filtration baromembranaire. Cette étude se fera en réacteur volumique semi-fermé (avec un rapport hauteur/diamètre de 0,73). A cet effet, différents protocoles de suivi de la cinétique de gélification seront mis en place en parallèle : un suivi du pH, un suivi rhéologique et des tests de renversement, pour déterminer les conditions de la gélification, i.e. le couple (pH de gélification ; temps de gélification associé). L'influence des paramètres opératoires (concentration en urée, en uréase, température…) sera également étudiée afin de déterminer les conditions opératoires optimales pour la gélification du chitosane en vue d'une future élaboration de membranes.

L'étude de la gélification du chitosane par voie enzymatique est présentée dans un article intitulé « **Enzymatic gelation to prepare chitosan gels: study of gelation kinetics and identification of limiting parameters for controlled gel morphology** » soumis pour publication dans le journal AIChE et actuellement en cours de révision.

Enzymatic gelation to prepare chitosan gels: study of gelation kinetics and identification of limiting parameters for controlled gel morphology

D. Wlodarczyk, J-P. Méricq*, L. Soussan, D. Bouyer, C. Faur

IEM (Institut Europeen des Membranes), UMR 5635 (CNRS-ENSCM-UM), France;

jean-pierre.mericq@univ-montp2.fr

tel. +33(0)4 67 14 91 88

***** Corresponding author

Abstract

Chitosan gels of controlled morphology, required to prepare membranes, were elaborated by an enzymatic chitosan gelation process where in-situ production of ammonia resulted from enzymatic hydrolysis of urea by urease. The reaction dynamics was studied by three complementary methods (rheological, colorimetric and pH-metric) to define an advanced gelation pH (and the associated advanced gelation time) enabling homogeneous chitosan gels with well-controlled morphology to be obtained that were suitable for a future membrane application. A comparative study of kinetics in water and aqueous chitosan solution highlighted differences probably related to ammonia consumption when chitosan was present. The key parameters evidenced for the control of the gelation kinetics were the temperature and the urease concentration. The operating parameters required to elaborate gels with sufficient mechanical resistance to be handled from 2.5% w/v chitosan concentration were defined: a 3.5 $u.mL^{-1}$ urease concentration, a 75 mM urea concentration and a temperature of 5°C.

Keywords: Enzymatic gelation - Advanced gelation time - pH, colorimetric and rheological monitoring

1. Introduction

Chitosan, the second most abundant polymer after cellulose, is an N-deacetylated polysaccharide and is soluble in dilute acid aqueous media because of the presence of amino groups [130, 135]. When exposed to basic media, chitosan reacts according to the reaction presented in Figure II. 1 [9]. For pH values higher than 6.2-7.1 (corresponding to the chitosan pKa), chitosan becomes a gel [136]. This property is often used as a preliminary step prior to the formation of chitosan films, beads or

flakes without the use of an organic solvent [50, 102, 137]. These chitosan materials can therefore be used in various forms for applications in water treatment or in the biomedical field [28, 101, 103, 138]. In the specific domain of water treatment, numerous studies have demonstrated the sorption properties of chitosan towards colouring compounds or metal ions, which are due to amino ($-NH_2$) and hydroxyl (-OH) groups on chitosan chains serving as coordination and electrostatic interaction sites [50, 52, 116, 139].

Figure II. 1 : chitosan gelation reaction

In classical polymeric membrane preparation, a synthetic polymer is initially dissolved in an organic solvent and a phase separation is induced through thermodynamic destabilization. The different methods leading to phase inversion involve (i) contact with a non-solvent, i.e. the NIPS (Non-Solvent Induced Phase Separation) process, (ii) a temperature modification, i.e. the TIPS (Temperature Induced Phase Separation) process or (iii) differential evaporation between solvent and non-solvent, i.e. the dry-casting process. NIPS can be conducted in a liquid phase (wet process) or by exposing the polymer solution to a vapour phase, i.e. the VIPS (Vapour Induced Phase Separation) process [140-142]. Nevertheless, the large quantities of organic solvents required for polymer membrane preparation do not match the REACH and green chemistry requirements [143].

Surprisingly, although chitosan solubility in acid aqueous media could be used in an attractive method for making green membranes without the use of organic solvents, very few works deal with membrane preparation using chitosan polymer for water treatment applications [95, 104, 110]. Furthermore, the interesting sorption properties of chitosan could enable the preparation of hybrid membrane systems for water treatment (increasing synergy between membrane systems and the physical process of sorption), these advanced membrane technologies being identified as a priority R&D needs by the European Union [144]. Tuning and properly controlling the morphology of hybrid sorbing membranes is a key step for attaining acceptable permeability and reducing pore diffusion limitation during the sorption process [45, 48, 95]. However, the aforementioned phase separation methods for membrane preparation induce mass transfer from the polymer matrix and the external environment, leading to concentration gradients within the solution before phase separation. Consequently, it is often difficult to control the membrane formation mechanisms (and hence its morphology) since the elementary phenomena are not only transient but also localized within a thin

film.

Recently, an original enzymatic gelation process for chitosan, based on the in-situ production of ammonia inside a chitosan solution, has been proposed [6, 7]. It employs enzymatic hydrolysis of urea by the enzyme urease (Figure II. 2). Because of the absence of a non-solvent gradient, this process could enable the formation of homogeneous chitosan gels with controlled morphology, as a preliminary step (before drying and cross-linking) in the production of membranes having a more controlled structure and morphology.

$$(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{urease} 2NH_3 + CO_2 \text{ (a)}$$
$$Chit - NH_3{}^+ + NH_3 \longrightarrow Chit - NH_2 + NH_4^+ \text{ (b)}$$

Figure II. 2: Chitosan enzymatic gelation: (a) hydrolysis of urea by urease; (b) deprotonation of chitosan by ammonia

In this study, we focus on the first step of chitosan membrane preparation, namely the enzymatic gelation process, to determine if it could be successfully controlled by key operating parameters. For this purpose, we propose a complete study of the relationship between the enzymatic gelation process parameters, the gelation kinetics, and the structural characterization of the gels obtained.

Urease from *Canavalia Ensiformis* was selected for urea hydrolysis by urease. In aqueous media, the significant parameters affecting enzyme activity are well-known; they are temperature, substrate to enzyme concentration ratio and pH [145]. However, the influence of these parameters is often determined at a buffered pH of 7-8, corresponding to the optimum pH for urease activity in aqueous media [87]. In the specific case of the urea hydrolysis required to induce enzymatic chitosan gelation, the aqueous urease enzymatic hydrolysis needed to be characterized in non-buffered pH conditions, from lower pH (to allow chitosan dissolution) up to higher pH (to allow complete chitosan gelation).

In a first part, the behaviour of urea hydrolysis in non-buffered water conditions was compared to that generally observed in buffered water conditions in order to determine the influence of operating parameters (temperature, urea and urease concentrations) and to approach, by comparison with the urea hydrolysis kinetics in a chitosan medium, the mechanisms involved during chitosan gelation. Then experimental protocols for flowing colorimetric tests and continuous pH measurements were designed, implemented and compared. Rheological analyses were also performed during the reaction and combined with the latter characterizations to enable a time characteristic of gelation to be assessed. The influence of various factors (presence of chitosan, urease and urea concentrations, temperature and initial pH) on the whole chitosan enzymatic

gelation kinetics was finally studied and the morphology of the gels elaborated in optimal conditions was characterized by Scanning Electron Microscopy observations.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Chitosan (obtained from France Chitine, France) had a degree of deacetylation (DDA) of 80 % (determined by magnetic nuclear resonance) and a mean molecular weight of 180 000 $g.mol^{-1}$ (supplier's data). BromoThymol Blue (BTB) solution (BTB mass content lower than 0.1% in isopropanol 70 – 80%) was purchased from Laboservice (France). Urea, urease (type III), hydrochloric acid, sodium hydroxide glutaraldehyde and hexamethyldisilazane were purchased from Sigma (France). Urease (EC 3.5.1.5) from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) was supplied as a glycerol solution and the specific activity of this enzymatic solution was 778 $u.mL^{-1}$ (supplier's data) where one catalytic unit (u) is defined as the enzyme quantity that will liberate 1.0 µmole of NH_3 from urea per minute at pH 7.0 and 25°C. This specific activity was confirmed experimentally with the protocol given by the supplier. Frequent controls on the supplied solution showed that its specific activity was stable for at least 6 months.

2.2 Implementation of enzymatic urea hydrolysis

2.2.1 Preparation of the solutions

A fresh stock solution of urea (5 M) was prepared in osmotic water. For urease, the supplied solution (778 $u.mL^{-1}$) or a fresh aqueous solution (28 $u.mL^{-1}$) was used for the assays. A preliminary study showed that the specific activity of the diluted urease solution was stable for 5 h at 4°C.

Chitosan solutions (from 2.5 to 3% w/v) were prepared by dissolving chitosan in HCl 0.1 M. In contrast to usual conditions used for the gelation process of chitosan, where it is dissolved in acetic acid, hydrochloric acid was used here to avoid a buffer effect due to acetic acid (pKa of 4.76 at 25°C). Before being used, the solutions were vigorously stirred for 24 hours at room temperature and the resulting pH of the solutions was 5.2 ± 0.1. The pH of these chitosan solutions was then adjusted to an initial, non-buffered pH of 4.7 ± 0.1 (by adding 0.1 M HCl), which allowed chitosan dissolution but did not prevent the occurrence of the enzymatic reaction. The density of the chitosan solution after pH adjustment was 1.005 $g.L^{-1}$. It should be noted that the range of mass contents for the chitosan

solutions [4, 146] was chosen to ensure that the solution viscosity was low enough to allow good mixing of urea and urease (< 4.0% w/v) and also to enable the formation of a gel strong enough for the target application (i.e. > 2.0% w/v). The viscosity of chitosan solutions at 2.5% w/v was determined using a rotational viscometer (Brookfield DV-II + Pro) at a constant speed of 10 rpm by using an LV2 spindle. Fresh osmotic water with an initial, non-buffered pH of 4.7 ± 0.1 was also prepared by adding 0.1 M HCl.

2.2.2 Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered water

Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered water was carried out in a 10 mL batch reactor made of glass and the total volume of the reaction mixture was 5.0 mL. The reaction was performed at 5, 25 and 37°C. The matrix solution was osmotic water with an initial, non-buffered pH fixed at 4.7 ± 0.1. Urea concentration in the reactor was varied from 25 to 150 mM by adjusting the volume of 5 M stock urea solution added (added volume ranged from 25 to 150 µL). Urease concentration in the reactor was fixed at 0.50 ± 0.01 $u.mL^{-1}$ (by adding 90 µL of the fresh solution at 28 $u.mL^{-1}$). In these conditions, a preliminary study showed that this enzyme concentration was high enough to ensure the assay reproducibility and not too high to prevent the reaction kinetics from being correctly studied.

In a first step, the reactor containing the matrix solution was placed on a waterproof stirrer in a water bath maintained at the assay temperature. When the matrix solution had reached the desired temperature, urease was introduced into the reactor under vigorous stirring. Stirring was kept constant during the assay and did not allow the formation of a vortex. After 2 minutes, a given volume of the stock urea solution was added to obtain the desired concentration in the reactor. Each essay was reproduced five times. Blanks corresponded to the same assays without enzyme (i.e. where the urease volume was replaced by osmotic water) or without urea (i.e. where the urea volume was replaced by osmotic water).

2.2.3 Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered chitosan solution

As for enzymatic urea hydrolysis in non-buffered water, enzymatic urea hydrolysis in non-buffered chitosan solution was carried out in a 10 mL glass batch reactor. The reaction was performed at different temperatures between 5 and 37°C. The matrix solution was the chitosan solution with an initial, non-buffered pH fixed at 4.7 ± 0.1 (Section 2.2.1). As for urea hydrolysis in water, the urea concentration in the reactor was varied from 25 to 150 mM by adjusting the volume of 5 M stock urea solution added. Urease concentration in the reactor varied from 0.50 ± 0.01 to 10.50 ± 0.01

u.mL^{-1} (by adding the required volume of the supplied enzyme solution at 778 u.mL^{-1}).

In a first step, chitosan solution was introduced into the reactor so as to achieve a mass of chitosan in solution of 5.0 ± 0.2 g. The reactor containing the chitosan solution was then placed on a waterproof stirrer in a water bath maintained at the assay temperature. After the matrix solution had reached the assay temperature, a given volume of the supplied urease solution was introduced into the reactor to obtain the desired concentration. Vigorous stirring (without vortex) was maintained for 30 min to ensure homogeneous distribution of the enzyme in the viscous chitosan solution. A preliminary study showed that this prior stirring had no influence on the specific activity of the urease diluted in the chitosan solution. Urea was then added at the desired concentration and the stirring was continued for a further 10 min. Stirring was then stopped to allow the gel to form. Blanks corresponded to the same assays without enzyme (i.e. where the urease volume was replaced by osmotic water) or without urea (where the urea volume was replaced by osmotic water).

2.2.4 In-situ characterization of the urea enzymatic hydrolysis kinetics and chitosan gelation kinetics

Several responses were used and compared to follow the enzymatic hydrolysis kinetics and/or the chitosan gelation kinetics:

(i) pH measurements were made during reactions using a Hanna Instruments pH-meter (HI 2214 pH/ORB) and a specific probe for viscous media (HI 2031, Hanna Instruments) in both chitosan solution and water. For hydrolysis carried out in water, pH variations were directly attributed to the production of NH3 in the solution. In chitosan media, this pH indicator was no longer directly related to the amount of NH3 produced (since the NH3 produced could be consumed by the chitosan for the gel formation, Figure II. 2) but could be related to the NH_3 quantity present in the solution. In consequence, the pH evolution in chitosan solution was representative of hydrolysis and gelation kinetics simultaneously. For each assay, pH was continuously recorded, with acquisition every 5 seconds, until the pH reached a plateau. The pH-meter was calibrated before each new series of assays, at the assay temperature, with pH 4.01, 7.00 and 10.01 buffered solutions. Calibration controls were performed before each test. Experiments in chitosan solution were reproduced to determine the uncertainty on pH (± 0.26).

(ii) Colorimetric monitoring of the reaction mixtures in chitosan media was also performed simultaneously with the pH recording. BTB (BromoThymol Blue) was chosen as the colour

indicator because its transition interval (pH 6.0 to 7.6) [4] included the chitosan pKa (6.2 - 7.1) and was consistent with the pH variation of the assays (i.e. from an initial pH of 4.7 ± 0.1 to a basic one). This colour indicator changes from yellow (in its acid form) to blue (in its basic form) passing through green (on the transition interval). This qualitative monitoring indicated the degree of homogeneity of the enzymatic gelation (by the colour distribution in the chitosan solution). When BTB was used, several drops of BTB solution (Section 2.2.1) were added to the chitosan solution just before the urease was introduced and the mixture was stirred for 30 min at the assay temperature before introducing the urea (Section 2.2.2). A preliminary study showed that the presence of BTB in the reactive mixture had no influence on the enzyme activity.

(iii) Another qualitative test, the flowing test method, was employed to monitor the gelation kinetics in chitosan media. For this method, the reactor was inverted to assess the mechanical strength of the gel (in the gel core and at its surface). In the rest of the study, colorimetric and flowing tests are combined and named the flowing colorimetric test.

(iv) Finally, the viscoelastic properties of the chitosan reaction mixtures were determined during the reaction by rheological measurements using an Anton Paar rheometer, model MCR301, equipped with a PP50 parallel plate system (in a closed system). Contrary to pH-measurement: A preliminary study had shown that there was no influence on pH evolution regardless system open or close. Temperature was controlled with an IMC70 Peltier system and kept constant at the assay temperature (5, 25, 37°C) during testing. The transition from liquid to soft solid was determined through an oscillation test (1 Hz frequency, normal force set to 0 N) with strain varying from 1% to 0.01% following a logarithmic ramp. Gelation was defined as occurring at t_g, the time when the values of the elastic modulus G' and the viscous modulus G'' were equal [77].

2.3 Gel morphology characterization by Scanning Electron Microscopy (SEM)

Enzymatic gels were prepared as described in section 2.2.3, with 2.5% w/v chitosan, 75 mM urea and 3.5 $u.mL^{-1}$ urease concentrations at a temperature of 5°C, then spread in petri dishes after 10 minutes of stirring. Gels were also prepared by a wet process with a 2.5%w/v chitosan solution spread in a petri dish and immersed in a 1 M NaOH solution for 24 h. Each gel was fixed by glutaraldehyde to maintain the structure during microscopic observations. Each sample was rinsed with osmotic water until the pH was neutral before being cross-linked [147] by immersion in 2.5% w/v aqueous glutaraldehyde solution for 1 h. Samples were rinsed in water, then dehydrated by

immersion in ethanol: 70 % (v/v) for 5 min, 90 % (v/v) for 5 min and 100 %(v/v) for two successive periods of 5 min. Samples were then immersed in hexamethyldisilazane (HMDS) for 1 min before being dried under a hood. All these steps were conducted at room temperature. Samples were finally observed by scanning electron microscopy (SEM) (FEI Quanta 200 FEG).

3. Results and discussion

3.1 Urea hydrolysis in non-buffered water

In most works reported in the literature, urea hydrolysis by urease is performed at buffered neutral pH in order to optimize urease activity [87]. However, in the case of chitosan enzymatic gelation, pH increased throughout the process to induce the gelation. Before studying chitosan enzymatic gelation kinetics, the hydrolysis of urea by urease in non-buffered water media (with an initial pH of 4.7) was investigated. Enzymatic hydrolysis kinetics was monitored by pH measurement as the NH_3 produced during the enzymatic reaction (Figure II. 2a) directly induced a modification of pH. Figure II. 3 presents these pH variations during urea hydrolysis in non-buffered water for different urea concentrations and temperatures, with a constant urease concentration (0.5 $u.mL^{-1}$). Each assay was reproduced five times and the average curve was plotted. The results shown in Figure II. 3a were obtained for urea concentrations of 0, 25, 50, 75 and 150 mM at a fixed assay temperature of 25°C. Those of Figure II. 3b were achieved for a given urea concentration (75 mM) but for assay temperatures of 5, 25 and 37°C. These temperatures were known to permit the catalysis of urea hydrolysis by urease and 37°C has been reported to allow optimal urease activity [94].

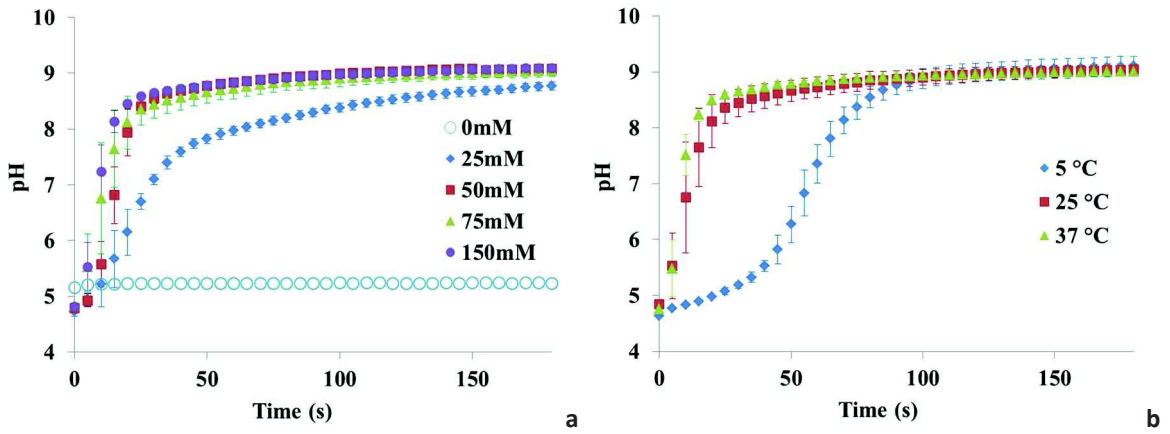

Figure II. 3: Influence on pH, during enzymatic urea hydrolysis in non-buffered aqueous media for [urease] = 0.5 u.mL^{-1}, of a) initial urea concentration at T = 25°C and b) assay temperature with a urea concentration fixed at 75 mM

In the absence of urea (Figure II. 3a), a slight increase of pH was initially observed (corresponding to the effect of the osmotic water volume addition replacing the highest urea volume addition for the blank experiment), then pH remained constant, since urease cannot produce NH_3 if there is no urea substrate. When urea was present without urease, the pH remained at its initial value, even for the highest urea concentration tested (150 mM) and temperature (37°C) (data not shown). The latter result is consistent with the fact that urea decomposition in water is very slow, with an estimated half-life of 3.6 years [83].

The curve profiles in Figure II. 3a correspond to profiles that are usually obtained in a buffered enzymatic reaction, i.e. first a constant product formation rate (assuming that there is enough substrate to initiate the reaction), then production slows down due to substrate limitation, which can be observed for the different urea concentrations. Two elements can explain this result. Firstly, pH variations are directly linked to NH_3 production (a preliminary monitoring of pH during the addition of ammonia in a non-buffered water solution with an initial pH of 4.7 showed that CO_2 produced hardly affected pH) and, secondly, the initial formation rates are so high that pH influence is not visible on the enzymatic activity. Table II. 1 reports the initial rates of pH variation, calculated as the slopes of the tangents to the curves at the initial point (Figure II. 3a) and the associated regression determination coefficient R^2 (-).

Table II. 1: Initial rates of pH variation for different urea concentrations ([urease] = 0.5 u.mL^{-1} and T = 25°C)

Urea concentration (mM)	Initial rate (s^{-1})	R^2 (-)
25	0.07	0.965
50	0.15	0.941
75	0.18	0.977
150	0.23	0.976

The most rapid pH variations (from an initial pH of 4.7 ± 0.1 to basic pH) were reached for the highest urea concentrations, notably 75 and 150 mM, meaning that, in the conditions of the study, no inhibition due to an excess of substrate occurred. Since the kinetic profiles obtained at 75 and 150 mM were quite similar (Figure II. 3a), 75 mM was chosen as the reference urea concentration for the urea hydrolysis because it enabled a high hydrolysis rate while permitting a significantly lower urea consumption.

The results in Figure II. 3b show the influence of the temperature on the hydrolysis kinetics for a urea concentration of 75 mM and a urease concentration of 0.5 u.mL^{-1}. Kinetics profiles at 25°C and 37°C were quite similar, which could be explained by a bell-shaped curve of temperature influence on urease activity. Comparatively, the profile at 5°C exhibited a different shape [94], with two rates of pH variation (one over the first 50 s and a greater one over the next 50 s) before pH stabilization. The initial rate of pH variation obtained at 5°C was 14 times lower than that obtained at 25°C (0.18 s^{-1}, Table II. 1). This expresses a significant slowdown of the enzymatic reaction at 5°C in accordance with the Arrhenius law. In that case, a combined effect of temperature and pH could be assumed, explaining the profile shape change in the second part of the curve when pH had increased. A temperature of 25°C was thus selected as the reference temperature for urea hydrolysis because the hydrolysis performances were similar at 25°C and 37°C but less energy was needed at 25°C.

These results have shown a similar behaviour of urea hydrolysis in non-buffered water conditions compared to buffered water conditions [87], except of an assay temperature of 5°C. In accordance with these preliminary results of urea hydrolysis in water, the reference conditions selected for the rest of the study were: 75 mM urea, 0.5 u.mL^{-1} urease and a temperature of 25°C.

3.2 Urea enzymatic hydrolysis in chitosan solution

Hydrolysis in chitosan was carried out with the reference conditions (75 mM urea, 0.5 u.mL^{-1} urease and a temperature of 25°C). Figure II. 4 compares the pH profiles versus time obtained during

hydrolysis of urea by urease in non-buffered water on the one hand and in a 2.5% w/v chitosan solution on the other. pH variations in chitosan solution are much slower than in water. For example, while less than one minute was required to reach a pH of 6.5 in water, nearly 500 minutes were necessary in chitosan solution.

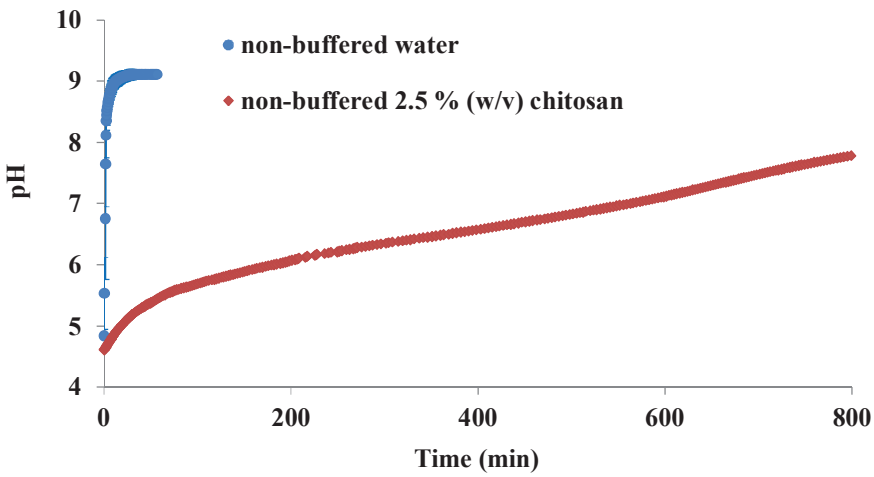

Figure II. 4: pH variations during enzymatic urea hydrolysis for [urease]= 0.5 u.mL^{-1} at 25°C and with a urea concentration fixed at 75 mM in (i) non-buffered water and (ii) non-buffered 2.5% w/v chitosan solution.

In non-buffered water, we have shown that the pH variations could be directly related to the NH_3 produced during the urea enzymatic hydrolysis reaction (Figure II. 2a). In chitosan solution, pH variations could not be simply related to the NH_3 production since some of the NH_3 produced was involved in the chitosan gelation reaction that occurred simultaneously (Figure II. 2 and 2b). In chitosan medium, pH variations observed during urea enzymatic hydrolysis were thus directly related to the NH_3 present in solution and no longer to the NH_3 produced. In this case, the pH could be used to monitor the global chitosan enzymatic gelation, i.e. the simultaneous combination of the urea enzymatic hydrolysis and the chitosan gelation reactions. These differences of phenomena in water and chitosan medium may be a first explanation of the slower variations of pH.

Two other phenomena may also contribute to the behaviour difference in water and in chitosan solution. First, the presence of chitosan increases the viscosity of the solution, both in the initial state (1580 cP at 25°C) and when the gelation begins to occur, which might slow down the mass transfer in the solution. Secondly, some sorption interactions may occur between urea and chitosan [57].

In the chitosan solution, pH variations were linear after the 50 first minutes of experiment, which indicates that the global functioning of the enzyme was maintained and that urea enzymatic hydrolysis occurred. However, the enzyme concentration was not high enough to produce the quantity of NH_3 required to induce the chitosan gelation reaction within a short time. It was thus

necessary to increase urease concentrations in order to produce more NH_3 and increase the kinetics of the chitosan enzymatic gelation.

Figure II. 5 presents the pH variation versus time during the enzymatic hydrolysis of urea in a 2.5% w/v chitosan solution in reference conditions (75 mM urease and a temperature of 25°C) for higher urease concentrations (3.5, 6.7 and 10.5 u.mL^{-1}).

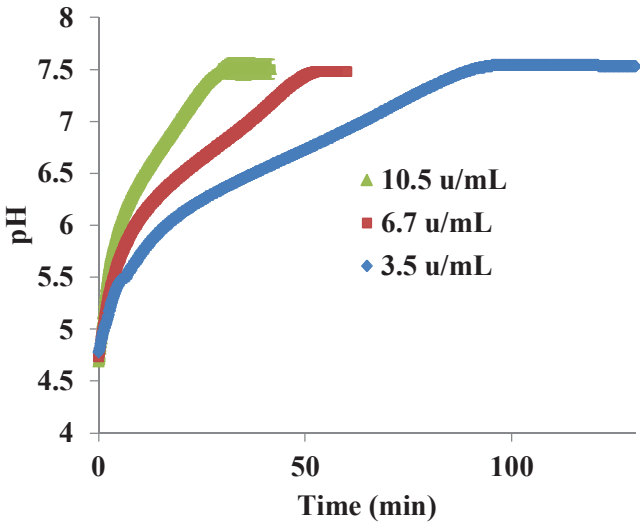

Figure II. 5: Influence of urease concentration on pH variations during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at 25°C and with a urea concentration fixed at 75 mM.

In comparison with a lower urease concentration of 0.5 u.mL^{-1} (Figure II. 4), the time needed to reach a pH of 6.5 in chitosan solutions was reduced by at least a factor of 10 over the urease concentration range tested. Figure II. 5 shows that the global enzymatic gelation rate needed to reach this pH increases quasi-linearly with urease concentration, from 8.0 10^{-4} s^{-1} at 3.5 u.mL^{-1} to 2.7 10^{-3} s^{-1} at 10.5 u.mL^{-1} (the rate was 8.1 10^{-5} s^{-1} for 0.5 u.mL^{-1}, Figure II. 4). This behaviour is consistent with what can be observed in buffered water conditions for urea/urease systems [87] and suggests that no significant activity loss of urease occurred during the gelation process. For the rest of the study, a urease concentration of 3.5 u.mL^{-1} was chosen as this gave a sufficiently high enzymatic gelation rate while minimizing urease consumption.

The gelation reference conditions having been determined (urea concentration of 75 mM, urease concentration of 3.5 u.mL^{-1}, temperature of 25°C), several methods were developed and validated to enable in situ monitoring of the reaction involved in chitosan enzymatic gelation kinetics in order to determine the time required to obtain a suitable chitosan gel that could be used for making membranes, which means that the gel must be sufficiently strong to withstand handling.

3.3 *In-situ monitoring of chitosan enzymatic gelation kinetics*

Because chitosan gelation is induced by deprotonation of amino groups when the pH increases, continuous pH measurements were used as a first method to follow the chitosan enzymatic gelation kinetics from pH 4.7 (where chitosan is soluble in acid media) to a basic pH (where the chitosan gel is formed). In parallel and for the same operating conditions, the viscoelastic properties of the chitosan solution were followed by rheological measurements during the enzymatic gelation reaction. Figure II. 6 shows the variations of the elastic modulus G' and the viscous modulus G'' for a 2.5% w/v chitosan solution with 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and in reference conditions. Rheological measurements began after 13 minutes of reaction, corresponding to the time for mixing the solution (10 minutes) and setting up the rheological experiment (3 minutes).

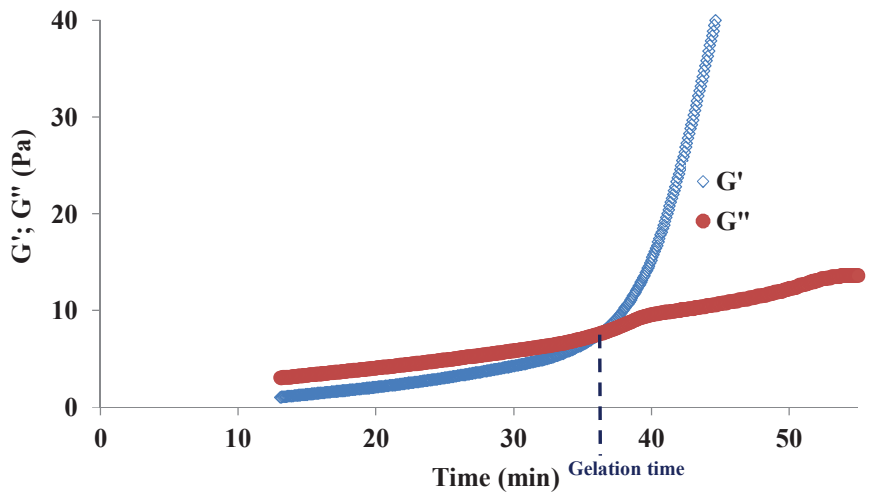

Figure II. 6: Evolution of elastic modulus (G') and viscous modulus (G'') during chitosan enzymatic gelation for non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1}

The elastic modulus G', or storage modulus, characterizes the elastic energy absorbed by the gel (gel solid component) while the viscous modulus G'', or loss modulus, characterizes the viscous energy dissipated due to internal shear stress (gel liquid component). At the beginning of the gelation reaction, the viscous modulus was higher than the elastic one: the chitosan was in solution. Both moduli increased slowly during the early period of gelation, then the elastic modulus G' increased dramatically, becoming much higher than the viscous modulus after a time corresponding to the formation of intermolecular non-covalent bonds (hydrogen bond and van der Waals interaction) because of the deprotonation of amino groups of chitosan. The time when elastic and viscous moduli are equal corresponds to the solution-gel transition (i.e. the gelation) [77] and is defined as the gelation time $\mathbf{t_g}$, which was around 33.9 ± 2.4 minutes after the start of the experiment presented in

Figure II. 6 (assays were reproduced twice).

To compare the information given by pH, rheological and colorimetric measurements, Figure II. 7a presents the variation of pH during chitosan gelation (each assay was reproduced three times and the average curve was plotted) and the corresponding gelation time obtained by rheological measurements in the same conditions is plotted on the curve. Flowing colorimetric tests performed for the same gelation conditions are also presented in Figure II. 7b.

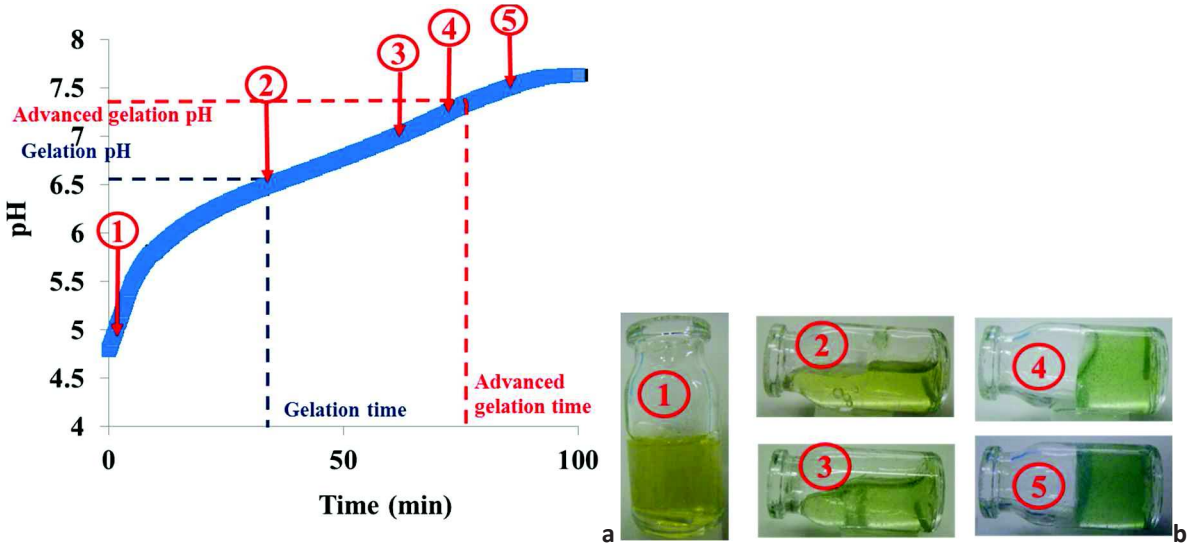

Figure II. 7: a) pH variation and b) flowing colorimetric tests during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at different times at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1} at: 1) t = 1 min (pH = 4.9) ; 2) t = 34 min (pH = 6.5); 3) t = 61 min (pH = 7.00); 4) t = 72 min (pH = 7.25) and 5) t = 85 min (pH = 7.50)

A comparison of Figure II. 6 and Figure II. 7 allows the gelation pH (pH_g) to be determined. It corresponds to the gelation time t_g. At 25°C and 75 mM, a pH of 6.43 (uncertainty less than 4.9%) was obtained, which corresponds to the chitosan pKa, and thus to the passage from the dominance of protonated amino groups of chitosan (at pH < pK_a) to the dominance of deprotonated amino groups of chitosan (at pH > pKa).

Similar rheological characterizations and pH monitoring were performed for different temperatures ranging from 5 to 37°C and for different urea concentrations. It was verified that the temperature did not have a significant effect on this gelation pH (pH_g = 6.76 ± 0.16 at 5°C and pH_g = 6.20 ± 0.02 at 37°C) nor on the urea concentration (values always between 6.43 – 6.75). A mean value of pH = 6.5 was taken.

Flowing tests (Figure II. 7b) showed that the gel rigidity after the gelation time (Point 3 on Figure II.

7b) was not high enough for the gel to be handled and used for further application in membrane preparation, since the gel could flow. When the reaction time increased, the rigidity of the gel also increased. After 76.6 minutes of reaction, the gel was completely rigid and no longer flowed (Point 5 on Figure II. 7b). This time was defined as the "advanced gelation time" t_{ag} and it allowed an "advanced gelation pH" (pH_{ag}) to be assessed as the corresponding pH (7.35). This pH, similar values (+/- 0.05) of which were found for the different operating conditions used in this study (results not shown here), characterizes the formation of a gel (beyond the sol-gel transition) that can be handled for further applications.

Figure II. 7b also shows the variation of colour of the chitosan solution/gel during the enzymatic gelation. The homogeneous colour change for all samples may be associated with a homogeneous macroscopic pH distribution in the chitosan/gel solution. It confirms that this enzymatic gelation process, unlike the wet process or VIPS process [4], prevents the appearance of a gelation front from one side of the solution. A more homogeneous gel may thus be obtained with better-controlled morphology.

In order to optimize the other operating conditions of the chitosan enzymatic process (mainly temperature and urea concentration), a multi-parametric study was required to evaluate the influence of each parameter on the enzymatic chitosan gelation kinetics and determine the advanced gelation time, which was previously fixed at a pH value of 7.35 to enable further use of the gel for membrane preparation.

3.4 Multi-parametric study of the enzymatic gelation of chitosan

3.4.1 Influence of temperature and urea concentration

We have previously demonstrated that temperature and urea concentration are influential parameters for urea enzymatic hydrolysis in a non-buffered pH aqueous medium. In order to study the effect of these parameters in a chitosan medium, an ANOVA methodology was applied. The student's F-test was considered at probability levels $p \leq 0.05$ to determine significant effects with the Excel 2010® software. Figure II. 8 presents the variations of pH during chitosan enzymatic gelation (2.5% w/v chitosan solution and 3.5 $u.mL^{-1}$ urease concentration). The results shown in Figure II. 8a were obtained for different urea concentrations (25, 75, 100 and 150 mM) and for the same assay temperature (25°C). The results shown in Figure II. 8b were achieved for a given urea concentration (75 mM) but for different assay temperatures (5, 10, 25 and 37°C).

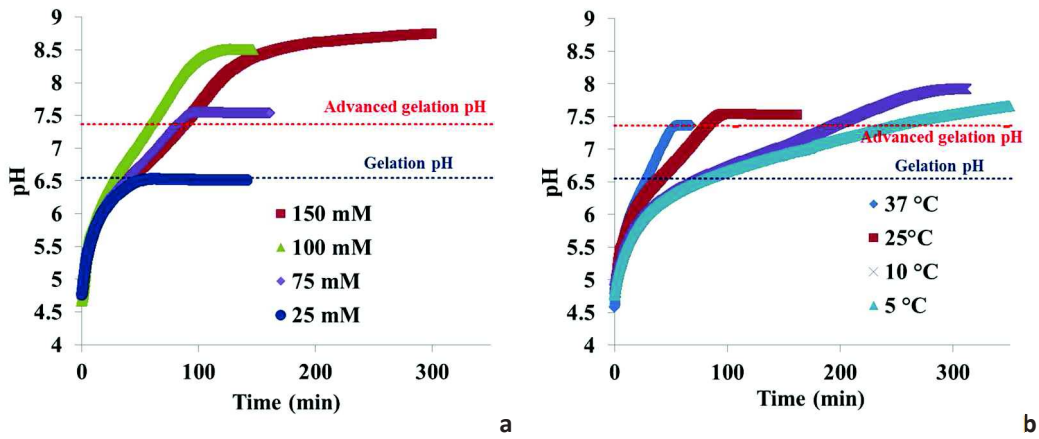

Figure II. 8: Influence on pH variations during chitosan enzymatic gelation, for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution and for [urease] = 3.5 u.mL^{-1}, of a) initial urea concentration at T = 25°C and b) assay temperature with a urea concentration fixed at 75 mM.

The general trends of chitosan enzymatic gelation curves (Figure II. 8), particularly for the lowest urea concentration, were similar to urea enzymatic hydrolysis curves obtained in water (Figure II. 3), except that the time scale was extended as explained previously (section 3.2). However, a decrease in the slope of the curves (showing a slower pH increase), not observed in water experiments, occurred around pH 6-7 (i.e. around the chitosan pKa). This difference between water and chitosan media can be explained, as previously, by the fact that the pH is now related to the equilibrium between deprotonation of chitosan and NH_3 produced during the urea enzymatic hydrolysis reaction rather than being related only to the enzymatic reaction as in aqueous media. A decrease of the hydrolysis rate might also occur at the same time. It could not be related to the pH range, since pH around 6-7 is the most favorable area for the enzymatic reaction, but it might be due to a possible modification of interactions between chitosan and urease occurring during the chitosan gelation reaction. Nevertheless, above pH values of 6-7, the slopes of the curves are constant and indicate that the presence of chitosan has practically no further influence on urease activity or on mass transfer occurring during the reactions.

The constant value obtained at the end of the reactions for each experiment indicates the end of the chitosan enzymatic gelation reaction due to the end of the urea enzymatic hydrolysis reaction, which could be due to the depletion of the urea substrate. For each experiment, the advanced gelation time corresponding to the advanced gelation pH of 7.35 was determined. Urea concentrations lower than 75 mM allowed the gelation pH to be reached but there was probably not enough urea to reach the advanced gelation pH (Figure II. 8a). Whatever the operating temperature, both the gelation and advanced gelation pH could be reached (Figure II. 8).

Although the initial urea concentration had to be equal to or higher than 75 mM to reach the advanced gelation pH (Figure II. 8a), the ANOVA showed that it did not have a significant impact on the advanced gelation time ($p = 0.54$) as already observed by Yan et al. (2014) [7]. A urea concentration of 75 mM was thus enough to obtain chitosan gel. In its turn, the assay temperature had a significant effect on the advanced gelation time ($p < 0.001$). Despite a temperature of 5°C (Figure II. 8b) being unfavourable for the urease activity and thus the enzymatic hydrolysis, advanced gelation pH was reached at this low temperature for times around 250 minutes, which indicates that the gelation occurred and was not stopped because of the slow enzymatic hydrolysis reaction of urea. This interesting result is very important for future membrane preparation because it shows that chitosan solution can be prepared and the future chitosan gel can be shaped easily (for example by casting on a plate to obtain a flat-sheet membrane) at this low temperature, which allows maintaining the fluidity of the liquid. The temperature could be increased in a second step in order to accelerate the chitosan enzymatic gelation reaction.

3.4.2 Influence of pH

Another parameter that can influence the enzymatic hydrolysis of urea and thus the global chitosan enzymatic gelation reaction is the pH. However, the influence of this parameter is very difficult to determine because it affects the urea hydrolysis reaction (through urease activity), which in turn, combined with the chitosan gelation reaction, modifies the pH and thus the urea hydrolysis reaction. The influence of pH must thus be studied at the beginning of the experiment before it has been significantly modified by the urea hydrolysis reaction. Figure II. 9a presents the variation of pH during chitosan enzymatic gelation in reference conditions for two initial pH values (pH 4.78 and pH 5.10).

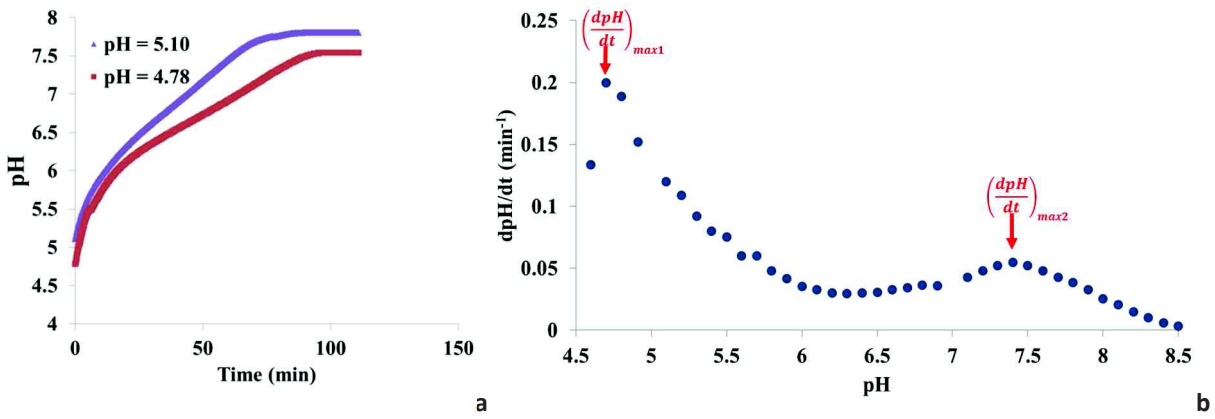

Figure II. 9: Influence of pH on the enzymatic chitosan gelation kinetics

a) Influence of initial pH on pH variations during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution with a urea concentration fixed at 75 mM, a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1} and a temperature of 25°C and b) Influence of pH on pH variations during enzymatic urea hydrolysis at 37°C with a urea concentration fixed at 150 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1} in non-buffered 2.5% w/v chitosan solution

Figure II. 9a shows that initial pH seems to have little influence on the chitosan enzymatic gelation process. Initial rates of the enzymatic gelation reaction are 0.112 min^{-1} for an initial pH = 4.78 and 0.164 min^{-1} for an initial pH = 5.10, which is consistent with the increase of urea hydrolysis rate observed in buffered water up to a maximum rate obtained around pH = 7-8 [82, 90].

