



**HAL**  
open science

## Captage enzymatique du dioxyde de carbone

Nathalie Favre

► **To cite this version:**

Nathalie Favre. Captage enzymatique du dioxyde de carbone. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT: 2011LYO10109 . tel-00840947

**HAL Id: tel-00840947**

**<https://theses.hal.science/tel-00840947>**

Submitted on 3 Jul 2013

**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.

N° d'ordre 109-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON  
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Spécialité: Chimie

Soutenue publiquement le 11 Juillet 2011

par

**FAVRE Nathalie**

**CAPTAGE ENZYMATIQUE DU DIOXYDE DE CARBONE**

Directeur de thèse : Pr. Alain PIERRE

**JURY :**

Monsieur BIANCHI Daniel	Professeur	Président
Madame HECQUET Laurence	Professeur	Rapporteur
Monsieur LIVAGE Jacques	Professeur	Rapporteur
Monsieur MIGNANI Gérard	Docteur	Examineur
Monsieur PIERRE Alain	Professeur	Examineur
Madame CHOPARD Claude	Chargée de recherche CNRS	Invitée

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

## **M. le Professeur A. Bonmartin**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

---

## RESUME en français

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre du projet ACACIA (Amélioration du Captage du CO<sub>2</sub> Industriel et Anthropique) soutenue par le pôle de compétitivité AXELERA et financé par « FUI » et « LE GRAND LYON ». Notre objectif était d'immobiliser l'anhydrase carbonique dans des gels inorganiques, en particulier la silice afin de préserver la structure de l'enzyme, sa fonctionnalité et de la protéger de l'environnement physico-chimique environnant. Pour cela, des essais préliminaires simples nous ont permis d'élaborer et de construire une cellule, comprenant membrane polymérique poreuse imprégnée de solution enzymatique aqueuse, ou de gel de silice lui-même imprégné de solution aqueuse d'enzyme. A partir de ce montage, nous avons étudié des paramètres importants de la membrane, comprenant un tampon, sa nature, molarité et son pH, ainsi que la taille des pores de la membrane et la concentration en enzyme. Il a été trouvé qu'un tampon à base de bicarbonate permet de déplacer l'équilibre de déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq) vers un pH plus élevé, par l'apport des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> équilibrés par des cations comme Na<sup>+</sup>, et favorise une contribution plus importante à la diffusion du CO<sub>2</sub> à travers la membrane. Nous avons également observé que quelque soit le gaz de captage (100 % et / ou 10 % de CO<sub>2</sub>), le tampon et le type de membrane, une perméance maximum a été observée pour une concentration en enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>.

---

## TITRE en anglais

### ENZYMATIC CAPTURE OF CARBON DIOXIDE

---

## RESUME en anglais

This thesis was part of the ACACIA project on the Improvement of CO<sub>2</sub> capture from industrial and anthropogenic fumes, supported by the AXELERA and funded by « FUI » et « THE GRAND LYON ». Our goal was to immobilize the carbonic anhydrase in inorganic gels, particularly silica, in order to preserve the structure of the enzyme, its functionality and protection of the physico-chemical environment. For this, simple preliminary tests have allowed us to develop a cell comprising a porous polymeric membrane impregnated with the aqueous enzyme solution or a silica gel itself impregnated with the enzyme solution. Important parameters were then studied on this cell, comprising the buffer: its nature, molarity and pH, the membrane pore size, and the enzyme concentration. It was found that a bicarbonate-based buffer displaced the deprotonation equilibrium of CO<sub>2</sub>(aq) to a higher pH, due the contribution of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> balanced by cations such as Na<sup>+</sup>, and promotes a greater contribution to the CO<sub>2</sub> diffusion across the membrane. We also observed that whatever the gas (100 % and / or 10 % CO<sub>2</sub>), the buffer and the type of membrane, a maximum permeance was observed for an enzyme concentration of 0.2 mg mL<sup>-1</sup>.

---

## DISCIPLINE

CHIMIE, catalyse

---

## MOTS-CLES

Dioxyde de carbone, captage, enzyme, membrane liquide, membrane sol-gel, silice, CaCO<sub>3</sub>.