To highlight the influence of pH, its rate variations were increased by using a higher temperature (37°C instead of 25°C) and urea concentration (150 mM rather than 75 mM). The derivative of pH with respect to time was plotted as a function of pH for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution with a urease concentration of 3.5 u.mL^{-1} (Figure II. 9b). Two local maximum rates were observed in these more drastic conditions: $(dpH/dt)_{max1}$ = 0.200 min^{-1} for a pH around 4.7-4.8 and a time of 0.75 minutes; $(dpH/dt)_{max2}$ = 0.050 min^{-1} for a pH around 7.4-7.5 and a time of 58 minutes. The absolute maximum $(dpH/dt)_{max1}$ occurred at the beginning of the chitosan enzymatic gelation reaction when the hydrolysis rate was assumed to be maximum (section 3.4.1.) because urea concentration was maximum. The effect of pH at this low value was smaller than the effect of urea concentration.

The local maximum $(dpH/dt)_{max2}$ occurred for pH around 7.5, which is close to the optimal pH for urease activity reported for the urea hydrolysis reaction in buffered water conditions (pH around 7-8) [82, 90]. It thus explains the increase of the chitosan enzymatic gelation reaction rate up to a maximum value around pH 7.5 where the influence of pH is visible.

3.4.3 *Influence of chitosan concentration*

As explained previously, chitosan concentration was chosen to be higher than 2.0% w/v, in order to enable the formation of a gel strong enough for membrane preparation, and to be lower than 4.0% w/v, in order to ensure that the solution viscosity was low enough to allow good mixing of the urea and urease. Table II. 2 presents the gelation pH and advanced gelation pH obtained in reference conditions for different chitosan concentrations (2.5% w/v, 2.75% w/v and 3.0% w/v).

Table II. 2: Gelation (time and pH) and advanced gelation (time and pH) parameters for different chitosan concentrations at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1}

Chitosan concentration (% w/v)	Gelation		Advanced gelation	
	Time (min)	pH	Time (min)	pH
2.5	33.9	6.43	78.9	7.35
2.75	33.2	6.46	78.67	7.35
3	29.5	6.45	69.8	7.35

For chitosan concentration between 2.5 and 3% w/v, Table II. 2 shows that an increasing chitosan concentration has hardly any influence on gelation time or on advanced gelation time. This means that increasing the chitosan concentration may not influence mass transfer in the solution. Moreover, the given range of chitosan concentrations induced a slight increase of the concentration of amino functions that could be deprotonated (1.15 to 1.38 M) [4], not high enough to result in a modification of the equilibrium between deprotonation of chitosan and NH_3 production during the urea enzymatic hydrolysis reaction. This would explain the small variations of the gelation and advanced gelation times. Finally, a concentration of 2.5% w/v chitosan was chosen since it had been shown to be suitable for subsequent membrane preparation.

3.5 *Gel final structure*

The multi-parametric study of chitosan enzymatic gelation has allowed the selection of operating parameters for the formation of a chitosan gel suitable for further membrane preparation: 2.5% w/v chitosan concentration, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration, 75 mM urea concentration and a temperature of 5°C. Cross-sections of gels obtained with these optimized operating conditions were observed (Figure II. 10: a) and compared with cross-sections of gels obtained by the classical wet

process (immersion of chitosan solution in NaOH 1M for 24 h then washing with water until NaOH was eliminated) (Figure II. 10: b).

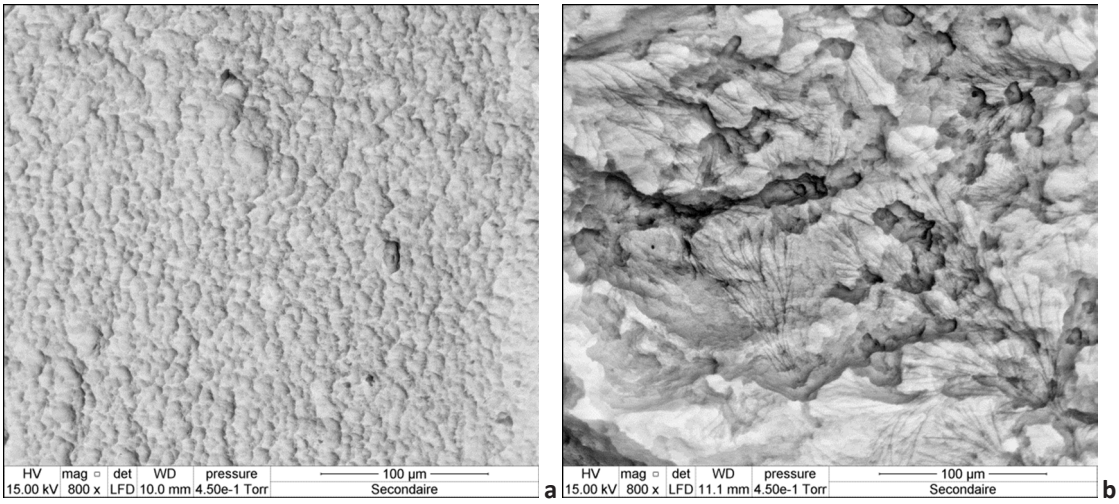

Figure II. 10: MEB observation (X 800) of a cross-section of a) chitosan gel prepared by enzymatic chitosan gelation with 2.5% w/v chitosan, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and 75 mM urea concentration at 5°C and b) chitosan gel prepared by wet process

The homogeneous distribution of pH observed during the colorimetric tests (Figure II. 7:b) led to the assumption of homogeneous gelation inside the chitosan gel, which may suggest homogeneous and well-controlled final structure and morphology. Figure II. 10: a shows a representative cross-section of chitosan gel elaborated by enzymatic chitosan gelation. It confirms this hypothesis and shows that more homogeneous gels with better controlled morphology could be obtained by the chitosan enzymatic gelation process than with the classical wet process, which presents a disordered structure and less-controlled morphology (Figure II. 10: b).

4. Conclusion

Enzymatic chitosan gelation allows chitosan gel with a homogeneous structure and well controlled morphology to be obtained. Enzymatic chitosan gelation is the result of two simultaneous reactions: the enzymatic reaction that produces NH_3 and the chitosan gelation thanks to this produced NH_3. The kinetics of the enzymatic chitosan gelation reaction has been studied by three different methods: rheological, flowing colorimetric and pH metric. This study has defined the advanced gelation pH (7.35) indicating the elaboration of a chitosan gel suitable for future membrane applications and the advanced gelation times needed, for different operating conditions, to reach this advanced gelation pH.

Comparison of experimental kinetics in water and chitosan media seems to indicate that the

differences observed in pH monitored between the two media are not related to a modification of the enzymatic reaction but rather to the equilibrium between deprotonation of chitosan functions by NH_3 (chitosan gelation) and NH_3 production by the urea hydrolysis (enzymatic reaction). Some modelling is, however, required and is currently underway to confirm this assumption.

Urea concentration must be high enough (equal to or greater than 75 mM) to avoid urea depletion and reach the advanced gelation pH. In these conditions, urea concentration has only a slight influence on the enzymatic chitosan gelation kinetics. In contrast, temperature and urease concentration are the main parameters that influence the advanced gelation time and thus the enzymatic chitosan gelation reaction. They are thus key parameters in the control of the chitosan gel preparation. For example for future flat-sheet membrane preparation, a temperature of 5°C allows the reagents to be mixed and facilitates the casting of the solution on a plate before gelation occurs. An increase of temperature then enables the enzymatic chitosan gelation reaction to be accelerated in order to obtain gels suitable for membrane application, after pore former addition and cross-linking steps.

Conclusion du Chapitre II

Ce Chapitre II s'est dans un premier temps focalisé sur l'étude préliminaire de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase. Réalisée en milieu aqueux non-tamponné, contrairement à ce qui se pratique habituellement dans la littérature, elle a toutefois montré un comportement de l'uréase similaire à celui connu en milieu tamponné pour des pH compris entre 5 et 9,55. Pour des concentrations en substrat (urée) comprises entre 25 et 150 mM, l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à 75 mM a pour effet d'accélérer la cinétique d'hydrolyse de l'urée sans pour autant observer d'inhibition par excès de substrat. L'augmentation de la température de 5 à 37°C a également pour effet d'accélérer la cinétique de la réaction d'hydrolyse enzymatique.

L'étude de la gélification enzymatique du chitosane a ensuite montré que la présence de chitosane ralentit fortement l'augmentation du pH induite par l'hydrolyse enzymatique de l'urée puisque le pH de 6,5 (correspondant au pKa du chitosane) est atteint en moins de 1 min en milieu aqueux non-tamponné tandis que plus de 500 min sont nécessaires en milieu chitosane 2,5% w/v. L'hypothèse principale pour expliquer cette différence de comportement est la présence supplémentaire de l'équilibre de protonation du chitosane lors de la gélification enzymatique. En effet en milieu aqueux, le pH peut être relié directement à la réaction enzymatique alors qu'en milieu chitosane, il doit être relié à la fois à la réaction enzymatique et à la réaction de gélification. Au travers d'une modélisation de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'urée en milieu chitosane en réacteur volumique fermé, la première partie du Chapitre III visera à confirmer cette hypothèse.

De plus, le suivi en parallèle de la cinétique de gélification au moyen de différentes techniques (suivi pH, suivi rhéologique, test de renversement) a permis de mettre en évidence que le pH de gélification est effectivement atteint lorsque celui-ci est égal au pKa (6,5) du chitosane. Cependant, les tests de renversement ont mis en évidence que ces gels ne sont pas suffisamment résistants pour être utilisés par la suite pour élaborer des membranes de filtration. Il convient d'atteindre un pH de 7,35, qui a été défini comme le « pH de gélification avancé (pH_{ag}) », correspondant au temps de gélification avancé associé (t_{ag}).

Une analyse de variance sur les temps de gélification avancée, en faisant varier la température et la concentration en urée, a permis de montrer que, outre la concentration en uréase, seule la température est un paramètre significativement influent sur la cinétique de gélification alors que la

concentration en urée n'a qu'un rôle mineur sur la cinétique, du moment que la concentration est supérieure ou égale à 75 mM de manière à ne pas être en défaut pour produire suffisamment d'ammoniaque en solution et atteindre le pH_{ag} pour une concentration massique en chitosane de 2,5 % w/v.

Cette étude a ainsi permis de définir des conditions opératoires de référence pour élaborer par voie enzymatique des gels plans de chitosane qui pourront être utilisés pour l'élaboration de membranes à base de chitosane:

- une solution de chitosane de concentration 2,5 % w/v,
- une concentration en uréase de 3,5 $u.mL^{-1}$,
- une concentration en urée de 75 mM,
- une température de 5°C.

Bien que travailler à faible température soit défavorable pour la cinétique de réaction, le ralentissement de la cinétique de gélification permet d'obtenir un mélange de viscosité appropriée à un étalement. Dans ces conditions, des observations au microscope électronique à balayage ont mis en évidence une structuration plus homogène des gels obtenus par voie enzymatique par rapport aux gels élaborés par immersion, i.e. le procédé classiquement utilisé pour l'obtention des gels de chitosane.

L'élaboration par voie enzymatique de membranes à base de chitosane destinée à l'élimination d'ions métalliques présents dans des effluents industriels acides nécessite le passage des gels élaborés en réacteur volumique semi-fermé (Chapitre II) à des membranes planes poreuses résistantes en milieu acide. La seconde partie du Chapitre III, au travers d'une modélisation en réacteur volumique semi-fermé mais également en mise en forme film mince plan, permettra la validation ou l'adaptation des conditions opératoires de gélification enzymatique (définies dans le Chapitre II) pour une mise en forme de gels plans (Chapitre IV).

Le Chapitre IV concernera également l'étape de création d'une porosité interne au gel plan (« gel plan poreux »), destinée à permettre l'usage des gels au sein d'une opération de filtration d'eau, ainsi que l'étape de modification chimiques des gels plans poreux destinée à rendre le chitosane insoluble en milieu acide (obtention de « membranes »)

.

CHAPITRE III

Introduction du Chapitre III

Le Chapitre II a montré la validité de la méthode de gélification enzymatique pour l'obtention de gels de chitosane ayant une structuration homogène, première étape vers l'obtention de membranes de filtration. La cinétique de la gélification a été suivie par mesure du pH et les temps de gélification et gélification avancée ont respectivement été définis lorsque le pH franchit respectivement les valeurs de 6.5 (pH de gélification) et de 7.35 (pH de gélification avancé). Ces temps de gélification peuvent être contrôlés par la température et la concentration en uréase, les deux paramètres opératoires les plus influents. Cependant, plusieurs questions ont été soulevées dans le chapitre précédent.

Tout d'abord, les résultats de suivi de pH obtenus en milieu eau ou en milieu chitosane sont très différents et le rôle de la réaction d'équilibre du chitosane a été mis en avant mais n'a pas été confirmé. Deuxièmement, le suivi de pH est une mesure globale qui ne permet pas de différencier la vitesse de réaction enzymatique et celle de gélification. Enfin, les conditions expérimentales ne permettent pas un suivi des concentrations présentes en solution (urée, ammoniaque, carbonate…) au cours du temps.

Afin d'avoir une meilleur compréhension des phénomènes et cinétiques réactionnelles mise en jeux dans la gélification enzymatique du chitosane, et par la suite d'avoir une meilleure optimisation des conditions opératoires, un travail de modélisation est nécessaire et fera l'objet de ce Chapitre III. Ce Chapitre III a ainsi pour objectif de mettre en place un modèle permettant de décrire et comprendre la cinétique de gélification enzymatique du chitosane. Il s'agira de coupler les réactions d'hydrolyse enzymatique de l'urée par l'uréase, de gélification du chitosane et des équilibres chimiques. Dans un premier temps, le modèle sera développé pour un système volumique fermé 0D en négligeant tout transfert massique ou thermique interne ou externe. Dans un second temps, les phénomènes de transfert seront ajoutés pour un système 1D : tout d'abord pour un réacteur volumique semi-fermé (de ratio H/D = 0,73 avec une hauteur de 1,5 cm) utilisé au Chapitre II puis pour une mise en forme de gel plan («système plan») nécessaire pour la fabrication des membranes et utilisée au Chapitre IV.

Dans la première partie de ce chapitre, le modèle permettant de décrire la cinétique de gélification enzymatique du chitosane sera établi à l'aide des résultats expérimentaux du Chapitre II qui peuvent être considérés valables pour un système fermé. Le modèle se base sur un modèle cinétique de l'hydrolyse enzymatique de l'urée établi pour un milieu aqueux sans chitosane, tamponné ou non. Il sera adapté pour le milieu chitosane en y incluant la réaction d'équilibre acide-base du chitosane (qui correspond à la réaction de gélification du chitosane) et les équilibres chimiques dus à la production d'ammoniaque et de carbonate lors de l'hydrolyse de l'urée. Les paramètres enzymatiques et

cinétiques du modèle seront déterminés pour le milieu chitosane grâce aux résultats expérimentaux du Chapitre II. La validation du modèle se fera par comparaison des suivis du pH issus des expériences et de simulations. Le modèle sera ensuite utilisé pour étudier l'influence du chitosane sur la réaction d'hydrolyse enzymatique et dissocier les cinétiques d'hydrolyse et de gélification pour obtenir une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeux. Cette première partie est présentée au travers d'un extrait d'article intitulé « **Modelling of enzymatic chitosan gelation reaction kinetics: tools for monitoring chitosan gelation and urea hydrolysis kinetics** » destiné à être soumis au journal international Chemical Engineering Journal.

Dans la seconde partie de ce chapitre, un modèle 1D sera mis en place en ajoutant les phénomènes de transferts de masse et de chaleur au modèle 0D. Le modèle 1D sera validé à l'aide des résultats obtenus sur le modèle 0D sur le réacteur semi-fermé. La modélisation sera ensuite appliquée à la mise en forme de gel plan, c'est-à-dire une fois que la solution de chitosane est étalée à une épaisseur variant de 0,5 à 1,5 mm. Avec ce changement de géométrie, l'influence des phénomènes de transferts ne peut plus être négligée. Les effets de ces transferts sur la cinétique de gélification du chitosane seront étudiés et, en repartant des précédentes conditions opératoires optimales définies au Chapitre II, de nouvelles conditions opératoires d'élaboration, spécifiquement applicables à la mise en forme gel plan, seront établies pour être utilisées dans le Chapitre IV. Cette seconde partie est présentée au travers d'un extrait d'article intitulé « **Modelling and simulation of chitosan enzymatic gelation for membrane formation »** destiné à être soumis au journal international AiCHE Journal.

Modelling of enzymatic chitosan gelation reaction kinetics: tools for monitoring chitosan gelation and urea hydrolysis kinetics

1. Introduction

Chitosan is a bio-based N-desacetylated polysaccharide composed of a succession of D-glucosamine (GlcN) and N-Acetyl-glucosamine monomers (GlcNAc) as shown on Figure III. 1. It is characterized by its degree of deacetylation (DDA) upper than 60% and its molecular weight (MM_{chit}) between 50 000 and 2000 000 g.mol^{-1} [9].

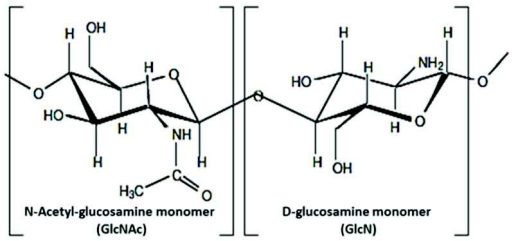

Figure III. 1: Chitosan N-Acetyl-glucosamine (GlcNAc) and D-glucosamine (GlcN) monomers

Amino-groups of the D-glucosamine chitosan monomers are mainly protoned in acid aqueous solution, resulting in the solubilisation of chitosan while they are mainly non protoned in basic conditions, resulting in the gelation of chitosan when pH increases according to the Reaction III. 1 [130, 135]. For pH values higher than the pKa of the chitosan amino-groups (between 6.2 and 7.1), chitosan thus becomes a gel [136, 148] . In order to prepare chitosan gel, chitosan is generally initially dissolved at 2 to 4% w/v in dilute acid aqueous solution like acetic acid and then chitosan gelation occurred due to an external supply of sodium hydroxide or ammonia [4, 78, 95, 104, 110]. Recently, an original enzymatic chitosan gelation process has been proposed by Chenite et al (2006) [6]. In this method which allows having a homogeneous gelation, the OH^- required for the chitosan gelation (Reaction III. 1) is in-situ produced by the hydrolysis of urea (Reaction III. 2) by urease enzyme, from *Canavalia ensiformis* (Jack bean), through the equilibrium of ammonia/ammonium (Reaction III. 3, Table III. 1) and carbonate/hydrogen carbonate/carbon dioxide (Reactions 4 and 5, Table III. 1). In order to prevent pH-buffered effect, chitosan was initially dissolved in hydrochloride acid aqueous solution. Enzymatic chitosan gelation can thus be divided in two complementary reactions: the chitosan gelation equilibrium (Reaction III. 1) and the urea enzymatic hydrolysis (Reaction III. 2).

$$\boldsymbol{Chit - NH_3^+ + OH^- = Chit - NH_2 + H_2O} \qquad \textbf{\textit{Reaction III. 1}}$$

$$\boldsymbol{(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{urease} 2NH_3 + CO_2} \qquad \textbf{\textit{Reaction III. 2}}$$

This chitosan enzymatic gelation has been further investigated and used to produce chitosan hydrogel for delivery of periodontal ligament cells [7] and chitosan gel aimed for membrane preparation [149]. The main influent parameters on the gelation time are the urease concentration [7, 150] and the temperature [150] while urea concentration has nearly no influence if the concentration is high enough to prevent urea depletion before the gelation. Gelation kinetics has also been monitored by pH measurements and kinetics has been compared in aqueous and in chitosan media showing that chitosan presence seems to have little influence of the enzyme activity during urea hydrolysis reaction [150] and that the observed difference may only be related to the presence of the chitosan amino-groups equilibrium (Reaction III. 1). However, this assumption has not been confirmed and the understanding of the global chitosan enzymatic reaction is only partial since pH measurements do not allow differentiating the kinetics of the two simultaneous reactions of chitosan gelation and urea hydrolysis. Study and modelling of the urea hydrolysis reaction kinetics in chitosan media is the key to deeply understand the global chitosan enzymatic gelation and to determine the gelation time of chitosan. Influences of parameters (temperature, urease concentration, urea concentration, pH, product inhibition, substrate inhibition) on enzymatic hydrolysis kinetics are well-known in aqueous media [82] and reaction kinetics has been successfully modelled for buffer-free aqueous media [87] and for pH-buffered aqueous media [90] but, to our knowledge, no such model exists for chitosan media.

The aim of this paper is to develop, based on urea hydrolysis kinetics modelling in aqueous media, both a modelling of the urea hydrolysis in chitosan media and of the global enzymatic chitosan gelation. Results of this model are being compared to experimental results of enzymatic chitosan gelation to validate it. Results of this model in aqueous and chitosan media will be compared to determine influence of chitosan on the urea hydrolysis reaction. Finally, gelation and urea hydrolysis kinetics will be studied.

2. Material and Methods

2.1 Materials

Chitosan (obtained from France Chitine, France) had a degree of deacetylation (DDA) of 80 % (determined by magnetic nuclear resonance) and a mean molecular weight (MM_{Chit}) of 180 000 g.mol^{-1} (supplier's data). Urea, urease (type III) and hydrochloric acid were purchased from Sigma

(France). Urease (EC 3.5.1.5) from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) was supplied as a glycerol solution and the specific activity of this enzymatic solution was 778 $u.mL^{-1}$ (supplier's data) where one catalytic unit (u) is defined as the enzyme quantity that will liberate 1.0 µmole of NH_3 from urea per minute at pH 7.0 and 25°C.

2.2 *Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered chitosan solution and in non-buffered water*

Enzymatic urea hydrolysis in non-buffered chitosan solution and in non-buffered water was carried out in a 10 mL glass batch reactor according to the protocol defined in Wlodarczyk et al. (submitted) [150]. Chitosan solutions (2.5% w/v) were prepared by dissolving chitosan in HCl 0.1 M in order to obtain an initial pH of 4.7 ± 0.1. Fresh osmotic water with an initial non-buffered pH of 4.7 ± 0.1 was prepared by adding 0.1 M HCl.

Reactions were performed at different temperatures between 1 and 37°C. Urea concentration in the reactor was varied from 10 to 200 mM. Urease concentration in the reactor ranged from 0.50 ± 0.01 to 10.50 ± 0.01 $u.mL^{-1}$.

Reactions were monitored by pH measurements using a Hanna Instruments pH-meter (HI 2214 pH/ORB) and a specific probe for viscous media (HI 2031, Hanna Instruments) in both chitosan solution and water. For each assay, pH was continuously recorded, with acquisition every 5 seconds, until the pH reached a plateau. The pH-meter was calibrated before each new series of assays, at the assay temperature, with pH 4.01, 7.00 and 10.01 buffered solutions. Calibration controls were performed before each test. Experiments in chitosan solution were reproduced to determine the uncertainty on pH (± 0.26).

3. Modelling of the chitosan enzymatic gelation kinetics

The mathematical modelling of the chitosan gelation reaction kinetics can be divided in three parts: the chitosan gelation equilibrium reaction (Section 3.1), the urea enzymatic hydrolysis by urea reaction (Section 3.2) and the chemical equilibrium reactions of the other different species in solution (Section 3.3). The modelling algorithm will be finally described in Section 3.4.

Species are considered to be in dilute aqueous solutions and species activities are assumed to be equal to species concentrations (all activity coefficients are equal to 1). Activity of the solvent water is taken equal to 1. The system is considered to be closed: no external or internal transfer phenomena are considered.

3.1 Chitosan gelation reaction

Chitosan gelation reaction is the chitosan chemical equilibrium reaction (Reaction III. 1', Table III. 1) between the protoned ($Chit - NH_3^+$) and non-protoned ($Chit - NH_2$) forms of the amino-groups of the chitosan D-glucosamine monomer. This equilibrium reaction is considered to be instantaneous. Mass balance on the amino-group is given, at each time t, in Eq III. 1 with the total concentration $[Chit - N]_0$ of amino-group in solution (mol.L^{-1}), the concentration $[Chit - NH_3^+]$ of protoned amino-group (mol.L^{-1}) and the concentration $[Chit - NH_2]$ of non-protoned amino-group (mol.L^{-1}).

$$[\boldsymbol{Chit - N}]_0 = [\boldsymbol{Chit - NH_3^+}] + [\boldsymbol{Chit - NH_2}] \qquad \textit{Eq III. 1}$$

The pKa of the amino group of the chitosan is comprised between 6.2 and 7.2 [136, 148] and a mean value of 6.7 was retained. The expression of the related equilibrium constant K_1 is thus given in Table III. 1 (Eq III. 2).

Table III. 1: Equilibrium reactions and constants

Reactions	Constants	Values	Ref.
Chit-NH$_3^+$ + H$_2$O = Chit-NH$_2$ + H$_3$O$^+$ **Reaction III. 1'**	$K_1 = \frac{(Chit-NH_2)(H_3O^+)}{(Chit-NH_3^+)(H_2O)} = \frac{[Chit-NH_2][H_3O^+]}{[Chit-NH_3^+]\times 1}$ ***Eq III. 2***	**10$^{-6.7}$**	**[136, 148]**
NH$_4^+$ + H$_2$O = NH$_3$ + H$_3$O$^+$ **Reaction III. 3**	$K_3 = \frac{(NH_3)(H_3O^+)}{(NH_4^+)(H_2O)} = \frac{[NH_3][H_3O^+]}{[NH_4^+]\times 1}$ ***Eq III. 3***	**10$^{-9.3}$ (at 25°C)**	**[151]**
HCO$_3^-$ + H$_2$ O = CO$_3^{2-}$ + H$_3$O$^+$ **Reaction III. 4**	$K_4 = \frac{(CO_3^{2-})(H_3O^+)}{(HCO_3^-)(H_2O)} = \frac{[CO_3^{2-}][H_3O^+]}{[HCO_3^-]\times 1}$ ***Eq III. 4***	**7.83 10^{-8} e$^{-2213/T}$**	**[152]**
CO$_2$ + 2H$_2$O = HCO$_3^-$ + H$_3$O$^+$ **Reaction III. 5**	$K_5 = \frac{(HCO_3^-)(H_3O^+)}{(CO_2)(H_2O)^2} = \frac{[H_3O^+][HCO_3^-]}{[CO_2]\times 1^2}$ ***Eq III. 5***	**5.02 10^{-5} e$^{-1462.7/T}$**	**[152]**

Chitosan is characterized by its degree of deacetylation DDA (%) and its molecular weight MM_{Chit} (g.mol^{-1}). The chitosan monomer average molecular weight MM_{Glc} can be calculated by according to the Eq III. 6 with the chitosan D-glucosamine monomer molecular weight MM_{GlcN} (179.17 g.mol^{-1})

and the N-Acetyl-glucosamine monomer molecular weight MM_{GlcNAc} (221.21 g.mol^{-1}).

$$\boldsymbol{MM_{Glc} = (\frac{DDA}{100}) \times MM_{GlcN} + (\frac{100-DDA}{100}) \times MM_{GlcNAc}} \qquad \textbf{Eq III. 6}$$

The number N_{Glcn} (mol.mol^{-1}) of moles of D-glucosamine by mole of chitosan can be deduced from Eq III. 7:

$$\boldsymbol{N_{GlcN} = (\frac{DDA}{100}) \times \frac{MM_{Chit}}{MM_{Glc}}} \qquad \textbf{Eq III. 7}$$

If the chitosan is initially in solution at a mass concentration C_C (% w/v), the concentration of D-Glucosamine amino group in solution can thus be calculated with Eq III. 8:

$$\boldsymbol{[Chit - N]_0 = 10 \times \frac{C_C}{MM_{Chit}} \times N_{GlcN}} \qquad \textbf{Eq III. 8}$$

3.2 Urea enzymatic hydrolysis reaction

Urea enzymatic hydrolysis by urease reaction is given in *Reaction III. 2* and produces both ammonia and carbon dioxide. Considering an uncompetitive substrate (urea) inhibition of the urease at high urea concentration and a non-competitive mechanism for product (ammonium) inhibition, urea hydrolysis by urease from Canavalia ensiformis (Jack bean) has been modelled for aqueous buffer free [87] and buffered media [90] using a similar expression of the hydrolysis reaction rate r_{hydro} (mol.L^{-1}.min^{-1}), defined in Eq III. 9, but different values of kinetics parameters, to take into consideration influences of temperature, pH, urea concentration, urease concentration and ammonium concentration on the urea hydrolysis reaction rate.

$$\boldsymbol{r_{hydro} = -\frac{d([(NH_2)_2CO])}{dt}} \qquad \textbf{Eq III. 9}$$

This hydrolysis reaction rate can thus be expressed following Eq III. 10 [90] with the Michaelis constant K_M (mol.L^{-1}), the product (ammonium, resulting from the ammonia/ammonium equilibrium) enzyme inhibition constant K_P (mol.L^{-1}), the substrate (urease) enzyme inhibition constant K_S (mol.L^{-1}), the enzymatic maximum reaction rate v_{max} (mol.L^{-1}.min^{-1}) and the urea concentration $[(NH_2)_2CO]$ (mol.L^{-1}).

$$\boldsymbol{r_{hydro} = \frac{v_{max}[(NH_2)_2CO]}{\left(K_M + [(NH_2)_2CO] + \frac{[(NH_2)_2CO]^2}{K_S}\right)\left(1 + \frac{[NH_4^+]}{K_P}\right)} = \frac{k_{T,pH}[E]_0[(NH_2)_2CO]}{\left(K_M + [(NH_2)_2CO] + \frac{[(NH_2)_2CO]^2}{K_S}\right)\left(1 + \frac{[NH_4^+]}{K_P}\right)}} \qquad \textbf{Eq III. 10}$$

The enzymatic maximum reaction rate v_{max} can be expressed following Eq III. 11 with the temperature and pH-dependent hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ (mol.u^{-1}. min^{-1}) and the

enzyme urease concentration $[E]_0$ (u.L^{-1}).

$$v_{max} = k_{T,pH}[E]_0 \qquad \textit{Eq III. 11}$$

It must be noted that previous modellings in water media used urease concentration $[E]_0$ and hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ respectively in g.L^{-1} and mol.g^{-1}. min^{-1}. In order to take into consideration possible loss of enzyme activity in the future, it was preferred in the present study to express these values in u.L^{-1}and mol.u^{-1}.min^{-1} where one catalytic unit (u) is defined as the enzyme quantity that will liberate 1.0 µmole of NH_3 from urea per minute at pH 7.0 and 25°C. The enzyme activity-mass conversion factor (k' = 1.15 10^4 u.g^{-1}) has been determined from supplier data.

Hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ depends both on temperature and pH and can be expressed according to Eq III. 11 [90] with the hydrolysis temperature-dependent reaction rate constant k_T (mol.u^{-1}.min^{-1}) and the pH-dependent correction factor $\left\{1 + (\frac{10^{-pH}}{K_{ES,1}})^{\alpha_{ES,1}} + (\frac{K_{ES,2}}{10^{-pH}})^{\alpha_{ES,2}}\right\}$ where $K_{ES,1}$ and $K_{ES,2}$ are the molecular dissociation constants for the enzyme-substrate complex, and $\alpha_{ES,1}$ and $\alpha_{ES,2}$ are empirical constants. These latter constants were supposed to be independent of temperature [90] for the considered temperature range.

$$k_{T,pH} = \frac{k_T}{\left\{1+(\frac{10^{-pH}}{K_{ES,1}})^{\alpha_{ES,1}}+(\frac{K_{ES,2}}{10^{-pH}})^{\alpha_{ES,2}}\right\}} = \frac{k_0\, exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right)}{\left\{1+(\frac{10^{-pH}}{K_{ES,1}})^{\alpha_{ES,1}}+(\frac{K_{ES,2}}{10^{-pH}})^{\alpha_{ES,2}}\right\}} \qquad \textit{Eq III. 12}$$

Temperature-dependent reaction rate constant k_T was supposed to follow Arrhenius law [87] with the Arrhenius Law pre-exponential factor k_0 (mol.L^{-1}.u^{-1}. min^{-1}), the activation energy Ea (J.mol^{-1}) and the universal gas constant R (J.mol^{-1}.K^{-1}).

Finally, the production rate of ammonium and carbonate can respectively be expressed according to Eq III. 13 and III. 14 with the ammonia concentration $[NH_3]$ (mol.L^{-1}) and the carbon dioxide concentration $[CO_2]$ (mol.L^{-1})

$$\frac{d([NH_3])}{dt} = 2r_{hydro} \qquad \textit{Eq III. 13}$$

$$\frac{d([CO_2]])}{dt} = r_{hydro} \qquad \textit{Eq III. 14}$$

3.3 Chemical equilibrium reactions in aqueous solution

Enzymatic hydrolysis of urea by hydrolysis produces both ammonia and carbon dioxide (Reaction III. 2). In addition of the chitosan reaction equilibrium, two other reaction equilibria are thus involved: the ammonium/ammonia equilibrium reaction (Reaction III. *3* in Table III. 1) and the

carbon dioxide/hydrogen carbonate/carbonate equilibrium reactions (Reactions 4 and 5 in Table 1).

Concerning the ammonium/ammonia equilibrium, Eq III. 13. must thus be rewritten and can be combined with Eq III. 9 to give Eq III. 15 where $[NH_3]$ is the concentration of ammonia in solution (mol.L^{-1}).

$$\frac{d([NH_4^+]+[NH_3])}{dt} = 2r_{hydro} = -2\frac{d([(NH_2)_2CO])}{dt} \qquad \textit{Eq III. 15}$$

As the initial concentrations of ammonium and ammonia are considered equal to zero and as no external transfer are considered, mass balance for ammonium/ammonia equilibrium can be written, at each time t, in Eq III. 16 with $[(NH_2)_2CO]_0$ the urea initial concentration. The expression of the related equilibrium constant K_3 is given in Table II. 1 (Eq III. 3). It is considered to be temperature independent.

$$[NH_4^+] + [NH_3] = 2([(NH_2)_2CO]_0 - [(NH_2)_2CO]) \qquad \textit{Eq III. 16}$$

Concerning the carbon dioxide/hydrogen carbonate/carbonate equilibrium, Eq III. 14 must be rewritten and can be combined with Eq III. 9 to give Eq III. 17 where $[HCO_3^-]$ is the concentration of hydrogen carbonate in solution (mol.L^{-1}) and $[CO_3^{2-}]$ the concentration of carbonate in solution (mol.L^{-1}).

$$\frac{d([CO_3^{2-}]+[HCO_3^-]+[CO_2])}{dt} = r_{hydro} = -\frac{d([(NH_2)_2CO])}{dt} \qquad \textit{Eq III. 17}$$

As the initial concentrations of carbon dioxide, carbonate and hydrogen carbonate are considered equal to zero and as no external transfer are considered, mass balance for carbon dioxide/hydrogen carbonate/carbonate equilibrium can be written, at each time t, in Eq III. 18 with $[(NH_2)_2CO]_0$ the urea initial concentration.The respective expression of the hydrogen carbonate/carbonate equilibrium constant K_4 and of the carbon dioxide/hydrogen carbonate equilibrium constant K_5 are given in Table III. 1 (Eq III.4 and III.5). They are considered to be temperature-dependent.

$$[CO_3^{2-}] + [HCO_3^-] + [CO_2] = [(NH_2)_2CO]_0 - [(NH_2)_2CO] \qquad \textit{Eq III. 18}$$

Finally, the electronic balance is given in Eq III. 19 with the concentration $[Cl^-]$ of chloride in solution (mol.L^{-1}), the concentration $[OH^-]$ of hydroxide in solution (mol.L^{-1}) and the concentration $[H_3O^+]$ of hydronium in solution (mol.L^{-1}).

$$[NH_4^+] + [H_3O^+] + [Chit - NH_3^+] = 2[CO_3^{2-}] + [OH^-] + [HCO_3^-] + [Cl^-] \qquad \textit{Eq III. 19}$$

Hydronium-hydroxide concentration relationship is given in Eq III. 20 and pH-hydronium

concentration is given in Eq III. 21.

$$(H_3O^+) \times (OH^-) = [H_3O^+] \times [OH^-] = 10^{-14} \qquad \textit{Eq III. 20}$$

$$[H_3O^+] = 10^{-pH} \qquad \textit{Eq III. 21}$$

3.4 Modelling numerical resolution

Figure III. 2 presents a summary of the modelling description and the modelling numerical resolution strategy which was performed using MATLAB® software.

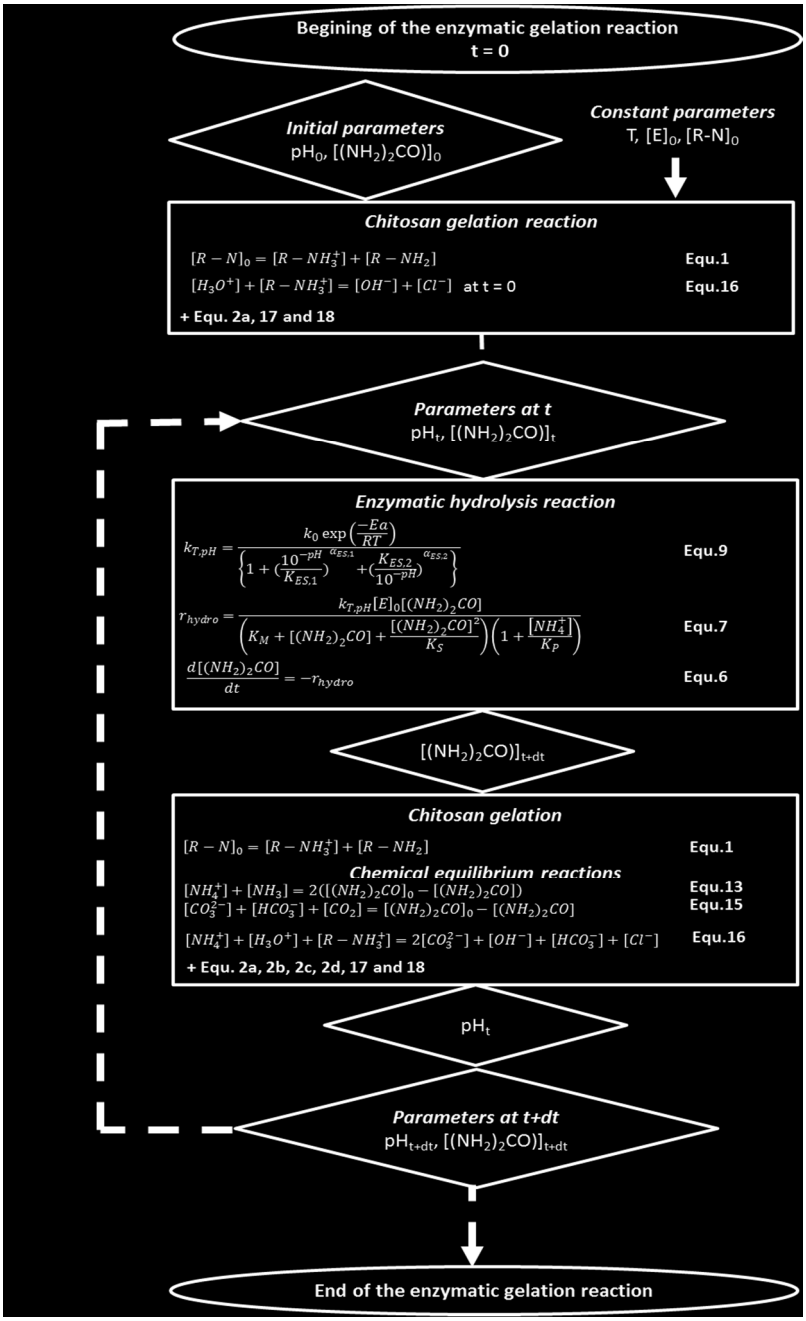

Figure III. 2: Modelling numerical resolution

The initial parameters, i.e. the parameters at the beginning of the chitosan enzymatic gelation (t = 0 min) are the temperature T, the pH, the urease concentration $[E]_0$, the urea initial concentration $[(NH_2)_2CO]_0$ and the chitosan mass concentration Cc. From the chitosan mass concentration Cc, the total concentration $[Chit-N]_0$ amino-groups in solution can be easily calculated using Eq III.6, III.7 and III.8. Temperature, urease concentration and amino-groups total concentration remain constant during all the chitosan enzymatic gelation. At t = 0 min, $[NH_4^+] = [NH_3] = [CO_3^{2-}] = [HCO_3^-] = [CO_2] = 0$ mol.L^{-1}. Using Eq III. 1 and III.19, chloride concentration $[Cl^-]$ and initial non-protoned and protoned amino-group concentration can be calculated.

Modelling resolution was performed in two stages for each time from the beginning of the enzymatic chitosan gelation (t = 0 min) to the end of the reaction (when a plateau of pH is reached). Time step of dt of 0.5 min has been found to be a good compromise between time consumption and results precision when chitosan media is used while a time step of 0.001 min is required when water media without chitosan is used.

The first stage is the enzymatic hydrolysis reaction. Hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ and reaction rate r_{hydro} are calculated at pH and urea concentration of the time t, and at the constant urease concentration, total amino-group concentration and temperature using Eq III. 10 and III. 12. Urea concentration $[(NH_2)_2CO]$ at the time t+dt can thus be calculated using Eq III. 9 by finite difference method.

The second stage is the calculation of chitosan gelation and chemical equilibrium reactions. The set of Eq III. 2, III. 3, III. 4, III. 5, III. 16, III. 18, III. 19, III. 20 and III. 21 is thus solved using build-in fsolve MATLAB®software function (least square method) to calculate hydronium concentration $[H_3O^+]$ and thus pH and at the time t+dt. Concentrations of the other species are then calculated at the time t+dt using the same set of equations.

This routine of two stages is performed until the end of the reaction is reached, i.e. until the pH reached a plateau.

4. Results

4.1 Determination of the kinetics parameters for the enzymatic gelation reaction

Enzymatic hydrolysis reaction rate r_{hydro} depends on several parameters: the Michaelis constant K_M, the ammonium enzyme inhibition constant K_P, the urea enzyme inhibition constant K_S and the hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$, which depends itself on the molecular dissociation

constant for the enzyme-substrate complex $K_{ES,1}$ and $K_{ES,2}$ (and their respective associated empirical factor $\alpha_{ES,1}$ and $\alpha_{ES,2}$) the Arrhenius law pre-exponential factor k_0 and the activation energy Ea (J.mol^{-1}). The values of these parameters has been determined in water media (without chitosan) using experimental data and are presented in Table III. 2 [87, 90].

Table III. 2: Enzymatic reaction kinetics validation range and parameters

		Qin et al. (1994) [87]	Fidaleo et al. (2003) [90]	This study
Validation range	Urease concentration (u.L^{-1})	4.6 – 115*note 1	230 – 2300*note 1	500 – 10 500
	Urea concentration (mM) pH	0 – 3000 5 – 9	0 – 70 4 – 9	0 – 200 4 – 9
	Ammonium (mM)	0 – 40	0 – 80	0 – 400
	Temperature (°C)	20 - 40	25 – 37	1– 37
	Chitosan concentration (% w/v)	0	0	2 – 4
Modelling parameters	K_M (mol.L^{-1})	2.56 10^{-3}	(3.21 ±0.36) 10^{-3}	3.2110^{-3}
	K_P (mol.L^{-1})	6.93 10^{-2}	(1.22 ±0.11) 10^{-2}	+∞
	K_S (mol.L^{-1})	6.18	+∞	+∞
	Ea (J.mol^{-1})	29 100	35 300	22 221
	T^* (K)	-	414.6*note 3	-
	k_0(mol.u^{-1}.min^{-1})	6.96 10^{-4} *note 2	2.44*note 3	4.14 10^{-3}
	$K_{ES,1}$ (mol.L^{-1})	10$^{-5.62}$ (25°C), 10$^{-5.28}$ (35°C), 10$^{-5.15}$ (45°C)	(7.57 ±0.0.41) 10^{-7}	(1.04 ±0.01) 10^{-6}
	$K_{ES,2}$ (mol.L^{-1})	10$^{-9.07}$ (25°C), 10$^{-9.43}$ (35°C), 10$^{-9.58}$ (45°C)	(1.27 ±0.08) 10^{-8}	(2.98 ±0.01) 10^{-9}
	$\alpha_{ES,1}$	0.564 (25°C), 0.717 (35°C), 0.769 (45°C)	1	1
	$\alpha_{ES,2}$	0.373 (25°C), 0.489 (35°C), 0.542 (45°C)	1	1

*note 1 Conversion between activity and mass has been made using our experimental value k'=1.15 10^4 u.g^{-1}

*note 2 Conversion of k_0 from mass to activity is made as followed: $k_0(mol.u^{-1}.min^{-1}) = \frac{k_0(mol.g^{-1}.min^{-1})}{k'}$

note 6 Conversion of $k_0$from T (i.e. the temperature in K at which k_T= 1 mol.g^{-1}. min^{-1}) is made as followed: $k_0(mol.u^{-1}.min^{-1}) = \frac{1}{k'}\exp(\frac{Ea}{RT^*})$

As chitosan may have an influence on these parameters, they must be determined in chitosan media using experimental results. For this determination, two set of experiments have been used for a chitosan concentration of 2.45% w/v, an urease concentration of 3500 u.L^{-1} and an initial pH_0 = 4.7 ± 0.1:

- First set of experiments is with a 75 mM urea concentration and temperatures of 274.15; 278.15; 283.15; 288.15; 293.15; 298.15; 303.15 and 310.15K. Experiments at 274.15 K and 298.15 K are from the present study. Others are from Wlodarczyk et al. submitted [150].
- Second set of experiments is with a temperature of 298.15K and urea concentrations of 75; 100; 150 and 200 mM. Experiment at 200 mM is from the present study. Others are from Wlodarczyk et al. (submitted) [150].

For each experiment, data of pH versus time was used. At each time of the reaction, urea concentration $[(NH_2)_2CO]$ was estimated from pH using the chitosan gelation and chemical equilibrium reactions, i.e. the set of Eq III. 1, III. 2, III. 3, III.4, III.5, III. 16, III. 18, III. 19, III. 20 and III. 21 solved using build-in fsolve MATLAB®software function (least square method). Experimental hydrolysis reaction was then calculated using Eq III. 22.

$$\boldsymbol{r_{exp} = -\frac{d[(NH_2)_2CO]}{dt}} \qquad \textbf{\textit{Eq III. 22}}$$

The Michaelis constant K_M can vary from 2.9 10^{-3} to 3.6 10^{-3} mol.L^{-1} as reported in literature [82] according to the purity of the enzyme and the conditions for the determination like temperature, buffer, its pH and concentration. An intermediate value of 3.21 10^{-3} mol.L^{-1} was retained for the present work (Table III. 2) and it was considered to be nearly no dependent of the temperature and pH [90].

An uncompetitive mechanism of inhibition of urease by substrate urea is considered but it occurs only for very high urea concentration. Values of urea inhibition constant K_S of 3 to 6.4 mol.L^{-1} have been indeed reported [82, 87, 92]. As in this work, the maximum urea concentration was no more than 0.2 mol.L^{-1} and only at the beginning of the hydrolysis reaction, any inhibition by the substrate was neglected. Value of K_S was thus considered to be infinite (Table III. 2).

A non-competitive mechanism of inhibition of urease by produced ammonium is reported in literature with inhibition constant K_P from 2 10^{-3} to 118 10^{-3} mol.L^{-1} [82, 90, 93]. Nevertheless, at the beginning of the chitosan enzymatic gelation, the term $\frac{[NH_4^+]}{K_P}$ was assumed to be much smaller than 1 (due to the small NH_4^+ quantity produced) and at the end of the reaction, urea concentration was

assumed to be dramatically decreased and become the limiting parameter of the reaction instead of the possible product inhibition of urease. In a first approach, the urease inhibition by the product was thus neglected and value of K_P was thus considered to be infinite (Table III. 2).

The pH correction factor was considered to be temperature independent (as in Fidaleo et al. (2003) [90] and contrary to Qin et al. (1994) [87]). In initial approximation, values of Fidaleo et al. (2003) [90] were considered (Table III. 2) for $K_{ES,1}$, $K_{ES,2}$, $\alpha_{ES,1}$ and $\alpha_{ES,2}$.

The last parameter, the temperature-dependent reaction rate constant k_T,was used as fitting parameter, at each reaction time, between modelling value of hydrolysis rate r_{hydro} (Eq III. 10) and experimental value of hydrolysis rate r_{exp} (Eq III. 22) using least square minimization for results of the first set of experiments (temperature between 274.15 and 310.15K).

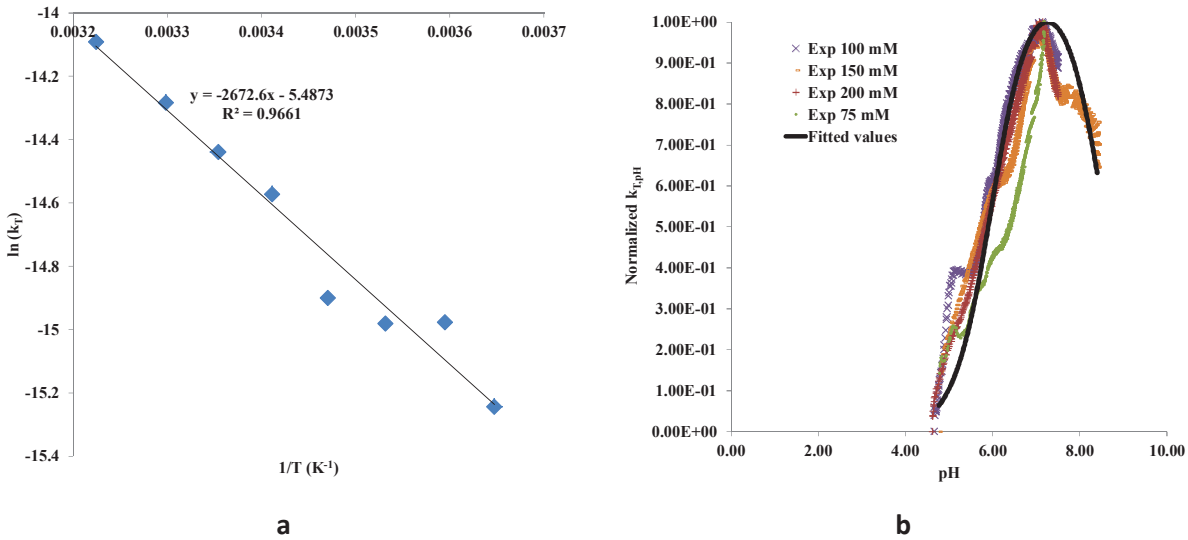

Figure III. 3: Determination of the kinetics parameters : a) determination of Ea and k_0 with the variation of $\ln(k_T)$ versus 1/T and b) determination of $K_{ES,1}$ and $K_{ES,2}$ with the variation of normalized $k_{T,pH}$ versus pH

Figure III. 3a confirms that these parameters follow an Arrhenius Law (Eq III. 23) with a correlation factor R^2 = 0.9661.

$$ln(k_T) = \frac{-Ea}{RT} + ln(k_0) \qquad \textit{Eq III. 23}$$

An Arrhenius pre-exponential factor k_0 = 4.14 10^{-3} (mol.u^{-1}.min^{-1}) was found (Table III. 2) which is higher than Qin et al. (1994) [87]. However comparison is difficult since the mass/activity conversion factor k' was established for the present work and is probably different for the work of Qin et al. (1994) [87]. The activation energy Ea was found to be 22 221 J.mol^{-1} (Table III. 2). This value is close but lower than results reported in literature for buffer-free media: 29 440 J.mol^{-1} [87] or 27 781

J.mol^{-1} [153]. It might be due to the larger temperature range used in the present work as opposed to the general temperature range of 293.15 to 313.15 K used in other studies.

The second set of experiments (different initial urea concentrations) was used to calculate, at each reaction time, the experimental hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ from the experimental hydrolysis rate according to Eq III. 24.

$$\boldsymbol{k_{T,pH,exp} = r_{exp} \frac{(K_M + [(NH_2)_2CO])}{[E]_0[(NH_2)_2CO]}} \qquad \textbf{\textit{Eq III. 24}}$$

In order to better put in evidence the bell-shape influence of the pH [82] and eliminate possible residual influence of other parameters, this coefficient was normalized by its maximum value for the considered experiment. On the same way and using the new determined parameter k_T, the modelling value of hydrolysis reaction rate coefficient $k_{T,pH}$ was calculated from Eq III. 12 and normalized by its maximum value for the considered experiment. With $\alpha_{ES,1}$=$\alpha_{ES,2} = 1$, molecular dissociation constants for the enzyme substrate-complex $K_{ES,1}$ and $K_{ES,2}$ were used as fitting parameter, at each reaction time, between modelling and experimental values of normalized hydrolysis reaction rate coefficient using least square minimization for results of the second set of experiments. Figure III. 3 shows the experimental variations of $k_{T,pH}$ and its fitted modelling variation. Values of $K_{ES,1}$= (1.04 ±0.01) 10^{-6} and $K_{ES,2}$= (2.98 ±0.01) 10^{-9}mol.L^{-1} have been determined (Table III. 2). A typical bell-shape pH dependence of the rate coefficient around neutral value of pH can be seen on Figure III. 3 as expected [82].

To summarize, the retained values of parameters in the present modelling for the Eq III. 10 and III. 12 are reported in Table III. 2: the Michaelis constant K_M =3.21 10^{-3} mol.L^{-1}; the product and substrate inhibition constants K_P = K_S = +∞; the energy of activation Ea = 22 221 J.mol^{-1} ;the pre-exponential Arrhenius factor k_0 = 4.14 10^{-3} mol.u^{-1}.min^{-1} ; the molecular dissociation constants for the enzyme substrate-complex $K_{ES,1}$ = (1.04 ±0.01) 10^{-6} (mol.L^{-1}) and $K_{ES,2}$ = (2.98 ±0.01) 10^{-9} with their empirical factors $\alpha_{ES,1}$ = $\alpha_{ES,2}$ = 1.

4.2 Comparison between modelling and experimental results

Enzymatic chitosan gelation modelling results were compared to experimental results from Wlodarczyk et al. (submitted) [150] in buffer-free 2.5% w/v chitosan solution at initial pH = 4.7. Comparisons were made for the pH variation versus time (Figure III. 4), the method chosen to follow enzymatic chitosan gelation [150] (Figure III. 4): Figure III. 4a presents results for different initial urea concentrations with a temperature of 25°C and an urease concentration of 3.5 u.mL^{-1}; Figure III. 4b

presents results for different temperatures with an initial urea concentration of 75 mM and an urease concentration of 3.5 u.mL^{-1}; Figure III. 4c presents results for different urease concentrations with a temperature of 25°C and an urea initial concentration of 75 mM.

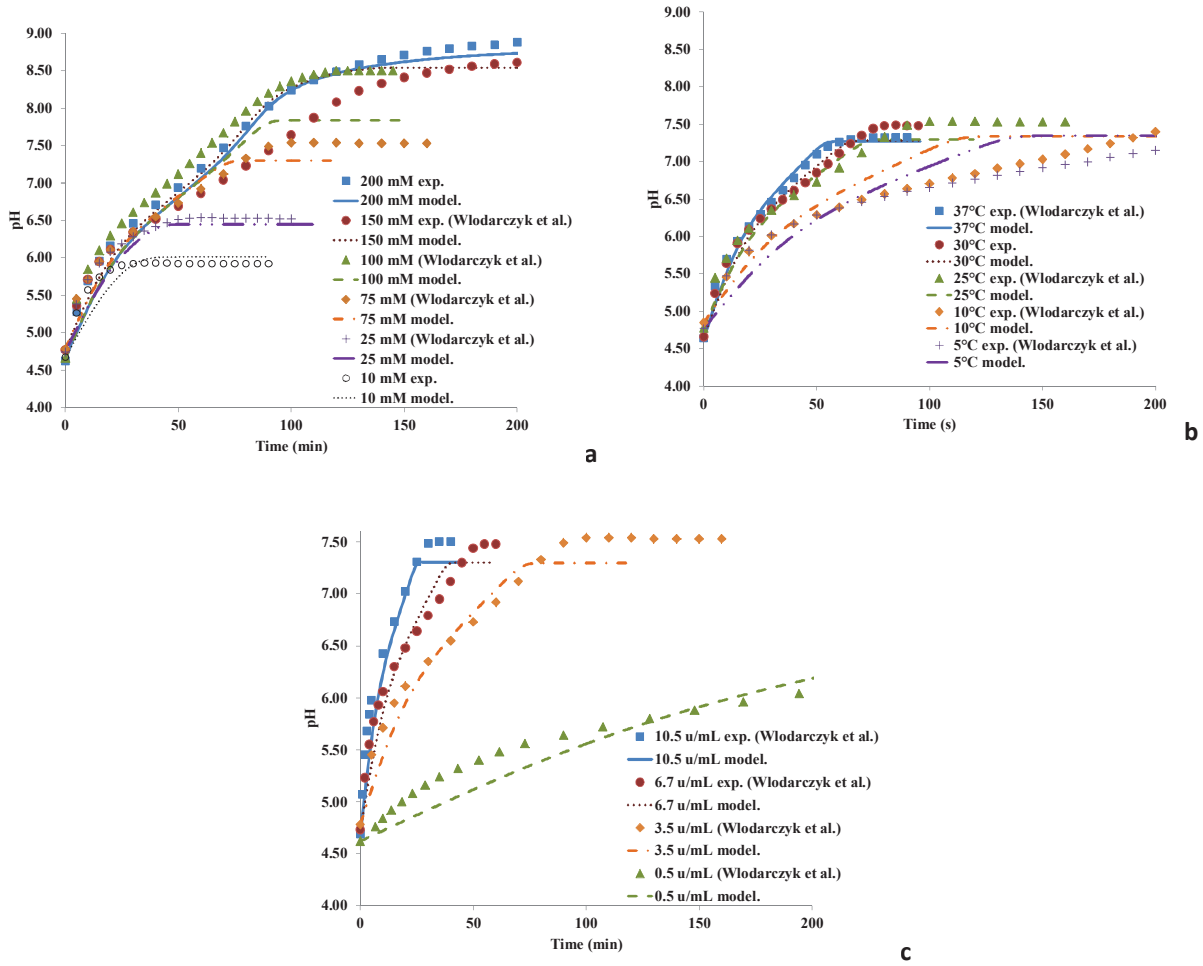

Figure III. 4: Comparison of experimental and modelling pH variations during chitosan enzymatic gelation for a buffer-free 2.5% w/v chitosan solution of a) assay of initial urea concentration with T = 25°C and [urease] = 3.5 u.mL^{-1} ; b) assay temperature with an urea concentration fixed at 75 mM and for [urease] = 3.5 u.mL^{-1}; and c) assay of urease concentration at T = 25°C and with an urea concentration of 75 mM

Figure III. 4 shows a general good concordance between experimental and modelling results which allow validating the modelling and the determination of associated parameters for a large range of operating conditions (Table III. 2): an urease concentration between 500 and 10 500 u.L^{-1}, an urea concentration between 0 and 200 mM, a pH between 4 and 9 and a temperature between 1 and 37°C. However, some differences can be raised between the modelling and the experimental.

First, except for the experiment where urea is a limiting parameter because of is too low

concentration (below 50 mM), the modelling results always underestimate the plateau of pH reached at the end of the experiment (Figure III. 4a). It would indicate that the depletion of urea occurred at a higher pH than predicted, i.e. that there is initially more urea in the solution than expected (which allow reaching a higher pH). In Section 4.1, the urea concentration during the reaction, used for the determination of kinetic parameters of the enzymatic gelation reaction, is estimated for pH using set of Eq III. 1, III. 2, III .3, III. 4, III. 5, III. 16, III. 18, III. 19, III. 20 and III. 21. However, uncertainty may exist on the characteristics of the chitosan like its pKa (Eq III. 2) and like its degree of deacetylation and molecular weight, used for the calculation of the amino-group concentration (Eq III. 1), and thus induces uncertainty on the urea concentration. Indeed, if the pKa is assimilated to the pH of gelation $pH_{g\ [150]}$ determined experimentally as the pH corresponding to the gelation time t_g (with the gelation time defined as the time where the values of the elastic modulus G' and the viscous modulus G'' are equal in rheological measurements), Mi et al. (2001) [103], values from 6.20 to 6.76 according to the temperature and the initial urea concentration.

Secondly, modelling and experimental results are less concordant at low temperatures (Figure III. 4b). It might be related to a divergence from Arrhenius law at these low temperatures (Figure III. 4a). Indeed, in water media, enzyme activity has only been modelled for temperature higher than 20°C (Table III. 2) and a significant decrease of the enzymatic activity has been considered in some studies lower than 5°C [6].

At last, modelling and experimental results diverge for intermediate pH (around 7-8) in some experiments (for example experiment at 150 mM on Figure III. 4a). This phenomenon was also observed in water media [87]. It may be explained by a transfer of CO_2, that exists in the solution around this pH, toward the outside and thus experimental pH could be higher than predicted by the modelling. Another explanation for the differences between modelling and experimental results is the possible inhibition by the product ammonium which may become non-negligible when ammonium reaches a more important concentration around these same values of pH while urea concentration is still important and is thus not yet a limiting factor.

Even if few gaps may be found between the modelling and experimental results of the pH variations versus time, these uncertainties have only a small influence on the prediction of the gelation time t_g and the advanced gelation time t_{ag}. The gelation time is the time when chitosan elastic modulus G' and the viscous modulus G'' are equals in rheological measurements (it was considered to be when pH 6.5 is reached) while the advanced gelation time is the time when a completely rigid gel is obtained (it was considered to be when pH 7.35 is reached) [150]. Figure III. 5 presents a comparison

between experimental and predicted values of gelation time and advanced gelation time (when the experiment allows reaching its value).

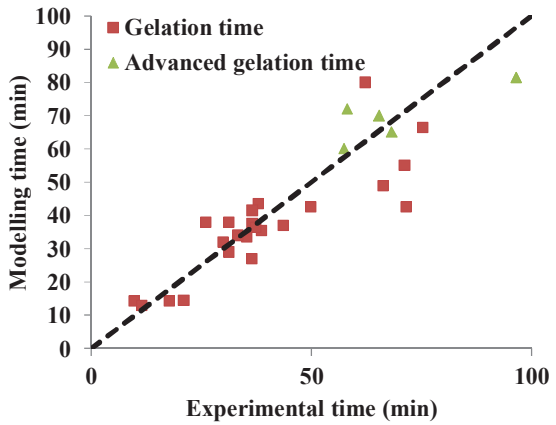

Figure III. 5: Comparison of the experimental and modelling gelation and advanced gelation times

Figure III. 5 shows a very good concordance between predicted and experimental times. A mean difference of 20% is observed on the gelation time and of 16% is observed for the advanced gelation time. Enzymatic chitosan gelation reaction modelling can thus be a good tool to predict gelation and advanced gelation time. It must however be noted that these experiments were made in a 10 mL glass batch reactor where transfer phenomenon may be neglected. For the preparation of membrane in flat-sheet form [150], the transfer phenomenon might not be neglected anymore.

4.3 Enzymatic urea hydrolysis reaction kinetics in water and chitosan media

One of the aims of the enzymatic chitosan gelation reaction modelling was to determine the possible influence of chitosan on the urea enzymatic hydrolysis kinetics. Same enzymatic chitosan gelation reaction modelling was applied in water media (i.e. for a chitosan concentration Cc equal zero) without modifying the enzyme and kinetic parameters determined in Section 4.1 for chitosan media. Figure III. 6 shows the comparison between experimental [150] and modelling pH variations during enzymatic urea hydrolysis for a non-buffered aqueous media at initial pH 4.7 and with an urease concentration of 0.5 $u.mL^{-1}$. Figure III. 6a presents results for a temperature of 25°C and different urea concentration while Figure III. 6b presents results for an initial urea concentration fixed at 75 mM and for different temperature. It must be noted that an urease concentration of 0.5 $u.mL^{-1}$ is used here (instead of 3.5 $u.mL^{-1}$ used for chitosan media) in order to slow down pH increase and be able to see an effect of operating conditions.

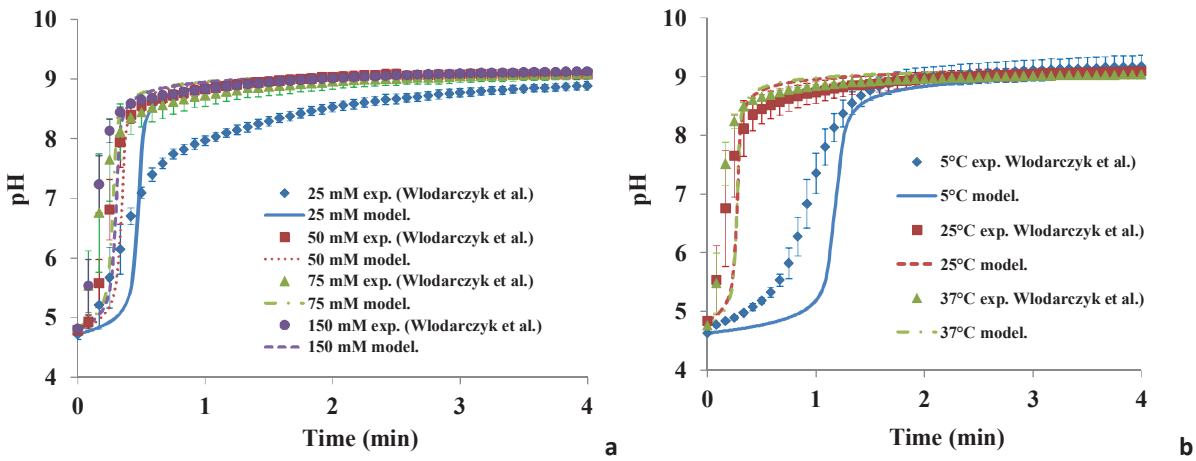

Figure III. 6: Comparison of experimental and modelling pH variations during enzymatic urea hydrolysis for non-buffered aqueous media for [urease]= 0.5 u.mL^{-1} : a) influence of initial urea concentration at T = 25°C and b) influence of assay temperature with a urea concentration

Important differences between water and chitosan media have been observed concerning the pH variations during the time [150]. The pH increase versus time is very fast in aqueous media and very slow in chitosan media. For example, for an urea concentration of 75 mM, a temperature of 25°C and an urease concentration of 0.5 u.mL^{-1}, less than one minute is required to reach pH 6.5 (Figure III. 6) while a pH of nearly 6 is only reached after 200 minutes of experiment.

In water media, the pH increases very fast before reaching an “apparent” plateau around 8.5-9. The pH fast increase can be related directly to the ammonium produced by the urea hydrolysis reaction (Reaction III. 2) and thus to the urea hydrolysis kinetics. In chitosan media, pH increases more slowly before also reaching a plateau. pH cannot be anymore related to the ammonium produced by the urea hydrolysis reaction because of the presence of the chitosan reaction equilibrium (Reaction III. 1). In this case, pH increasing can be related to the global enzymatic chitosan gelation reaction (Reaction III. 1 and III. 2) and no more to the only urea hydrolysis reaction. The presence of the chitosan equilibrium reaction (taken into consideration only in chitosan media) is thus the main explanation to the difference pH variations between water and chitosan media, since a good concordance between modelling and experimental results is observed in water media using enzyme and kinetics parameters established for chitosan media. Other assumptions proposed by Wlodarczyk et al. (submitted) [150] for the slow increase of pH in chitosan media, like a slowdown of mass transfer in solution due to a higher viscosity of chitosan or possible sorption interaction between urea and chitosan, seem thus to play a minor part.

It must be noted that same difference between modelling and experimental results are observed for low temperature in water media (Figure III. 6b) than in chitosan media (See Section 4.2). At last, it is

interesting to see the difference of behaviour between modelling and experimental results when urea concentration is limiting (for 25 mM in Figure III. 6a) while a very good concordance was observed in chitosan media (Figure III. 4a): it could be related to product inhibition that is more visible for low initial urea concentration when there is no product consumption like in the case of chitosane.

In both water media and in chitosan media, pH seems to reach a plateau at the end of the reaction. However, explanations of this behaviour are totally different for chitosan and water media since a "real" plateau is obtained in chitosan media while an "apparent" plateau is reached in water media. Figure III. 7 presents simulated urea concentration versus time in chitosan (Figure III. 7a) and water media (Figure III. 7b) for the experiments of Figure III. 4a (in chitosan media) and Figure III. 6a (in water media) and for different initial urea concentrations.

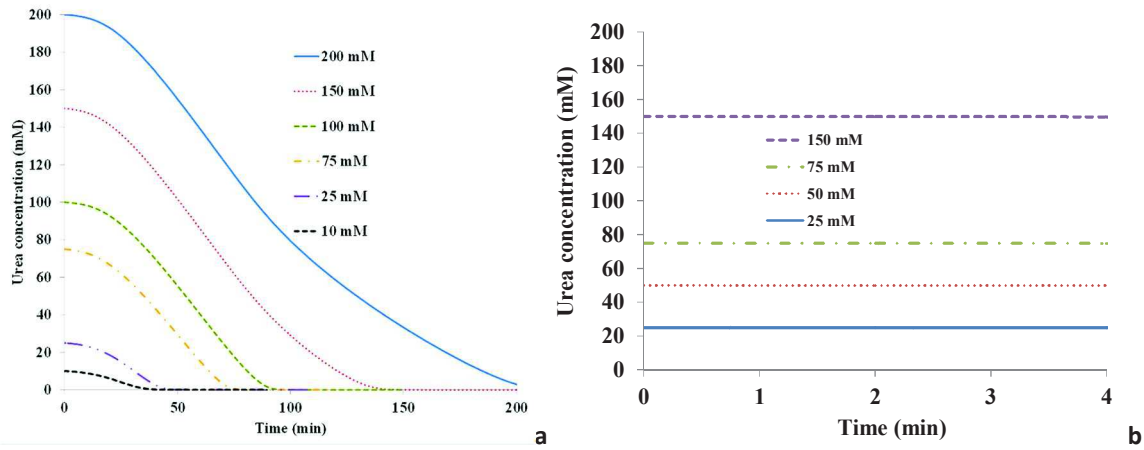

Figure III. 7: Variation of urea concentration versus time for different urea concentration and at 25°C during a) chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution with [urease] = 3.5 u.mL^{-1}b) during enzymatic urea hydrolysis for a non-buffered aqueous media with [urease]= 0.5 u.mL^{-1} and

As shown on Figure III. 7b, the urea concentration stays nearly unchanged when the "apparent" plateau of pH is reached at the end of the experiment (after 4 minutes) in water media. On the contrary, Figure III. 7a shows that urea concentration drops to zero at the end of the urea hydrolysis reaction in chitosan media. This depletion of urea corresponds to the moment where the pH reached a "real" plateau (Figure III. 4a). The level of this plateau, i.e. the final value of pH, is only related to the final product concentration resulting of the urea hydrolysis reaction (reaction balance) and thus to the urea concentration that was initially present in the solution at the beginning of the reaction (effect of temperature on aqueous equilibrium constants and thus on the obtained pH is indeed negligible). However, the time when this plateau is reached depends on the reaction kinetics and thus mainly on temperature and urease concentration, the parameters that have been found to have

the main influence on enzymatic gelation kinetics [7, 150] as seen in Figure III. 4b and c.

To explain the “apparent” plateau reached in water media, a longer experiment was simulated using the modelling for an initial urea concentration of 150 mM, an initial pH = 4.7, and with a temperature of 37°C for an urease concentration of 3.5 u.mL^{-1} (in order to have faster kinetics). For comparison, same experiment was also simulated in 2.5% w/v chitosan media. Figure III. 8 presents the variations of pH and urea concentration during the time in water media.

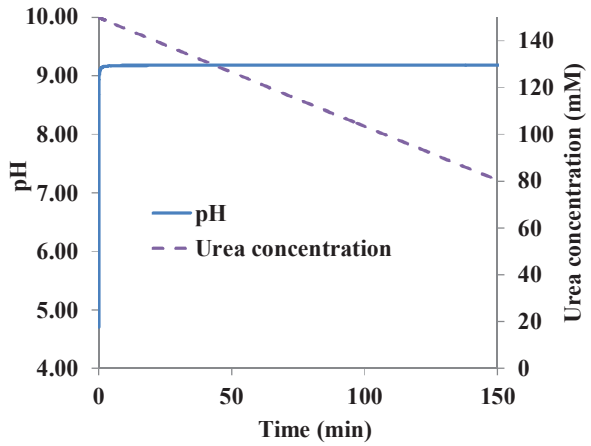

Figure III. 8: Variation of pH and urea concentration versus time for 150 mM urea concentration, 37°C and a 3.5 u.mL^{-1} urease concentration in aqueous media

As seen on Figure III. 8, the pH of the solution seems to have reached a plateau but it is still very slowly increasing. Urea concentration decreases slowly versus time which indicates that the urea hydrolysis reaction is still going on. Urea hydrolysis rate r_{hydro} was calculated in water and chitosan media and can be seen on Figure III. 9a (versus the time) and Figure III. 9b (versus the pH).

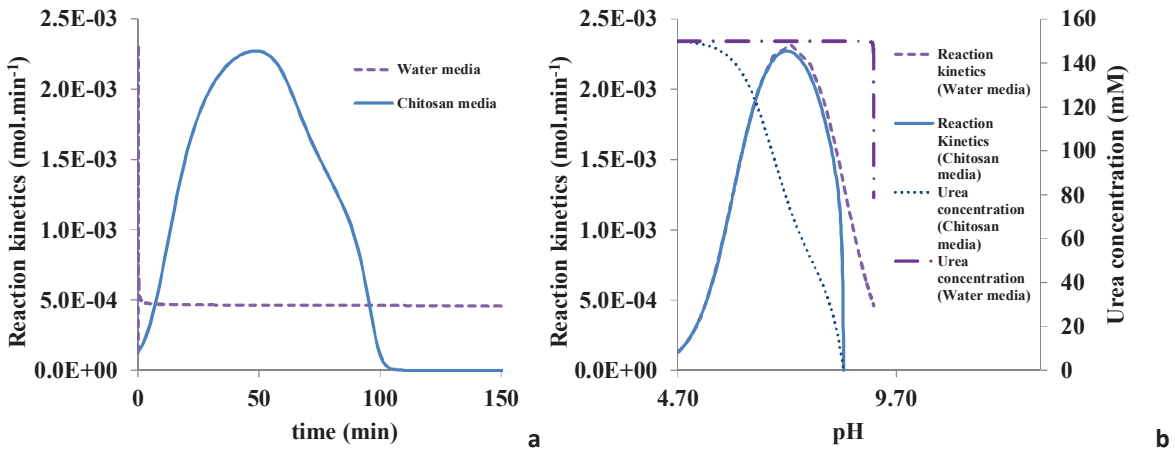

Figure III. 9: Variation of urea hydrolysis rate in water and 2.5% w/v chitosan media for 150 mM urea concentration, 37°C and a 3.5 u.mL^{-1} urease concentration a) versus time and b) versus pH (with also the urea concentration)

As expected from the pH measurement in water media (the fast increase of the pH at the beginning of the reaction), Figure III. 9a shows a peak of the reaction rate at 2.3 10^{-3} mol.min^{-1}at the beginning of the reaction (for time less than one minute) then it reaches a value below 5.0 10^{-4} mol.min^{-1}and has a very slow decreasing. On the contrary, the hydrolysis rate has a bell-shape around a maximum value of 2.3 10^{-3} mol.min^{-1} in chitosan media. During these experiments, both urea concentration and pH vary as seen on Figure III. 9b. Figure III. 9b shows a very similar dependence of the hydrolysis rate on the pH up to a value of 7.2 which corresponds to the optimum pH for the activity of the enzyme. Until this optimum pH of 7.2 is reached (few seconds in water media and about 50 minutes in chitosan media because of the chitosan equilibrium reaction), urea is still at a high concentration and the limiting parameter for this reaction is the pH. After this optimum pH of 7.2, a more important urea quantity has been used for the reaction in chitosan media (because of a longer experimental time) and values lower than 75 mM has been reached. Urea concentration becomes the limiting parameter for the hydrolysis reaction rate and then the depletion of urea induces the final drop of the hydrolysis rate. On the contrary in water media, the limiting parameter stays always the pH since the urea concentration is still maintain at high value and is never the limiting parameter. The 'apparent" plateau of pH reached in water media is thus due to influence of pH which slowdown the hydrolysis reaction at higher value but does not stop it. It is also important to note that the pH of the "apparent" is closed to the buffer effect zone of the ammonia/ammonium (pKa = 9.3) which also contributes to the slow-down of the pH increasing.

At last, it is interesting to note that the "strange" urea concentration versus pH curve shape is easily explained by the fact that only few urea is used to reached a pH of 9.2 (very short time of experiment) and then urea concentration decreases for a longer period of time while the pH ha only

a narrow variations on this same period of time.

To conclude, pH measurement can be a useful tool for monitoring urea hydrolysis reaction rate in water media but only for the initial time of the reaction before the "apparent" plateau while pH measurement might characterize the global chitosan enzymatic gelation rate in chitosan media.

4.4 Monitoring of gelation and urea hydrolysis reaction kinetics in chitosan media

Figure III. 10a presents the variation of pH versus time of the simulated experiment in 2.5% w/v chitosan media for an initial urea concentration of 150 mM, an initial pH 4.7, a temperature of 37°C and an urease concentration of 3.5 u.mL^{-1}. The gelation is usually defined thanks to rheological measurements [103]. It is the moment when the elastic modulus G', or storage modulus, which represents the gel solid component, becomes equal to the viscous modulus G'', or loss modulus, which represents the gel liquid component. It corresponds to the formation of inter-molecular non-covalent bonds (hydrogen bond and van der Waals interactions) because of the deprotonation of chitosan amino-group. This moment of gelation defined the gelation time t_g and thus the corresponding pH of gelation pH_g.[150]. Gelation was defined in the present work as the chemical equilibrium between the concentration of chitosan non-protoned amino-groups $[Chit-NH_2]$ and the concentration of chitosan protoned amino-groups $[Chit-NH_3^+]$. The percentage of gelation was thus defined according to Eq III. 25 and it is also shown Figure III. 10.

$$\boldsymbol{Gelation} = \frac{[\boldsymbol{Chit-NH_2}]}{[\boldsymbol{Chit-NH_3^+}]+[\boldsymbol{Chit-NH_2}]} \qquad \textbf{\textit{Eq III. 25}}$$

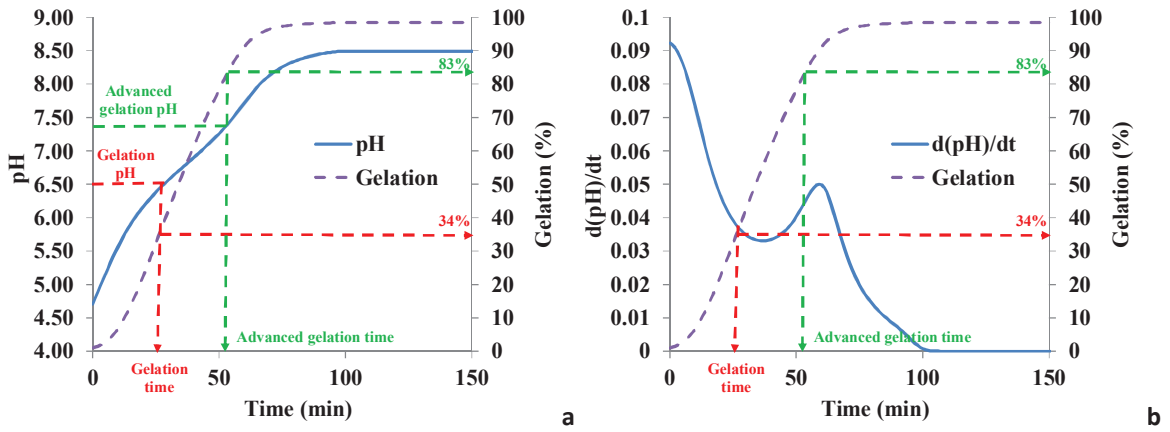

Figure III. 10: Variations of the percentage of gelation versus time for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution a) with the pH variations and b) with the dpH/dt variations.

Figure III. 10a shows that for the gelation pH considered of 6.5 and the corresponding gelation time [150], a gelation of 34% is obtained. This result must however be carefully considered. Indeed, a pKa

of 6.7 was considered for all the modelling while a mean value of gelation pH of 6.5 was retained experimentally [150] which can explain this low gelation percentage. Figure III. 10b represents the variation of d(pH)/dt versus the time. As expected from the previous remarks, the local minimum of this curve does not correspond to the gelation pH. The minimum is obtained at 32 minutes which correspond to pH of 6.7, i.e. the chitosan pKa retained for the modelling which will be thus the real gelation pH for this simulated experiment. Indeed, the slowest variations of pH are obtained in the buffer zone of the chitosan. However it must be noted than only little difference is obtained between the gelation time of 27 minutes for a pH of 6.5 and a gelation time of 32 minutes for pH of 6.7. A small variation of pH in this zone induces however an important variation of the gelation percentage. At last, it must be noted that for the considered advanced gelation time (where a rigid gel is obtained), a gelation percentage of 83% was obtained which traduces the more important rigidity of the gel than at the gelation pH (which will theoretically 50% since it corresponds to the chitosan pKa).

The study of d(pH)/dt seems to be a good tool to determine the gelation pH. In order to validate this method, Figure III. 11 presents variations of d(pH)/dt for the experiment for 2.5% w/v chitosan media, 150 mM urea concentration, 25°C and a 3.5 u.mL^{-1} urease concentration (Experiment of Figure III. 4a)

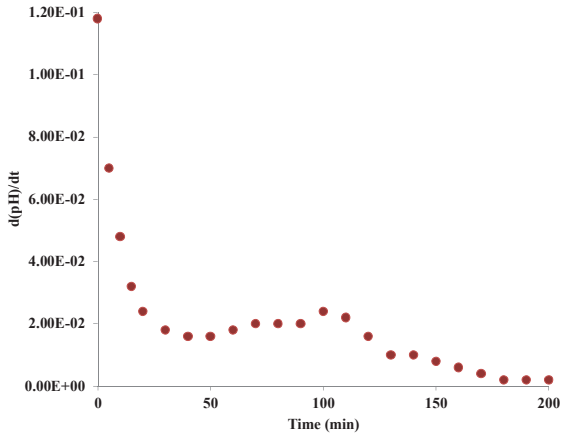

Figure III. 11: Variations of dpH/dt for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 25°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution

The minimum of the curve is obtained at a time 45-50 min for a corresponding to a pH of around 6.52 - 6.69. This value can thus be defined as the gelation time and gelation pH. It corresponds to the value determined by rheological measurements of 6.5 which also thus correspond to the chitosan real pKa. It can finally be concluded that there is a strong and direct similarity between the mechanical property (rheological measurement of the gelation point) and the chitosan chemical

equilibrium (measurement of pH). In chitosan media, pH is thus a good tool to measure the global enzymatic gelation reaction and determined the gelation time and the advanced gelation time.

Figure III. 12 presents the chitosan gelation reaction rate r_{gel} (defined according Eq III. 26) and the urea hydrolysis reaction rate r_{hydro} versus time for the same simulated experiment of Figure III. 10. d(pH)/dt variations versus time are also presented again.

$$r_{gel} = \frac{d([Chit-NH_2])}{dt} \qquad \textit{Eq III. 26}$$

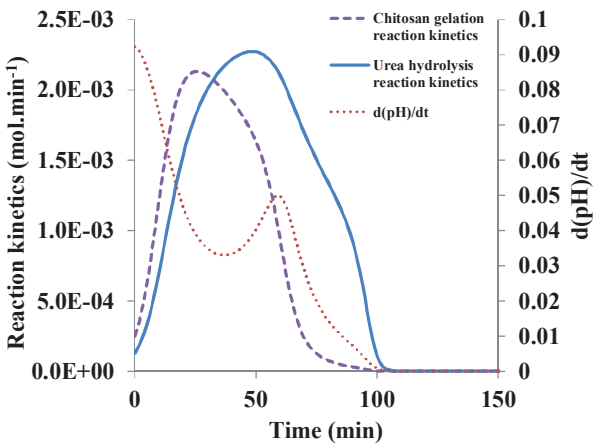

Figure III. 12. Variations of d(pH)/dt, chitosan gelation and urea hydrolysis reaction kinetics versus time for an urea concentration for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution

First, this figure shows that the chitosan gelation reaction and urea hydrolysis reaction maximum rate are not at the same time. The maximum rate for the chitosan gelation reaction occurred around the gelation pH (i.e. the chitosan pKa) whereas the maximum rate for the urea hydrolysis reaction occurred around the optimum pH for the urease activity (see Section 4.3). Figure III. 12 also shows that pH measurement can be a good indicator for the chitosan gelation and urea hydrolysis kinetics. Indeed the local minimum of pH nearly corresponds to the maximum of chitosan gelation reaction rate (Reaction III. 1) while the local maximum of pH nearly corresponds to the maximum urea hydrolysis reaction rate (Reaction III. 2). It must be noted that this correspondence is not exactly the same because of the presence of the other equilibrium reactions: ammonia/ammonium equilibria and carbon dioxide/carbonate/hydrogen carbonate equilibrium.

4.5 *Ammonium/ammonia equilibria and carbon dioxide/carbonate/hydrogen carbonate equilibrium in chitosan media*

For the same simulated experiment in chitosan media as Section 4.5, Figure III. 13a presents dissolved ammonia, ammonium and total ammonium/ammonia concentrations (Reaction3) during the experimental time while Figure III. 13b presents dissolved carbon dioxide, carbonate and hydrogen carbonate concentrations (Reaction III. 4 and III. 5) during the experimental time. Urea concentration is also presented on both figures. Figure III. 14a presents the speciation in chitosan solution for ammonia/ammonium and Figure III. 14b presents the speciation in chitosan solution for carbon dioxide/carbonate/hydrogen carbonate.

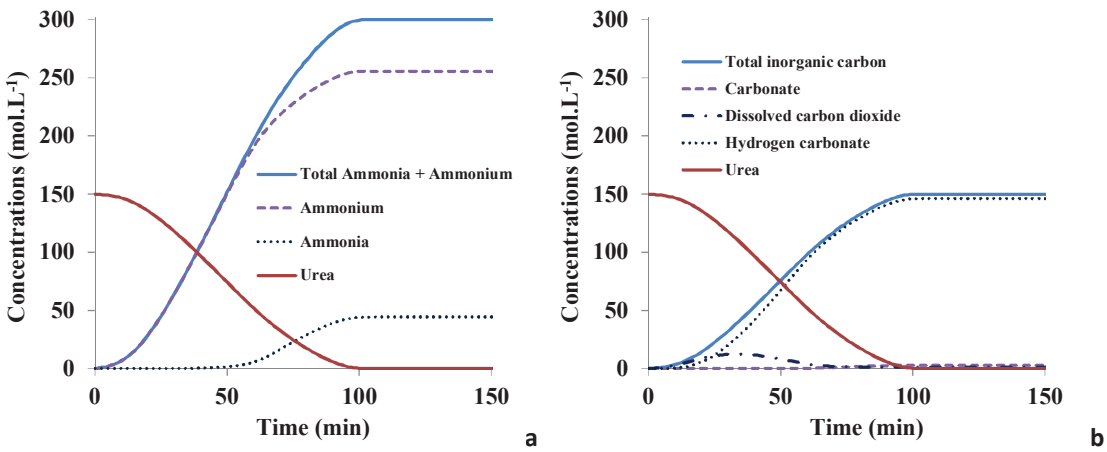

Figure III. 13: Variation of species concentrations versus time during chitosan enzymatic gelation for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution: a) ammonium, ammonia and urea concentrations; b) carbon dioxide, carbonate, hydrogen carbonate and urea concentrations

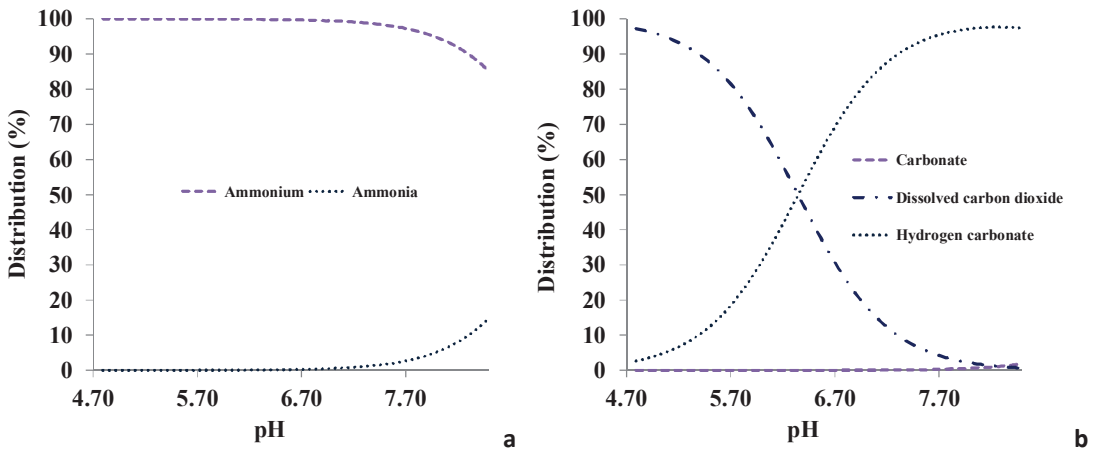

Figure III. 14: Chitosan enzymatic gelation for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution: speciation of a) ammonium-ammonia and b) carbon dioxide, carbonate and hydrogen carbonate

As seen from Figure III. 13 and Figure III. 14, ammonium is the main species present in the solution because of the urea hydrolysis reaction. Hydrogen carbonate can also be found at lower concentrations while there is no carbonate because of the pH conditions. It is interesting to look deeply onto the ammonia and carbon dioxide concentration that can be transfered toward the external environment because of their gas-liquid equilibrium or could form some bubble that will be trapped during the enzymatic chitosan gelation reaction. Ammonia can be found in the solution but only for long time of experiment and at high pH (Figure III. 14a) beyond the advanced gelation pH, i.e. after the gel formation. Ammonia is thus not a problem for the gelation process. On the contrary, carbon dioxide is the main carbon species at low pH (Figure III. 14b). As seen on Figure III. 13a maximum concentration of 12 mM can be found in solution around the gelation time and might induced formation of bubble inside the gel. However, this assumption does not take into consideration any transfer of the carbon dioxide inside the solution or toward the external environment that may play a major role in this behaviour. Furthermore, all the modelling in this work has been performed without transfer consideration and validated for 10 mL experimental vial i.e. in geometry where external transfer may reasonably neglected. For the preparation of membrane [150], a flat-sheet configuration of gel will be used and thus transfer cannot be anymore neglected and must thus be taken into consideration in the chitosan enzymatic gelation modelling.