---

## INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon, IRCELYON, UMR – CNRS 5256, 2 avenue Albert Einstein, 69626 Villeurbanne cedex, France

# **REMERCIEMENTS**

## REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Alain PIERRE, Professeur à l'Université de Lyon 1, pour m'avoir accordé sa confiance pendant ces trois années de thèse. Au cours de ces années, sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier Monsieur Michel LACROIX, directeur de l'Institut de Recherche sur la Catalyse et l'Environnement, de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet ACACIA (Amélioration du CAPtage du CO<sub>2</sub> Industriel et Anthropique) soutenue par le pôle de compétitivité AXELERA et financé par « FUI » et « LE GRAND LYON ». Leur soutien a été grandement apprécié. Je remercie tout particulièrement Monsieur Paul BROUTIN pour avoir animé ce programme de recherche.

Je remercie également Madame Laurence HECQUET et Monsieur Jacques LIVAGE qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'éprouve un profond respect pour leur travail et leur parcours.

Merci à Monsieur Daniel BIANCHI et à Monsieur Gérard MIGNANI d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Madame Claude CHOPARD pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses explications lors de ma présence de quelques jours à Paris dans son équipe de recherche, afin de m'apprendre à doser des protéines ainsi qu'à effectuer des électrophorèses.

Je remercie tout particulièrement Mlle Flora CHAMBON, futur docteur, pour sa compagnie, son soutien, sa joie de vivre, nos discussions, nos soirées, nos séances sportives au badminton. J'ai rencontré une très belle personne et j'ajouterais une Amie avec un grand A.

Je remercie la moitié de Flora, Fafou pour ses petits roulés forts sympathiques et ses cocktails effectués au « feeling », sa gentillesse mais également ses tentatives d'attaques avec le volant au badminton.

Je remercie également Monsieur Gilbert SAPALY pour son aide lors de petits « pépins » techniques, pour nos moments de fou rire, de complicité, ses « Oui mais... » et son soutien.

Je remercie Monsieur Cyril FECHE pour nos discussions aussi bien sur le domaine de la chimie que sur ceux de la vie quotidienne dont notamment les voitures.

Je remercie également Rodrigo LOPES DE SOUZA pour m'avoir initié à la vie brésilien notamment par leurs cocktails et leurs nourritures.

Je tiens à remercier Madame Nadine ESSAYEM pour son soutien et sa gentillesse.

Je remercie également toute l'équipe « Biovert », dont notamment Marion ETERNOT, Franck RATABOUL, Virginie, Florian, Tiago, Adriana, Marie, Mary, Daniel...

Je remercie ma collègue de bureau, Madame Lorraine CHRIST pour ses conseils.

Je tiens à remercier Madame Christine BABOLAT pour sa disponibilité, son énergie et sa gentillesse.

Je remercie Madame Françoise BOSSELET pour avoir effectuer des diffractions aux rayons X de mes aérogels et xérogels.

Je tiens à remercier, Mesdames Nöelle CRISTIN et Pascale MASCUNAN pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur explication pour effectuer mes mesures de surface spécifique BET de poudres.

Je remercie également, Madame Laurence BUREL pour avoir effectuer des clichés de mes membranes au Microscope à Balayage Electronique et pour m'avoir accordée de son temps.

Je tiens à remercier Angélique, ma meilleure Amie, pour sa présence lors de cette thèse, son amitié et sa bonne humeur.

Je remercie également mes parents Mady et Claude pour, d'une part, m'avoir aidée financièrement dans mes études, d'autre part pour leur soutien et leur compréhension face à un domaine « la chimie » peut aimé du grand public.

Je tiens à remercier ma sœur Amandine pour son aide, sa présence et ses conseils.

Enfin je souhaite remercier mon futur époux Julien pour son soutien de tous les instants dans les moments de joies mais aussi de doutes, de remise en question ou encore de légers découragements.

En espérant n'avoir oublié personne !!