5. Conclusion

Based on urea hydrolysis kinetics modelling in water media, an enzymatic chitosan gelation kinetics modelling has been performed and successfully validated by experimental measurement for

geometry where mass transfer can be neglected. Comparison between urea hydrolysis reaction rates in water and chitosan media show that the chitosan has nearly no influence on the enzymatic kinetics parameters. Differences observed in pH measurement are only related to the presence of the chitosan equilibrium.

Simulations results have allowed decoupling and better understanding gelation and urea hydrolysis reaction and show the limitation of urea hydrolysis reaction by urea concentration depletion in chitosan media and by pH in water media. Modelling has also shown that pH monitoring, more particularly d(pH)/dt monitoring, can be a good indicator for the determination of the gelation time, the advanced gelation time, the times where gelation and urea hydrolysis respective kinetics maximum rates are obtained.

Finally, modelling has pointed out the possible problem of dissolved organic carbon present in the solution. This last assumption must however be deeply investigated using modelling that will take into consideration internal and external mass transfer.

Modeling and simulation of chitosan enzymatic gelation for membrane formation

1. Introduction

Chitosan is derived from chitin, which is a natural biopolymer that can be extracted from the shells of crustaceans or in the exoskeleton of insects. Chitin and chitosan are copolymers of β, $(1 \rightarrow 4)$ linked 2-amino-2-deoxy-D-glucan and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucan; the form of chitosan (chitin or chitosan) depends on the degree of deacetylation (DDA) that represents the proportion of amino groups along the polymeric chains. Over 60 %, the polymer is called chitosan, but chitin for DDA below 60 %. The degree of deacetylation strongly affects the physico-chemical properties of chitosan and especially its solubility. Indeed, while chitin is soluble in some organic solvents, chitosan is soluble in acid aqueous solutions [136]. Thanks to its remarkable biological properties (bioactive, biocompatible, and bioresorbable), chitosan is largely used in the biomedical field, especially for tissue engineering, drug delivery and wound dressings [154]. Chitosan (and chitin) can be used under liquid, membrane or hydrogel form depending on the final application.

The preparation of chitosan gels using a basic media has been previously presented in the literature and involves different and concomitant mechanisms: mass transfer and/or heat transfer, diffusion within the polymeric matrix, chemical reaction between chitosan and the basic element and finally gelation due to polymer chain precipitation. Most of time, a chitosan solution dissolved in acidic solution (hydrochloric or acetic acid) is immersed into an ammonia bath to induce the polymer gelation, but recently our group developed a novel and smoother way to prepare chitosan gels: the VIPS (Vapour Induced Phase Separation) gelation process, consisting in exposing the chitosan solution to basic vapors [4]. Such a process enabled to slow down the mass transfer of ammonia and hence to obtain more uniform gel [155]. The VIPS-gelation process is directly derived from VIPS process used for preparing homogeneous polymeric membrane for water treatment, which have been developed in the last two decades [156-159]. Indeed, by increasing the mass transfer limitation between the polymer solution and the non-solvent in the vicinity of the membrane/air interface, mass transfer involving solvent extraction and non-solvent intake can be strongly reduced comparing to the wet process, thus enabling to obtain more homogeneous morphologies after membrane solidification.

In parallel, researches focused in a recent past on the preparation of novel membranes without the use of organic solvents, in agreement with the principles of green chemistry [142]. In these cases, the phase separation has been induced by a temperature change or by the addition of salts. Likewise, recent works exhibited that chitosan membranes could be prepared without the use of ammonia, therefore using an enzymatic way [150], following the work of Chenite et al (2006) and Yan (2014) [6, 7]. Indeed, the later proposed an original enzymatic gelation process based on in-situ production of ammonia by an enzymatic hydrolysis of urea using urease as the enzyme. By this way, it was no more necessary to use external ammonia intake, from liquid or vapour phase, therefore reducing the environmental and health problems linked to the membrane preparation. Moreover, such a preparation method is expected to reduce the concentration gradient linked to the mass transfer phenomena involved during the other gelation or phase inversion methods, thus enabling to obtain more symmetric and isotropic morphologies. In previous papers [150], we demonstrated that this enzymatic gelation method could be successfully used to prepare membrane from chitosan and we focused on the gelation kinetics in relation with the urea hydrolysis in presence of urease, in perfectly mixed reactor. A 0D model was developed to describe and follow the progress of the enzymatic reaction with and without the presence of chitosan. It was pointed out that the reaction time of hydrolysis was only little affected by the presence of chitosan while the pH kinetics is strongly reduced by the presence of chitosan (Chap III.1). The 0D model was useful to predict the chitosan gelation rate, and hence the time necessary to reach the gelation and advanced gelation pH depending on the chosen operating conditions (urea and urease concentration, temperature, etc..).

Nevertheless, the aforementioned study only focused on the equilibrium reactions in a closed system, as the solution was in a deep cell during the gelation process; consequently it would be now necessary to investigate the coupling between the equilibrium reactions and the external transfers that would occur in real conditions of membrane preparation. To the best of our knowledge, the investigation of the whole phenomena involved during the membrane preparation by enzymatic gelation has never been completely described, i.e. taking into account both the equilibrium reactions and the mass transfer phenomena between the casting solution and the external environment.

During the two last decades, numerical models have been developed and published in the field of classical membranes prepared by phase inversion methods, especially for TIPS (Temperature Induced Phase Separation) process [160], dry casting process [161, 162] and VIPS process [157]. In parallel recent works report the development of models aiming at describing the VIPS-gelation process for

chitin [163] and chitosan hydrogels [5]. In such papers, the model involved a coupling between the mass and heat transfer phenomena, the chemical reaction and the diffusion within the polymer matrix. Herein, an original mathematical model was therefore developed to describe the coupling between the whole transfer phenomena and the enzymatic reaction (including the equilibrium reactions involving CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-}, NH_3, NH_4^+). The model developed in this paper will be useful for simulating the membrane formation dynamics depending on the whole operating conditions, i.e. process conditions such as temperature, air flow rate, initial pH etc., and formulation conditions (initial concentration of chitosan, urea, urease, initial pH, etc.).

The model strategy will first be exposed in this paper, and then the model equations will be thoroughly described. The model validation will then be discussed in a second part and then the numerical results will be detailed as a function of the operating conditions. Finally, this model will help choosing the most appropriate conditions for preparing the membrane having the target morphology.

2. Model description

2.1 Modeling strategy

In a previous paper, our group developed a 0D model aiming at predicting the pH variation, and hence the gelation rate, during chitosan gelation by enzymatic way using urea. The main goal of such previous model was (i) to determine the effect of the chitosan on the whole kinetics of the enzymatic reaction and (ii) to determine the best conditions to performed chitosan gelation in deep cell geometry.

Nevertheless, the 0D model was only available to estimate kinetic data in close system, i.e. without any external transfer. Indeed, the preparation of flat membrane involves first the casting of a thin film into a horizontal support, and then this casting film is exposed to the ambient atmosphere during the membrane formation. In such thin film geometry, the surface/volume ratio is much higher than in deep cell geometry, thus enhancing the influence of the external transfer on the whole mechanisms through the solution/atmosphere interface. The enzymatic reactions involved during chitosan gelation lead to the production of ammonia, which could evaporate from the solution. In the same time, carbon dioxide can intake the polymer solution thus inducing an acidification of the system, and consequently modifying the pH increase due to urea hydrolysis. In this enzymatic gelation process, the mass transfers involving water (H_2O), carbon dioxide (CO_2), hydrochloric acid

(HCl) and ammonia (NH_3) had to be taken into account by the 1D model.

The geometry will first be detailed in a first section and the thermodynamics of the system will be expressed for this specific system. The diffusion equations representing the mass transfer within the solution will be detailed in a third part and then the external transfer equation, involving semi-empirical correlations, will be detailed in a last part of the model description. A system of partial differential equation will thus be written and solved using commercial software COMSOL Multiphysics® 5.1.

2.2 Geometry

The geometry of the system was represented on Figure III. 15. The polymer solution is cast onto an impermeable support and exposed to air. Due to the low thickness of the chitosan film (around 1 mm in thin film geometry) the boundary effects were neglected in the 1D model, thus assuming transfers only in the vertical axis. Free convection was simulated in this model, in agreement with the real conditions used to perform the enzymatic gelation. Since the chitosan gelation was experimentally performed into a climatic chamber where the relative humidity and the temperature could be fixed, both parameters were also tested during the simulation runs.

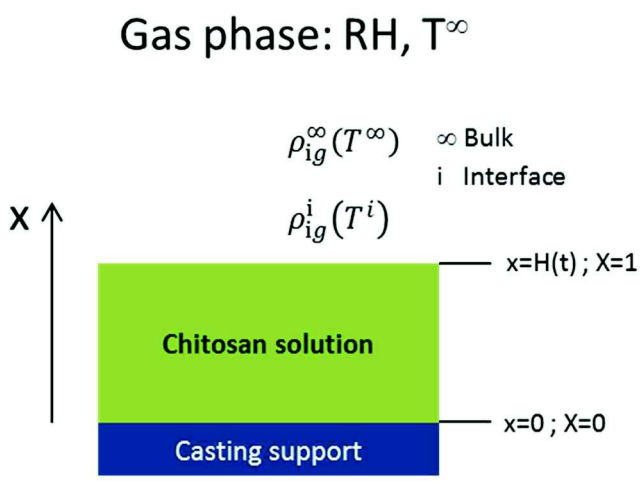

Figure III. 15: Schematic of enzymatic gelation process

2.3 Chemical reactions

The whole chemical reactions involved in the enzymatic gelation of chitosan have been extensively presented and commented in a previous paper. In this paper, the whole chemical reaction equations were reminded and reported into a synthetic table (Table III. 3). First, urea is hydrolyzed in aqueous solution to form NH_3 and CO_2 (Reaction III. 2); this reaction is irreversible and catalyzed by urease.

The reaction rate depends on several parameters and is expressed as:

$$r_{hydro} = \frac{k_0\, exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right)\times[urease]_0\times[CO(NH_2)_2]}{(K_m+[CO(NH_2)_2])(1+10^{-pH}/K_{E1}+K_{E2}/10^{-pH})} \qquad \textit{Eq III. 27}$$

The whole parameters involved in this reaction rate parameter r_{hydro} have been discussed in the previous paper dealing with the kinetic model of enzymatic reaction for chitosan gelation. It is important to note that the urea hydrolysis rate depends on both the temperature and the solution pH.

Table III. 3: System of chemical reaction involved in the chitosan enzymatic gelation

Reaction number	Description	Reaction	Reaction rate/Equilibrium constant
1'	Chitosan deprotonation	$Chit\text{-}NH_3^+ + H_2O = Chit\text{-}NH_2 + H_3O^+$	$K_1 = 10^{-6.7}$
2	Urea hydrolysis	$(NH_2)_2CO + H_2O \xrightarrow{urease} 2NH_3 + CO_2$	r_{hydro}
3	Dissociation of ammonia	$NH_4^+ + H_2O = CO_3^{2-} + H_3O^+$	$K_3 = 10^{-9.3}$
4	Equilibrium reaction for $CO_2/HCO_3^-/CO_3^{2-}$	$HCO_3^- + H_2O = CO_3^{2-} + H_3O^+$	$K_4 = 5.02\ 10^{-5}\ e^{-1462.7/T}$
5		$CO_2 + 2H_2O = HCO_3^- + H_3O^+$	$K_5 = 7.83\ 10^{-8}\ e^{-2213/T}$
6	Water dissociation	$2H_2O = H_3O^+ + HO^-$	$K_e = 10^{-14}$

Then, NH_4^+ and NH_3 concentrations will be linked by the equilibrium reaction (Reaction III. 3). Equilibrium reactions of CO_2 with HCO_3^- and CO_3^{2-} (Reaction III. 4 and III. 5) are also involved in the system. The enzymatic chitosan gelation is due to the deprotonation of the protonated form of chitosan ($Chit - NH_3^+$) in basic conditions, which was represented by Reaction III. 1. Finally, the water dissociation had to be taken into account in the model (Reaction III. 6).

2.4 Thermodynamics

Thermodynamic data were necessary to simulate the mass transfers between the solution and the external environment. Three components were targeted, i.e. water, CO_2 and NH_3, and the solubility data were obtained from literature at different temperatures and atmospheric pressures and for

different concentrations in water [151]. In each case, since the chitosan concentration is very low (less than 3% w/v, it was assumed in this model that the polymer did not significantly affect the whole equilibria, thus considering all species as if they were in aqueous solution.

2.5 Mass transfer

Some assumptions were made in the mass transfer model presented here: (i) ideal gas behavior in the gas phase, (ii) no transfer of chitosan in the air, (iii) gas-liquid equilibrium at the film/air interface and (iv) the excess of volume due to mixing was neglected. Based on these assumptions, the continuity equation was derived as follows in the chitosan system:

$$\frac{\partial \rho_i}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial x}\left(-D_i \frac{\partial \rho_i}{\partial x}\right) = R_i \quad i = 1 \; to \; 11 \qquad \textit{Eq III. 28}$$

Subscripts 1 to 11 are reported in the Table III. 4.

Table III. 4: Subscripts and species

Subscript	Specie
1	Urea
2	H_2O
3	NH_4^+
4	CO_3^{2-}
5	NH_3
6	H_3O^+
7	HCO_3^-
8	CO_2
9	Chit-NH_3^+
10	OH^-
11	Chit-NH_2

R_i is a source term taking into account the reaction involved for each component except water. D_i is the mutual diffusion coefficient of component *i* in the chitosan system and ρ_i is the concentration of component i defined by:

$$\rho_i = \frac{\phi_i}{\hat{V}_i} \qquad \textit{Eq III. 29}$$

$\hat{V}$ is the partial specific volume (kg.m^{-3}) and ϕ is the volume fraction.

Due to mass exchanges at the upper interface, the global mass of the system will change during time and hence the upper boundary will move. To fix boundaries between 0 and 1, a coordinate transform was therefore performed in the vertical axis by dividing the x coordinate by the solution thickness at time t:

$$\boldsymbol{X = \frac{x}{H(t)}} \qquad \textit{Eq III. 30}$$

Using this coordinate transform, Eq III. 28 becomes:

$$\boldsymbol{\frac{\partial \rho_i}{\partial t} - \frac{X}{H(t)}\frac{\partial H(t)}{\partial t}\frac{\partial \rho_i}{\partial X} - \frac{\partial}{\partial X}\left[\frac{D_i}{H(t)^2}\left(-\frac{\partial \rho_i}{\partial X}\right)\right] = R_i} \qquad \textit{Eq III. 31}$$

The term $\frac{\partial H(t)}{\partial t}$ represents the variation of the solution thickness due to mass exchanges; D_i and R_i are the coefficient diffusion and the reaction term for component *i*, respectively. The system of partial differential equations thus represents the coupling between (i) diffusion in the polymer solution, (ii) the hydrolysis reaction of urea to form ammonium ion and CO_3^{2-}, (iii) the dissociation equilibrium equations concerning on the one hand CO_2, HCO_3^-, CO_3^{2-} and on the other hand NH_3 and NH_4^+, (iv) the deprotonation reaction of $ChitNH_3^+$ to form $ChitNH_2$ and (v) the mass transfers at the upper interface (detailed later in the paper).

As in previous studies, the diffusion coefficients involved in the continuity equation were determined in pseudo aqueous solution, assuming that the chitosan did not significantly affect the diffusion of small species because of it very low mass fraction (less than 2%) [164]. The diffusion coefficients of the ions involved in the enzymatic gelation system were obtained at 25°C from handbooks [151]. The Table III. 5 reports the values of the diffusion coefficients at 25°C in aqueous solution. Since the chitosan concentration is very low in this system too (less than 3% w/v, its was assumed that the diffusion coefficients in chitosan solution were very close to those one in aqueous solution ([4, 5, 163]. The variations of the diffusion coefficients with the temperature and the solution viscosity were taken into account in the model. The diffusion coefficients of protonated and deprotonated form of chitosan were assumed to be negligible compared to the diffusion coefficients of small diffusive species.

Table III. 5: Diffusion coefficients at 25°C in aqueous solution

specie	D ($m^2.s^{-1}$)
H_2O	2.30 10^{-9}
Urea	1.38 10^{-9}
NH_4^+	1.96 10^{-9}
NH_3	2.07 10^{-9}
CO_2	1.73 10^{-9}
HCO_3^-	1.18 10^{-9}
CO_3^{2-}	0.92 10^{-9}
H_3O^+	9.31 10^{-9}
OH^-	5.27 10^{-9}

2.6 Heat transfer

The enzymatic chitosan reaction can be performed at various temperatures but the initial temperature of the solution should be always kept constant (5°C in the study). Therefore, heat transfer will occur in the system, thus affecting the chemical reaction rates during the enzymatic gelation. Depending on the system thickness and temperature increase rate, temperature gradients between the bottom and top surface of the system could also be formed, thus affecting locally the reaction rates.

For thin film geometry, uniform temperature was generally assumed [165] since heat transfer by conduction within the sample could be considered much faster than the heat production due to mass exchanges or chemical reactions. In such cases, a lumped parameter approach was shown to be sufficient to simulate the temperature variation of the system [4]. But for thicker geometry (deeper samples), uniform temperature in the whole sample could not be assumed and the heat equation should be solved. The transition between both approaches depends on the value of the Biot number that is expressed as:

$$\boldsymbol{Biot = \frac{hL_c}{k}} \qquad \textbf{\textit{Eq III. 32}}$$

Where h is the heat transfer coefficient, L_c is the characteristic length of the system and k is the thermal conductivity.

When the Biot number is less than 0.1, a lumped parameter approach can be used whereas for Biot

number higher than 0.1, the heat equation should be solved:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} - \nabla(k\nabla T) = Q \qquad \textit{Eq III. 33}$$

Where ρ (kg.m^{-3}), Cp (J.kg^{-1}.K^{-1}) and k (W.m^{-1}.K^{-1}) are the density, the heat capacity and the thermal conductivity, respectively. Q (W.m^{-3}) was a heat source term (production or consumption) that was assumed to be null in this model, thus assuming the heat of reaction negligible comparing to (i) heat transfers and (ii) heat vaporization due to evaporation or absorption. In the 1D model, since the sample thickness could vary from 500 µm (thin film) to 15 mm (deep cell), the Biot number could strongly vary and exceed 0.1 depending on the operating conditions, and therefore heat equation was solved in each case.

Assuming only transfers in the vertical x-axis, no source term and the coordinate transform, the heat equation can be rewritten as follows:

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial X}\left[\frac{k}{H(t)^2}\left(-\frac{\partial T}{\partial X}\right)\right] = 0 \qquad \textit{Eq III. 34}$$

2.7 Initial and boundary conditions

At initial time, the chitosan concentration is known and using the degree of deacetylation (DDA), the number of protonated ($Chit - NH_3^+$) and non-protonated ($Chit - NH_2$) sites can be calculated.

At t = 0$^-$ (just before the introduction of urea), the system is composed of chitosan (under D-glucosamine and N-Acetyl-glucosamine forms which can give (i) protonated and (ii) deprotonated forms of amino groups), water, hydrochloric acid (H_3O^+ and Cl^- ions), and does not contain neither CO_2 nor ammonia.

The initial conditions for this system are therefore written as follows:

$$\rho_i(0, X) = \rho_i^X(0) \qquad \textit{Eq III. 35}$$

$$H(0) = H_0 \qquad \textit{Eq III. 36}$$

Impermeable boundary conditions are considered at the substrate/solution interface:

$$X = 0, \quad -\frac{\partial \rho_i}{\partial X} = 0 \quad for\ i = 1\ to\ 11 \qquad \textit{Eq III. 37}$$

At the air/solution interface, Neumann conditions were considered for water, CO_2 and NH_3:

$$X = 1, \quad -\frac{D}{H(t)}\frac{\partial \rho_i}{\partial X} = J_i = k_{ci}\{\rho_{ig}^{i}(T^i) - \rho_{ig}^{\infty}(T^{\infty})\} \qquad \textit{Eq III. 38}$$

$\rho_{ig}^{i}(T^i)$ is the concentration of component *i* in the gas phase at the air/solution interface (at the temperature of the interface T^i) and $\rho_{ig}^{\infty}(T^{\infty})$ is the concentration of component *i* in the bulk (fabrication chamber at the temperature of the air T^{∞}). k_{ci} is the mass transfer coefficient, which will be discussed later in the model description.

The water concentration in gas phase bulk (ρ_{2g}^{∞}) can be deduced from the relative humidity in the bulk (RH):

$$\rho_{2g}^{\infty}(T^{\infty}) = \frac{RH\ P_2^0(T^{\infty})M_2}{RT^{\infty}} \qquad \textit{Eq III. 39}$$

The position of the air/solution boundary can be determined by a global mass balance:

$$\frac{dH(t)}{dt} = \frac{\sum_i J_i}{\rho_p} \qquad \textit{Eq III. 40}$$

Where ρ_p is the density of the polymer solution.

2.8 External transfers

The external mass and heat transfer coefficients were calculated by empirical correlations. In free convection conditions, the air motion is induced by a density change in the vicinity of the air/solution interface and the following correlation was used to express the mass transfer coefficient k_{ci} [155, 158]:

$$\frac{k_{ci}\, L_c\, y_{air,lm}}{D_{ig}} = 0,27\ (Gr\ Sc_i)^{0,25} \qquad \textit{Eq III. 41}$$

The Grashof number (*Gr*) allows calculating free convection due to density difference caused by composition gradients and/or temperature gradients near the air/solution interface:

$$Gr = \frac{L_C^3\, g\, \beta\, \rho_a}{\mu_a^2}\left|-\frac{1}{\rho_a}\left(\frac{\partial \rho_a}{\partial T}\right)_{P,y_i}(T^i - T^{\infty}) - \sum_i\left\{-\frac{1}{\rho_a}\left(\frac{\partial \rho_a}{\partial y_i}\right)_{P,T}(y^i - y^{\infty})\right\}\right| \qquad \textit{Eq III. 42}$$

$$Sc = \frac{\nu_i}{D_{ig}} \qquad \textit{Eq III. 43}$$

T^i and T^{∞} are the temperature at the interface and in the bulk, respectively. μ_a and ρ_a are the dynamic viscosity and the density of the air at the bulk temperature T^{∞}, respectively. L_c is the characteristic length of the system, β is the dilatation coefficient of water, $y_{air,lm}$ is the mean log of molar fraction of air between the air and the interface, ν_i is the viscosity of the air at the interface,

and D_{ig} is the diffusion coefficient of water or HCl in gas phase.

The whole physicochemical properties used in the model were taken from handbook tables (ref, [166, 167]) and the model takes into account the fact that the physico-chemical properties (μ_a, ρ_a, β) depend on the temperature.

The diffusion coefficients in gas phase were deduced form the following equation [168]:

$$\boldsymbol{D_{ig}} = \frac{\mathbf{1{,}43\ 10^{-7}}\boldsymbol{T}^{\mathbf{1{,}75}}}{\boldsymbol{PM_{i,g}^{0,5}}\left[(\sum \boldsymbol{V_d})_i^{1/3}+(\sum \boldsymbol{V_d})_g^{1/3}\right]^2} \qquad \textit{Eq III. 44}$$

$$\boldsymbol{M_{i,g}} = \frac{\mathbf{2}\ \boldsymbol{M_i M_g}}{\boldsymbol{M_i} + \boldsymbol{M_g}} \qquad \textit{Eq III. 45}$$

2.9 Numerical algorithm

The system of partial differential equations that described the coupling between the mass and heat transfer phenomena and the chemical reactions were numerically solved in one-dimension (x-axis) using finite element software: COMSOL Multiphysics® 5.1. The mesh was in the vicinity of the air/solution interface, i.e. in the region where the concentration gradients were expected to be the highest (X = 1). A variable time step was used in order to improve the numerical resolution.

3. Results and Discussion

3.1 Model validation in deep cell geometry

In a previous paper, a 0D model was developed to estimate the kinetic parameters of the whole chemical reactions involved during the chitosan formation. This model has been validated using experimental data obtained under various operating conditions; indeed, the temperature, the initial concentrations of urea and urease were the operating parameters that could be modified before conducting the experiments. The initial concentration of urea fixed the whole quantity of NH_4^+ available for the experiments; besides, the initial concentration of urease fixed the catalyzer quantity and the temperature had a strong effect on the chemical reaction kinetics.

The experiments used to estimate the model parameters were performed in a deep cell whose dimensions where: 15 mm height and 20.6 mm diameter. The 0D model did not take into account the mass transfers between the polymer solution and the external environment (water evaporation, CO_2 intake or extraction depending on the solution pH and NH_3 evaporation) and therefore the

model parameters could be slightly misevaluated.

The 1D model presented in this paper allows overcoming such limitations and is able to estimate the concentration profiles formed during the gelation process. At first, the 1D model was thus compared to the 0D model in the deep cell geometry under various operating conditions (T, urea concentration). The values of the parameters chosen for such comparisons between both models were taken from the previous paper (Chap III.1), where those parameters where fixed by experimental conditions. The urea concentration and pH variation were followed during time for such simulations. The values of the whole parameters used for the different simulation run were reported in the Table III. 6.

Table III. 6: Model parameters used for simulation run performed in deep and thin cell conditions – free convection conditions for external transfers

	$[Chitosan]_{init}$ ($g.L^{-1}$)	[urea] (mM)	[urease] ($u.L^{-1}$)	pH_{init}	T_{init} (°C)	T_{ext} (°C)	RH	solution thickness (mm)
Run 1	25	10	3500	4.67	5	25	50%	15
Run 2	25	25	3500	4.74	5	25	50%	15
Run 3	24.5	75	3500	4.78	5	25	50%	15
Run 4	24.4	100	3500	4.66	5	25	50%	15
Run 5	24.1	150	3500	4.77	5	25	50%	15
Run 6	24.4	200	3500	4.66	5	25	50%	15
Run 7	24.5	75	3500	4.64	5	37	50%	15
Run 8	24.5	75	3500	4.77	5	5	50%	15
Run 9	25	25	3500	4.7	5	25	50%	15
Run 10	25	25	3500	4.7	5	25	50%	0.5
Run 11	25	75	3500	4.7	5	25	50%	15
Run 12	25	75	3500	4.7	5	25	50%	0.5
Run 13	25	100	3500	4.7	5	25	50%	15
Run 14	25	100	3500	4.7	5	25	50%	0.5
Run 15	25	200	3500	4.7	5	25	50%	15
Run 16	25	200	3500	4.7	5	25	50%	0.5

Figure III. 16 represents the urea concentration versus time for increasing values of initial urea concentration (from 10 to 200 mM) for both the 0D and 1D model. In deep cell geometry, Figure III. 16 exhibits that the 0D and 1D models give very similar results in terms of urea concentration versus time in the whole range of urea concentrations. In each case, the decrease of the urea concentration is slightly faster with the 0D model (dotted line) comparing to 1D model (solid line). The difference between both simulation results increases when decreasing the initial urea concentration.

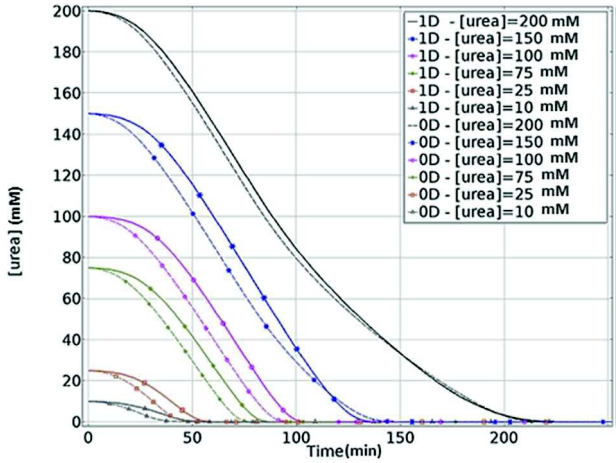

Figure III. 16: Urea concentration versus time for different initial urea concentrations – comparison between 0D and 1D model, H = 15 mm – run 1 to 6

The pH variation during the gelation process was also compared between 0D and 1D models for three operating conditions (simulations 2, 4, 6): initial urea concentrations of 25, 100 and 200 mM for a gelation temperature (meaning external temperature in 1D model) equal to 25°C, a chitosan concentration of 25 $g.L^{-1}$ and an urease concentration of 3500 $u.L^{-1}$. The results were reported in Figure III. 17a, b and c. The simulation results for 0D model are in black dotted line and those one for 1D model are represented in color in solid line with symbols; the pH value was followed at both the top and the bottom of the polymer solution whereas the average value was reported in blue solid line with triangle symbol (integration along the polymer solution thickness). Due to coordinate transform, X = 0 corresponds to the bottom of the polymer solution and X = 1 corresponds to the top surface. For the three conditions aforementioned, Figure III. 17 exhibits that the simulation results obtained with the 0D model were very close to the results obtained with the 1D model at the bottom surface of the polymer solution (X = 0). Both the average pH and the pH at the top surface of the polymer solution simulated by 1D model are lower than the pH at X = 0. These differences can be explained by the fact that the 1D model took into account the mass transfers of CO_2 and NH_3 during the process, on the contrary of the 0D model, which assumed closed system. Figure III. 17 shows that the value of the average pH is very close to the pH value at the bottom of the solution, but is very

different to the pH value at the top surface, suggesting that pH gradients are localized in the vicinity of the air/solution interface (top surface). Figure III. 17 exhibit that the difference between the pH values at the bottom and at the top surface are all the greater since the initial urea concentration was high. For instance, for an initial urea concentration of 200 mM, the pH value simulated at the bottom surface did not exceed 7.5 whereas its value was greater than 8.6 at the top of the polymer solution.

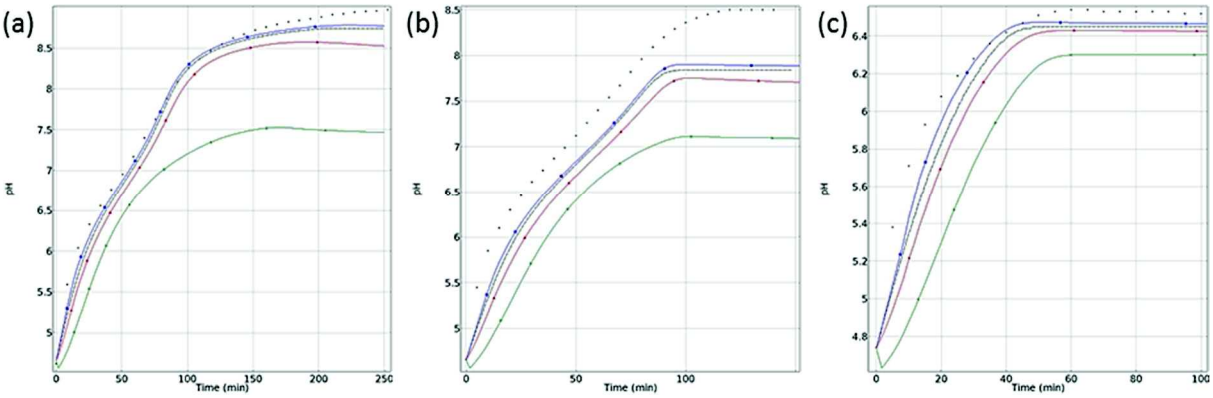

Figure III. 17: pH variation versus time for $[urea]_{init}$ = 25(c), 100(b), 200(a) mM – comparison between 0D and 1D model in deep cell geometry – run 2, 4, 6; 1D model: —○— X = 0 ; —✱— average value ; —△— X = 1 ; 0D model: ——

The comparison between 0D and 1D simulation results was also done at different temperatures, i.e. 5, 25 and 37°C, corresponding to the run 3, 7 and 8. For those simulations, the urea concentration was fixed at 75 mM and the urease concentration was maintained at 3500 $u.L^{-1}$. The simulations results are reported in Figure III. 18, and exhibit that the average pH calculated by the 1D model is in good agreement with the pH previously calculated by the 0D model.

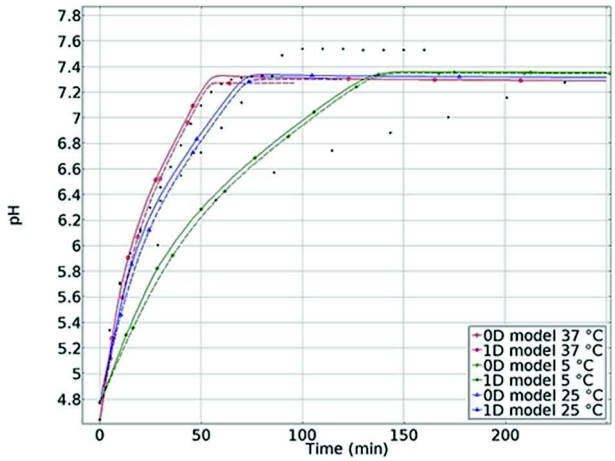

Figure III. 18: Influence of T on pH variation – comparison between 0D and 1D models on the average pH value, deep cell geometry – simulation run 3, 7 and 8.

3.2 Concentration profiles in deep cell geometry

3.2.1 pH profiles

Figure III. 19 represents the pH profiles determined by the 1D model at increasing time steps for two different conditions of initial urea concentration, 25 and 200 mM, at 25°C and for an urease concentration equal to 3500 u.L^{-1}. The pH profiles were reported during the first 50 minutes for an initial urea concentration of 25 mM and during the first 200 minutes at 200 mM of urea since the time to consume urea was strongly reduced at lowest initial concentration (cf. Figure III. 17). The simulations results reported in Figure III. 19 point out that pH gradients appear as soon as the process starts whatever the initial urea concentration and are mainly localized near the top surface of the polymer solution (X = 1). The decrease of pH value at the vicinity of the top surface is due to the CO_2 intake within the solution, especially during the first minutes of the process. Indeed, the initial CO_2 concentration in the solution is null, and hence the driving force for mass transfer of CO_2 is maximum.

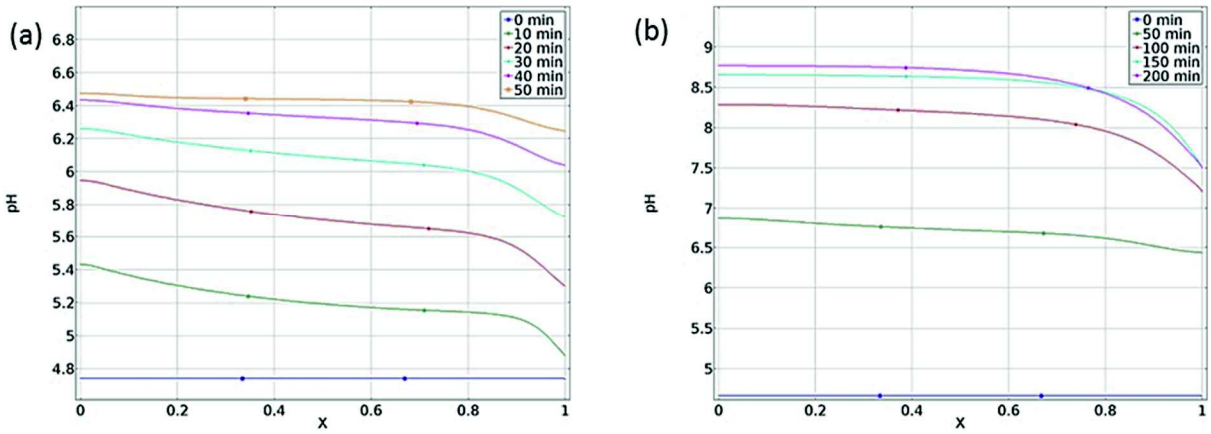

Figure III. 19: profiles versus time for increasing initial urea concentrations (a: 25 mM and b: 200 mM) – run 2 and 6

3.2.2 *Concentration profiles of CO_2 and NH_3*

To better understand the variation of the pH profiles during time, the concentration profiles of CO_2 and NH_3 were represented in Figure III. 20 at the same time steps as reported in Figure III. 19.

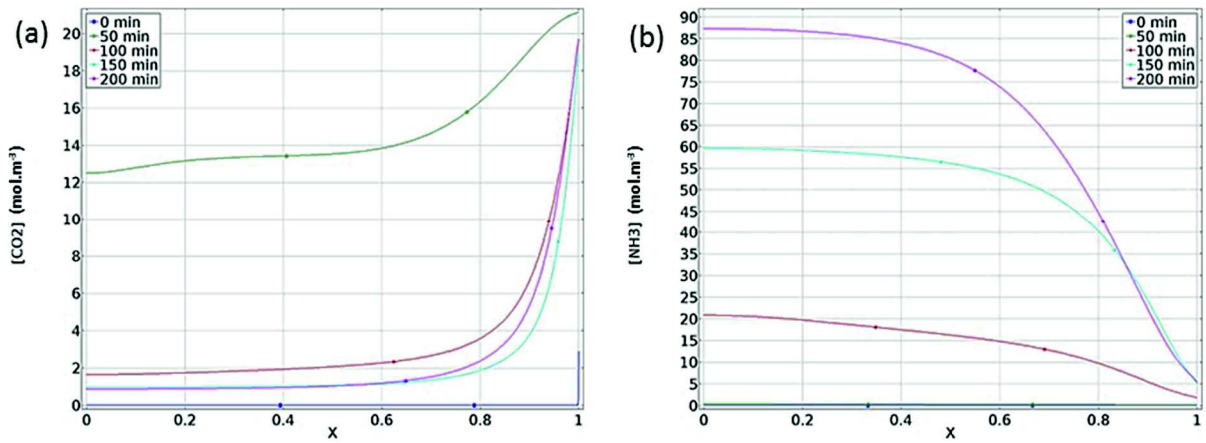

Figure III. 20: CO_2 (a) and NH_3 (b) concentration profiles for an initial urea concentration of 200 mM

Figure III. 20 clearly exhibits that the concentration profiles of CO_2 and NH_3 are not flat during the whole process, with strong concentration gradients near the top surface of the solution. As aforementioned, CO_2 enters into the polymer solution as soon as the polymer solution is exposed to the ambient atmosphere, thus leading to the formation of concentration gradients. At the beginning of the process, the pH of the solution is low (less than 5) therefore the CO_2 exists in solution, explaining why the profile of CO_2 is characterized by a low concentration gradient after 50 minutes. Later, because of urea degradation (Reaction III. 1 in Table III. 3), the pH progressively increases during the process, therefore the CO_2 is transformed into HCO_3^- form (and CO_3^{2-} form depending on pH value) and the driving force is maintained high until the end of the process. Higher CO_2 concentration gradients are thus formed after 100 minutes. Due to the equilibrium reactions

involving CO_2, HCO_3^- and CO_3^{2-} (reactions 3 and 4 in Table III. 3), the concentration of CO_2 that enters within the system remains very low during the main part of the process far from the top surface since it is consumed before diffusing towards the bottom of the solution. In parallel, ammonia (NH_3) is formed during the hydrolysis of urea; its concentration remains very low during the first 50 minutes because of low pH value. After 100 minutes, NH_3 concentration gradually increases until the end of the process and concentration gradient are formed near the air/solution interface because of ammonia evaporation. At the vicinity of the top surface, the ammonia concentration depends on the pH value, which mainly depends on the CO_2 concentration; since CO_2 continuously enters within the system through the air/solution interface, the pH tends to decrease locally in this region, thus leading to reduce the ammonia concentration.

3.2.3 Temperature and kinetic reaction rate profiles within the solution during time

The solution temperature is initially maintained at 5°C and during the process the bottom temperature is at 25°C. Due to heat transfers at the bottom surface (by conduction) and at top surface (heat transfer by free convection from ambient atmosphere to the solution) the solution temperature increases gradually with time. In deep cell geometry, since the solution thickness is important, high temperature gradients are formed during the process, as proved by Figure III. 21.

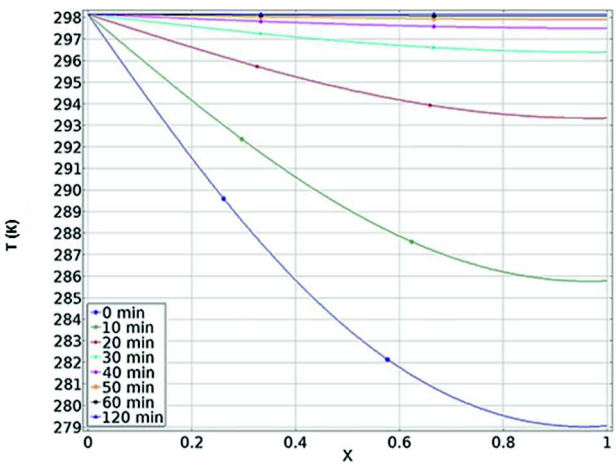

Figure III. 21: Temperature profiles for an initial urea concentration of 200 mM, T_{init} = 25°C, deep cell geometry – run 6

The equilibrium temperature is almost reached after 50 minutes in the solution. During this period, the temperature gradient within the solution could affect the chemical reactions involved in the chitosan gelation. Figure III. 22 thus reports the profiles of (i) the kinetic reaction rate of urea hydrolysis (r_{hydro}) and (ii) the urea concentration. During the first minutes of the process, between 0 and 50 minutes, the temperature gradient exhibited in Figure III. 21 did not significantly affect the

kinetic reaction rate r_{hydro} and only weak gradients appear near the top surface of the solution.

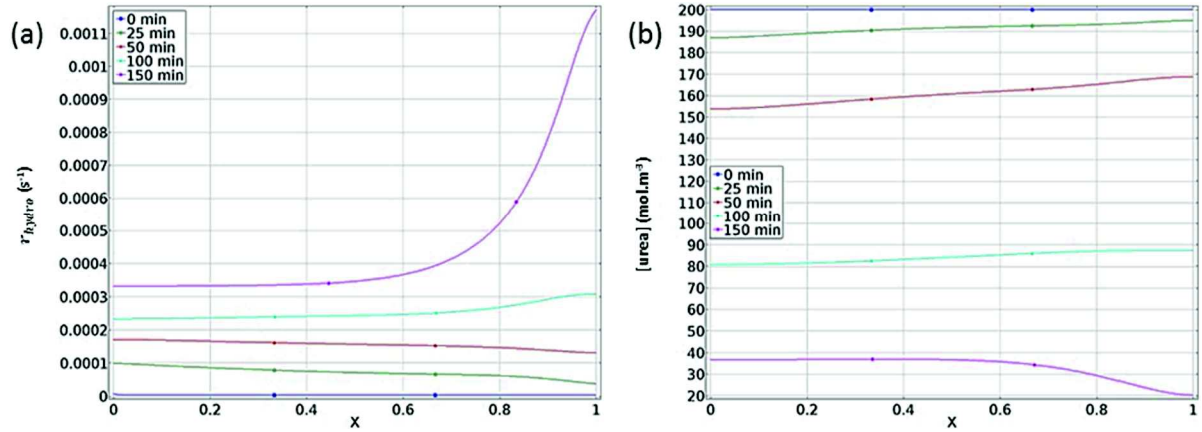

Figure III. 22: r_{hydro} (a) and urea concentration (b) profiles versus time for initial urea concentration equal to 200 mM, deep cell geometry – simulation run 6

In parallel, the urea concentration gradient seems in agreement with the profile of r_{hydro} since slightly higher values of urea concentration are localized near the top surface. After 150 minutes (for an initial urea concentration of 200 mM), the profile of r_{hydro} suddenly changes, exhibiting strong gradients in the region of the top surface (between X = 0.8 and X = 1); such trend can be explained by the significant decrease of the urea concentration at the end of the process when almost the whole urea hydrolyzed, especially in this specific region due transfer phenomena and pH gradients. Indeed, in the region near the top surface, the urea concentration is less than 15% of the initial concentration.

In deep cell geometry, the comparison between 0D and 1D simulation results exhibits that the mass transfer of carbon dioxide and ammonia could affect the whole phenomena involved in the chitosan gelation by enzymatic reaction. Due to CO_2 intake, the pH is modified during the process, thus affecting the chemical reactions; in parallel, NH_3 tends to evaporate at the end of the process, when the pH value increases due to continuous urea hydrolysis. In this case too, such a transfer has an influence on the chemical reactions (urea hydrolysis and equilibrium reactions).

Those first simulations were performed in deep cell geometry for comparison with previous experimental data obtained in this geometry and with the 0D simulations published in a previous paper. However, chitosan membranes formation involves thin film geometry (less than 1 mm) and hence it is now crucial to simulate, with the 1D model developed in this paper, the mass transfer phenomena coupled to chemical reactions, in thin film geometry rather than in deep cell geometry.

3.3 Simulations in thin film conditions

3.3.1 Urea concentration

Figure III. 23 reports the comparison between the simulation results obtained using the 1D model for different initial urea concentrations and two different initial solution thicknesses: 15 mm (deep cell geometry) and 0.5 mm (thin film geometry). The whole other parameters of the model were kept identical for all simulation runs (run 9 to 16 in Table III. 6).

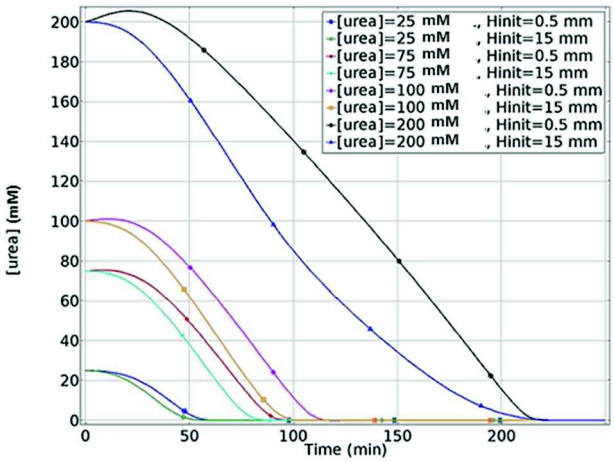

Figure III. 23: Urea concentration versus time for different initial urea concentrations in deep cell and thin film geometries – run 9 to 16

Figure III. 23 exhibits that the decreasing rate of urea consumption during time is significantly affected by the solution thickness, i.e. by the transfer phenomena. At the beginning of the process, Figure III. 23 shows that the urea concentration slightly increases and reaches a maximum after 20 minutes for an initial urea concentration of 200 mM. The same phenomenon could be observed at lower initial concentration (100, 75 and 25 mM in Figure III. 23) by doing a zoom in the figure near the first minutes of the process. Such an increase in the urea concentration is related to the decrease of the solution due to continuous water evaporation. Indeed, although water evaporation rate is not significantly influenced by the geometry (deep cell or thin film), the surface/volume ratio is strongly enhanced in thin film geometry conditions: this ratio is initially equal to 67 in deep geometry (initial solution thickness equal to 15 mm) but higher than 2000 in thin film geometry. The surface/volume ratio is therefore more than 30 times higher in thin film geometry than in deep cell geometry, thus explaining why the mass transfers have much stronger influence on the whole gelation process. For instance, Figure III. 24 represents the variation of the solution thickness during the gelation process under 50% RH, with an external temperature of 25°C and an initial urea concentration of 200 mM (run 16 in Table III. 6). The same figure could have been plotted for different initial urea

concentration but the results are almost identical. Figure III. 24 shows that the thickness does not change a lot in deep cell geometry (less than 2.2% comparing to initial thickness after 250 min) but in thin film geometry, the solution thickness is less than 40% of the initial thickness after 250 min, thus leading to a significant increase of the concentration of the whole species in the chitosan solution.

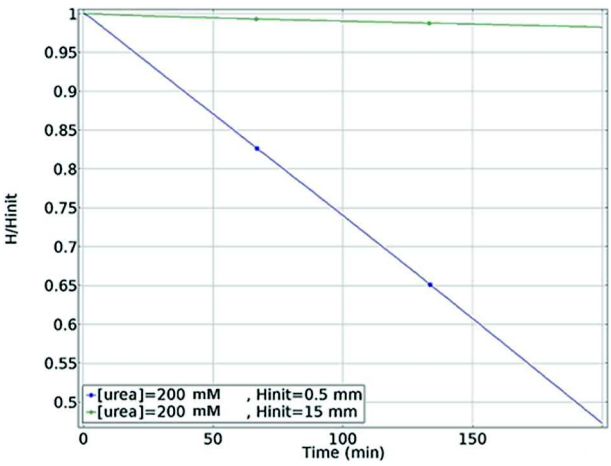

Figure III. 24: Variation of the solution thickness in deep cell and thin film geometries – run 16

3.3.2 pH variation in thin film geometry

Figure III. 25 represents the pH variation at the bottom (X = 0), at the top (X = 1), and the mean pH (from integration along the whole thickness) in deep cell and thin film geometries, for an initial urea concentration of 200 mM. This figure clearly points out that the curves are almost overlapped in thin film geometry, on the contrary of the curves obtained in deep cell geometry. This result suggests that the concentration gradients are very weak in thin film geometry whereas Figure III. 20 previously exhibited that they could be significant in deep cell geometry. From this result, it was decided to show only the variation of mean pH versus time in thin film geometry for the other operating conditions to improve figure clarity.

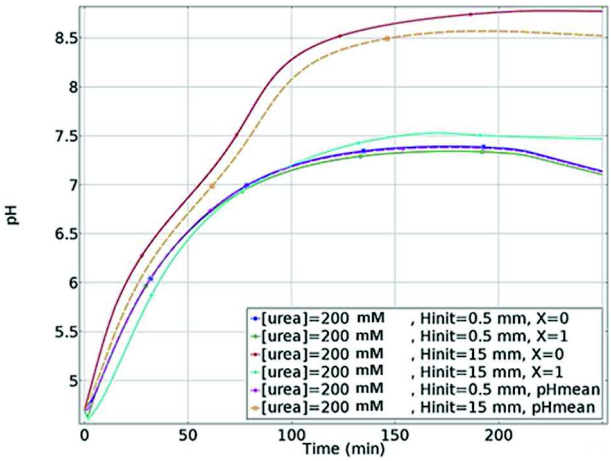

Figure III. 25: pH variation versus time in deep cell and thin film geometries – run 16

Consequently, Figure III. 26a,b,c,d report the mean pH variation versus time in deep cell and thin film geometries for different initial urea concentrations (200, 100, 75 and 25 mM). This figure exhibit that the difference between the curves is all the greater since the initial urea concentration is high, whereas the differences in terms of initial thickness keep the same value (0.5 and 15 mm). This can be explained by the fact the pH variation is mainly affected by the variation of CO_2 and NH_3 concentrations, which affect the equilibrium reactions involving also NH_4^+, HCO_3^-, CO_3^{2-}. In deep cell geometry, the influence of the transfers on the whole quantity of the species is much less than in thin film geometry.

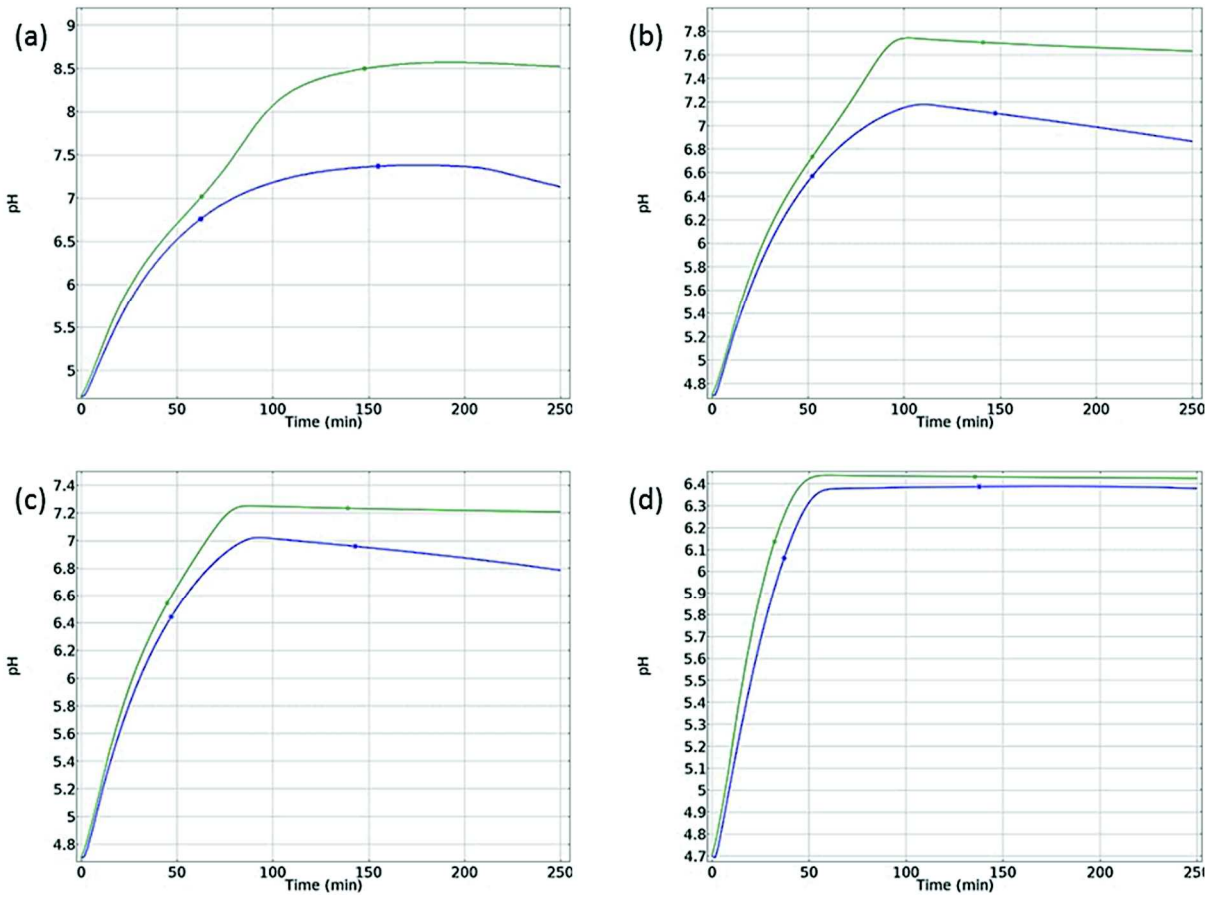

Figure III. 26: Mean pH variation versus time for different initial urea concentrations (a: 200 mM; b: 100 mM; c: 75 mM; d: 25 mM) in deep cell and thin film geometries – run 9 to 16; Mean pH value: —○— H_{init} = 15 mm ; —✱— H_{init} = 0.5 mm

Figure III. 27 illustrates this phenomenon, by representing the relative influence of the transfers of CO_2 and NH_3 in deep and thin film geometries. Figure III. 27a reports the ratio between the flux of CO_2 and NH_3 during the gelation process divided by the mean CO_2 and NH_3 concentration, respectively. Figure III. 27a exhibits that the relative CO_2 flux is higher in deep cell than in thin film geometry. At the beginning of the process, CO_2 concentration is null, thus the ratio is very high and then it decreases until almost zero when the pseudo equilibrium is reached (after about 50 minutes in deep cell geometry). In both geometries, the pH value is increasing due to NH_3 production by urea hydrolysis, thus leading to CO_2 intake, especially in deep geometry. Indeed, the ammonia production is related to the whole solution volume whereas the transfer phenomena are linked to the transfer area (top surface in this case), and hence the production rate is higher than the transfer rate in deep cell geometry, inducing a higher pH increasing rate.

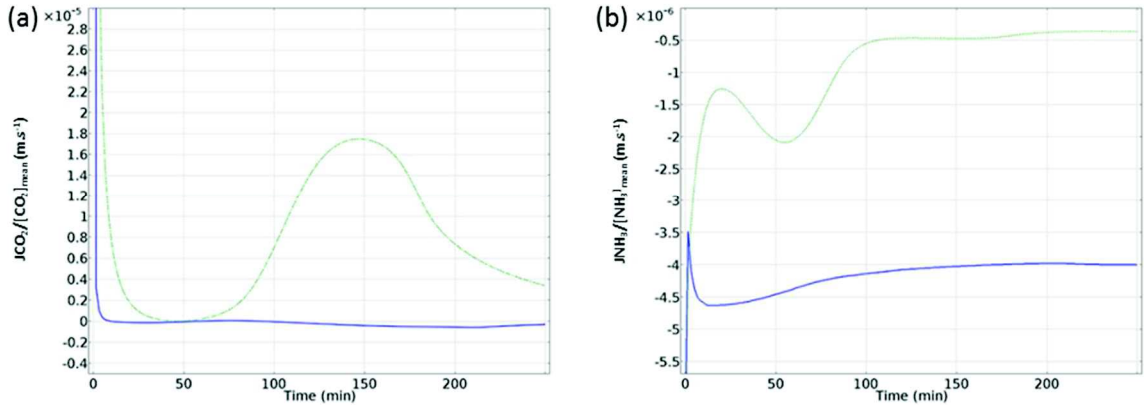

Figure III. 27: Variation of the ratios between the fluxes and the mean concentration of CO_2 and NH_3 (a: $JCO_2/[CO_2]_{mean}$ and b: $JNH_3/[NH_3]_{mean}$) during time in deep cell and thin film geometries – run 16; Mean pH value: --- H_{init} = 15 mm ; — H_{init} = 0.5 mm

In this case, the equilibrium for CO_2 is displaced and CO_2 transfers from the external environment to chitosan solution for reducing the concentration gradient induced by ammonia production. In thin film geometry, the production rate is much less than in deep geometry due to much lower volume and therefore CO_2 intake rate is much lower too. In parallel, NH_3 evaporation rate (absolute value of NH_3 flux) is always higher in thin film geometry for the same reasons, exhibiting how strong is the influence of the transfer in thin film geometry comparing to deep cell one. Of course, Figure III. 27a explains why in deep cell geometry the pH value was low at the top surface (Figure III. 17a,b,c): CO_2 transfer rate is high but the solution thickness is high too, and since its diffusion within the solution is slow, the CO_2 concentration is high only in a thin region in the vicinity of the air/solution interface. In the main part of the solution thickness, the production of ammonia is faster than (i) its diffusion toward the top interface and then its evaporation and (ii) the intake of CO_2 and then its diffusion toward the solution bottom.

3.3.3 Which operating conditions for ensuring complete gelation in thin film geometry?

3.3.3.1 Urea concentration

Based on those results, Figure III. 26 is more comprehensible and gives useful indications concerning the operating conditions that should be chosen to conduct the enzymatic gelation process. Indeed, Figure III. 26 shows that the mean pH value reaches lower values in thin film than in deep cell geometry. Here, it should be reminded that the concentration and pH profiles along the thickness are expected to be flat regarding the small differences between the pH curves in Figure III. 25 in thin film geometry. In this context, the average pH value is representative of the pH in the whole solution volume. A previous study exhibited that two pH values are important in the gelation process: the pH

corresponding to the gelation point (intersection of the viscous and elastic modulus during rheological measurements), named the gelation pH, and the pH corresponding to the advanced gelation (the solution does not flow when the cell is returned) (Chap III.1). The first gelation pH was close to 6.5 and the advanced gelation pH was close to 7.35. The previous 0D model developed in closed system and that focused on chemical reaction equilibria, exhibited that a minimum initial urea concentration was necessary to reach both the gelation and advanced gelation pH values. For instance, Figure III. 26 shows that in deep cell geometry, an initial urea concentration of 75 mM would be sufficient to reach the gelation pH (reached after 43 min) but not the advanced gelation pH as the maximum pH value reached after 80 min is only equal to 7.25. For lower value of initial urea concentration, the previous results demonstrated that in closed system the advanced gelation could never been obtained.

Herein, the 1D model is more useful that the 0D model since it takes into account the transfer at the interface. It is therefore expected to be more precise and relevant than the 0D model, and it is otherwise applicable in a wider range of operating conditions and especially in thin film geometries. Based on the simulation results obtained with the 1D model (Figure III. 26), new predictions can be done concerning the minimum initial urea concentration necessary to reach the complete gelation (with the same other operating conditions reported in Table III. 7). Indeed, the model exhibited that in thin film geometry, the advanced gelation pH was reached only when the initial urea concentration was equal to 200 mM. For lower values, the first gelation pH could be reached (at 100 and 75 mM for instance), but the final pH value was too low to ensure the advanced gelation. Such results were of great interest since previous experiments conducted in thin film geometry in parallel to the model development showed that it was very difficult to reach the complete gelation (advanced gelation pH) in thin film geometry whereas the 0D model seemed to indicate that it was theoretically possible. In this context, the 1D model is more powerful than the 0D model and is a more reliable tool for predicting the gelation process whatever the geometry and the operating conditions.

Moreover, the 1D model exhibits that the pH value increases due to ammonia production, reaches a maximum and then decreases until the end of the process. Such a phenomenon is mainly due to CO_2 intake but also in a lesser extended NH_3 evaporation (in the vicinity of the air/solution interface), as demonstrated the variation of fluxes during time reported in Figure III. 27. Consequently, when the maximum pH value is close to the advanced pH value, it should be interesting to estimate

experimentally the time necessary to stay at the advanced gelation pH to ensure the complete gelation. This raises the question of the gelation reversibility in a small range of pH around the advanced gelation pH. Supplementary experiments will be required in the future to answer the question.

3.3.3.2 Urease concentration

Moreover, it was also interesting to investigate the influence of the urease concentration on the gelation dynamics. For this purpose, the pH variation versus time was plotted for increasing urease concentration (Figure III. 28).

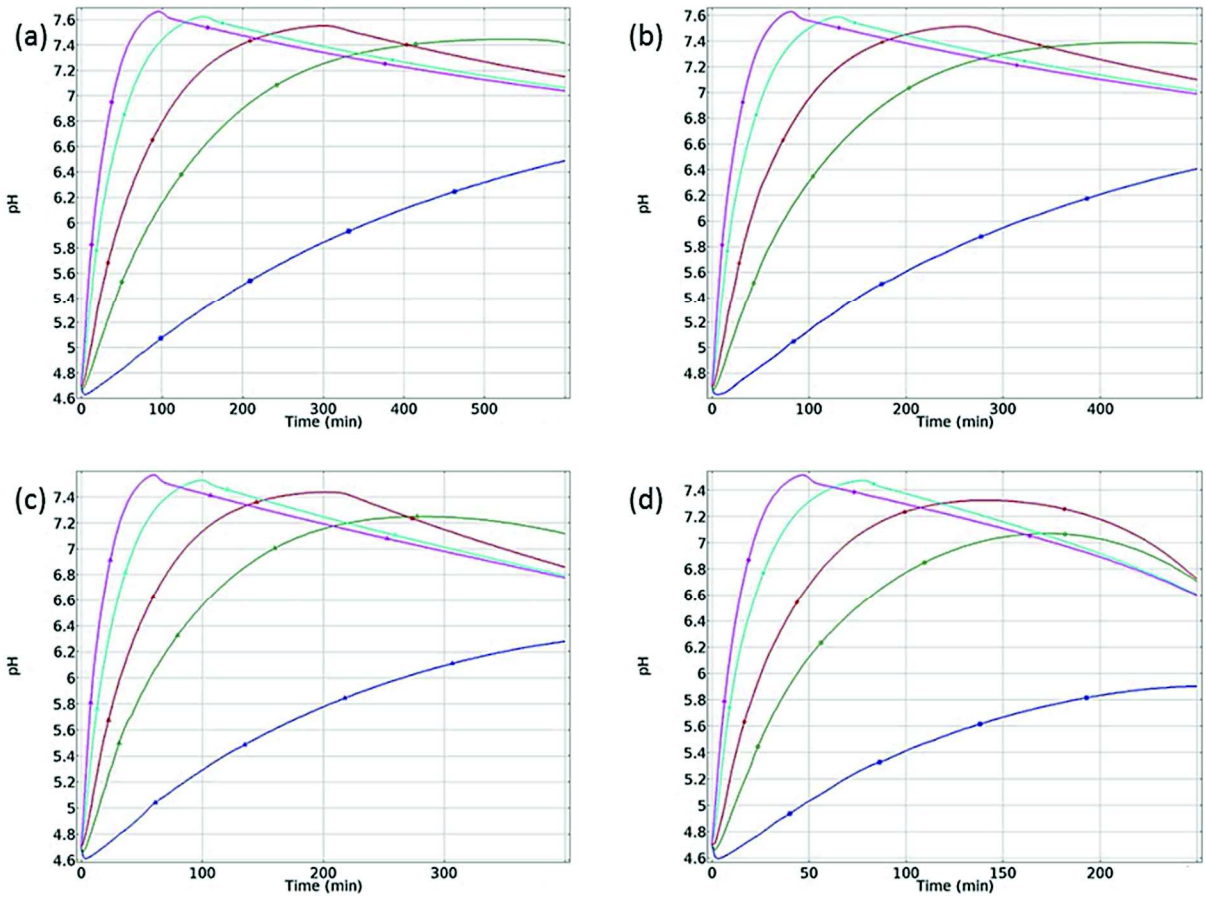

Figure III. 28: Mean pH variation versus time for different initial external temperature T_{ext} (a: 5°C run 17-21; b: 10°C run 22-26; c: 20°C run 25-28; d: 30°C run 29-32) and urease concentrations in thin film geometries – run 17 to 36; —✱— [urease] = 0.5 u.mL^{-1}; —○— [urease] = 2 u.mL^{-1}, —◇— [urease] = 3.5 u.mL^{-1}, —■— [urease] = 6.7 u.mL^{-1}, —✚— [urease] = 10.5 u.mL^{-1}

Table III. 7: Model parameters used for simulation run performed in thin film conditions – free convection conditions for external transfers

	$[Chitosan]_{init}$ ($g.L^{-1}$)	[urea] (mM)	[urease] ($u.L^{-1}$)	pH_{init}	T_{init} (°C)	T_{ext} (°C)	RH	solution thickness (mm)
Run 17	25	200	500	4.7	5	5	50%	0.5
Run 18	25	200	2000	4.7	5	5	50%	0.5
Run 19	25	200	3500	4.7	5	5	50%	0.5
Run 20	25	200	6700	4.7	5	5	50%	0.5
Run 21	25	200	10500	4.7	5	5	50%	0.5
Run 22	25	200	500	4.7	5	10	50%	0.5
Run 23	25	200	2000	4.7	5	10	50%	0.5
Run 24	25	200	3500	4.7	5	10	50%	0.5
Run 25	25	200	6700	4.7	5	10	50%	0.5
Run 26	25	200	10500	4.7	5	10	50%	0.5
Run 27	25	200	500	4.7	5	20	50%	0.5
Run 28	25	200	2000	4.7	5	20	50%	0.5
Run 29	25	200	3500	4.7	5	20	50%	0.5
Run 30	25	200	6700	4.7	5	20	50%	0.5
Run 31	25	200	10500	4.7	5	20	50%	0.5
Run 32	25	200	500	4.7	5	30	50%	0.5
Run 33	25	200	2000	4.7	5	30	50%	0.5
Run 34	25	200	3500	4.7	5	30	50%	0.5
Run 35	25	200	6700	4.7	5	30	50%	0.5
Run 36	25	200	10500	4.7	5	30	50%	0.5

Run 37	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**5**	**60%**	**0.5**
Run 38	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**5**	**75%**	**0.5**
Run 39	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**5**	**95%**	**0.5**
Run 40	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**5**	**60%**	**0.5**
Run 41	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**5**	**75%**	**0.5**
Run 42	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**5**	**95%**	**0.5**
Run 43	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**30**	**60%**	**0.5**
Run 44	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**30**	**75%**	**0.5**
Run 45	**25**	**200**	**2000**	**4.7**	**5**	**30**	**95%**	**0.5**
Run 46	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**30**	**60%**	**0.5**
Run 47	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**30**	**75%**	**0.5**
Run 48	**25**	**200**	**10500**	**4.7**	**5**	**30**	**95%**	**0.5**
Run 49	**25**	**150**	**3500**	**4.7**	**5**	**5**	**50%**	**1**
Run 50	**25**	**150**	**3500**	**4.7**	**5**	**5**	**50%**	**1.5**
Run 51	**25**	**150**	**3500**	**4.7**	**5**	**25**	**50%**	**1**
Run 52	**25**	**150**	**3500**	**4.7**	**5**	**25**	**50%**	**1.5**

The simulations were performed at increasing external temperatures, i.e. 5°C, 10°C, 20°C and 37°C and the same initial urea concentration (200 mM). This curves show that the pH variation is clearly more affected by the urease concentration than by the temperature, even if a higher temperature leads, as expected, to higher pH increasing rate. Indeed, high temperatures favor the hydrolysis rate of urea and therefore the production of ammonia in the chitosan solution, thus inducing a faster pH increasing rate. Figure III. 28 exhibits that the urease concentration has a strong effect on the pH variation during the process, which was also expected to some extend since the urease is precisely the catalyzer of urea hydrolysis reaction. At given temperature, the influence of the urease concentration is all the higher since the urease concentration is low. Indeed, Figure III. 29 represents the gelation and advanced gelation times versus the temperature as a function of the urease concentration. Figure III. 29 shows that the gelation pH is achieved for each operating condition whereas advanced gelation pH is not reached when the temperature increases for urease concentrations of 2 and 3.5 $u.mL^{-1}$ because the maximum decreases when temperature increases (Figure III. 28). The temperature has hardly any influence on the advanced gelation time and gelation when the concentration of urease increases, the gelation time is divided by 2 for a urease concentration of 2 $u.mL^{-1}$ (from 135 to 68.8 min) when the temperature increases from 5 to 37 ° C while the temperature has little influence for urease concentration of 10.5 $u.mL^{-1}$ (from 54.8 to 27.75 min).

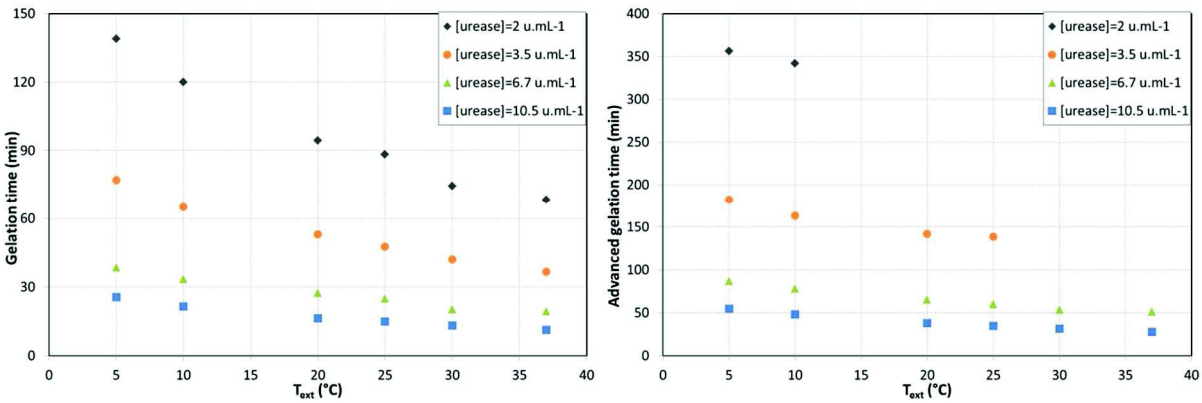

Figure III. 29: Gelation and advanced gelation time versus the external temperature at increasing urease concentration – run 17 to 32

3.3.3.3 Relative humidity

The previous simulation results obtained with a relative humidity of 50% exhibit that the water evaporation may have a significant influence on the solution thickness variation, and hence on the concentration of the whole species within the chitosan solution. More, Figure III. 28 points out that

the advanced gelation time is not reached for the whole operating conditions; more precisely, a high temperature combined to a relative low urease concentration (for instance 30°C and less than 3500 u.L^{-1} of urease) does not allow reaching the advanced gelation pH. At 30°C, at higher urease concentrations (6700 and 10500 u.L^{-1}), the advanced gelation pH is reached but due to evaporation and mass transfers, the pH decreases after having reached its maximum value close to 7.5. Since the water evaporation is driven by the relative humidity in the external atmosphere, simulation run were performed at increasing RH values (60%, 75% and 95%) to find the most appropriate conditions. Figure III. 30 represents the simulation results obtained in thin film conditions, with an initial urea concentration of 200 mM, two temperatures (5°C and 30°C) and two different urease concentrations (2000 and 10500 u.L^{-1}).

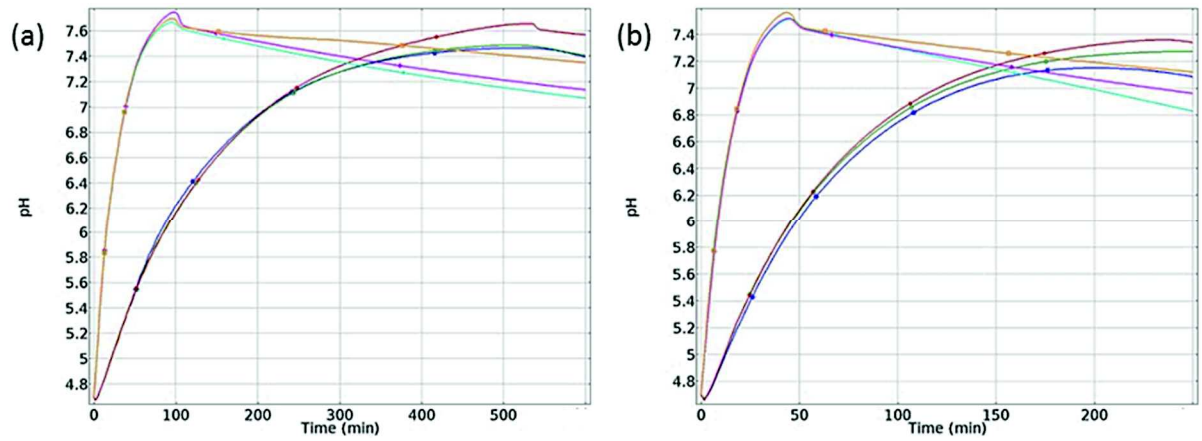

Figure III. 30: Mean pH variation versus time for different initial external temperature T_{ext} (a: 5°C run 37-42; b: T_{ext} = 30°C run 43-48) and urease concentrations in thin film geometries – run 37 to 48; —✱— [urease] = 2000 u.mL^{-1} RH = 60%; —○— [urease] = 2000 u.mL^{-1} RH = 75%, —◇— [urease] = 2000 u.mL^{-1} RH = 95%, —■— [urease] = 10500 u.mL^{-1} RH = 60%, —✚— [urease] = 10500 u.mL^{-1} RH = 75%, —□— [urease] = 10500 u.mL^{-1} RH = 95%

Figure III. 30 shows that whatever the temperature the time to reach the gelation pH is not affected by the relative humidity, unlike the urease concentration that is significant. Nevertheless, at 30°C the simulation results indicate that the advanced gelation pH cannot be reached for a too low urease concentration (2000 u.L^{-1}) when the relative humidity is less than 95%. On the contrary, at 5°C, the advanced gelation pH (7.35) is reached whatever the operating conditions chosen for those simulation run, i.e. even for the lowest RH tested (60%). This is due to the fact that at 5°C the reaction rates are lower than at 30°C and the time to reach the gelation and the advanced gelation time are higher: the time to reach the gelation time is close to 25 min at 5°C and only half (13 min) at 30°C for an urease concentration of 10500 u.L^{-1} (130 min and 75 min for an urease concentration of 2000 u.L^{-1} at 5 and 30°C, respectively); in the same time, the time to reach the advanced gelation

time is close to 50 min at 5°C and only 30 min at 30°C for an urease concentration of 10500 $u.L^{-1}$ (300 min and 220 min for an urease concentration of 2000 $u.L^{-1}$ at 5 and 30°C, respectively).

3.3.3.4 Summary

Finally, the previous exhibit the following trends:

- A minimum urea concentration is required in thin film conditions to reach the advanced gelation time (between 100 and 200 mM).
- A minimum urease concentration is required to accelerate the gelation rate (an appropriate urease concentration seems to be close to 3500 u.L-1).
- Higher the temperature, faster the gelation rate, but higher the evaporation rate as well, which does not favor the pH increase above the advanced gelation pH. Low temperature conditions will therefore be preferred for conducting the enzymatic chitosan gelation.
- The thickness of the casting solution has also a significant influence on the mass transfers between the film and the external atmosphere because of high ratio surface per volume. The previous results suggested that an initial thickness weakly higher than 500 µm should be chosen for performing the gelation experiments, all the more since the chitosan is low concentrated within the solution.

Consequently, last run where performed using suggested appropriate operating conditions mentioned in the previous paragraph: $[urea]_{init}$ = 150 mM, [urease] = 3500 $u.L^{-1}$, [chitosan] = 25 $g.L^{-1}$, initial thicknesses of 1 and 1.5 mm and temperatures of 5 and 25°C (simulation run 49 to 52). The results are presented in Figure III. 31 and confirm that a temperature of 5°C should be preferred to 25°C to be sure to reach a pH of 7.35 (advanced gelation pH). At this temperature, the initial thickness will have a weak influence on the gelation dynamics since the gelation and the advanced gelation time will be reached almost at the same times.

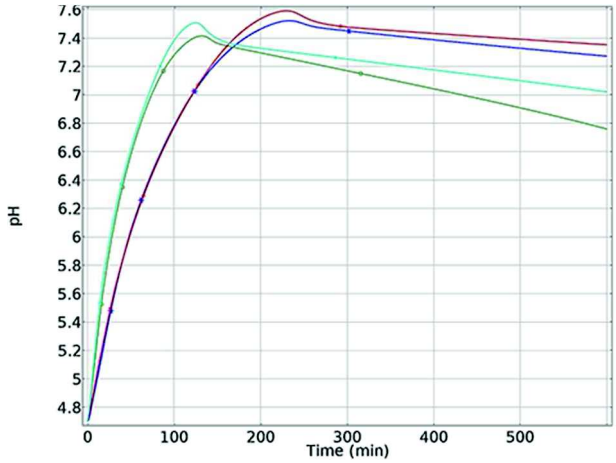

Figure III. 31: Mean pH variation versus time for different initial external temperature Text (5 and 25°C) and two initial solution thicknesses – run 49 to 52; —✱— Text = 5°C Hinit = 1 mm, —○— Text = 25°C Hinit = 1 mm, —◇— Text = 5°C Hinit = 1.5 mm, —■— Text = 25°C Hinit = 1.5 mm

4. Conclusion

Herein, a 1D model was developed to simulate the enzymatic gelation of chitosan in real conditions, i.e. thin film geometry where a solution is cast onto a support and have a thickness less than 2 mm. Mass and heat transfer phenomena were included in the model and coupled to the chemical reactions involved during the gelation (urea hydrolysis, equilibrium reactions, deprotonation of chitosan). Mass transfer involved water and ammonia evaporation and carbon dioxide transfer (intake and evaporation depending on the gelation process stage). Heat transfer was solved to take into account the temperature gradient within the polymer solution, especially in deep cell geometry. The 1D model was first compared to 0D model developed in a previous paper and showed a very good agreement. Moreover the comparison of the simulation run performed by the 0D and 1D models in deep geometry exhibited that the transfer phenomena had a weak influence on the gelation dynamics in deep cell geometry.

The 1D model was used to simulate the gelation rate in thin film geometry. The simulation results exhibited that the mass transfers have a significant influence on the pH variation in thin film geometry because the ratio surface/volume is much higher than in deep geometry. Water evaporation leads to a decrease of the solution thickness during the process, thus inducing an increase of the concentration of all the other species; in the same time, ammonia evaporation and carbon dioxide induce an acidification of the solution, thus limiting the pH increase and the maximum pH value reached during the process. Comparing the simulation results performed in thin

film and deep cell geometries, it was shown that the advanced gelation pH is not reached for all the operating conditions. Minimum values of the urea and urease concentration required to reach the advanced gelation pH are thus close to 150 mM and 3500 $u.L^{-1}$, respectively. The temperature was shown to affect the gelation rate as well: higher the temperature, higher the gelation rate. Finally, the 1D model was useful to demonstrate that the external operating conditions could have a few influence on the gelation rate, although the relative humidity controls the water evaporation rate, and hence the volume reduction rate of the solution.

Optimized operating conditions for conducting the enzymatic chitosan gelation were therefore found using the 1D model, with respect to the constraints of the process: minimizing the urea and urease concentrations while being sure to reach the gelation and the advanced gelation pH. These operating conditions could be used to conduct real experiments in thin film geometry for preparing membranes from chitosan.

Conclusion du Chapitre III

La première partie de ce Chapitre III a permis de mettre en place un modèle décrivant la cinétique de gélification par voie enzymatique du chitosane et de déterminer ses différents paramètres enzymatiques et cinétiques. Ce modèle a pu être validé, à l'aide des résultats expérimentaux du Chapitre II, au travers de la mesure du pH et de la détermination des temps de gélification et de gélification avancée. Cependant, quelques écarts sont observés entre modèle et expérience dans certains cas : (i) le modèle semble sous-estimer la valeur finale du pH pour les concentrations en urée supérieures à 50 mM probablement à cause d'une incertitude sur les caractéristiques du chitosane (pKa, MM et DDA) qui sont utilisées pour calculer la quantité de groupements amines du chitosane et ainsi la concentration en urée ; des écarts sont visibles également (ii) pour les faibles températures probablement à cause d'un écart sur la loi d'Arrhenius intervenant dans la cinétique réactionnelle de l'uréase qui n'est utilisée qu'à partir de 20°C pour le milieu aqueux (iii) lorsque le pH est compris entre 7 et 8 à cause du CO_2 présent dans cette gamme de pH et qui pourrait s'échanger avec le milieu extérieur, ainsi qu'à une possible inhibition de l'enzyme par l'ammonium, également présent dans cette gamme de pH. Les paramètres cinétiques déterminés pour le modèle en milieu chitosane sont proches de ceux utilisées dans la littérature pour le milieu aqueux (tamponné ou non-tamponné).

En appliquant ce modèle au milieu aqueux non tamponné sans chitosane (milieu dans lequel l'évolution du pH est seulement due à la production d'ammoniaque en solution), il a été montré que le fort ralentissement de l'évolution du pH dans le milieu chitosane était seulement lié à l'équilibre acide-base du chitosane et que les phénomènes de sorption entre le chitosane et l'urée ou la forte viscosité de la solution qui diminuerait les transferts dans le mélange n'intervenaient pas.

La comparaison des cinétiques d'hydrolyse enzymatique en milieux aqueux avec ou sans chitosane a permis de mettre en évidence et de comprendre les différences, notamment sur le plateau de pH obtenu en fin de réaction. Dans le cas du milieu aqueux sans chitosane, ce plateau est en effet un plateau « apparent » lié à un fort ralentissement de la réaction enzymatique due à des conditions défavorables de pH (le pH optimum étant autour de 7,2). Comme la variation de pH est très rapide en début d'expérience, la réaction d'hydrolyse est très rapide sur un temps très court : très peu d'urée est consommée. A cause du pH élevé et défavorable, la vitesse est ensuite plus lente et l'urée est consommée très lentement. Dans le cas du milieu aqueux avec chitosane, ce plateau est un « vrai » plateau lié à un arrêt de la réaction enzymatique dû à un épuisement du substrat urée. En effet, le pH varie dans ce cas plus lentement et une vitesse importante d'hydrolyse est maintenue sur une plus

longue période : l'urée est donc plus consommée et s'épuise ce qui conduit à un arrêt de la réaction.

Le modèle a aussi permis de dissocier les vitesses de gélification du chitosane de celle de l'hydrolyse enzymatique de l'urée dans le milieu chitosane et de les comparer à l'évolution du pH au cours du temps afin d'utiliser le pH comme outil pour détermination de la gélification. Le minimum de variation du pH correspond à la zone tampon du chitosane (pKa = 6,7), ce qui correspond au maximum de la vitesse de gélification du chitosane. Il convient de rappeler que le pH de gélification obtenu par mesure rhéologique (Chapitre II) était également proche de cette valeur (pH = 6,5). Cela traduit un fort lien quasi immédiat entre le comportement chimique (équilibre de protonation et de déprotonation du chitosane) et le comportement mécanique (formation des liaisons).

Au contraire, le maximum de la vitesse de l'évolution du pH est atteint pour le pH optimum de l'uréase (7,2), c'est-à-dire pour une vitesse d'hydrolyse de l'urée maximale. L'évolution de la vitesse du pH par rapport au temps devient alors un outil important pour estimer le pH de gélification du chitosane et le moment où la vitesse d'hydrolyse est la plus élevée.

Enfin, le modèle a permis de calculer les quantités de chaque espèce en solution afin de connaître d'une part les proportions d'ammoniaque et d'ions ammonium, et d'autre part, les proportions de dioxyde de carbone, d'ions carbonate et d'ions hydrogénocarbonate produits au cours du temps. En s'intéressant à la concentration en ammoniaque et au dioxyde de carbone, ces deux espèces étant susceptibles d'être transférées avec le milieu extérieur pendant la formation du gel, il a été montré que l'ammoniaque n'est présent en solution qu'une fois que la valeur du pH de gélification avancée est atteinte et donc que le gel est formé, ce qui signifie qu'il est peu probable qu'il présente un problème pour la structuration du gel. Cependant, le dioxyde de carbone est présent pour des faibles pH pendant la formation du gel ce qui pourrait induire des échanges à la surface.

La seconde partie de ce Chapitre III a ainsi pris en compte les phénomènes de transfert de masse, mais aussi de chaleur, pouvant intervenir lors de la gélification du chitosane. Ce nouveau modèle amélioré 1D a été validé en système fermé similaire à celui utilisé au Chapitre II et dans la première partie du chapitre III (système volumique de rapport h/d = 0,73). Ces premières simulations ont montré que les phénomènes de transfert ont une faible influence sur la cinétique de gélification pour cette configuration.

Le modèle 1D a ensuite été appliqué sur une géométrie de film mince simulant l'étalement d'une solution chitosane-urée-uréase sur un support en verre avec une épaisseur d'étalement inférieure à

2 mm. Il a été montré que dans cette géométrie les phénomènes de transferts ont une influence non négligeable sur le temps de gélification et de gélification avancé. En effet, le rapport surface/volume est beaucoup plus élevé dans le cas du film plan. Les transferts de matière, notamment l'évaporation d'eau, entraîne également une diminution de l'épaisseur et donc une augmentation des concentrations des espèces présentes.

Les temps de gélification et de gélification avancés sont fortement modifiés en raison de l'évaporation de l'ammoniaque et de la pénétration du dioxyde du carbone ce qui a pour effet d'acidifier le milieu. La cinétique d'augmentation du pH est donc réduite et le pH final obtenu est plus faible. Dans certaines conditions opératoires, le pH de gélification avancée, qui correspond à l'obtention d'un gel adaptée à la future formation de membrane, n'est plus atteint. De nouvelles conditions opératoires d'obtention du gel doivent donc être redéfinies ; des concentrations en uréase et urée minimum respectivement de 3,5 $u.mL^{-1}$ et 150 mM pour pouvoir atteindre le pH de gélification avancée. L'influence importante de la température sur la cinétique de gélification enzymatique est également confirmée : même si une température de 5°C est défavorable à la cinétique de gélification, celle-ci sera néanmoins retenue pour les raisons évoquées au Chapitre II (ralentissement de la gélification pour pouvoir étaler les gels).

Les conditions extérieures ont également une influence potentiellement importante sur la gélification, en particulier l'humidité relative ambiante qui contrôle l'évaporation de l'eau.

En résumé, les nouvelles conditions opératoires de gélification enzymatique (pour une solution de chitosane à 2,5% w/v) seront ainsi : une concentration en uréase de 3,5 $u.mL^{-1}$, une concentration en urée de 150 mM et une température de 5°C. Ces conditions opératoires seront utilisées au Chapitre IV pour le passage d'un gel plan à une membrane poreuse résistante en milieu acide.

Chapitre IV

Introduction

Les chapitres précédents ont montré que le procédé de gélification du chitosane par voie enzymatique permettait d'élaborer des gels de morphologie homogène. Une étude expérimentale multi-paramétrique de la cinétique de gélification enzymatique (Chapitre II) a permis d'optimiser les conditions d'élaboration pour atteindre le pH de gélification avancée de 7,35 en configuration de réacteur volumique semi-fermé : une solution de chitosane de 2,5% w/v, une concentration en uréase de 3,5 $u.mL^{-1}$, une concentration en urée de 75 mM et une température de 5°C. La modélisation de la cinétique de gélification enzymatique en 1D (Chapitre III) a permis d'étudier l'influence de la géométrie du mélange chitosane-uréase-urée en prenant en compte les phénomènes de transfert. Il a été mis en évidence que lors du passage du réacteur volumique semi-fermé vers le gel plan avec une épaisseur d'étalement inférieure à 1,5 mm, les phénomènes de transfert ont une influence non négligeable sur le pH : dans certains cas le pH de gélification avancée n'est plus atteint. Cependant, une augmentation de la concentration initiale en urée de 75 à 150 mM permettrait d'atteindre le pH de gélification avancée lorsque le mélange est étalé pour élaborer des gels plans.

L'objectif de ce Chapitre IV consiste maintenant, à partir des gels précédemment obtenus, à élaborer des membranes planes de chitosane insolubles en milieu acide à des fins de traitement d'effluents acides chargés en ions métalliques. Il faudra donc, à cette fin, maîtriser les deux étapes que sont : la création d'une porosité permettant de travailler dans le domaine de l'ultrafiltration ; la modification chimique du chitosane pour le rendre insoluble en milieu acide.