## **ACRONYMES**

## ACRONYMES

AA = Acide Acrylique

AAm = Acrylamide

AC = Anhydrase Carbonique

AIE = Agence Internationale de l'Energie

ATP = Adénosine TriPhosphate

BAC = Anhydrase Carbonique Bovine

BET = méthode de Brunauer, Emmett et Teller

Bis = N, N méthylène-bisacrylamide

BSA = Albumine de Sérum Bovin

CCS = CO<sub>2</sub> Capture and Storage

CHES = N-Cyclohexyltaurine

DDC = N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DEA = Diéthaloamine

DLA = Diffusion Limited Agregation

E.C.n = Enzyme Commission number

EOR = Enhanced Oil Recovery

GIEC = Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat

HCA = Anhydrase Carbonique Humaine

IRTF = absorption Infrarouge par Transformée de Fourier

IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry

KPS = Peroxodisulfate de potassium

MEA = Ethanolamine

MEB = Microscope Electronique à Balayage

NHS = N-hydroxysuccinimide

NMBA = N, N'-méthylènebisacrylamide

PABB = perles en polyacrylamide

PEI = Poly-éthylèneimine

PhTMOS = Phényltriméthoxysilane

p-NPA = para-nitrophényleacétate (p-NPA)

p-NP = para-nitrophénol

PSP = PhénolSulfonePhtaléine

PU = mousses de PolyUréthane

PVI = Poly(N-vinylimidazole)

RMN-MAS = Résonance Magnétique Nucléaire par Spinning à l'Angle Magique

SMAS = Acide 2-méthyl-2-propène-1-sulfonique

TEMED = N, N, N', N''-tétraméthyléthylènediamine

TEOS = Tétraéthoxysilane

TGA = Thermogravimétrie

TMOS = Tétraméthoxysilane

Tris = Tris-aminométhane



# **SOMMAIRE**

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>1</b>
<b>ACRONYMES</b> .....	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>CHAPITRE 1: BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. Captage du dioxyde de carbone</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 Impact du dioxyde de carbone sur l'effet de serre et techniques pour y remédier <sup>1</sup> .....	17
a. Les grandes filières de Captage du CO <sub>2</sub> <sup>1-4</sup> .....	17
b. Stockage du CO <sub>2</sub> <sup>2,3,5,6</sup> .....	19
c. Le stockage sous forme de carbonates solides <sup>2,7 à 13</sup> .....	19
a. Procédé par « lavage de gaz » de la société « CO <sub>2</sub> Solution Inc. » <sup>14 à 20</sup> .....	21
b. Procédé membranaire liquide.....	23
c. Procédé membranaire à base de microfibrilles poreuses de la société Carbozyme, Inc. <sup>26 à 29</sup> .....	24
d. Autres recherches expérimentales utilisant l'enzyme anhydrase carbonique <sup>30,31</sup> .....	26
<b>1.2. Chimie-physique du captage de CO<sub>2</sub> en milieu aqueux</b> .....	<b>29</b>
1.2.1 Dissolution du CO <sub>2</sub> gazeux, coté captage.....	29
a. Equilibre de dissolution du CO <sub>2</sub> gazeux.....	29
b. Valeur de la constante de Henry du CO <sub>2</sub> .....	30
1.2.2 Transformation en milieu aqueux, coté captage, des espèces moléculaires neutres CO <sub>2</sub> (aq) en espèces ionique HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	31
a. Equilibre de 1 <sup>ère</sup> déprotonation de CO <sub>2</sub> (aq).....	31
b. Mécanisme de la 1 <sup>ère</sup> déprotonation de CO <sub>2</sub> (aq).....	31
1.2.3 Transport des espèces de CO <sub>2</sub> neutres et ioniques en solution, du coté captage vers le coté relargage.....	32
1.2.4 Libération, coté relargage, du CO <sub>2</sub> capté.....	33
1.2.5 Transformation des ions HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en ions CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> et précipitation d'un carbonate solide.....	33
a. Equilibre de 2 <sup>ème</sup> déprotonation de CO <sub>2</sub> (aq).....	33
b. Précipitation de carbonate solide.....	34
<b>1.3. Références bibliographiques</b> .....	<b>35</b>
<b>CHAPITRE 2: LES ANHYDRASES CARBONIQUES</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1. Bibliographie sur les Anhydrases carboniques</b> .....	<b>41</b>
2.1.1 Généralités sur les enzymes.....	41
a. Définition <sup>1,2</sup> .....	41
b. Concentration en enzyme.....	42
c. Cinétique enzymatique <sup>3 à 11</sup> .....	43
d. Inhibition <sup>4 à 6,11</sup> .....	46
2.1.2 Description des enzymes anhydrase carbonique (AC).....	49
a. Historique <sup>1,12 à 17</sup> .....	49
b. Les différentes variétés d'anhydrase carbonique <sup>7,15,18</sup> .....	50
2.1.3 Mécanismes et cinétique catalytique de l'anhydrase carbonique (AC).....	51
a. Réactions catalysées par les anhydrases carboniques <sup>19</sup> .....	51
b. Méthodes expérimentales de détermination de l'activité enzymatique dans la réaction d'hydratation du CO <sub>2</sub> <sup>20 à 25</sup> .....	52
c. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydratation du CO <sub>2</sub> <sup>4,24 à 29</sup> .....	53
d. Autres paramètres influant sur la catalyse enzymatique d'hydratation du CO <sub>2</sub> <sup>18,30</sup> .....	58
e. Etudes du mécanisme enzymatique dans l'hydrolyse du para-nitrophénylacetate <sup>23,31 à 34</sup> .....	60
<b>2.2. Partie expérimentale</b> .....	<b>62</b>

2.2.1	. Source d'enzyme utilisée et caractérisation de la répartition en masse de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	62
a.	Source d'enzyme utilisée.....	62
b.	Analyse par électrophorèse de la source d'anhydrase carbonique utilisée dans cette thèse .....	62
2.2.2	. Détermination de l'activité enzymatique.....	63
a.	Objectif des tests d'activité catalytiques utilisés .....	63
b.	La méthode de Wilbur et Anderson et son adaptation.....	64
c.	Tampons utilisés.....	67
d.	Résultats .....	68
<b>2.3.</b>	<b>Conclusions du chapitre sur l'anhydrase carbonique .....</b>	<b>73</b>
<b>2.4.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE 3: ESSAIS PRELIMINAIRES ET CONSTRUCTION DE LA CELLULE A MEMBRANE LIQUIDE.....</b>		<b>79</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objectifs des études préliminaires.....</b>	<b>79</b>
<b>3.2.</b>	<b>Etudes préliminaires du captage de CO<sub>2</sub> par suivi de pression au-dessus d'un ballon d'eau .....</b>	<b>80</b>
3.2.1	. Montage expérimental.....	80
3.2.2	. Résultats: Influence de la masse d'enzyme et de la concentration en tampon pH ≈ 7 à base de NaHCO <sub>3</sub> (0.1M).....	82
<b>3.3.</b>	<b>Etudes préliminaires du captage de CO<sub>2</sub> par précipitation de CaCO<sub>3</sub> .....</b>	<b>83</b>
3.3.1	. Montage expérimental.....	83
3.3.2	. Résultats sur la cinétique de précipitation du CaCO <sub>3</sub> .....	87
a.	Influence des caractéristiques du tampon.....	87
b.	Influence de la proportion d'eau saturée en CO <sub>2</sub> et de la proportion de tampon, pour un tampon 1.4 M à pH = 10.5 .....	89
c.	Conclusion sur l'utilisation de la masse de CaCO <sub>3</sub> précipité pour caractériser le transfert de CO <sub>2</sub> .....	91
<b>3.4.</b>	<b>Etudes préliminaires de captage du CO<sub>2</sub> par un film aqueux simplifié.....</b>	<b>92</b>
3.4.1	. Montage .....	93
3.4.2	. Résultats .....	94
a.	Influence de la masse d'enzyme et de la concentration en tampon pH ≈ 7 à base de NaHCO <sub>3</sub> .....	94
b.	Influence de l'épaisseur du film liquide .....	97
<b>3.5.</b>	<b>Construction de la membrane liquide mince.....</b>	<b>99</b>
3.5.1	. Cellule contenant la membrane liquide.....	99
3.5.2	. Système d'alimentation en continu du CO <sub>2</sub> à capter.....	101
3.5.3	. Système de récupération et d'analyse du gaz relargué .....	101
<b>3.6.</b>	<b>Conclusions des études préliminaires.....</b>	<b>103</b>
<b>3.7.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>104</b>
<b>CHAPITRE 4: CAPTAGE DU CO<sub>2</sub> PAR MEMBRANES LIQUIDES .....</b>		<b>105</b>
<b>4.1.</b>	<b>Conditions générales de captage.....</b>	<b>105</b>
4.1.1	. Rappel du principe de fonctionnement d'une membrane de captage liquide .....	105
4.1.2	. Température et gaz de captage sélectionnés.....	108
a.	Température prévalant dans tous les tests sur membrane fine présentés dans ce mémoire ....	108
b.	Choix des pourcentages de CO <sub>2</sub> dans les gaz soumis au captage.....	108
<b>4.2.</b>	<b>Résultats obtenus sur les membranes liquides et un gaz à 100 % de CO<sub>2</sub> côté captage .....</b>	<b>110</b>
4.2.1	. Etude du transfert de CO <sub>2</sub> (g) par suivi de concentration et de pression différentielle, sans balayage d'azote coté relargage.....	110
4.2.1.1	Mode opératoire.....	110
4.2.1.2	Résultats obtenus avec un film aqueux d'épaisseur variable disposé au-dessus d'une membrane polymérique .....	111
a.	Evolution de la concentration en CO <sub>2</sub> en fonction de la hauteur du film d'eau, sans enzyme.....	111