La première partie de ce Chapitre IV portera sur la génération de la porosité. Le poly(éthylène glycol) sera utilisé comme porogène, l'étude bibliographique du Chapitre I ayant montré qu'il est le porogène le plus adapté pour élaborer des membranes dont la porosité se situe dans le domaine de l'ultrafiltration, tandis que le NaCl ou les particules de Si génèrent des pores de diamètre supérieurs à 2,5 µm (domaine de la microfiltration). L'influence de la taille et de la concentration du PEG sur la perméabilité sera dans un premier temps étudiée sur le procédé de gélification par immersion de sorte à pouvoir découpler l'étape de génération de la porosité du procédé de gélification enzymatique d'une part et permettre une comparaison des résultats avec ceux de la littérature, qui considère le procédé par immersion comme procédé « référence », d'autre part. Les conditions (type et concentration de PEG) permettant d'obtenir une perméabilité satisfaisante seront ensuite

appliquées au procédé de gélification enzymatique, et mises en œuvre pour travailler sur la modification chimique du chitosane à des fins d'insolubilisation.

Dans la seconde partie du Chapitre IV, l'objectif sera d'améliorer la résistance chimique du chitosane pour le rendre insoluble en milieu acide sans pour autant diminuer sa rigidité. Plusieurs voies de modification chimique seront étudiées : par réticulation des chaînes de polymère avec du glutaraldéhyde ou de l'épichlorohydrine ; par acétylation des fonctions amines par de l'anhydride acétique.

Enfin, la dernière partie du Chapitre IV consistera à déterminer les propriétés structurales et fonctionnelles des membranes obtenues. Leurs propriétés de filtration et de sorption seront établies vis-à-vis d'une solution acide de Cu(II), ion métallique sélectionné comme élément métallique modèle.

Preparation, from chitosan gels, of porous and acid-resistant chitosan flat-sheet membranes for water treatment applications

1. Introduction

Heavy metal contamination of water is a serious health and environmental issues due to their toxicity, non-biodegradable properties and accumulative behaviors. Heavy metal ions can be found in wastewaters from various industries such as metal plating, mining operation and pharmaceutical industry [49, 95]. Their removal may be accomplished by various separation processes: ions exchange, reverse osmosis, adsorption, complexation and precipitation [20, 50, 111]. The sorption process is of great interest because that can remove trace quantities of heavy metals and it is both effective and economical process [49, 51, 95].

The sorbent used is generally activated carbon or exchange-ion resin but polymer biosorbents, such as chitosan, can also be used for the removal of metals ions. Indeed, chitosan presents interesting sorption properties for some heavy metal cations (Hg^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}) [130, 169] because of its amino ($-NH_2$) and hydroxyl (-OH) functional groups. Sorption capacities from 7 to 180 $mg.g^{-1}$ can be reached [52, 95]. Chitosan has mainly been used in the form of beads or flakes which require to a separation step. One interesting solution could state in the preparation of chitosan sorbent in the form of hybrid membranes, to couple sorption and filtration steps in a single process to treat acidic effluents containing metal ions and organic solute.

Chitosan is a biopolymer composed of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine units. It is obtained by the alkaline deacetylation of chitin. Because it is soluble in acidic aqueous media and may become a gel when exposed to basic aqueous media (for pH higher than its pKa 6.2-7.1), chitosan is very interesting to prepare membranes without the use of organic solvents, in agreement with the REACH and green chemistry requirements. Chitosan membranes can be prepared by non-solvent induced phase separation (NIPS) through a wet-process (if chitosan-acid initial solution is immersed in a basic media like ammonia or sodium hydroxide) or vapor induced phase separation process (if chitosan-acid initial solution is exposed to basic media under vapor form like ammonia). However, both processes induce a non-solvent concentration gradient at the chitosan surface in contact with liquid or vapor non-solvent and thus a gelation front. Consequently, it is often difficult to control the membrane formation mechanisms (and hence its morphology) since the elementary

phenomena are not only transient but also localized within a thin film. However, properly controlling the morphology of hybrid sorbing membranes is a key step for attaining acceptable permeability, reducing pore diffusion limitation during the sorption process and having important specific active area available for adsorption [45, 48].

Recently, an original chitosan enzymatic gelation process has been developed, based on the deprotonation of amino groups of chitosan by *in situ* generated alkali (ammonia) thanks to the enzymatic hydrolysis of urea (substrate) by urease (enzyme) [6, 7]. We have shown through a deep study of chitosan in-situ enzymatic gelation [150] that unlike classical gelation process, this original gelation way allows obtaining chitosan gels with a well-controlled and homogeneous structure, which could constitute the first step to get chitosan membranes of controlled morphology. This previous work led to define an "advanced gelation pH" (pH_{ag} 7.35) where the chitosan gel presented a sufficient mechanical resistance for future membrane preparation. Temperature and urease concentration were identified as limiting parameters for the gelation kinetics whereas the influence of urea concentration was lower when its initial concentration was sufficient to generate enough ammonia to deprotonate amino groups of chitosan.

However, the obtention of chitosan gels was only the first step in the development of permeable chitosan membranes aimed to remove metal ions from acidic effluent. Following steps are now required: the creation of a porosity suitable for ultrafiltration and the chemical modification of the chitosan membrane so that it becomes insoluble in effluents containing metal ions whose pH ranges from pH 1 to 6 [170-172].

The porosity of chitosan gels prepared by a wet process is generally obtained by addition of porogens like silica [95, 109, 110], sodium chloride [97] or poly(ethylene glycol) (PEG) [104, 106, 173] in the solution of chitosan dissolved in acetic acid. The solution is then casted and dried to evaporate the solvent prior to immersion in a bath of alkali. Porogens are finally extracted (by immersion either in hot water bath for poly(ethylene glycol) (PEG) or in water bath for sodium chloride or in hot sodium hydroxide bath for silica) to obtain a porous gel. Silica particles (15-40 µm) and NaCl involve respectively too high permeabilities (32 000 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$) and mean pore diameter (74.14 µm) to reach the targeted area of ultrafiltration [97, 110]. Moreover, silica particles are soluble in the HCl solvent used for the enzymatic process and could thus not play their role of particles porogens. In return, the use of PEG as porogens induces permeabilities suitable to elaborate chitosan porous gels (100 – 800 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$) dedicated to ultrafiltration [104, 106].

The second step consists in modifying the porous chitosan gel by cross-linking or acetylation to make

it insoluble in acidic media. This modification can be done either by adding glutaraldehyde in the polymer solution before casting [56, 57, 173] or by immersion of the porous gel in a bath containing the reagent (glutaraldehyde [95, 111], epichlorohydrin [99, 116] or acetic anhydride [47, 48, 121]). These reagents are well known in the literature: glutaraldehyde and epichlorohydrin were used to crosslink beads or flakes of chitosan and acetic anhydride allowed the elaboration of chitosan membranes but the reaction was carried out by immersion of the gel in a methanol bath. Glutaraldehyde and acetic anhydride react with amino groups of chitosan whereas epichlorohydrin reacts with hydroxyl groups. When glutaraldehyde is added to the chitosan solution before gel elaboration, a control of crosslinking and gelation kinetics is needed to prevent that crosslinking happens before gelation.

The present paper aims to prepare, starting from chitosan gels obtained by enzymatic gelation, permeable and acid-resistant chitosan membranes for the treatment of metal ions in solution. It focuses on the passage from a flat-sheet dense chitosan gel to a flat-sheet porous chitosan membrane. After having defined and characterized the starting chitosan gel (called the “reference chitosan gel”), the first part of this work is dedicated to the generation of porosity to get a permeable “porous chitosan gel”. PEG was chosen as porogen because it is suitable for elaboration of ultrafiltration membrane. The influence of PEG molecular weight and concentration was first studied for the classical wet-process (to decouple enzymatic gelation and porosity generation); then results were transposed to the enzymatic gelation process. In a second part of this work, the insolubilisation of the chitosan gel was studied, by two ways: cross-linking (with different cross-linkers and protocols) and acetylation. At last, characteristics and functional properties of the obtained “chitosan membrane” were determined by filtration in acidic media of a solution containing Cu(II) ions, selected as model heavy metal ions.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Chitosan (obtained from France Chitine, France) had a degree of deacetylation (DDA) of 80 % (determined by magnetic nuclear resonance) and a mean molecular weight of 180 000 g.mol^{-1} (supplier’s data). Urea, urease (type III), hydrochloric acid, sodium hydroxide, glutaraldéhyde (GA), epichlorohydrin (EPI), all kinds of polyethylene glycol (PEG, samples with different molecular weights from 200 to 35 000 g.mol^{-1}) and polyethylene oxide (PEO, 100 000 and 400 000 g.mol^{-1}) were purchased from Sigma (France). Urease (EC 3.5.1.5) from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) was

supplied as a glycerol solution and the specific activity of this enzymatic solution was 778 $u.mL^{-1}$ (supplier's data) where one catalytic unit (u) is defined as the enzyme quantity that will liberate 1.0 µmole of NH_3 from urea per minute at pH 7.0 and 25°C.

2.2 Preparation of chitosan materials (gels and membranes)

2.2.1 Elaboration of flat sheet chitosan gels by enzymatic process

Chitosan solution at 2.5% w/v was prepared by dissolution of chitosan in HCl 0.1 M during 24 h. HCl was used to avoid a buffer effect of acetic acid (pKa of 4.76 at 25°C) but as acetic acid is generally used to prepare chitosan solution in the literature, a comparison of enzymatic gelation kinetics was made with chitosan solution at 2.5% w/v by dissolution in acetic acid 0.35 M. This comparison was performed by monitoring pH during the enzymatic gelation in the reference conditions defined and optimized in our previous works [[150];Chap III.2]. For the rest of the study, the optimal conditions issued from [Chap II and Chap III.2] were applied: pH of the solution was adjusted at 4.7 at 5°C with HCl 0.1M, and the solution was implemented with 3.5 $u.mL^{-1}$ urease and then stirred during 30 min before adding 150 mM urea (prepared at 5 M in osmotic water). A stirring at 5°C was maintained for 10 min to obtain a homogeneous mixture of reactants while the enzymatic reaction starts. Although a temperature of 5°C was not the most favourable for the urease activity, it allows maintaining an acceptable viscosity to cast the solution. After being cast on a glass plate, the cast solution was dried at 5°C during 3h (partial drying) or 2 days (total drying until constant weight). This time allowed reaching the advanced gelation time (Chap III). Then the glass plate was immersed in NaOH 1 M during 48 h for detachment of the flat sheet chitosan gel, which was finally rinsed with water until neutral pH.

2.2.2 Elaboration of porous flat sheet chitosan gels

Wet process was first used as a « reference process » to optimize the choice of porogen independently on the enzymatic gelation and to enable comparison with results from literature. The optimized porogen was then used to elaborate porous gels by the enzymatic process.

2.2.2.1 By wet process

Chitosan solutions at 2.5% w/v with PEG were prepared in HCl 0.1 M with different molecular weights (MW) from 200 to 35000 $g.mol^{-1}$ (weight ratio chitosan/PEG = 1/1 for all PEG and weight ratio chitosan/PEG = 1/0.5 with PEG 6000 to study the influence of the weight ratio chitosan/PEG).

This solution was cast on a glass plate to be dried in an oven at 60°C until a constant mass. The glass plate was then immersed in NaOH 1 M during 24 h to induce gelation. The gel was finally immersed in water at 80°C during 12 h to dissolve the PEG.

Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurements (TA instrument Q20) allowed to determine the potential presence of residual PEG in porous gels after extraction by hot water. The temperature was increased and decreased from 20 to 85°C by heating rates of 10°C.min^{-1}. All experiments were done with dry N_2 flowing through the calorimeter.

2.2.2.2 By enzymatic gelation

The same solution of chitosan and PEG than that used for the wet process was prepared and its pH was adjusted to pH 4.7 ± 0.1 using HCl 0.1 M at 5°C. The gelation procedure was the same than for "flat sheet chitosan gels", which were finally immersed in water at 80°C during 12 h to dissolve the PEG.

2.2.3 Elaboration of chitosan membranes

Chitosan membranes were obtained by chemical modification of the porous flat-sheet chitosan gels, either by adding glutaraldehyde in the chitosan solution before casting (this could not be applied to EPI as a crosslinking agent since it requires a pH of 10 to crosslink) or by immersion of the porous gels in a reagent bath of glutaraldehyde (GA), epichloroydrin (EPI) or acetic anhydride.

2.2.3.1 Crosslinking of chitosan by glutaraldehyde

Starting from the same protocol as that used for flat-sheet chitosan membranes, two possibilities of cross-linking by GA were considered:

- Adding a glutaraldehyde solution in the chitosan solution containing urease and urea, only two minutes before casting the mixture to prevent that the very reactive GA reacts with both the urease and urea before casting. The GA concentration was 0.25 M [134] to enable to reach chitosan concentration of 2.5% w/v for 3.5 u.mL-1 urease, 150 mM urea after GA addition. The influence of GA on reaction kinetics in aqueous and chitosan media was studied according to the same protocol of pH monitoring used in our previous work [150].
- Immersing the flat-sheet porous gel of chitosan during 2 h in a crosslinking glutaraldehyde bath, whose concentration ranged from 0.015 to 0.40% w/v [20, 95]. Membranes obtained were finally washed with water to remove the residual GA.

2.2.3.2 Crosslinking of chitosan by epichlorohydrin

Flat sheet porous chitosan gel was immersed in epichlorohydrin solution (prepared in NaOH 0.067 M) during 2 h at 50°C. The crosslinked gel was finally rinsed with water until neutral pH. The effect of epichlorohydrin concentration was studied by varying the molar ratio chitosan/epichlorohydrin from 1 to 4 [116].

2.2.3.3 Acetylation of chitosan gel

Flat sheet porous chitosan gels were acetylated by immersion at room temperature during 2 h in a bath constituted by a 3/100 volumetric ratio of acetic anhydride to methanol 3/100 [110]. Membranes obtained were rinsed in water.

Whatever the method applied, it was verified by immersion in HCl 0.1 M during 24 h, drying until constant mass and weighing before and after immersion that the obtained "chitosan membrane" was insoluble in acidic media.

2.3 Chitosan gels and membranes characterization

2.3.1 Membrane morphology

The membrane samples were metalized by gold spatter coater model SC7620. Membrane cross-sections and surfaces (glass side and air side) were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) with a microscope Hitachi S-4800.

2.3.2 Functional properties

2.3.2.1 Permeability

Permeation properties were determined by filtration of osmotic water by a 13.4 cm² sample of flat-sheet membrane using a stirred ultrafiltration cell (Amicon 8050, Millipore Corporation). Membranes were first conditioned by filtering osmotic water with an increasing pressure from 0.2 to 1 bar (with an increment of 0.2 bar each 10 min) and then applying a constant pressure of 1.2 bar for 1 h. The water flux J_w (L.h^{-1}.m^{-2}) was calculated at 20°C using the following equation:

$$\boldsymbol{J_w = \frac{Q}{\Delta t . A}} \qquad \textbf{\textit{Eq IV. 1}}$$

Q (L) is the water amount getting through the membrane area A (m²) during the time Δt (h). Water fluxes were calculated with pressures between 0.2 and 1.0 bar. The hydraulic permeability L_p (L.h^{-}

^{1}.m².bar^{-1}) was determined from the slope of the linear variation of J_w versus the applied pressure. Each essay was reproduced at least three times and the average permeability was presented.

2.3.2.2 Solute rejection

Molecular weight cut-off (MWCO) (defined as the molecular weight of the solute whose 90% were retained) was determined by measuring the rejection at 1 bar of 1 g.L^{-1} polyethylene glycol (PEG, from 200 to 35 000 g.mol^{-1}) or polyethylene oxide (PEO, 100 000 and 400 000 g.mol^{-1}) solutions. The membrane was washed with osmotic water after each filtration and the water flux at 1 bar was measured to verify the lack of membrane fouling. PEG and PEO contents in the feed C_0 and the permeate solution C_p were determined by flow injection analysis using a refractometer 2414 (Waters Corporation). The solute rejection TR (%) was calculated using the following equation:

$$\boldsymbol{TR = \left(1 - \frac{C_p}{C_0}\right) \times 100} \qquad \textit{Eq IV. 2}$$

Empirical relationships between the size of PEG and PEO solutes expressed as the Stokes radii (r_s in nm) and their molecular weight can be expressed using the Eq IV. 3 for Mw < 0.75 kDa, Eq IV. 4 for 0.75 kDa ≤ Mw < 35 kDa and Eq.IV 5 for Mw ≥ 35 kDa) [174, 175]:

$$\boldsymbol{r_s = 0.02830 \times Mw^{0.485}} \qquad \textit{Eq IV. 3}$$

$$\boldsymbol{r_s = 0.01673 \times Mw^{0.577}} \qquad \textit{Eq IV. 4}$$

$$\boldsymbol{r_s = 0.01044 \times Mw^{0.587}} \qquad \textit{Eq IV. 5}$$

Mean pore size distribution can be evaluated by plotting the solute transport data versus the corresponding Stokes radii using a log normal model [122]. The mean pore radius r_p is determined from the maximum of the pore size distribution, while the ratio between the Stokes radius at 84.13 % of rejection and that at 50 % is taken as the geometric standard deviation σ. The pore size distribution can be then expressed by the probability density function described by the following equation:

$$\boldsymbol{R = \int_0^r \frac{1}{r_s ln\sigma\sqrt{2\pi}} exp\left(-\frac{(ln\, r_s - lnr_p)^2}{2(ln\sigma)^2}\right) dr} \qquad \textit{Eq IV. 6}$$

2.3.2.3 Sorption properties

The sorption properties of chitosan membranes were first characterized in batch reactor by immersion of a sample membrane in a solution of Cu(II) at 20 mg.L^{-1} at pH 3 (pH adjusted by HCl 0.1 M) prepared from Chem Lab standard solutions of Cu(II) at a concentration of 1000 mg.L^{-1} diluted at

20 mg.L^{-1} with osmotic water. The Cu(II) solution was magnetically stirred at 500 rpm and maintained at 20°C. Samples of during time of Cu(II) solution were filtered by 0.2 µm cellulose acetate filters (LaboService) before analysis by Atomic Absorption Spectrometry (Perkin Elmer). The metal uptakes Q (the amounts of metal sorbed (mmol) per unit of sorbent mass (g)) were determined by mass balance (Eq IV. 7) :

$$\boldsymbol{Q} = \frac{(\boldsymbol{C_i} - \boldsymbol{C_t})\boldsymbol{V}}{\boldsymbol{m}} \qquad \textit{Eq IV. 7}$$

Where C_i and C_t (mM) are metal concentrations in solution at t = 0 and at time t, V (L) is the volume and m (g) the mass of chitosan membrane.

The removal dynamic of Cu(II) from an acidic solution by chitosan membranes was studied in a filtration process at 1 bar and at room temperature. Feed solutions were prepared from the previous standard solution diluted at 20 mg.L^{-1} with osmotic water and an initial pH of 3 (adjusted by HCl 0.1 M). Samples of permeate was analysed by the same procedure as the batch sorption to plot breakthrough curve C_t *vs* time t.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of the reference chitosan flat-sheet gel

In the gelation wet-process, acetic acid is generally used as a solvent for the preparation of the chitosan solution. In our previous work [150], chitosan gels have been obtained in a 10 mL glass batch reactor (H/D = 0.73) by the enzymatic chitosan gelation process from chitosan solutions obtained by dissolving 2.5% w/v of chitosan in HCl, used to avoid a buffer effect of acetic acid (pKa of 4.76 at 25°C). Reference conditions for the preparation of chitosan gels have been determined: an urea concentration of 75 mM (in order produce enough ammonia for the gelation and to reach the advanced gelation pH), an urease concentration of 3.5 u.mL^{-1} (in order to give a sufficiently high enzymatic gelation rate while minimizing urease consumption) and a temperature of 25°C. We assessed the “advanced gelation pH” (pH_{ag} = 7.35) and the “corresponding advanced gelation time”, i.e. the time needed to obtain a gel with sufficient mechanical resistance for future membrane preparation.

To compare our results with those from literature, i.e. from chitosan solutions prepared with acetic acid, Figure IV. 1 presents the pH variations during enzymatic gelation of chitosan in the 10 mL glass batch reactor when the chitosan solution was prepared with HCl or acetic acid. The advanced

gelation pH (7.35) is reached in 78.9 min with HCl as a solvent, while at this time the pH is only 5.91 with acetic acid as a solvent. This slower gelation kinetic with acetic acid is due to its buffer effect at the initial reaction pH (acetic acid pKa of 4.76 at 25°), coupled with the low ammonia production at this pH which is very unfavorable to the enzyme activity [150]. Gelation process is thus dramatically slown-down at the beginning of the reaction. In the second part of the reaction, when the pH is outside of the buffer area of acetic acid (pH > 5.86), the rate of pH variation for HCl and acetic acid are similar (for instance, calculated from the slopes of the tangents to the curves at pH equal 6.15 they are equal to 0.03 and 0.02 s^{-1} respectively). Despite the same gelation rate when pH is over the buffer area, the slow-down happening at the beginning of the reaction induces it takes 4 times more time to reach a given pH with acetic acid. Because the gelation time is greatly increased when using acetic acid, it will thus not be used for the enzymatic chitosan gelation but only for the wet-process. For the enzymatic process, the preparation of the chitosan solution will be made in HCl.

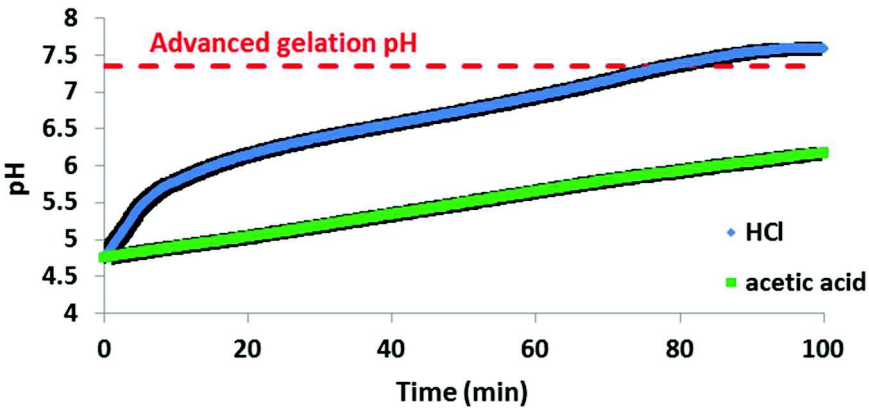

Figure IV. 1: influence of solvent on gelation kinetics of chitosan (monitored through pH evolution) with 2.5% w/v chitosan solution prepared in HCl 0.1 M or acetic acid 0.35 M, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and 75 mM urea concentration at 25°C.

The elaboration conditions defined in our previous work were established for chitosan gels obtained in a 10 mL glass batch reactor. To get flat-sheet chitosan gels, a gelation temperature of 5° was applied. Although it is not the most favourable for the urease activity, it enables to slow-down gelation and thus to maintain an acceptable viscosity before solution casting. In these conditions, gelation happened in less than 3 h so it was more acceptable than the use of acetic acid at ambient temperature.

In this present work and in order to obtain chitosan flat-sheet gels, the same operating conditions than those defined previously were used (2.5% w/v chitosan in HCl 0.1 M, 3.5 u.mL^{-1} urease and 5°C), apart from the urea concentration. Indeed, Chap III.2 highlighted that a change of geometry to a flat-

sheet gel, because of mass transfers occuring at the interface, induces the need of a higher urea concentration up to 150 mM to reach the advanced gelation pH. Modeling of the gelation kinetics showed that the final pH is lower for thin film geometry due to transfer of ammonia by evaporation and carbon dioxide which induce an acidification of the solution.

Flat-sheet gels elaborated in these conditions (2.5% w/v chitosan in HCl, 3.5 $u.mL^{-1}$ urease, 150 mM urea, 5°C) and submitted to a partial drying (3 h) after gelation presented a homogeneous structure but a low rigidity, which was not suitable for a filtration application. To improve the rigidity of the enzymatic gels, a total drying of the cast solution was performed at 5°C, monitored until constant mass. The dried flat-sheet gel was then immersed in NaOH 1M. Compared to the flat-sheet chitosan gels obtained partial drying, these gels were shown to be rigid enough to be handled for water filtration but their permeabilities were very low, reaching only 0.52 ± 0.08 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$. These permeability values correspond to dense materials as observed by SEM (Figure IV. 2a/b) whereas the chitosan gels obtained by the enzymatic process followed by a partial drying (3 h) were quite porous [150]. Thereafter, the next section will focus on the creation of the porosity of the dense flat-sheet chitosan gels obtained after a total drying.

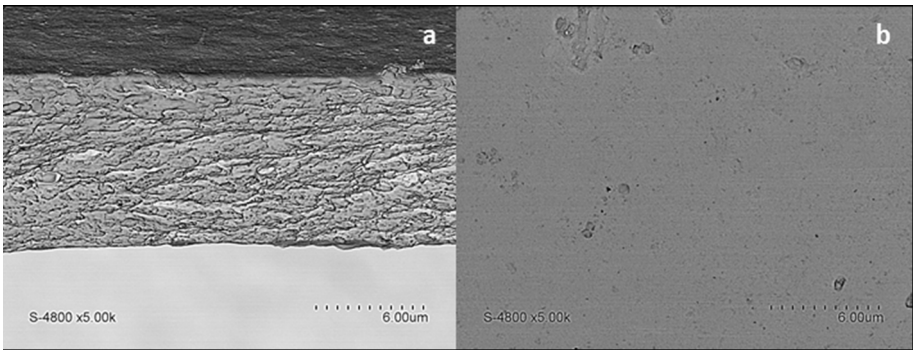

Figure IV. 2: SEM pictures of cross-section (a) and surface (b) of flat-sheet chitosan gels elaborated by enzymatic process with 2.5% w/v chitosan prepared in HCl 0.1 M, 3.5 $u.mL^{-1}$ urease concentration and 150 mM urea concentration at 5°C

3.2 Preparation of porous flat-sheet chitosan gel by addition of PEG

The generation of the porosity was first studied on the classical wet-process in order to decouple enzymatic gelation from porosity generation. PEG was used as porogen because it is adapted for the elaboration of porous gels in the area of ultrafiltration.

3.2.1 *By the wet process*

To approach the influence of PEG size on the gel permeability, Figure IV. 3 presents the permeate flux versus the pressure for porous flat-sheet chitosan gels elaborated by the wet process after addition of PEG of given Molecular Weight (MW from 200 to 35000 $g.mol^{-1}$) in the chitosan solution. HCl 0.1 M was used as solvent and chitosan/PEG solution weight ratio was fixed at 1/1 (another ratio of 1/0.5 being studied for PEG 6000). For each gel, permeate flux increased linearly with pressure and permeability (calculated as the slope of the line) increased from 0.8 to 29.7 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ with the size of the PEG, the maximum value being obtained for PEG 35 000. It is likely that increasing MW raises water permeability. This trend of the influence of the MW of PEG on the permeability is usual in the domain of membrane preparation. For chitosan membranes, Zeng et al. (2004) [104] obtained higher permeabilities (100 - 800 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$) than our values; these differences could be explained by the use of acetic acid as solvent, which could involve other interactions with PEG than HCl. Using HCl rather than acetic acid to dissolve chitosan may lead to a porous gel more crystalline because the organic acid bulkier than HCl [176]. So, increasing crystallinity decreases permeability of porous gels.

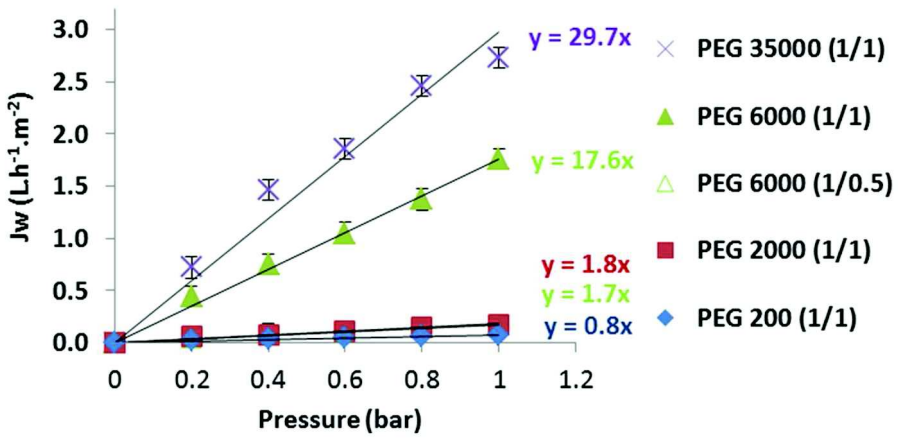

Figure IV. 3: influence of PEG size and weight ratio chitosan/PEG on the permeability of chitosan gel elaborated by wet process

The effect on permeability of chitosan/PEG solution weight ratio was study for PEG 6000 (Figure IV. 3). The decrease of permeability from 17.6 ± 4.1 to 1.7 ± 0.03 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ when the amount of PEG is divided by two may be related with a decrease in porosity and the absence of interconnected pores.

Following these results, permeabilities obtained for PEG 6000 and PEG 35000 could be used to elaborate chitosan membranes for the lower range of ultrafiltration with a lower limit of 10 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ (permeability of ultrafiltration membranes are between 50 to 500 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ [60]).

3.2.2 *By enzymatic process*

PEG 6000 and PEG 35000 were thus selected according to permeabilities obtained in wet process. When PEG 35000 was used to elaborate porous gels by the enzymatic process, the solution was however too viscous to be cast that's why PEG 6000 was selected to study the enzymatic gelation way. A porous flat sheet gel was thus elaborated by the enzymatic process by adding PEG 6000 in chitosan solution. Its permeability was compared with that presented by the gel elaborated by the wet process in Figure IV. 4, all others conditions being equal. Figure IV. 4 shows that the "enzymatic" porous gel has a permeability which decreases of 77 % compared to that obtained for the porous gel elaborated by the wet process (from 17.6 ± 4.1 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ to 4.2 ± 0.7 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$).

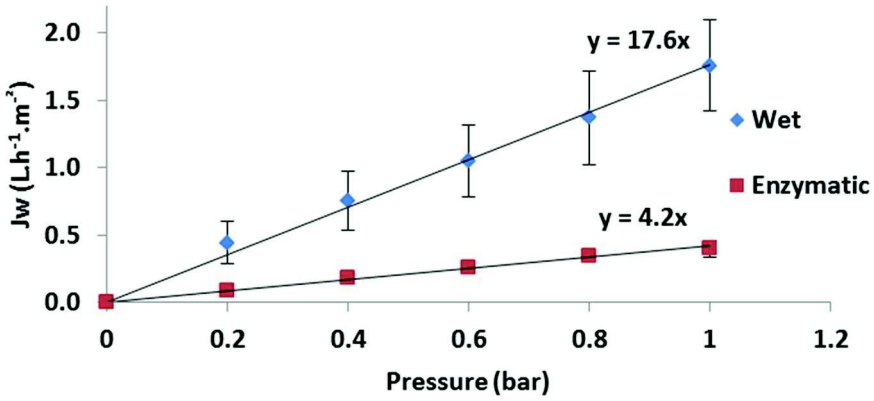

Figure IV. 4: influence of elaboration process on the permeability; gels elaborated from Chitosan solutions at 2.5% w/v with PEG in HCl 0.1 M with weight ratio of chitosan on PEG 1/1.

This difference of permeability could first be explained by an incomplete extraction of PEG 6000 in the case of enzymatic process. To confirm this assumption, Figure IV. 5a represents the thermographs of the chitosan-PEG 6000 solution, chitosan and PEG 6000 powders as references. The thermograph of PEG 6000 shows an endothermic peak at 59.1°C while chitosan powder does not show a melting point in the temperature range 20 - 80°C. In the case of the chitosan-PEG 6000 solution, the characteristic peak of PEG 6000 is slightly visible at 53.4°C. Moreover, the difference between the melting point of PEG 6000 alone and with chitosan (from 59.1 to 53.4°C) could be explained by hydrogen bonding between chitosan and PEG [96, 106].

Figure IV. 5b compares the thermographs performed for two porous gels elaborated by a wet process (green) and an enzymatic process (blue). The thermograph of the porous gels obtained by enzymatic gelation shows an endothermic peak corresponding to a residual presence of PEG in the porous gel, which may be due to hydrogen bonding between chitosan and PEG. The difference of

permeability between wet and enzymatic process can be explained by the presence of residual PEG 6000 for the flat sheet porous gel elaborated by enzymatic process and a assumption proposes that the crystallization increases in the case of enzymatic gelation due to the decrease in the rate of the evaporation rate (5°C for the enzymatic process against 60°C for the wet process) where a recrystallization more important of polymer chains may be induce.

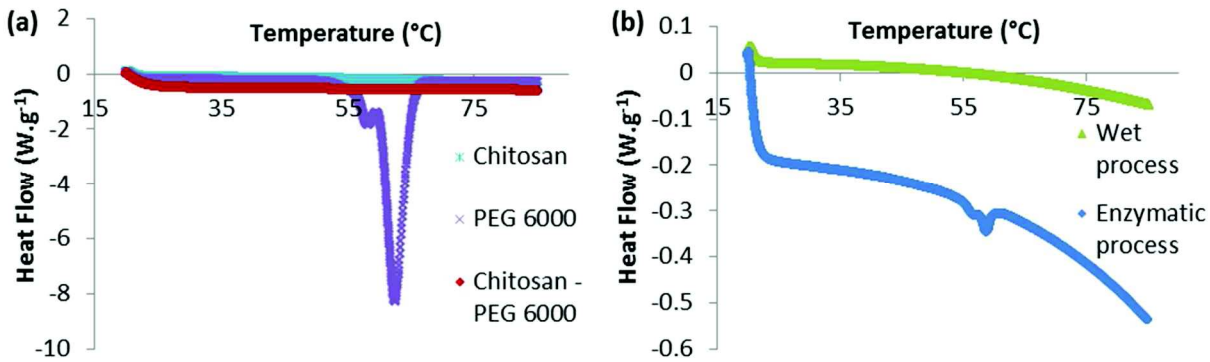

Figure IV. 5: DSC thermographs of chitosan, PEG 6000, solution chitosan-PEG 6000 (a) and porous gels elaborated either by enzymatic process or wet process (b)

However, SEM pictures of porous gel obtained by wet process (Figure IV. 6b and a) and by enzymatic process (Figure IV. 6c and d) show for both gels a similar nanoporous structure, which seems more homogeneous for the gel issued from the enzymatic process. Despite permeabilites measurement showed that the wet process would provide more porous gels than the enzymatic one, SEM magnification does not allow to observe any difference in porosity between both gels.

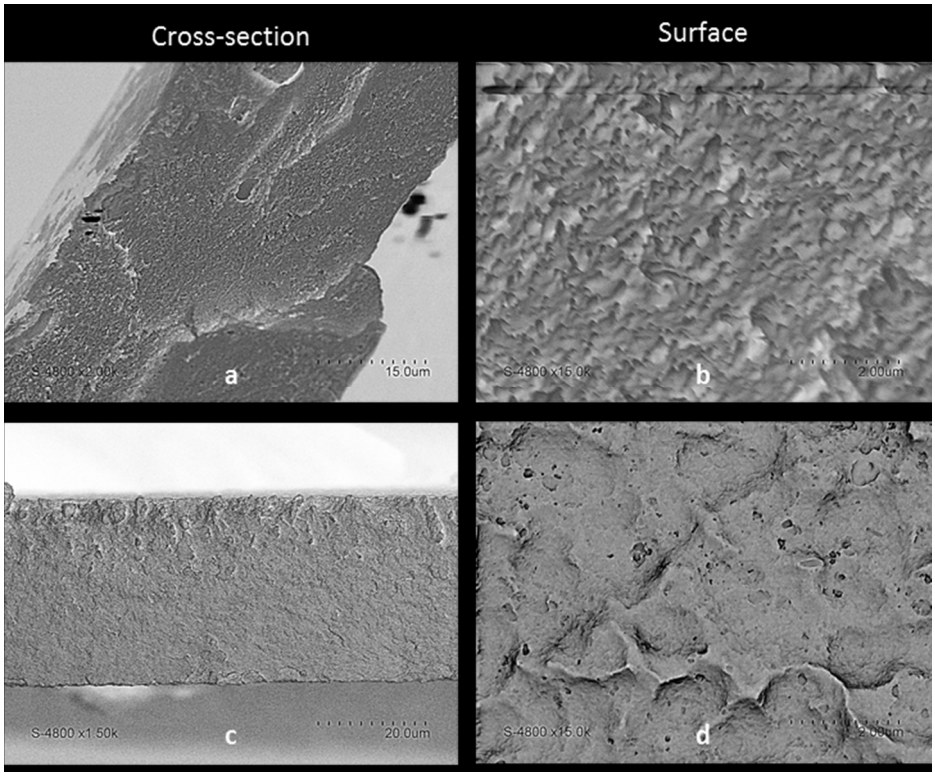

Figure IV. 6: SEM pictures of cross-section and surface of chitosan/PEG6000 gels elaborated by wet process (a;b) and enzymatic process (c;d)

To improve the permeability of the enzymatic gel, in agreement with results from [Chap III.2] which showed the influence of thickness on gelation, the thickness casting was reduced from 1.5 to 1 mm. The permeability was thus increased from 4.2 ± 0.7 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ to 8.3 ± 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ (Figure IV. 7). This trend could be explained by a decrease of resistance filtration since the final thickness of porous gels decreased from 49 ± 4 µm to 82 ± 6 µm. A lower thickness casting was however not studied because the decrease of the thickness casting (from 1.5 to 1 mm) made porous gels more brittle and harder to handle. So, a thickness of 1 mm was retained for the next porous flat sheet chitosan gel.

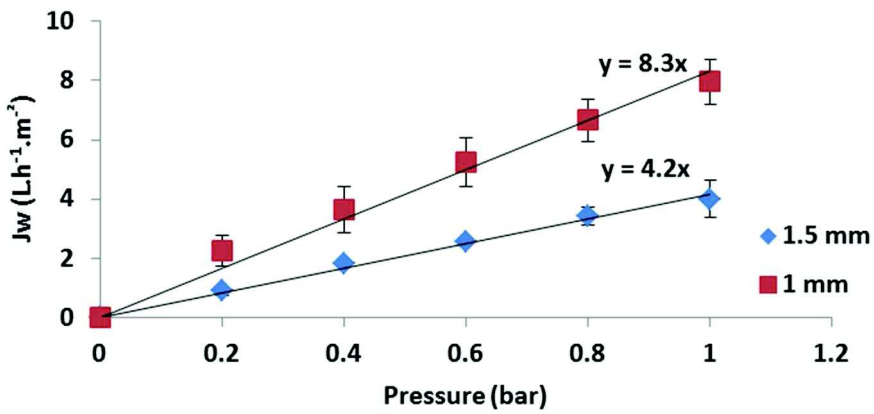

Figure IV. 7: Effect of thickness casting on the flux for enzymatic gel with PEG6000

With permeabilities ranged in the lower limit of ultrafiltration, it was thus possible to elaborate porous flat sheet chitosan gels by adding PEG 6000 in chitosan solution. To enable the use of these gels for the filtration/sorption of metal ions from acid effluents, a chemical modification of chitosan is now needed to make it insoluble in acidic media on one hand and keep the gels rigid enough to be handled for membrane application on the other hand.

3.3 Preparation of chitosan membranes

3.3.1 Coupling gelation/crosslinking by glutaraldehyde

Glutaraldehyde crosslinking takes place by reaction with amine groups of chitosan, which may happen after addition of GA in the solution of chitosan-urease-urea. However, in this case, it must be verified that the crosslinking reaction does not interfere with the enzyme gelation reaction. Hydrolysis kinetic of urea by urease was first compared in non-buffer water with and without glutaraldehyde 15 mM and in the absence of chitosan (Figure IV. 8), in the conditions defined in aqueous medium by our previous work [150]. Adding glutaraldehyde in non-buffer water shows first that the initial rate is clearly lower since it needs about 5 times longer to reach the pH of 7.35 (which correspond to the advanced gelation pH in chitosan media) in presence of GA. This can be explained by the high reactivity of GA with urease and urea, which was exploited either for the immobilization of urease on chitosan beads [113] or for the elaboration of adhesive [114]. The reaction most likely with GA is by the interaction of amino, hydroxyl or carboxylate groups of amino acid in the case of the immobilization of urease or on the amide groups in the case of urea.

The final pH is also lower in presence of GA (7.8 against 9.1 without GA). This is related to the same previous explanation. Indeed, the final pH reached is directly related to ammonia produced which is

related to the initial urea concentration present in solution, or more exactly to the initial urea concentration available for the reaction. In the case of the presence of GA, the urea concentration available is decreased because of the reaction between the glutaraldehyde and urea.

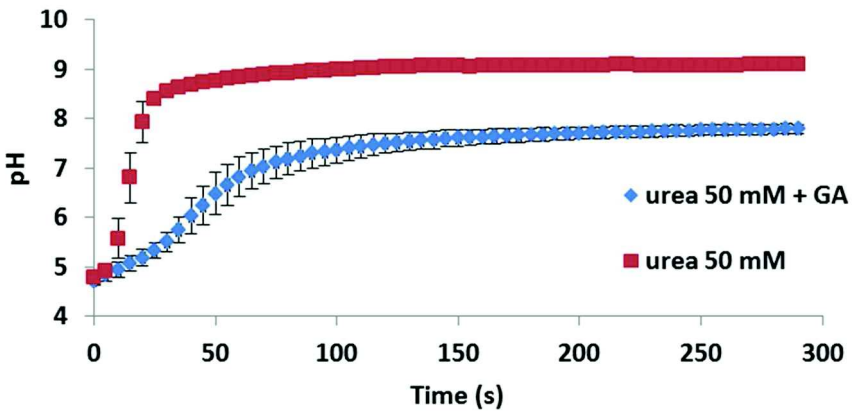

Figure IV. 8: pH variations during enzymatic urea hydrolysis for [urease]= 0.5 u.mL^{-1} at 25°C and with a urea concentration fixed at 50 mM in (i) non-buffered water and (ii) glutaraldéhyde solution at 15 mM prepared in non-buffered water.

In order to maintain the advanced gelation time, urease concentration or urea initial concentration will must be increased.

The high reactivity of GA for urea and urease slows the chitosan gelation and reduces the final pH which would require (i) an increasing of urease concentration to maintain advanced gelling time and increasing the urea initial concentration to reach the pH advanced gelation.

Figure IV. 9 compares pH variations during enzymatic gelation with and without GA in chitosan media. First, the evolution of pH is almost constant during for a few minutes after GA addition (the adding of the same volume of water did not induce any significant difference with references conditions). After 7 min, the rate of pH variation becomes similar without and with GA (0.020 and 0.015 min^{-1} at pH 6.0 respectively). The shape of the curve could be explained by a fast reactivity of GA with the present species then, in the second part, GA does not influence the evolution of pH since it cannot react with the remaining reagents available.

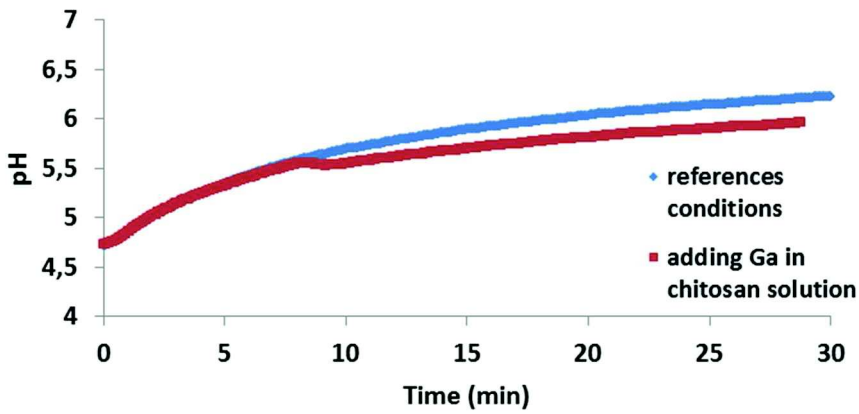

Figure IV. 9: pH variations during enzymatic gelation with [urea]=75 mM, [urease]= 3.5 u.mL^{-1} at 25°C in (i) chitosan solution at 2.5% w/v and (ii) by adding Ga in chitosan solution at 2.5% w/v.

However, the mixture obtained after about two minutes of stirring in presence of GA was too viscous to be cast, meaning that crosslinking with chitosan begins as soon as GA is adding. The steps of crosslinking after gelation should thus be considered in heterogeneous phase by immersion of the flat-sheet porous gel in a bath containing the crosslinking agent.

3.3.2 By immersion of the gel in a crosslinking agent bath

3.3.2.1 Glutaraldehyde

To ensure to obtain a gel resistant in acidic media on one hand and strong enough to withstand handling on the other hand, the influence of GA concentration in the crosslinking bath was investigated from 0.025 to 0.40% w/v, around a value of 0.25% w/v frequently used [20, 95, 177].

According to Table IV. 1, the crosslinking of chitosan by immersion in GA bath below 0.05% w/v gave a gel totally soluble in HCl 0.1 M, an increase of GA concentration from 0.10 to 0.25% w/v improved the chemical resistance of the gels (dissolution percentage is reduced from 51.6 to 10.9 %). A gel almost insoluble in acidic media (dissolution less than 3.4%) was obtained for a GA concentration of 0.40% w/v. However this latter gel was brittle and therefore unsuitable for a future membrane application.