b.	Influence de la concentration en enzyme pour un film aqueux de 1 mL (épaisseur équivalent 1.17 mm) sans tampon .....	112
c.	Influence de la nature et de la molarité du tampon .....	115
d.	Influence de la nature et de la taille des pores de la membrane polymérique.....	117
4.2.1.3	Résultats obtenus sur une membrane hydrophile de type PVDF imprégnée de solution aqueuse, prise en sandwich entre 2 membranes hydrophobes .....	119
a.	Influence de la concentration enzymatique présente dans l'eau, sans tampon .....	120
b.	Influence d'un tampon phosphate 0.1 M .....	121
c.	Influence de la concentration enzymatique dans un tampon phosphate 1 M.....	123
4.2.2	Etude du transfert de CO <sub>2</sub> (g) par suivi de concentration, sous balayage d'azote coté relargage 125	
4.2.2.1	Mode opératoire.....	125
4.2.2.2	Résultats des campagnes de balayage de paramètres.....	127
a.	Influence de l'enzyme, en l'absence de tampon .....	127
b.	Influence des enzymes en présence d'un tampon.....	128
c.	Essai d'un type de membrane fine à base de nylon tissé .....	133
<b>4.3.</b>	<b>Résultats obtenus sur les membranes liquides et un gaz à 10 % CO<sub>2</sub> - 90 % N<sub>2</sub> côté captage .....</b>	<b>134</b>
4.3.1	Influence d'un tampon et de la concentration en enzyme .....	134
4.3.2	Comportement d'une membrane fine à base de nylon tissé NY20.....	143
4.3.3	Comportement d'une membrane fine à base de nylon tissé NY60.....	143
<b>4.4.</b>	<b>Conclusions du chapitre sur le captage du CO<sub>2</sub> par membrane fine liquide .....</b>	<b>144</b>
<b>4.5.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>147</b>
<b>CHAPITRE 5: CAPTAGE DU CO<sub>2</sub> PAR MEMBRANES HYBRIDES POLYMERES - SILICE SOL-GEL.....</b>		<b>149</b>
<b>5.1.</b>	<b>Description des études effectuées.....</b>	<b>149</b>
<b>5.2.</b>	<b>Les Procédés sol-gel et l'immobilisation d'anhydrase carbonique.....</b>	<b>150</b>
5.2.1	Les procédés sol-gel.....	150
a.	Bref historique <sup>1 à 12</sup> .....	150
b.	Définitions <sup>3, 6, 13, 14</sup> .....	151
c.	Chimie du procédé sol-gel <sup>3, 13, 19 à 25</sup> .....	154
d.	Avantages et inconvénients des procédés sol-gel <sup>3, 26</sup> .....	159
5.2.2	L'immobilisation sol-gel d'enzymes.....	160
a.	Adsorption physique sur un support <sup>32, 33</sup> .....	161
b.	Attachement covalent <sup>32, 33</sup> .....	162
c.	Réticulation <sup>33, 34</sup> .....	162
d.	Encapsulation .....	162
e.	Immobilisation sol-gel d'enzymes <sup>3, 35 à 50</sup> .....	162
5.2.3	Etudes précédentes d'immobilisation de l'anhydrase carbonique.....	164
a.	Immobilisation au sein de perles de chitosane-alginate <sup>51 à 53</sup> .....	164
b.	Greffage de l'enzyme sur un support polymérique thermoplastique <sup>54</sup> .....	165
c.	Immobilisation par greffage sur des hybrides organique-inorganiques <sup>56 à 58</sup> .....	166
d.	Immobilisation dans des mousses de polyuréthane <sup>59, 60 à 70</sup> .....	170
<b>5.3.</b>	<b>Membranes hybrides préparées par adsorption d'enzyme sur membranes en gel de silice préalablement séchées .....</b>	<b>172</b>
5.3.1	Préparation des membranes sol-gel en silice.....	172
a.	Membranes polymériques utilisées.....	172
b.	Imprégnation par un gel de silice .....	172
c.	Adsorption d'enzymes.....	172
d.	Aspect des membranes .....	173
5.3.2	Conditions de test des membranes hybrides préparées par adsorption d'enzyme, dans le captage du CO <sub>2</sub> .....	174
5.3.3	Effet d'un tampon lors de l'adsorption d'enzyme .....	175
a.	Procédé d'adsorption en 1 étape.....	175
b.	Procédé d'adsorption en 2 étapes .....	175
5.3.4	Effet du procédé et des durées de trempage de la membrane polymérique.....	177

a.	Effet du temps du temps de trempage durant le procédé en 1 étape.....	177
b.	Influence du temps d'adsorption d'enzyme durant la 2 <sup>ème</sup> étape du procédé en 2 étapes.....	178
c.	Comparaison des protocoles d'adsorption en 1 ou 2 étapes .....	182
d.	Comparaison des deux membranes nylon pour le procédé de trempage à 2 étapes.....	184
5.3.5	Effet de la concentration en enzyme dans la solution utilisée lors de la 2 <sup>ème</sup> étape du procédé d'adsorption en 2 étapes .....	185
5.3.6	Influence de la molarité de la solution NaHCO <sub>3</sub> .....	187
5.3.7	Influence de la concentration en silice lors de l'imprégnation sol-gel des membranes en nylon .....	188
a.	Synthèse des sols de silice .....	188
b.	Aspect des membranes .....	189
c.	Comportement des membranes hybrides lors du captage de CO <sub>2</sub> .....	190
<b>5.4.</b>	<b>Influence d'un dépôt de CaCO<sub>3</sub> solide dans la membrane .....</b>	<b>192</b>
5.4.1	Objectif.....	192
5.4.2	Essais préliminaires de dépôt de CaCO <sub>3</sub> avec l'enzyme.....	192
5.4.3	Dépôt CaCO <sub>3</sub> dans des membranes liquides et comportement des membranes dans le captage du CO <sub>2</sub> .....	197
5.4.4	Aspect des membranes polymériques séchées .....	201
5.4.5	Dépôt CaCO <sub>3</sub> dans des membranes hybrides et comportement dans le captage du CO <sub>2</sub> .....	202
5.4.6	Aspect des membranes hybrides séchées .....	205
<b>5.5.</b>	<b>Membranes hybrides préparées par gélification in situ de la silice.....</b>	<b>206</b>
5.5.1	Préparation des membranes sol-gel en silice.....	206
a.	Membranes polymériques utilisées.....	206
b.	Imprégnation par un sol de silice.....	206
c.	Tests de captage.....	207
d.	Aspect des membranes .....	207
5.5.2	Comportement lors du captage de CO <sub>2</sub> .....	208
5.5.3	Intéraction gel de silice - enzyme.....	210
a.	Préparation des gels de silice.....	210
b.	Caractérisation des gels séchés.....	211
c.	Analyse des résultats .....	221
5.5.4	Test d'activité d'une membrane hydrophile hybride.....	223
<b>5.6.</b>	<b>Conclusions du chapitre sur le captage du CO<sub>2</sub> par membrane hybride.....</b>	<b>225</b>
<b>5.7.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>227</b>
	<b>CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>239</b>
	<b>PUBLICATIONS DE LA THESE.....</b>	<b>243</b>
	<b>ANNEXE A.....</b>	<b>245</b>
	<b>ANNEXE B.....</b>	<b>249</b>
	<b>ANNEXE C.....</b>	<b>251</b>
	<b>ANNEXE D.....</b>	<b>253</b>
	<b>ANNEXE E.....</b>	<b>257</b>