Table IV. 1: influence of concentration of Ga in crosslinking bath on chemical resistance in acidic media

% (w/v) Ga in bath	0.025	0.05	0.10	0.175	0.25	0.40
Dissolution (%)	100	100	51.6 ± 3.2	17 ± 0.0	10.9 ± 2.0	3.4 ± 1.2

3.3.2.2 Epichlorohydrin

An alternative to the use of GA, could be the EPI. EPI could not be used by incorporation in the acid chitosan solution since this crosslinking agent needs a pH of 10 to react. The porous gel was thus immersed in a bath of EPI for cross-linking.

The effect of epichlorohydrin concentration was studied through the molar ratio of hydroxyl groups of chitosan to epichlorohydrin, equal to 1, 2 or 4 in Table IV. 2. Manipulable gels were been obtained following from crosslinking with EPI. It shows that for molar ratios of 2 and 4, gels were partially dissolved at 8 and 8.9 % in HCl 0.1 M, whereas the gel obtained with a molar ratio of 1 was almost insoluble in acidic medium.

However, it could not be used for acid media filtration because of swelling phenomenon observed in the acidic media due to repulsion of protonated amino functions [50, 110, 115] that makes it brittle.

Table IV. 2: influence of molar ratio of hydroxyl groups of chitosan to epichlorohydrin on chemical resistance in acidic media

molar ratio of hydroxyl groups of chitosan to epichlorohydrin	1	2	4
Dissolution (%)	**2.9**	**8**	**8.9**

3.3.2.3 Acetic anhydride

Due to the brittle or swelling character of chitosan gels cross-linked by immersion in a GA or EPI bath, the acetylation of amino groups along chitosan chain has been considered as another way to make insoluble the chitosan gels (Figure IV. 10). By this reaction, chitosan gels are transformed into chitin gels insoluble in aqueous media. Zeng et al. (1996) [110] showed that, in addition to increase chemical resistance, reaction of acetylation could also improve mechanical properties.

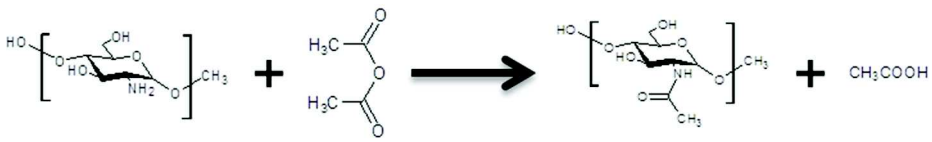

Figure IV. 10: Reaction of acetylation of chitosan with acetic anhydride

According to the operating conditions used in literature [47, 48, 110, 121], chitosan porous gel was immersed during 2 h at room temperature in a bath containing acetic anhydride and methanol with a volumetric ratio acetic anhydride/methanol 3/100. This reaction allows the elaboration of chitosan gels almost insoluble (dissolution of 2.7 %) in acidic media and strong enough to be handled for

membrane application. The obtained chitosan flat-sheet membranes were characterized by water filtration and dynamic sorption of a Cu(II) solution at acid pH and show that the membranes have sorption properties despite the acetylation on amino groups.

Membranes obtained with a porous structure and a resistance to acidic media were then characterized by their structure properties, filtration performances and sorption performances.

3.4 Chitosan membranes characterization:

3.4.1 Structural properties

According to SEM pictures (Figure IV. 11), the chitosan membranes produced by the enzymatic gelation process followed by an acetylation step present a homogeneous structure quite similar to that obtained for chitosan porous gel before acetylation.

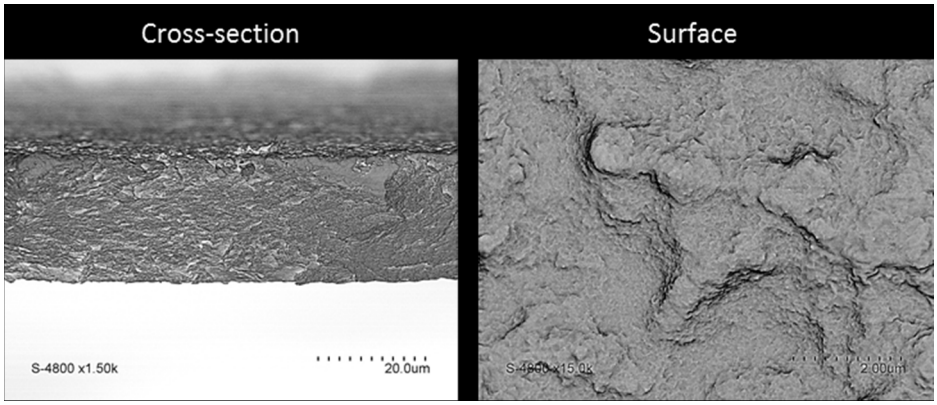

Figure IV. 11: SEM pictures of cross-section and surface of chitosan membrane enzymatic process elaborated from chitosan/PEG6000 and acetylated after gelation.

SEM observations are not able to show the presence of pores observe. To confirm the presence of pores in the selective layer, the characterization of molecular weight cut-off (defined as the MW of the solute whose 90% were retained) was performed (Figure IV. 12). The polynomial fit of the experimental rejection shows that compounds with a molecular weight greater than 17 000 g.mol^{-1} were retained and that the mean pore radius r_p was 1.3 ± 2.3 nm. This value of r_p can confirm that the SEM observation does allow to see the presence of these pores.

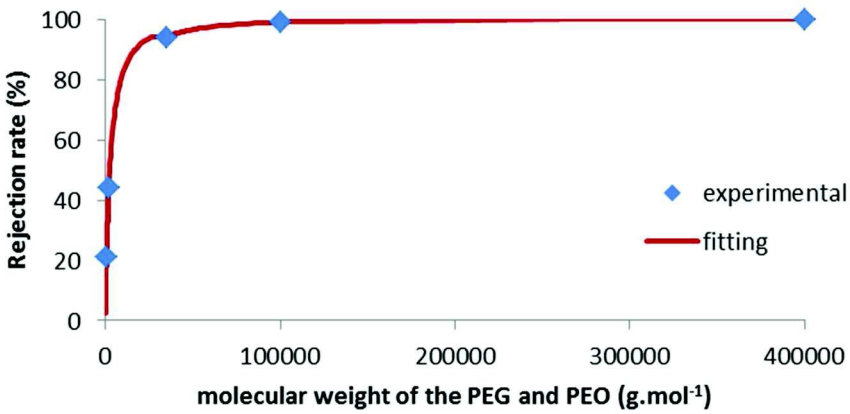

Figure IV. 12: Solute rejection of filtration at 1 bar for different molecular weight of PEG and PEO on a chitosan membrane

Structural properties characterized by mean pore radius r_p of 1.3 ± 2.3 nm and MWCO of 17 000 g.mol^{-1} corresponding with the low range of ultrafiltration (r_p and MWCO of ultrafiltration membranes are between 5 to 50 nm and 1 000 to 500 000 g.mol^{-1} respectively) which will now be confirmed by the study of filtration performances.

3.4.2 Filtration performances

A mean permeability of 8.8 ± 1.2 L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1} was obtained for chitosan membrane (Figure IV. 13) with water filtration at pH 6, confirming a potential use in the lower range of ultrafiltration. The step of acetylation has almost no influence on the water permeability since the permeability of porous gel was 8.3 ± 1.2 L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}.

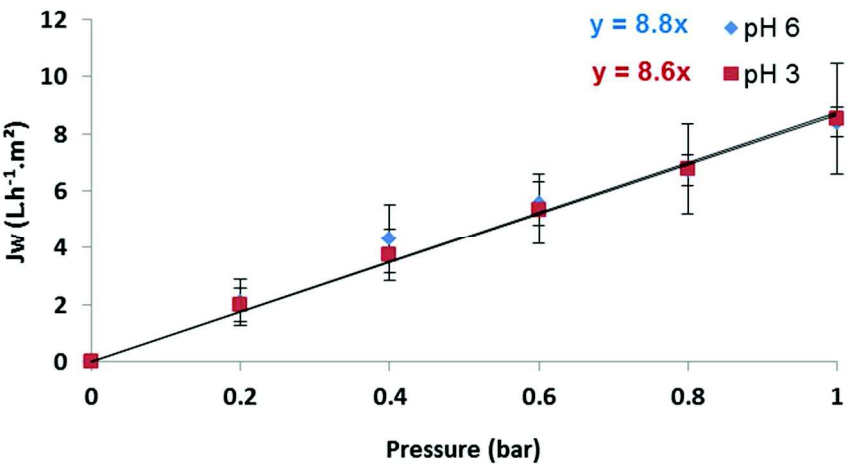

Figure IV. 13: Effect of pressure and pH solution on water flux for chitosan membrane

The characterization of the permeability for two different samples from a same casting gave mean

permeability of 10.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ± 0.6 and shows a good homogeneity of the membrane. Furthermore, the protocol of elaboration of chitosan membrane can be considered as reproducible since an uncertainty of 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ was obtained after the measuring the permeability of five different membranes.

Figure IV. 14 represents successive rises of pressure from 0 to 1.0 bar and drops of pressure from 1.0 to 0.2 bar. This assay shows that the permeabilities obtained from successive rises and drops of the pressure were very similar, which means that initial conditioning of the membrane is effective and that the structure of chitosan membrane is not deformed under pressure effect.

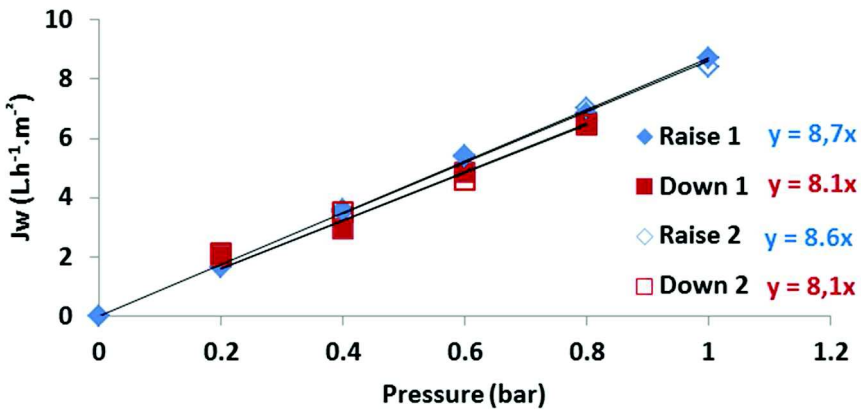

Figure IV. 14: Effect of raise and drop of pressure between 0 and 1 bar on the water flux

However, the permeabilities obtained in the present are much lower than that obtained by Zeng et al. (2004) [104] who obtained permeabilities between 100 to 800 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$. In this case, their membranes were elaborated by the wet process from chitosan solution in acetic acid and with a higher drying temperature. These two differences could play a role on the membrane crystallinity on the one hand because the acetic acid bulkier than HCl thus this organic solvent decrease the crystallinity [176] and on the other, a lower evaporation rate may allow polymer chains to recrystallize

In order to study the stability of the membrane, an assay of water filtration during 6 hours at 1 bar is represented Figure IV. 15 where J_w/J_{w0} is the ratio of flux (J_w) on intial flux (J_{w0}) to characterize the lost of flux during the filtration and V ($L.m^{-1}$) is water volume through the membrane (area of 13.4 cm^2). Figure IV. 15 shows that the water flux decreases only of 13 % after about 5h20 of filtration for a volume of 60 mL (corresponding to V = 3.5 $L.m^{-2}$) which shows a good stability of the membrane structure for a quite long filtration time. This stability was not studied for chitosan membranes in literature but this decrease of permeability is very low and can be compared to commercial

membranes. For instance, Zhao et al.(2012) [178] obtained a decrease of about 15 % for PES commercial membrane (Sepro UF, PES10).

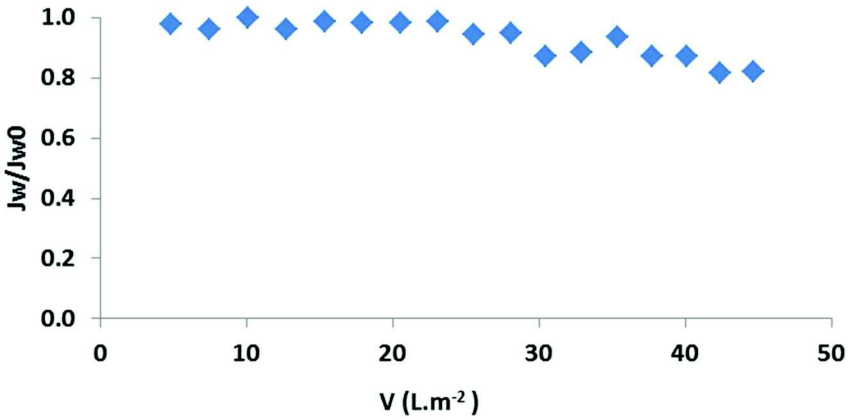

Figure IV. 15: effect of filtration duration on flux at 1 bar for membrane chitosan membrane

Finally, filtration of an acidic solution at pH 3 was performed (Figure IV. 13) and shows no modification of the permeability. (8.6 ± 2.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$). No degradation of the membrane was observed following filtration in acidic media, moreover, the acidic media did not seem to modify the mechanical strength and the swelling of the chitosan membrane.

According to the characteristics of chitosan membranes: mean pore radius r_p of 1.3 ± 2.3 nm, a permeability of 8.7 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ and a MWCO of 17 000 $g.mol^{-1}$, they can be dedicated the lower range of ultrafiltration. Moreover, this original process of membrane elaboration was allowed to produce insoluble porous flat sheet gels in acidic media which have the interesting characteristic to be homogeneous and reproducible. A decrease of the normalized flux of 13 % after about 5h20 of filtration at 1 bar highlighted a stable structure. Furthermore, the water flux at acidic media pH 3 showed a similar permeability than for neutral media which can be exploited for the treatment of acid effluents containing ions metals.

3.4.3 Sorption properties

Figure IV. 16 represents sorption kinetics of Cu(II) on chitosan membrane in batch reactor for an acidic effluent at pH 3 and 20°C. In this operating conditions, a sorption capacity at the equilibrium (Q_e) of 2.0 $mg.g^{-1}$ was obtained after 20 min. This value shows that it remains free amino groups available of chelating metal ions, furthermore, this value is similar to the sorption capacity of 2.7 $mg.g^{-1}$ at pH 5 obtained by Ghaee et al (2010) [95] for dense chitosan flat sheet crosslinking with GA, this result could show that it remains free amino groups since Monteiro et al (1999) [134] obtained a sorption capacity of 9.5 $mg.g^{-1}$ for unmodified chitosan.

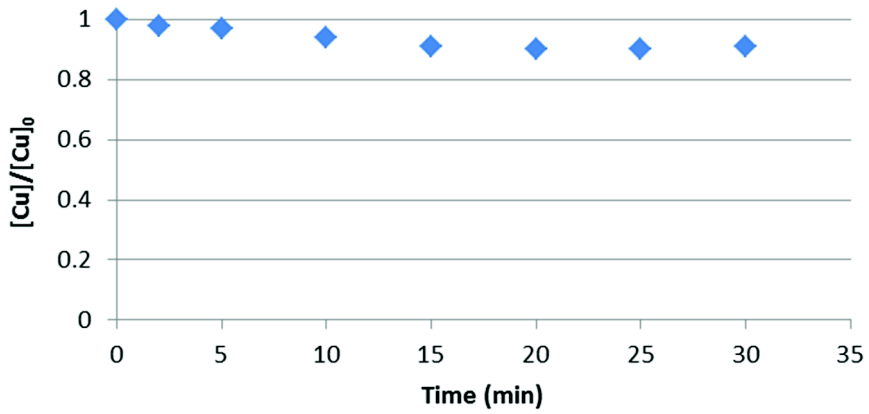

Figure IV. 16: Sorption kinetics of Cu(II) on chitosan membrane (88 mg of dry chitosan membrane, 100 mL of Cu(II) solution at pH 3, 292 K and 150 rpm).

Sorption breakthrough curve of Cu (II) from an acidic effluent at pH 3 containing initially 20 mg.L^{-1} of copper was then carried out by filtration by the chitosan membrane at a pressure at 1 bar (Figure IV. 17). The purpose of the sorption breakthrough curve is to show how much Cu (II) can adsorb before it saturates.

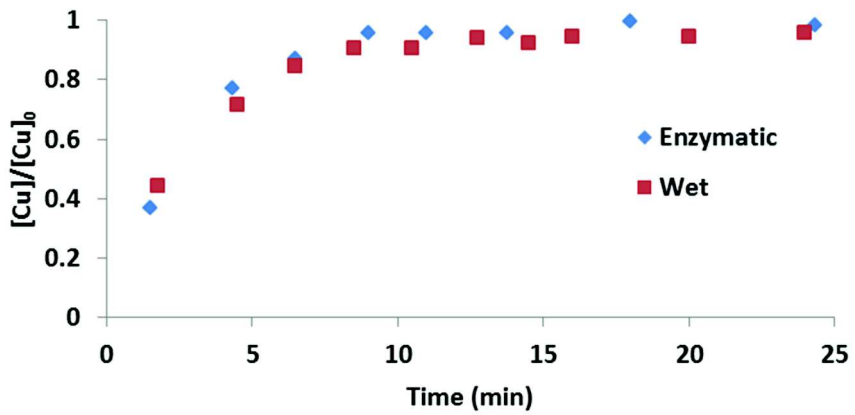

Figure IV. 17: sorption properties to remove Cu (II) from solution at 20 mg.L^{-1} and pH 3 during filtration at 1 bar with chitosan membrane elaborated either by enzymatic or wet process

This preliminary test of sorption showed that chitosan membranes are able to remove Cu (II) in the given condition but no breakthrough point could be observed from these measurements. The saturation was reached after about 9 min and a filtration of 1.63 g of initial solution; during this period of filtration, chitosan membrane with a surface of 13.4 cm² has sorbed 0.008 mg of Cu(II). These results are in agreement with the batch adsorption tests showing that remaining free amino groups available for sorption despite acetylation chitosan. A comparative test with a chitosan

membrane elaborated by wet process was realized in the same filtration conditions, but with a pressure of 0.5 bar to the same flux than enzymatic membrane (because the permeability of membrane elaborated by wet process is 17.6 $L.h^{-1}.m^{2}.bar^{-1}$). No significant difference was observed, however, it can be assumed that the membrane elaborated by wet process shows similar sorption capacity in dynamic to enzymatic membrane which have a homogeneous structure, is due to lower crystallinity as shown by highest permeability.

4. Conclusion

The enzymatic process allowed to elaborate chitosan porous flat-sheet gels with a mean permeability of 8.3 ± 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ using PEG 6000 as porogen. These membranes were made insoluble in acidic media by acetylation, without any significant influence of the acetylation step on the membrane morphology or permeability (a permeability of 8.8 ± 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ was obtained). This elaboration process enabled to obtain homogeneous membranes (similar permeabilities were obtained for different samples from the same membrane) and reproducible (similar permeabilities were obtained for membranes elaborated in the same conditions). Moreover, a permeability of 8.6 ± 2.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ was obtained during filtration with water at pH 3 showing that properties filtrations are maintained in acidic media. The measurement of solute rejection of PEG and PEO solutions showed that membranes retained compounds with a molecular weight greater than 17 000 $g.mol^{-1}$ and presented a mean pore radius r_p estimated at 1.3 ± 2.3 nm. These membranes are therefore suitable for the lower range of ultrafiltration. Sorption kinetics of Cu(II) at pH 3 on chitosan membrane at 20°C has shown it remains amino groups on the chitosan membrane after acetylation as a sorption capacity of 2.0 $mg.g^{-1}$ was obtained. A preliminary test in continuous reactors of Cu(II) sorption from an acidic effluent at pH 3 demonstrated that 23 % of Cu(II) was removed during a filtration time of 9 min.

Conclusion du Chapitre IV

Le chapitre IV a permis de montrer qu'il était possible d'élaborer des gels plans à partir de des conditions opératoires optimisées lors du Chapitre III.2. La concentration en urée a été augmentée de 75 à 150 mM pour la formation de gels plans puisque cette géométrie requiert une quantité d'urée plus importante par rapport à la gélification enzymatique du chitosane en réacteur volumique semi-fermé. Cette différence est due aux échanges d'ammoniaque et de dioxyde de carbone avec l'extérieur (Chap III.2). Ces gels plans qui sont partiellement séchés pendant la réaction de gélification qui dure environ 3 h n'ont pas une rigidité suffisante pour permettre d'être utilisés pour une opération de filtration, c'est pourquoi un séchage total a été réalisé de manière à améliorer leur rigidité. Mais cette étape conduit à des gels denses caractérisés par une très faible perméabilité de 0,52 ± 0.08 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$.

Il a été choisi de générer la porosité des gels par ajout de PEG comme porogène. Une étude préliminaire de l'influence de la taille du PEG sur la perméabilité pour des gels poreux élaborés par le procédé par immersion a permis de sélectionner les PEG 6000 et 35000. Le PEG 35000 s'est montré incompatible avec le procédé par voie enzymatique puisqu'il donnait lieu à une solution trop visqueuse pour pouvoir être étalée. Des gels plans poreux avec une perméabilité de 8.3 ± 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ont ainsi été obtenus par le procédé par voie enzymatique en utilisant du PEG 6000 comme porogène.

Plusieurs modifications chimiques ont été testées pour rendre le chitosane insoluble en milieu acide. La réticulation par le glutaraldéhyde et par l'épichlorohydrine n'ont pas permis d'obtenir de membranes présentant un compromis intéressant entre leur rigidité et leur résistance en milieu acide, alors que la réaction d'acétylation des fonctions amines du chitosane a permis d'élaborer des membranes insolubles en milieu acide et suffisamment résistantes pour être utilisées en filtration. Ces membranes ont été caractérisées par une perméabilité de 8.8 ± 1.2 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ (ce qui signifie que l'étape d'acétylation a peu d'influence sur la perméabilité), mais aussi par un seuil de coupure de 17 000 $g.mol^{-1}$ et un diamètre moyen de pores de 1.3 ± 2.3 nm. De plus, ce procédé présente l'avantage d'être reproductible pour élaborer des membranes puisque des perméabilités similaires sont obtenues sur plusieurs membranes élaborées selon le même protocole. Un essai préliminaire de filtration à pH 3 d'une solution à 20 $mg.L^{-1}$ de Cu(II) a montré que ces membranes sont capables d'éliminer du Cu(II) issu d'un effluent acide. De plus, une capacité de sorption de 2.0 $mg.g^{-1}$ a été

déterminée suite à un essai en réacteur fermé pour ce même effluent ce qui permet de montrer qu'il reste donc des fonctions amines libres disponibles pour la sorption malgré l'acétylation du chitosane qui se fait sur les groupements amines

Des essais supplémentaires sont maintenant nécessaires pour étudier les propriétés de sorption des membranes de chitosane de façon plus approfondie. Ces propriétés de sorption pourraient d'abord être caractérisées par sorption du cuivre en réacteur batch en réalisant des cinétiques de sorption à différentes températures, pH et concentrations en Cu(II) pour déterminer les conditions optimales qui pourront être appliquées en filtration. Les capacités de sorption du chitosane pourraient notamment être améliorées en optimisant la réaction d'acétylation de manière à maximiser le pourcentage de fonctions amines libres (principales fonctions responsables des propriétés de sorption du chitosane) tout en maintenant le caractère insoluble des membranes de chitosane.

Conclusion générale

Le chitosane est un polymère-biosourcé possédant des fonctions amines et hydroxyles qui lui confèrent des propriétés de sorption intéressantes notamment envers les ions métalliques. De plus, en raison de sa solubilité en milieu aqueux acide et de sa gélification lorsque le pH dépasse le pKa du chitosane (entre 6,2 et 7,2), il présente l'avantage de pouvoir être utilisé pour l'élaboration de membranes plus « vertes » sans l'utilisation de solvants organiques.

Récemment, un nouveau procédé de gélification du chitosane, basé sur une gélification enzymatique, a été proposé. Ce procédé permet de s'affranchir de la présence du front de gélification (conséquence de l'exposition de la solution initiale de chitosane acide à un liquide ou des vapeurs basiques pour entraîner sa gélification) et d'avoir un meilleur contrôle de la gélification. La source basique (l'ammoniaque) responsable de la gélification du chitosane est produite in-situ de la solution de chitosane par l'hydrolyse enzymatique de l'urée (substrat) par l'uréase (enzyme).

L'objectif de ce travail de thèse était d'élaborer de nouvelles membranes à base de chitosane, par le procédé de gélification enzymatique, pouvant permettre un couplage filtration/sorption pour le traitement d'effluents acides contenant des ions métalliques, ces membranes devant être poreuses pour permettre la filtration et résistantes en milieu acide.

Dans un premier temps, une étude complète, en réacteur volumique semi-fermé, de l'influence des paramètres d'élaboration (concentration en chitosane, concentration en urée, concentration en uréase, température) sur la cinétique de gélification enzymatique du chitosane a été réalisée grâce à la combinaison de trois méthodes expérimentales : un suivi continu du pH, des mesures rhéologiques et des tests de renversement. Elle a également été renforcée par le développement d'un modèle 0D (sans phénomène de transferts) permettant de décrire l'évolution du pH de la solution et de la gélification au cours du temps. Ce modèle prend en compte la cinétique de la réaction enzymatique, la gélification du chitosane et les équilibres chimiques des différentes espèces présentes et a été validé par les résultats expérimentaux.

Le suivi du pH au cours du temps permet de suivre la gélification enzymatique du chitosane, et couplé à la modélisation, de dissocier les cinétiques de gélification du chitosane et de réaction enzymatique. Cette première partie a montré que lorsque le pH de la solution atteignait le pH de gélification du chitosane (pH = pka), les gels obtenus n'étaient néanmoins pas suffisamment rigides pour être exploités. Il a ainsi été défini un « pH de gélification avancée » (pH = 7.35), avec un temps de gélification avancé associé, qui permet l'obtention de gels utilisables pour la future préparation de membranes. L'étude de l'influence des paramètres opératoires sur la cinétique de gélification enzymatique du chitosane a montré un comportement similaire de l'activité enzymatique en milieux

chitosane ou aqueux. Ce résultat a été confirmé par la modélisation qui montre que le chitosane n'a que très peu d'influence sur la cinétique de réaction enzymatique, les variations plus lentes du pH observées en milieu chitosane s'expliquant simplement par la présence de l'équilibre de gélification du chitosane. Les paramètres opératoires clés contrôlant la cinétique de gélification ont pu être identifiés comme étant la température et la concentration en uréase. La concentration en urée n'influence quasiment pas la cinétique de gélification mais doit être supérieure à une valeur minimum nécessaire pour atteindre le pH de gélification avancé. Cette première partie a enfin montré (grâce à des mesures colorimétriques) qu'une gélification homogène du chitosane pouvait être obtenue.

Dans un second temps, l'étude a concerné le passage à une mise en forme plan puis le passage de ces gels plans à des membranes poreuses résistantes en milieu acide. Un travail complémentaire de modélisation 1D (prenant en compte cette fois ci les phénomènes de transfert de matière et de chaleur) a montré des résultats sensiblement différents entre la gélification enzymatique du chitosane en réacteur volumique et celle en films minces. En raison de la pénétration de dioxyde de carbone et du départ d'ammoniaque, le pH de la solution est diminué par rapport au cas précédent : certaines conditions opératoires ne permettent ainsi plus d'atteindre le pH de gélification avancée, l'épaisseur d'étalement étant un paramètre supplémentaire important dans la gélification du chitosane. Les conditions opératoires retenues pour l'élaboration de gels plans ont ainsi pu être précisées pour une concentration en chitosane de 2,5% w/v : une concentration en uréase de 3,5 $u.mL^{-1}$, une température de 5°C (bien que ralentissant la cinétique de gélification, cette température permet d'obtenir une viscosité appropriée à un étalement de la solution avant gélification) et une concentration en uréase de 150 mM pour atteindre le pH de gélification avancée. La génération de la porosité a été réalisée grâce à l'ajout d'un agent porogène PEG 6000 couplé à un séchage total de la membrane pour obtenir une résistance suffisante. La seule voie de modification chimique ayant permis d'obtenir une membrane résistante en milieu acide, tout en étant utilisable pour une filtration, s'est révélée être l'acétylation par l'anhydre acétique d'une partie des fonctions amines du chitosane.

En résumé, les conditions opératoires suivantes ont été retenues pour élaborer des membranes de filtration/sorption à base de chitosane pour le traitement d'effluents acides contenant des ions métalliques :

- une solution initiale de chitosane à 2,5% w/v préparée dans HCl 0,1 M contenant du PEG 6000 comme porogène avec un rapport massique chitosane/PEG 6000 de 1/1.

- des conditions de gélification enzymatique optimisées avec des concentrations en uréase et en urée respectivement de 3,5 $u.mL^{-1}$ et 150 mM et une température de 5°C.
- un étalement du mélange chitosan-PEG6000-uréase-urée de 1 mm sur une plaque en verre puis un séchage total à 5°C avant immersion dans NaOH 1M pour permettre le décollement du gel plan. Le gel plan poreux est ensuite obtenu après l'extraction du PEG 6000 par immersion du gel plan dans un bain d'eau à 80 °C.
- une acétylation du chitosane par l'anhydride acétique pour le passage vers la membrane insoluble en milieu acide.

Les membranes obtenues ont été caractérisées au travers de leur morphologie et de leurs propriétés fonctionnelles de filtration et de sorption. La caractérisation a montré l'obtention d'une structure homogène en surface et dans l'épaisseur de la membrane avec un diamètre moyen des pores de 1,3 ± 2,3 nm. Des perméabilités de l'ordre de 9 $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ont pu être obtenues pour la filtration d'effluent acide. Ces membranes ont également montré une bonne stabilité durant la filtration. Malgré l'étape d'acétylation, ces membranes conservent des capacités de sorption (vis-à-vis d'une solution de Cu à pH 3) de 2,0 $mg.mg^{-1}$ de membrane sèche à 20 °C qui sont comparables à celles qui ont pu être observé dans la littérature pour des membranes de chitosane en réacteur fermé dont la porosité a été générée à l'aide de particules de silice et le chitosane réticulé par du glutaraldéhyde.

Un essai préliminaire de sorption en filtration d'une solution de Cu(II) à 20 $mg.L^{-1}$ à pH 3 à une pression de 1 bar a également permis de montré qu'il était possible d'obtenir un abattement de 29 % sur un temps de filtration de 9 min.

Plusieurs questions et verrous restent cependant à résoudre et à approfondir.

- La résistance chimique des gels plans poreux de chitosane a pu être renforcée pour obtenir des membranes suffisamment résistantes pour ne pas se dégrader durant la filtration d'une solution de Cu(II) à pH 3. Cependant, l'étape d'acétylation du chitosane par l'anhydride acétique qui requiert une immersion dans un bain de méthanol. Ainsi, l'utilisation d'un réticulant biosourcé pouvant être utilisé en milieu aqueux tel que la génipine serait plus adapté dans le cadre de la règlementation REACH.
- De premiers essais ont montré que les membranes chitosane élaborées permettaient de réaliser simultanément des opérations de filtration et de sorption du cuivre. Néanmoins, il convient maintenant d'étudier de façon plus approfondie ces propriétés de sorption, en fonction des conditions opératoires de filtration (température, concentration initiale en

ions métalliques, débit, etc.) et pour d'autres éléments métalliques, seuls ou en mélange de manière à étudier la sélectivité des membranes. Par la suite il convient de caractériser les propriétés de régénération de ces membranes.

- Les propriétés de sorption des membranes obtenus pourrait être améliorées (i) en optimisant la réaction d'acétylation du chitosane pour maximiser le pourcentage de fonctions amine libres disponibles pour la sorption sans modifier le caractère insoluble du chitosane ou (ii) en fonctionnalisation les membranes par l'ajout de groupements chélatants, cette voie pourrait aussi être utilisée pour modifier la sélectivité lors de la sorption d'un mélange d'ions métallique.

Nomenclature, abréviations et tables

Nomenclature

k_0	Facteur pré-expodentiel de la loi d'Arrhenius	$mol.u^{-1}.min^{-1}$
k'	Facteur de conversion de l'activité de l'enzyme	$u.g^{-1}$
k_T	Constante de la vitesse de réaction dépendant de la température	$mol.u^{-1}.min^{-1}$
$k_{T,pH}$	Coefficient de la vitesse de réaction d'hydrolyse	$mol.u^{-1}.min^{-1}$
$k_{T,pH\ exp}$	Coefficient de la vitesse de réaction d'hydrolyse expérimentale	$mol.u^{-1}.min^{-1}$
pH	pH	-
pH_g	pH de gélification	-
pH_{ag}	pH de gélification avancé	-
r_{exp}	Vitesse de la réaction d'hydrolyse estimée expérimentalement	$mol.L^{-1}.min^{-1}$
r_{gel}	Vitesse de la réaction de gélification	$mol.L^{-1}.min^{-1}$
r_{hydro}	Vitesse de la réaction d'hydrolyse	$mol.L^{-1}.min^{-1}$
t	Temps	min
t_g	Temps de gélification	min
t_{ag}	Temps de gélification avancé	min
C_c	Concentration du chitosane en solution	% w/v
Ea	Energie d'activation	$J.mol^{-1}$
DDA	Degré de désacétylation du chitosane	%
K_1	Constante d'équilibre entre les groupements amines protonés et déprotonés du chitosane	$mol.L^{-1}$
K_3	Constante d'équilibre entre l'ammoniaque et les ions ammonium	$mol.L^{-1}$
K_4	Constante d'équilibre entre l'hydrogénocarbonate et le carbonate	$mol.L^{-1}$
K_5	Constante d'équilibre entre le dioxyde de carbone et l'hydrogénocarbonate	$mol.L^{-1}$
$K_{ES,2}$	Constante moléculaire de dissociation du complexe 1 enzyme-substrat	$mol.L^{-1}$
$K_{ES,2}$	Constante moléculaire de dissociation du complexe 2 enzyme-substrat	$mol.L^{-1}$
K_M	Constante de Michaelis	$mol.L^{-1}$
K_P	Constante d'inhibition de l'ammonium pour l'enzyme	$mol.L^{-1}$
K_S	Constante d'inhibition de l'urée pour l'enzyme	$mol.L^{-1}$
MM_{Chit}	Masse molaire du chitosane	$g.mol^{-1}$
MM_{Glc}	Masse molaire moyenne d'une unité de monomère du chitosane	$g.mol^{-1}$

MM_{GlcN}	Masse molaire moyenne d'une unité de monomère D-glucosamine du chitosane	$g.mol^{-1}$
MM_{GlcNAc}	Masse molaire moyenne d'une unité de monomère N-Acétyl-β-D-glucosamine du chitosane	$g.mol^{-1}$
N_{GlcN}	Nombre d'unité de monomère de D-glucosamine dans le chitosane	-
R	Constante universelle des gaz parfaits	$J.mol^{-1}.K^{-1}$
T	Température	K
T^*	Paramètre cinétique de la teméprature	K
$[Cl^-]$	Concentration en chloride	$mol.L^{-1}$
(CO_2)	Activité du dioxyde de carbone	-
$[CO_2]$	Concentration en dioxyde de carbone	$mol.L^{-1}$
(CO_3^{2-})	Activité du carbonate	-
$[CO_3^{2-}]$	Concentration en carbonate	$mol.L^{-1}$
(HCO_3^-)	Activité de l'hydrogénocarbonate	-
$[HCO_3^-]$	Concentration en l'hydrogénocarbonate	$mol.L^{-1}$
(H_3O^+)	Activité de l'hydronium	-
$[H_3O^+]$	Concentration en hydronium	$mol.L^{-1}$
$[(NH_2)_2CO]$	Concentration en urée	$mol.L^{-1}$
$[(NH_2)_2CO]_0$	Concentration initiale en urée	$mol.L^{-1}$
(NH_3)	Activité de l'ammoniaque	-
$[NH_3]$	Concentration en ammoniaque	$mol.L^{-1}$
(NH_4^+)	Activité de l'ammonium	-
$[NH_4^+]$	Concentration en ammonium	$mol.L^{-1}$
(OH^-)	Activité de l'hydroxyde	-
$[OH^-]$	Concentration en hydroxyde	$mol.L^{-1}$
$[Chit-N]_0$	Concentration en monomère D-glucosamine	$mol.L^{-1}$
$(Chit-NH_2)$	Activité des monomères D-glucosamine avec leurs groupements amines déprotonés	-
$[Chit-NH_2]$	Concentration en monomères D-glucosamine avec leurs groupements amines déprotonés	$mol.L^{-1}$
$(Chit-NH_3^+)$	Activité des monomères D-glucosamine avec leurs groupements amines protonés	-
$[Chit-NH_3^+]$	Concentration en monomères D-glucosamine avec leurs groupements amines protonés	$mol.L^{-1}$
$[E]_0$	Concentration en uréase	$u.L^{-1}$
$\alpha_{ES,1}$	Constante empirique 1	-

$\alpha_{ES,2}$	Constante empirique 2	-
v_{max}	Vitesse maximale de la réaction enzymatique	$mol.L^{-1}.min^{-1}$
JCO_2	Flux de dioxyde de carbone échangé à la surface	$m.s^{-1}$
JNH_3	Flux de d'ammoniaque échangé à la surface	$m.s^{-1}$
J	Densité de flux d'eau au cours de la filtration membranaire	$L.h^{-1}.m^{-2}$
L_p	Perméabilité hydraulique	$L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$
ΔP	Pression transmembranaire	bar
A	Surface de la membrane de filtration	m^2
C_0	Concentration initiale en soluté	$g.L^{-1}$
C_p	Concentration en soluté dans le perméat	$g.L^{-1}$
V	Volume de solution traitée contenant le soluté	L

Abréviations

EPI	Epichlorohydrine
GA	Glutaraldéhyde
HCl	Acide chlorhydrique
MWCO	Seuil de coupure
NaOH	Hydroxyde de sodium
KOH	Hydroxyde de potassium
PEG	Poly (éthylène glycol)
PEO	Poly (éthylène oxide)
TR	Taux de rejet
SEM	Scaning Electron Microscopy

Tables des figures

Chapitre I

Figure I. 1: Structure chimique de la chitine et du chitosane.....13

Figure I. 2: Formule chimique d'un motif de chitosane acétylé deutéré.....15

Figure I. 3: Schéma de principe de la filtration membranaire.....21

Figure I. 4: Représentation de membranes symétriques (a : membrane isotrope poreuse ; b : membrane dense ; c : photographie MEB d'une membrane de filtration faiblement asymétrique) [59] 25

Figure I. 5: Représentation des membranes asymétriques (a : représentation schématique d'une membrane asymétrique ; b : membrane asymétrique en céramique) [59] 25

Figure I. 6: courbe de sélectivité permettant de déterminer le seuil de coupure [62] 27

Figure I. 7: principe de la séparation de phase.....28

Figure I. 8: Schéma d'élaboration de gels de chitosane par immersion dans un non-solvant basique.31

Figure I. 9: Schéma d'élaboration de gels de chitosane par intrusion de vapeurs basiques 32

Figure I. 10: réaction d'hydrolyse de l'urée avec et sans uréase.....33

Figure I. 11: Influence du pH sur l'activité de l'uréase Canavalia Ensiformis pour différents tampons pH ((2-acide acétique amino-cyclohexyle) : CHES ; (N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N2-[acide 2-éthanesulfonique) : HEPES ; (2-[N-morpholino] acide éthanesulfonique) : MES) et un tampon inhibiteur inorganique (phosphate) [85] 34

Figure I. 12: Effet de la température sur l'activité d'une enzyme 35

Figure I. 13: Schéma de l'inhibition de l'enzyme par excès de substrat avec S le substrat, E l'enzyme et I et II les sites actifs du substrat et de l'enzyme se fixant dans leur forme respective.....36

Figure I. 14: Influence de la température pour [uréase] = 17,2 µg.mL^{-1} et [urée] = 43 mM (a), de [Uréase] à 37°C et [urée] = 43 mM (b) et de [Urée] à 37°C et [uréase] = 17,2 µg.mL^{-1} (c) sur le temps de gélation enzymatique.[chitosane] = 2% w/v 37

Figure I. 15: (a) Temps de gélification en fonction de la concentration en urée et en uréase ; (b) Evolution du pH au cours du temps avec Ureasex-ureay, x et y correspondant respectivement à la

concentration en urée (mM) et en uréase (u.mL^{-1}) 38

Figure I. 16: Photographie MEB de la section de gels élaborés par voie enzymatique avec Urease*x*-urea*y*, x et y correspondant respectivement à la concentration en urée (mM) et en uréase (u.mL^{-1}) [7].....39

Figure I. 17: Photographie MEB d'un gel dense réalisé à partir du séchage total d'une solution chitosane/acide acétique avant immersion dans un bain de soude 41

Figure I. 18: Photographies MEB d'un gel plan poreux asymétrique obtenu par séchage partiel avant immersion dans un bain de soude [102]. La couche dense (a) ; la couche microporeuse (b) et la couche macroporeuse (c) [102].....41

Figure I. 19: Formule chimique du poly(éthylène glycol).....42

Figure I. 20 : Schéma d'élaboration de gels plans poreux de chitosane par ajout de PEG dans le collodion [104-106].....43

Figure I. 21: Image MEB de la section de gels plans poreux obtenus à partir de mélanges de rapport massique 1/1 : (a) chitosane/PVP et (b) chitosane/PEG [105] 43

Figure I. 22: Image MEB de la surface de gels plans poreux obtenus à partir d'un mélange chitosane/PEG pour un rapport massique 1/1 avec : (a) PEG 2000 et (b) PEG 20000 [104] 44

Figure I. 23: Schéma d'élaboration de gels poreux par ajout de silice dans le collodion [107, 108, 110]. 45

Figure I. 24: Image MEB montrant l'influence du rapport chi/Si sur la morphologie des gels plans poreux avec de la silice de 15 à 40 µm et des rapports chi/Si de 1/1 (A) ; 1/3 (B) pour une concentration initiale en chitosane de 3% w/v [95]. 46

Figure I. 25: Schéma d'élaboration de gels poreux asymétrique selon Santos et al. 2008 [109].....47

Figure I. 26: Protocole d'élaboration de gels plans poreux à l'aide de particules de NaCl utilisées comme porogène [97]. 47

Figure I. 27: Fonctions du chitosane susceptibles d'être utilisées pour la réticulation 49

Figure I. 28 : Formule chimique du glutaraldéhyde (a) ; représentation schématique de la réticulation entre le glutaraldéhyde et chitosane (b).....50

Figure I. 29: Formule chimique de la génipine 51

Figure I. 30: Réaction d'acétylation du chitosane par de l'anhydride acétique 53

Figure I. 31: formule chimique de l'histidine.....60

Figure I. 32: organigramme représentant le passage de l'étude de la gélification enzymatique du chitosane dans un réacteur volumique semi fermé vers l'élaboration de membrane 65

Chapitre II

Figure II. 1 : chitosan gelation reaction.....72

Figure II. 2: Chitosan enzymatic gelation: (a) hydrolysis of urea by urease; (b) deprotonation of chitosan by ammonia.....73

Figure II. 3: Influence on pH, during enzymatic urea hydrolysis in non-buffered aqueous media for [urease] = 0.5 $u.mL^{-1}$, of a) initial urea concentration at T = 25°C and b) assay temperature with a urea concentration fixed at 75 mM.....79

Figure II. 4: pH variations during enzymatic urea hydrolysis for [urease]= 0.5 $u.mL^{-1}$ at 25°C and with a urea concentration fixed at 75 mM in (i) non-buffered water and (ii) non-buffered 2.5% w/v chitosan solution. 81

Figure II. 5: Influence of urease concentration on pH variations during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at 25°C and with a urea concentration fixed at 75 mM. ..82

Figure II. 6: Evolution of elastic modulus (G') and viscous modulus (G") during chitosan enzymatic gelation for non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 $u.mL^{-1}$.....83

Figure II. 7: a) pH variation and b) flowing colorimetric tests during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution at different times at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 $u.mL^{-1}$ at: 1) t = 1 min (pH = 4.9) ; 2) t = 34 min (pH = 6.5); 3) t = 61 min (pH = 7.00); 4) t = 72 min (pH = 7.25) and 4) t = 85 min (pH = 7.50) 84

Figure II. 8: Influence on pH variations during chitosan enzymatic gelation, for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution and for [urease] = 3.5 $u.mL^{-1}$, of a) initial urea concentration at T = 25°C and b) assay temperature with a urea concentration fixed at 75 mM.....86

Figure II. 9: Influence of pH on the enzymatic chitosan gelation kinetics a) Influence of initial pH on

pH variations during chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution with a urea concentration fixed at 75 mM, a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1} and a temperature of 25°C and b) Influence of pH on pH variations during enzymatic urea hydrolysis at 37°C with a urea concentration fixed at 150 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1} in non-buffered 2.5% w/v chitosan solution.....88

Figure II. 10: MEB observation (X 800) of a cross-section of a) chitosan gel prepared by enzymatic chitosan gelation with 2.5% w/v chitosan, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and 75 mM urea concentration at 5°C and b) chitosan gel prepared by wet process.....90

Chapitre III

Figure III. 1: Chitosan N-Acetyl-glucosamine (GlcNAc) and D-glucosamine (GlcN) monomers 99

Figure III. 2: Modelling numerical resolution 106

Figure III. 3: Determination of the kinetics parameters : a) determination of $\boldsymbol{Ea}$ and $\boldsymbol{k0}$ with the variation of $\mathbf{ln(kT)}$ versus 1/T and b) determination of $\boldsymbol{KES,1}$ and $\boldsymbol{KES,2}$ with the variation of normalized $\boldsymbol{kT,pH}$ versus pH 110

Figure III. 4: Comparison of experimental and modelling pH variations during chitosan enzymatic gelation for a buffer-free 2.5% w/v chitosan solution of a) assay of initial urea concentration with T = 25°C and [urease] = 3.5 u.mL^{-1} ; b) assay temperature with an urea concentration fixed at 75 mM and for [urease] = 3.5 u.mL^{-1}; and c) assay of urease concentration at T = 25°C and with an urea concentration of 75 mM 112

Figure III. 5: Comparison of the experimental and modelling gelation and advanced gelation times 114

Figure III. 6: Comparison of experimental and modelling pH variations during enzymatic urea hydrolysis for non-buffered aqueous media for [urease]= 0.5 u.mL^{-1} : a) influence of initial urea concentration at T = 25°C and b) influence of assay temperature with a urea con 115

Figure III. 7: Variation of urea concentration versus time for different urea concentration and at 25°C during a) chitosan enzymatic gelation for a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution with [urease] = 3.5 u.mL^{-1}b) during enzymatic urea hydrolysis for a non-buffered aqueous media with [urease]= 0.5 u.mL^{-1} and.....116

Figure III. 8:Variation of pH and urea concentration versus time for 150 mM urea concentration, 37°C

and a 3.5 u.mL-1 urease concentration 117

Figure III. 9: Variation of urea hydrolysis rate in water and 2.5% w/v chitosan media for 150 mM urea concentration, 37°C and a 3.5 u.mL^{-1} urease concentration a) versus time and b) versus pH (with also the urea concentration) 118

Figure III. 10: Variations of the percentage of gelation versus time for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution a) with the pH variations and b) with the dpH/dt variations.....119

Figure III. 11: Variations of dpH/dt for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 25°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution.....120

Figure III. 12. Variations of d(pH)/dt, chitosan gelation and urea hydrolysis reaction kinetics versus time for an urea concentration for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution.....121

Figure III. 13: Variation of species concentrations versus time during chitosan enzymatic gelation for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution: a) ammonium, ammonia and urea concentrations; b) carbon dioxide, carbonate, hydrogen carbonate and urea concentrations.....122

Figure III. 14: Chitosan enzymatic gelation for 150 mM urea, 3.5 u.mL^{-1}urease, 37°C and a non-buffered 2.5% w/v chitosan solution: speciation of a) ammonium-ammonia and b) carbon dioxide, carbonate and hydrogen carbonate 123

Figure III. 15: Schematic of enzymatic gelation process 128

Figure III. 16: Urea concentration versus time for different initial urea concentrations – comparison between 0D and 1D model, H = 15 mm – run 1 to 6 138

Figure III. 17: pH variation versus time for $[urea]_{init}$ = 25(c), 100(b), 200(a) mM – comparison between 0D and 1D model in deep cell geometry – run 2, 4, 6; 1D model: —○— X = 0 ; —✱— X = 1; —△— average value; 0D model: —— 139

Figure III. 18: Influence of T on pH variation – comparison between 0D and 1D models on the average pH value, deep cell geometry – simulation run 3, 7 and 8.....140

Figure III. 19: profiles versus time for increasing initial urea concentrations (a: 25 mM and b: 200 mM) – run 2 and 6.....141

Figure III. 20: CO_2 (a) and NH_3 (b) concentration profiles for an initial urea concentration of 200 mM 141

Figure III. 21: Temperature profiles for an initial urea concentration of 200 mM, T_{init} = 25°C, deep cell geometry – run 6 142

Figure III. 22: **rhydro** (a) and urea concentration (b) profiles versus time for initial urea concentration equal to 200 mM, deep cell geometry – simulation run 6 143

Figure III. 23: Urea concentration versus time for different initial urea concentrations in deep cell and thin film geometries – run 9 to 16 144

Figure III. 24: Variation of the solution thickness in deep cell and thin film geometries – run 16.....145

Figure III. 25: pH variation versus time in deep cell and thin film geometries – run 16 146

Figure III. 26: Mean pH variation versus time for different initial urea concentrations (a: 200 mM; b: 100 mM; c: 75 mM; d: 25 mM) in deep cell and thin film geometries – run 9 to 16; Mean pH value: —○— H_{init} = 15 mm ; —✱— H_{init} = 0.5 mm 147

Figure III. 27: Variation of the ratios between the fluxes and the mean concentration of CO_2 and NH_3 (a: $JCO_2/[CO_2]_{mean}$ and b: $JNH_3/[NH_3]_{mean}$) during time in deep cell and thin film geometries – run 16; Mean pH value: --- H_{init} = 15 mm ; — H_{init} = 0.5 mm 148

Figure III. 28: Mean pH variation versus time for different initial external temperature T_{ext} (a: 5°C run 17-21; b: 10°C run 22-26; c: 20°C run 25-28; d: 30°C run 29-32) and urease concentrations in thin film geometries – run 17 to 36; —✱— [urease] = 0.5 $u.mL^{-1}$; —○— [urease] = 2 $u.mL^{-1}$, —◇— [urease] = 3.5 $u.mL^{-1}$, —■— [urease] = 6.7 $u.mL^{-1}$, —✚— [urease] = 10.5 $u.mL^{-1}$ 150

Figure III. 29: Gelation and advanced gelation time versus the external temperature at increasing urease concentration – run 17 to 32 153

Figure III. 30: Mean pH variation versus time for different initial external temperature T_{ext} (a: 5°C run 37-42; b: T_{ext} = 30°C run 43-48) and urease concentrations in thin film geometries – run 37 to 48; —✱— [urease] = 2000 $u.mL^{-1}$ RH = 60%; —○— [urease] = 2000 $u.mL^{-1}$ RH = 75%, —◇— [urease] = 2000 $u.mL^{-1}$ RH = 95%, —■— [urease] = 10500 $u.mL^{-1}$ RH = 60%, —✚— [urease] = 10500 $u.mL^{-1}$ RH = 75%, —□— [urease] = 10500 $u.mL^{-1}$ RH = 95%.....154

Figure III. 31: Mean pH variation versus time for different initial external temperature Text (5 and 25°C) and two initial solution thicknesses – run 49 to 52; —✱— Text = 5°C Hinit = 1 mm, —○—

Text = 25°C Hinit = 1 mm, —◇— Text = 5°C Hinit = 1.5 mm, —■— Text = 25°C Hinit = 1.5 mm 156

Chapitre IV

Figure IV. 1: influence of solvent on gelation kinetics of chitosan (monitored through pH evolution) with 2.5% w/v chitosan solution prepared in HCl 0.1 M or acetic acid 0.35 M, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and 75 mM urea concentration at 25°C. 175

Figure IV. 2: SEM pictures of cross-section (a) and surface (b) of flat-sheet chitosan gels elaborated by enzymatic process with 2.5% w/v chitosan prepared in HCl 0.1 M, 3.5 u.mL^{-1} urease concentration and 75 mM urea concentration at 5°C.....176

Figure IV. 3: influence of PEG size and weight ratio chitosan/PEG on the permeability of chitosan gel elaborated by wet process 177

Figure IV. 4: influence of elaboration process on the permeability; gels elaborated from Chitosan solutions at 2.5% w/v with PEG in HCl 0.1 M with weight ratio of chitosan on PEG 1/1.....178

Figure IV. 5: DSC thermographs of chitosan, PEG 6000, solution chitosan-PEG 6000 (a) and porous gels elaborated either by enzymatic process or wet process (b) 179

Figure IV. 6: SEM pictures of cross-section and surface of chitosan/PEG6000 gels elaborated by wet process (a;b) and enzymatic process (c;d) 180

Figure IV. 7: Effect of thickness casting on the flux for enzymatic gel with PEG6000 181

Figure IV. 8: pH variations during enzymatic urea hydrolysis for [urease]= 0.5 u.mL^{-1} at 25°C and with a urea concentration fixed at 50 mM in (i) non-buffered water and (ii) glutaraldéhyde solution at 15 mM prepared in non-buffered water. 182

Figure IV. 9: pH variations during enzymatic gelation with [urea]=75 mM, [urease]= 3.5 u.mL^{-1} at 25°C in (i) chitosan solution at 2.5% w/v and (ii) by adding Ga in chitosan solution at 2.5% w/v. 183

Figure IV. 10: Reaction of acetylation of chitosan with acetic anhydride.....184

Figure IV. 11: SEM pictures of cross-section and surface of chitosan membrane enzymatic process elaborated from chitosan/PEG6000 and acetylated after gelation. 185

Figure IV. 12: Solute rejection of filtration at 1 bar for different molecular weight of PEG and PEO on a chitosan membrane 186

Figure IV. 13: Effect of pressure and pH solution on water flux for chitosan membrane 186

Figure IV. 14: effect of raise and drop of pressure between 0 and 1 bar on the water flux.....187

Figure IV. 15: effect of filtration duration on flux at 1 bar for membrane chitosan membrane.....188

Figure IV. 16: Sorption kinetics of Cu(II) on chitosan membrane (88 mg of dry chitosan membrane, 100 mL of Cu(II) solution at pH 3, 292 K and 150 rpm).....189

Figure IV. 17: sorption properties to remove Cu (II) from solution at 20 $mg.L^{-1}$ and pH 3 during filtration at 1 bar with chitosan membrane elaborated either by enzymatic or wet process 189

Table des Tableaux

Chapitre I

Table I. 1: Exemples de paramètres de la relation de Mark-Houwink-Sakurada pour différents couples solvant/polymère à température fixée.....17

Table I. 2: Principales propriétés et applications du chitosane.....18

Table I. 3: Exemple de sorption en fonction du type de soluté et pour différentes mises en forme du chitosane.....20

Table I. 4: Classification des procédés principaux membranaires selon la force motrice appliquée [58] 22

Table I. 5: Principales caractéristiques des membranes en fonction du procédé de filtration.....23

Table I. 6: Caractéristiques des membranes selon leur nature.....24

Table I. 7: Principaux solvants utilisés pour l'élaboration des membranes polymères à base de polymères synthétiques (non-solvant = eau).....30

Table I. 8: Vitesse initiale calculée à partir des 5 premières minutes d'évolution du pH au cours du temps. Uréasex-Uréey, x et y correspondant respectivement à la concentration en urée (mM) et en uréase ($u.mL^{-1}$) [7].....39

Table I. 9: Influence de la durée de l'étape de séchage à 50°C sur la morphologie de gels plans poreux de chitosane [103] 42

Table I. 10: Influence de la taille du PEG sur la porosité [104].....44

Table I. 11: Tableau récapitulatif de l'influence du rapport massique chi/NaCl sur les propriétés physiques de gels plans poreux de chitosane. Chi-NaCl x où x représente le rapport massique chi/NaCl [97].....48

Table I. 12: Synthèse des principaux gels poreux caractérisés en perméabilité en fonction du choix du porogène.....55

Table I. 13: Exemples de membranes en Polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou en polyéthersulfone (PES) 56

Table I. 14: Classification de certains cations métalliques et ligands selon la théorie HSAB.....57

Table I. 15: Exemples de capacité de sorption d'éléments métalliques sur du chitosane 62

Chapitre II

Table II. 1: Initial rates of pH variation for different urea concentrations ([urease] = 0.5 u.mL^{-1} and T = 25°C).....80

Table II. 2: Gelation (time and pH) and advanced gelation (time and pH) parameters for different chitosan concentrations at 25°C with a urea concentration fixed at 75 mM and a urease concentration fixed at 3.5 u.mL^{-1}.....89

Chapitre III

Table III. 1: Equilibrium reactions and constants.....102

Table III. 2: Enzymatic reaction kinetics validation range and parameters.....108

Table III. 3: System of chemical reaction involved in the chitosan enzymatic gelation.....129

Table III. 4: Subscripts and species 130

Table III. 5: Diffusion coefficients at 25°C in aqueous solution 132

Table III. 6: Model parameters used for simulation run performed in deep and thin cell conditions – free convection conditions for external transfers 137

Table III. 7: Model parameters used for simulation run performed in thin film conditions – free convection conditions for external transfers 151

Chapitre IV

Table IV. 1: influence of concentration of Ga in crosslinking bath on chemical resistance in acidic media 183

Table IV. 2: influence of molar ratio of hydroxyl groups of chitosan to epichlorohydrin on chemical resistance in acidic media 184

Références bibliographiques

1. Berland, J.-M.J., C., *Les procédés membranaires pour le traitement de l'eau*2002: M. D. L'AGRICULTURE.

2. Mark, H.F., *Encyclopedia of polymer science and technology*2007: Wiley-Interscience.

3. Bouyer, D.f., C. pochat, C. , *Procédés d'élaboration de membranes par séparation de phases.* Techniques de l'ingénieur, 2009.

4. Venault, A., et al., *Investigation of chitosan gelation mechanisms by a modeling approach coupled to local experimental measurement.* Aiche Journal, 2012. **58**(7): p. 2226-2240.

5. Venault, A., et al., *Modeling the Mass Transfers During the Elaboration of Chitosan-Activated Carbon Composites for Medical Applications.* Aiche Journal, 2010. **56**(6): p. 1593-1609.

6. Chenite, A., et al., *Monolithic gelation of chitosan solutions via enzymatic hydrolysis of urea.* Carbohydrate Polymers, 2006. **64**(3): p. 419-424.

7. Yan, X.Z., et al., *Enzymatic Control of Chitosan Gelation for Delivery of Periodontal Ligament Cells.* Macromolecular Bioscience, 2014. **14**(7): p. 1004-1014.

8. Crini, G.B., P-M. Guibal, *chitine et chitosane, du biopolymère à l'application*, P.u.d. France-Comté, Editor 2009. p. chap 1.

9. Chenite, A., et al., *Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions.* Carbohydrate Polymers, 2001. **46**(1): p. 39-47.

10. NO J-K, M.S.-P., *Preparation of chitin and chitosan in: Chitin Handbook* ed. G.A. Edizioni1997.

11. Sorlier, P., et al., *Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan.* Biomacromolecules, 2001. **2**(3): p. 765-772.

12. Qin, C.Q., et al., *Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity.* Carbohydrate Polymers, 2006. **63**(3): p. 367-374.

13. Rinaudo, M., G. Pavlov, and J. Desbrieres, *Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan.* Polymer, 1999. **40**(25): p. 7029-7032.

14. Pillai, C.K.S., W. Paul, and C.P. Sharma, *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation.* Progress in Polymer Science, 2009. **34**(7): p. 641-678.

15. Chattopadhyay, D.P. and M.S. Inamdar, *Aqueous Behaviour of Chitosan.* International Journal of Polymer Science, 2010.

16. Nguyen, T.T.B., et al., *Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions.* Journal of Applied Polymer Science, 2008. **107**(4): p. 2588-2593.

17. Knill, C.J., et al., *Acid hydrolysis of commercial chitosans.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005. **80**(11): p. 1291-1296.

18. Fernandez-Megia, E., et al., *Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by H-1-NMR.* Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(2): p. 155-161.

19. Hirai, A., H. Odani, and A. Nakajima, *Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by H-1-Nmr Spectroscopy.* Polymer Bulletin, 1991. **26**(1): p. 87-94.

20. Beppu, M.M., et al., *Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption.* Journal of Membrane Science, 2007. **301**(1-2): p. 126-130.

21. Balazs, N. and P. Sipos, *Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan.* Carbohydrate research, 2007. **342**(1): p. 124-130.

22. Domszy, J.G. and G.A.F. Roberts, *Evaluation of Infrared Spectroscopic Techniques for Analyzing Chitosan.* Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics, 1985. **186**(8): p. 1671-1677.

23. Roberts, G.A.F. and J.G. Domszy, *Determination of the Viscometric Constants for Chitosan.* International Journal of Biological Macromolecules, 1982. **4**(6): p. 374-377.

24. Rinaudo, M., M. Milas, and P. Ledung, *Characterization of Chitosan - Influence of Ionic-Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion.* International Journal of Biological Macromolecules, 1993. **15**(5): p. 281-285.

25. Kasaai, M.R., J. Arul, and C. Charlet, *Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan.* Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2000. **38**(19): p. 2591-2598.

26. Lesec, J., *Masses molaires moyennes.* Technique de l'ingénieur, 1996.

27. Zarzycki, R. and Z. Modrzejewska, *[Use of chitosan in medicine and biomedical engineering].* Polimery w medycynie, 2003. **33**(1-2): p. 47-58.

28. Hein, S., et al., *Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives.* Materials Science and Technology, 2008. **24**(9): p. 1053-1061.

29. Mathur, N.K. and C.K. Narang, *Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals.* Journal of Chemical Education, 1990. **67**(11): p. 938-942.

30. Muzzarelli, R.A.A., et al., *The biocompatibility of dibutyryl chitin in the context of wound dressings.* Biomaterials, 2005. **26**(29): p. 5844-5854.

31. Kumar, M.N.V.R., *A review of chitin and chitosan applications.* Reactive & Functional Polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.

32. Agullo, E., et al., *Present and future role of chitin and chitosan in food.* Macromolecular Bioscience, 2003. **3**(10): p. 521-530.

33. Propieszny H, S.H., Chirkov SN, Atabekov JG, *New applications of chitosan in agriculture in : chitin world*, 1994, Bremerhaven: Wirtschaftsuerlag. p. 246.

34. Kumar, R., et al., *Synthesis and characterization of novel water soluble derivative of Chitosan as an additive for polysulfone ultrafiltration membrane.* Journal of Membrane Science, 2013. **440**: p. 140-147.

35. Wang, C.C., et al., *High flux and antifouling filtration membrane based on non-woven fabric with chitosan coating for membrane bioreactors.* Bioresource Technology, 2010. **101**(14): p. 5469-5474.

36. Bailey, S.E., et al., *A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals.* Water Research, 1999. **33**(11): p. 2469-2479.

37. Konishi, S., et al., *Binary metal-ion sorption during permeation through chelating porous membranes.* Journal of Membrane Science, 1996. **111**(1): p. 1-6.

38. Limam, Z., et al., *Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties.* African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(4): p. 640-647.

39. Kong, M., et al., *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review.* International Journal of Food Microbiology, 2010. **144**(1): p. 51-63.

40. Benhabiles, S., et al., *Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste.* Food Hydrocolloids, 2012. **29**(1): p. 48-56.

41. Kittur, F.S., A.B.V. Kumar, and R.N. Tharanathan, *Low molecular weight chitosans - preparation by depolymerization with Aspergillus niger pectinase, and characterization.* Carbohydrate research, 2003. **338**(12): p. 1283-1290.

42. Je, J.Y. and S.K. Kim, *Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(18): p. 6629-6633.

43. Aroua, M.K., F.M. Zuki, and N.M. Sulaiman, *Removal of chromium ions from aqueous solutions by polymer-enhanced ultrafiltration.* Journal of Hazardous Materials, 2007. **147**(3): p. 752-758.

44. Verbych, S., M. Bryk, and M. Zaichenko, *Water treatment by enhanced ultrafiltration.* Desalination, 2006. **198**(1-3): p. 295-302.

45. Villalobos, L.F., T. Yapici, and K.V. Peinemann, *Poly-thiosemicarbazide membrane for gold recovery.* Separation and Purification Technology, 2014. **136**: p. 94-104.

46. Liu, C.X. and R.B. Bai, *Adsorptive removal of copper ions with highly porous chitosan/cellulose acetate blend hollow fiber membranes.* Journal of Membrane Science, 2006. **284**(1-2): p. 313-322.

47. Kaminski, W. and Z. Modrzejewska, *Application of chitosan membranes in separation of heavy metal ions.* Separation Science and Technology, 1997. **32**(16): p. 2659-2668.

48. Modrzejewska, Z. and W. Kaminski, *Separation of Cr(VI) on chitosan membranes.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 1999. **38**(12): p. 4946-4950.

49. Ngah, W.S.W., C.S. Endud, and R. Mayanar, *Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads.* Reactive & Functional Polymers, 2002. **50**(2): p. 181-190.

50. Eser, A., et al., *Removal of nickel(II) ions by histidine modified chitosan beads.* Chemical Engineering Journal, 2012. **210**: p. 590-596.

51. Vieira, R.S. and M.M. Beppu, *Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres.* Water Research, 2006. **40**(8): p. 1726-1734.

52. Ruiz, M., A.M. Sastre, and E. Guibal, *Palladium sorption on glutaraldehyde-crosslinked chitosan.* Reactive & Functional Polymers, 2000. **45**(3): p. 155-173.

53. Suc, N.V. and H.T.Y. Ly, *Lead (II) removal from aqueous solution by chitosan flake modified with citric acid via crosslinking with glutaraldehyde.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2013. **88**(9): p. 1641-1649.

54. Zhou, Z.K., et al., *Adsorption of food dyes from aqueous solution by glutaraldehyde cross-linked magnetic chitosan nanoparticles.* Journal of Food Engineering, 2014. **126**: p. 133-141.

55. Chiou, M.S. and H.Y. Li, *Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads.* Chemosphere, 2003. **50**(8): p. 1095-1105.

56. Poon, L., L.D. Wilson, and J.V. Headley, *Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties.* Carbohydrate Polymers, 2014. **109**: p. 92-101.

57. Wilson, L.D. and C. Xue, *Macromolecular Sorbent Materials for Urea Capture.* Journal of Applied Polymer Science, 2013. **128**(1): p. 667-675.

58. szymczyk A, F.P., *Les procédés de filtration membranaire appliqués au raitement des eaux dans : Traitement et Epuration des Eaux Industrielles Polluées – Procédés Membranaires, Bioadsorption et Oxydation chimique*, 2007, Presses Universitaires de Franches-Comté. p. 65-103.

59. Remigy, J.-C.D., S, *Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules.* Techniques de l'ingénieur, 2007.

60. Aimar, P., *Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Mise en oeuvre et performances.* Techniques de l'ingénieur, 2006.

61. Aimar, P.B., P. Maurel, A., *Filtration memrbanaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspect théoriques : perméabilité et sélectivité.* Techniques de l'ingénieur, 2010.

62. Causserand, C., *Filtration membranaires (OI, NF, UF) - Caractérisation des membranes.* Techniques de l'ingénieur, 2006.

63. Crini, G.B., M-P., *Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique* 2007: presses universitaires de franche-comté.

64. Rabiller-Baudry, M., *Nettoyage et décolmatage des membranes de filtration.* Techniques de l'ingénieur, 2009.

65. Nguyen, Q.T., et al., *Dry-cast process for synthetic microporous membranes: Physico-chemical analyses through morphological studies.* Journal of Membrane Science, 2010. **358**(1-2): p. 13-25.

66. Qin, J.J., et al., *Development of a LCST membrane forming system for cellulose acetate ultrafiltration hollow fiber.* Separation and Purification Technology, 2005. **42**(3): p. 291-295.

67. Fu, X.Y., et al., *Preparation of polymer blend hollow fiber membrane via thermally induced phase separation.* Separation and Purification Technology, 2006. **52**(2): p. 363-371.

68. Matsuyama, H., S. Berghmans, and D.R. Lloyd, *Formation of anisotropic membranes via thermally induced phase separation.* Polymer, 1999. **40**(9): p. 2289-2301.

69. Vogrin, N., et al., *The wet phase separation: the effect of cast solution thickness on the appearance of macrovoids in the membrane forming ternary cellulose acetate/acetone/water system.* Journal of Membrane Science, 2002. **207**(1): p. 139-141.

70. Tsai, H.A., et al., *Morphology control of polysulfone hollow fiber membranes via water vapor induced phase separation.* Journal of Membrane Science, 2006. **278**(1-2): p. 390-400.

71. Li, C.L., et al., *Insight into the preparation of poly(vinylidene fluoride) membranes by vapor-induced phase separation.* Journal of Membrane Science, 2010. **361**(1-2): p. 154-166.

72. Wang, X.Y., et al., *Formation mechanism and crystallization of poly(vinylidene fluoride) membrane via immersion precipitation method.* Desalination, 2009. **236**(1-3): p. 170-178.

73. deZarate, J.M.O., L. Pena, and J.I. Mengual, *Characterization of membrane distillation membranes prepared by phase inversion.* Desalination, 1995. **100**(1-3): p. 139-148.

74. Watchanida, C., et al., *Effect of a drying pretreatment on morphology of porous poly(Ether-Imide) membrane prepared using vapor-induced phase separation.* Drying Technology, 2006.

24(10): p. 1317-1326.

75. Mukherjee, R. and S. De, *Adsorptive removal of nitrate from aqueous solution by polyacrylonitrile-alumina nanoparticle mixed matrix hollow-fiber membrane.* Journal of Membrane Science, 2014. **466**: p. 281-292.

76. Almdal, K., et al., *What Is a Gel.* Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia, 1993. **76**: p. 49-51.

77. Winter, H.H. and M. Mours, *Rheology of polymers near liquid-solid transitions.* Neutron Spin Echo Spectroscopy Viscoelasticity Rheology, 1997. **134**: p. 165-234.

78. Wang, X.H., Y.N. Yan, and R.J. Zhang, *A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2006. **21**(1): p. 39-54.

79. Madhavan, K., et al., *Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs.* Acta Biomaterialia, 2010. **6**(4): p. 1413-1422.

80. Venault, A., et al., *Elaboration of Chitosan/Activated Carbon Composites for the Removal of Organic Micropollutants from Waters.* Environmental Technology, 2008. **29**(12): p. 1285-1296.

81. Montembault, A., C. Viton, and A. Domard, *Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent.* Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 653-662.

82. Krajewska, B., *Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review.* Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2009. **59**(1-3): p. 9-21.

83. Shaw, W.H.R. and J.J. Bordeaux, *The Decomposition of Urea in Aqueous Media.* Journal of the American Chemical Society, 1955. **77**(18): p. 4729-4733.

84. Takishima, K., T. Suga, and G. Mamiya, *The Structure of Jack Bean Urease - the Complete Amino-Acid Sequence, Limited Proteolysis and Reactive Cysteine Residues.* European Journal of Biochemistry, 1988. **175**(1): p. 151-165.

85. Krajewska, B. and S. Ciurli, *Jack bean (Canavalia ensiformis) urease. Probing acid-base groups of the active site by pH variation.* Plant Physiology and Biochemistry, 2005. **43**(7): p. 651-658.

86. Combes, D.M., P. , *Biotalyse ou catalyse enzymatique.* Techniques de l'ingénieur, 2009.

87. Qin, Y.J. and J.M.S. Cabral, *Kinetic-Studies of the Urease-Catalyzed Hydrolysis of Urea in a Buffer-Free System.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994. **49**(3): p. 217-240.

88. Martins, M.B.F., et al., *Urease Immobilization on an Alkylamine Derivative of Titanium(Iv)-Porous Silica - Kinetics and Operational Stability.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1987. **39**(3): p. 201-213.

89. Huang, T.C. and D.H. Chen, *Kinetic-Study of Urease-Catalyzed Urea Hydrolysis.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1991. **52**(4): p. 433-444.

90. Fidaleo, M. and R. Lavecchia, *Kinetic study of enzymatic urea hydrolysis in the pH range 4-9.* Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2003. **17**(4): p. 311-318.

91. Cornish-Bowden. Athel, J.M., Saks Valdur,, *Cinétique enzymatique*2012: EDP Sciences.

92. Moynihan, H.J., et al., *Urea Hydrolysis by Immobilized Urease in a Fixed-Bed Reactor - Analysis and Kinetic Parameter-Estimation.* Biotechnology and Bioengineering, 1989. **34**(7): p. 951-963.

93. Hoare, J.P. and K.J. Laidler, *The Molecular Kinetics of the Urea-Urease System .2. The Inhibition by Products.* Journal of the American Chemical Society, 1950. **72**(6): p. 2487-2489.

94. Krajewska, B., *Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review.* Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2009. **59**(1-3): p. 22-40.

95. Ghaee, A., et al., *Effects of chitosan membrane morphology on copper ion adsorption.* Chemical Engineering Journal, 2010. **165**(1): p. 46-55.

96. Zeng, M.F. and Z.P. Fang, *Preparation of sub-micrometer porous membrane from chitosan/polyethylene glycol semi-IPN.* Journal of Membrane Science, 2004. **245**(1-2): p. 95-102.

97. Chao, A.C., S.H. Yu, and G.S. Chuang, *Using NaCl particles as porogen to prepare a highly adsorbent chitosan membranes.* Journal of Membrane Science, 2006. **280**(1-2): p. 163-174.

98. Rabelo, R.B., et al., *Adsorption of Copper(II) and Mercury(II) Ions onto Chemically-modified Chitosan Membranes: Equilibrium and Kinetic Properties.* Adsorption Science & Technology, 2012. **30**(1): p. 1-21.

99. Vieira, R.S. and M.M. Beppu, *Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions.* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **279**(1-3): p. 196-207.

100. Vieira, R.S., et al., *Adsorption and desorption of binary mixtures of copper and mercury ions on natural and crosslinked chitosan membranes.* Adsorption-Journal of the International Adsorption Society, 2007. **13**(5-6): p. 603-611.

101. Clasen, C., T. Wilhelms, and W.M. Kulicke, *Formation and characterization of chitosan membranes.* Biomacromolecules, 2006. **7**(11): p. 3210-3222.

102. Hong, H., J. Wei, and C.S. Liu, *Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration.* Composites Part B-Engineering, 2007. **38**(3): p. 311-316.

103. Mi, F.L., et al., *Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing.* Biomaterials, 2001. **22**(2): p. 165-173.

104. Zeng, M.F., Z.P. Fang, and C.W. Xu, *Novel method of preparing microporous membrane by selective dissolution of chitosan/polyethylene glycol blend membrane.* Journal of Applied Polymer Science, 2004. **91**(5): p. 2840-2847.

105. Zeng, M.F., Z.P. Fang, and C.W. Xu, *Effect of compatibility on the structure of the microporous membrane prepared by selective dissolution of chitosan/synthetic polymer blend membrane.* Journal of Membrane Science, 2004. **230**(1-2): p. 175-181.

106. Li, X.Y., et al., *Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs.* International Journal of Pharmaceutics, 2011. **420**(2): p. 371-377.

107. Machado, R.L., et al., *Evaluation of a chitosan membrane for removal of endotoxin from human IgG solutions.* Process Biochemistry, 2006. **41**(11): p. 2252-2257.

108. Mei, L.Q., et al., *Preparation, characterization and evaluation of chitosan macroporous for potential application in skin tissue engineering.* International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **51**(5): p. 992-997.

109. Santos, D.E.S., et al., *Chitosan macroporous asymmetric membranes-Preparation, characterization and transport of drugs.* Journal of Membrane Science, 2008. **325**(1): p. 362-

370.

110. Zeng, X.F. and E. Ruckenstein, *Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 1996. **35**(11): p. 4169-4175.

111. Baroni, P., et al., *Evaluation of batch adsorption of chromium ions on natural and crosslinked chitosan membranes.* Journal of Hazardous Materials, 2008. **152**(3): p. 1155-1163.

112. Kildeeva, N.R., et al., *About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde.* Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2009. **35**(3): p. 360-369.

113. Chen, J.P. and S.H. Chiu, *Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis.* Bioprocess Engineering, 1999. **21**(4): p. 323-330.

114. Maminski, M.L., et al., *Simple urea-glutaraldehyde mix used as a formaldehyde-free adhesive: effect of blending with nano-Al2O3.* European Journal of Wood and Wood Products, 2011. **69**(3): p. 505-506.

115. Beppu, M.M., et al., *Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine.* Journal of Membrane Science, 2004. **240**(1-2): p. 227-235.

116. Laus, R., et al., *Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent.* Journal of Hazardous Materials, 2010. **183**(1-3): p. 233-241.

117. Ngah, W.S.W., S. Ab Ghani, and A. Kamari, *Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads.* Bioresource Technology, 2005. **96**(4): p. 443-450.

118. Mi, F.L., S.S. Shyu, and C.K. Peng, *Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin.* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2005. **43**(10): p. 1985-2000.

119. Mi, F.L., H.W. Sung, and S.S. Shyu, *Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker.* Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2000. **38**(15): p. 2804-2814.

120. Liu, B.S. and T.B. Huang, *A Novel Wound Dressing Composed of Nonwoven Fabric Coated with Chitosan and Herbal Extract Membrane for Wound Healing.* Polymer Composites, 2010. **31**(6): p. 1037-1046.

121. East, G.C. and Y.M. Qin, *Wet Spinning of Chitosan and the Acetylation of Chitosan Fibers.* Journal of Applied Polymer Science, 1993. **50**(10): p. 1773-1779.

122. Gassara, S., et al., *Pore size tailoring of poly(ether imide) membrane from UF to NF range by chemical post-treatment using aminated oligomers.* Journal of Membrane Science, 2013. **436**: p. 36-46.

123. Yuan, Y., et al., *The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release.* Carbohydrate Polymers, 2007. **68**(3): p. 561-567.

124. Zeng, X.F. and E. Ruckenstein, *Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations.* Journal of Membrane Science, 1998. **148**(2): p. 195-205.

125. Damodar, R.A., S.J. You, and H.H. Chou, *Study the self cleaning, antibacterial and photocatalytic properties of TiO2 entrapped PVDF membranes.* Journal of Hazardous Materials, 2009. **172**(2-3): p. 1321-1328.

126. Cao, X.C., et al., *Effect of TiO2 nanoparticle size on the performance of PVDF membrane.* Applied Surface Science, 2006. **253**(4): p. 2003-2010.

127. Rahimpour, A., et al., *Coupling TiO2 nanoparticles with UV irradiation for modification of polyethersulfone ultrafiltration membranes.* Journal of Membrane Science, 2008. **313**(1-2): p. 158-169.

128. Bhatt, R.R. and B.A. Shah, *Sorption studies of heavy metal ions by salicylic acid-formaldehyde-catechol terpolymeric resin: Isotherm, kinetic and thermodynamics.* Arabian Journal of Chemistry, 2015. **8**(3): p. 414-426.

129. Ceglowski, M. and G. Schroeder, *Preparation of porous resin with Schiff base chelating groups for removal of heavy metal ions from aqueous solutions.* Chemical Engineering Journal, 2015. **263**: p. 402-411.

130. Guibal, E., *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review.* Separation and Purification Technology, 2004. **38**(1): p. 43-74.

131. Guibal, E., T. Vincent, and R. Navarro, *Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials.* Journal of Materials Science, 2014. **49**(16): p. 5505-5518.

132. Guibal, E., C. Milot, and J.M. Tobin, *Metal-anion sorption by chitosan beads: Equilibrium and kinetic studies.* Industrial & Engineering Chemistry Research, 1998. **37**(4): p. 1454-1463.

133. Guzman, J., et al., *Vanadium interactions with chitosan: Influence of polymer protonation and metal speciation.* Langmuir, 2002. **18**(5): p. 1567-1573.

134. Monteiro, O.A.C. and C. Airoldi, *Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system.* International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **26**(2-3): p. 119-128.

135. Vieira, R.S., et al., *Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: An XPS investigation of mechanism.* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2011. **374**(1-3): p. 108-114.

136. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications.* Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.

137. Ngah, W.S.W. and S. Fatinathan, *Chitosan flakes and chitosan-GLA beads for adsorption of p-nitrophenol in aqueous solution.* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2006. **277**(1-3): p. 214-222.

138. Liu, L., et al., *Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO3 for injectable drug delivery system.* International Journal of Pharmaceutics, 2011. **414**(1-2): p. 6-15.

139. Guibal, E., et al., *Platinum and palladium sorption on chitosan derivatives.* Separation Science and Technology, 2001. **36**(5-6): p. 1017-1040.

140. Caneba, G.T. and D.S. Soong, *Polymer Membrane Formation through the Thermal-Inversion Process .1. Experimental-Study of Membrane-Structure Formation.* Macromolecules, 1985. **18**(12): p. 2538-2545.

141. Zhao, N., et al., *Superhydrophobic surface from vapor-induced phase separation of copolymer micellar solution.* Macromolecules, 2005. **38**(22): p. 8996-8999.

142. M'barki, O., et al., *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, 2014. **458**: p. 225-235.

143. DeSimone, J.M., *Practical approaches to green solvents.* Science, 2002. **297**(5582): p. 799-803.

144. Schrotter, J.-C.L., B., *Membrane technologies for water applications*, 2012, WssTP.

145. Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 2nd Edition ed1995.

146. Celine, P.B., et al., *Development and characterization of composite chitosan/active carbon hydrogels for a medical application.* Journal of Applied Polymer Science, 2013. **128**(5): p. 2945-2953.

147. Barre, C., D. O'Neil, and V.M. Bricelj, *Preparation of large bivalve specimens for scanning electron microscopy using hexamethyldisilazane (HMDS).* Journal of Shellfish Research, 2006. **25**(2): p. 639-641.

148. Wang, Q.Z., et al., *Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation.* Carbohydrate Polymers, 2006. **65**(2): p. 194-201.

149. Kolodziejczyk, M., et al., *Human Demineralized Bone Matrix Granules Enhance Maturation of Osteoclasts in Cell Culture.* Tissue Engineering Part A, 2015. **21**: p. S324-S324.

150. Wlodarczyk, D.M., J-P. Soussan, L. Bouyer, D. Faur, C. , *Enzymatic gelation to prepare chitosan gels: study of gelation kinetics and identification of limiting parameters for controlled gel morphology* submitted.

151. Lide, D., *Handbook of Chemistry and Physics*. 83rd Edition ed2002.

152. Delleur, J.W., *the handbook of groundwater engineering*. second edition ed2006.

153. Dixon, N.E., et al., *Jack Bean Urease (Ec-3515) .5. On the Mechanism of Action of Urease on Urea, Formamide, Acetamide, N-Methylurea, and Related-Compounds.* Canadian Journal of Biochemistry, 1980. **58**(12): p. 1335-1344.

154. Venault, A., et al., *Preparation of Composite Hydrogels for Medical Applications: Experimental Study and Modeling of Mass Transfers.* International Journal of Chemical Reactor Engineering, 2010. **8**.

155. Bouyer, D., et al., *Morphological properties of membranes fabricated by VIPS process using PEI/NMP/water system: SEM analysis and mass transfer modelling.* Journal of Membrane Science, 2010. **349**(1-2): p. 97-112.

156. Park, H.C., et al., *Membrane formation by water vapor induced phase inversion.* Journal of Membrane Science, 1999. **156**(2): p. 169-178.

157. Matsuyama, H., et al., *Membrane formation via phase separation induced by penetration of nonsolvent from vapor phase. I. Phase diagram and mass transfer process.* Journal of Applied Polymer Science, 1999. **74**(1): p. 159-170.

158. Yip, Y. and A.J. McHugh, *Modeling and simulation of nonsolvent vapor-induced phase separation.* Journal of Membrane Science, 2006. **271**(1-2): p. 163-176.

159. Venault, A., et al., *A Review on Polymeric Membranes and Hydrogels Prepared by Vapor-Induced Phase Separation Process.* Polymer Reviews, 2013. **53**(4): p. 568-626.

160. Li, D.M., et al., *Membrane formation via thermally induced phase separation (TIPS): Model development and validation.* Journal of Membrane Science, 2006. **279**(1-2): p. 50-60.

161. Shojaie, S.S., W.B. Krantz, and A.R. Greenberg, *Dense Polymer Film and Membrane Formation*

Via the Dry-Cast Process .1. Model Development. Journal of Membrane Science, 1994. **94**: p. 255-280.

162. Tsay, C.S. and A.J. Mchugh, *Mass-Transfer Dynamics of the Evaporation Step in Membrane Formation by Phase Inversion.* Journal of Membrane Science, 1991. **64**(1-2): p. 81-92.

163. Bouyer, D., et al., *Influence of mass transfer on gelation time using VIPS-gelation process for chitin dissolved in LiCl/NMP solvent-Modelling and experimental study.* Chemical Engineering Journal, 2010. **157**(2-3): p. 605-619.

164. Zielinski, J.M. and J.L. Duda, *Predicting Polymer Solvent Diffusion-Coefficients Using Free-Volume Theory.* Aiche Journal, 1992. **38**(3): p. 405-415.

165. Alsoy, S. and J.L. Duda, *Modeling of multicomponent drying of polymer films.* Aiche Journal, 1999. **45**(4): p. 896-905.

166. Green, D. and R. Perry, *Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition*2007: McGraw-Hill Education.

167. Haynes, W.M. and D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 93rd Edition*2012: Taylor & Francis.

168. Roustan, M., *Transferts gaz-liquide dans les procedes de traitement des eaux et des effluents gazeux*. Tec & Doc ed2003, Paris.

169. Babel, S. and T.A. Kurniawan, *Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review.* Journal of Hazardous Materials, 2003. **97**(1-3): p. 219-243.

170. Changul, C., et al., *Chemical characteristics and acid drainage assessment of mine tailings from Akara Gold mine in Thailand.* Environmental Earth Sciences, 2010. **60**(8): p. 1583-1595.

171. Slowey, A.J., J.J. Rytuba, and G.E. Brown, *Speciation of mercury and mode of transport from placer gold mine tailings.* Environmental Science & Technology, 2005. **39**(6): p. 1547-1554.

172. Geremias, R., et al., *Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using Allium cepa L. as a bioindicator.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012. **79**: p. 116-121.

173. Reiad, N.A., et al., *Adsorptive removal of iron and manganese ions from aqueous solutions with microporous chitosan/polyethylene glycol blend membrane.* Journal of Environmental Sciences-China, 2012. **24**(8): p. 1425-1432.

174. Paduano, L., et al., *Mutual diffusion in aqueous solution of ethylene glycol oligomers at 25 degrees C.* Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1998. **94**(17): p. 2571-2576.

175. Gumi, T., et al., *Characterization of activated composite membranes by solute transport, contact angle measurement, AFM and ESR.* Journal of Membrane Science, 2003. **212**(1-2): p. 123-134.

176. Matsuyama, H., H. Shiraishi, and Y. Kitamura, *Effect of membrane preparation conditions on solute permeability in chitosan membrane.* Journal of Applied Polymer Science, 1999. **73**(13): p. 2715-2725.

177. Hsien, T.Y. and G.L. Rorrer, *Effects of Acylation and Cross-Linking on the Material Properties and Cadmium Ion Adsorption Capacity of Porous Chitosan Beads.* Separation Science and Technology, 1995. **30**(12): p. 2455-2475.

178. Zhao, Z.G., et al., *High performance ultrafiltration membrane based on modified chitosan*

coating and electrospun nanofibrous PVDF scaffolds. Journal of Membrane Science, 2012. **394**: p. 209-217.

Résumé

Elaboration contrôlée de membranes à base de chitosane pour le traitement de l'eau

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a pour objectif de mettre en place un nouveau procédé d'élaboration de membranes à base de chitosane pour le traitement d'effluents acides contenants des ions métallique. Soluble en milieu aqueux acide, le chitosane présente la propriété de gélifier lorsque le pH devient basique, ce qui permet d'envisager l'élaboration de membrane sans solvant organique contrairement aux polymères synthétiques classiques. Par ailleurs, ce travail de thèse s'est intéressé à un procédé original de gélification par voie enzymatique, dans lequel la gélification in-situ de la solution de chitosane permet une structuration contrôlée de la membrane contrairement aux procédés classiques qui donnent lieu à un front de gélification.

Une étude des cinétiques de gélification en fonction des paramètres d'élaboration (température et concentration en urée) a mis en évidence que seule la température est significativement influente sur le temps de gélification dès lors que la concentration en urée n'est pas limitante. Un modèle a été mis en place pour décrire la gélification enzymatique du chitosane afin de comprendre les mécanismes des cinétiques réactionnelles et de transferts lors de la formation du gel.

Des membranes de chitosane ont ainsi été élaborées par le procédé par voie enzymatique, la porosité de ces membranes ayant été générée avec un agent porogène (PEG 6000) et une réaction d'acétylation du chitosane ayant permis d'obtenir des membranes insolubles en milieu acide. Les membranes obtenues ont été caractérisées en termes de morphologie et de propriétés fonctionnelles (filtration, sorption du Cu(II) comme élément métallique modèle).

Mots clés : gélificaiton enzymatique, ultrafiltration, sorption

Abtract

Elaboration of chitosane membrane for water treatment

The Ph-D work presented in this manuscript aims to develop a new process for elaborate chitosan membranes for treatment of acidic media containing metal ions. Soluble In acidic aqueous media, gelation occurs when the pH becomes basic, allowing elaboration of membrane without the use of organic solvents unlike classical synthetic polymers. Moreover, this Ph-D work has focused on an original process enzymatic gelation which the in-situ gelation of chitosan solution allows a controlled structuration of the membrane unlike conventional processes which leads to a front gelling.

A study of gelation time as a function of the elaboration parameters (temperature and urea concentration) highlighted that only the temperature is a main parameter on gelation time since the urea concentration is not limiting. A model was developed to describe the chitosan enzymatic gelation in order to understand mechanisms of reaction kinetics and transfers during the gel formation.

Chitosan membranes have been prepared by enzymatic process, the porosity of such membranes have been generated with a blowing agent (PEG 6000) and an acetylation of chitosan having yielded insoluble membranes in acid medium. The resulting membranes were characterized by their morphology and functional properties (filtration, sorption of Cu (II) as model metal element).

Keywords : enzymatic gelation, ultrafiltration, sorption