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Depuis quelques années, une importante préoccupation de notre monde est de capturer le dioxyde de carbone rejeté dans l'atmosphère par les industriels. En effet, ce gaz est un des principaux responsables de l'effet de serre, dont les conséquences sur l'environnement sont graves. Selon un rapport du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC), datant de 2005, les émissions de ce gaz ont augmenté de 30 % depuis 1750<sup>1</sup>. Un protocole international a donc été signé à Kyoto en 1997 et représente un premier pas important dans la lutte contre cet effet de serre. Il est entré en vigueur en 2005 et en 2010 a été ratifié par 141 pays. Aux termes de cet accord, les états s'engagent collectivement à réduire d'au moins 5 % leurs émissions de gaz à effet de serre par rapport aux niveaux de 1990 pendant une période allant de 2008 à 2012. En ce qui la concerne, l'Union Européenne a décidé de réduire collectivement ces émissions de 8 % entre 2008 et 2012.

La présente thèse se place dans ce contexte. La région Rhône Alpes, par l'intermédiaire de son Pôle de compétitivité à vocation mondiale « Chimie-Environnement Lyon & Rhône-Alpes » « AXELERA », a ainsi lancé et obtenu le financement d'un vaste projet baptisé « ACACIA » pour capter ce CO<sub>2</sub>. Ce projet en cours de développement comprend plusieurs sous-projets, dont certains dits de « rupture » dans un état de recherche fondamentale plus amont. L'un de ces sous-projets constituant l'objet de cette thèse était d'initier l'étude du captage du CO<sub>2</sub> de fumées industrielles, par voie enzymatique. Le captage a été défini dans ce projet comme la séparation du CO<sub>2</sub> des autres gaz. L'enzyme est une anhydrase carbonique, dont la spécificité est de catalyser la transformation d'espèces neutres de CO<sub>2</sub> dissoutes en milieu aqueux, soit CO<sub>2</sub>(aq), en espèces ioniques H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. L'utilisation de ce type d'enzyme pour cette application est un sujet actuellement en cours de développement par quelques groupes, aux Etats Unis, Canada et Europe (société Novozymes), et des publications importantes de ces concurrents sont sorties au cours de la thèse. Un de nos objectifs était également d'aborder l'utilisation de céramiques possédant une porosité élevée, du type silice synthétisée par sol-gel, dont les pores seraient remplis d'une solution aqueuse de l'enzyme. Ce dernier objectif nous a conduit naturellement vers une technique à base de membranes fines: membranes liquides pouvant évoluer vers des membranes sol-gel humides, dans lesquelles le CO<sub>2</sub> capté diffuse dans un liquide immobile.

Le chapitre 1 de ce manuscrit est consacré à une introduction bibliographique, concernant d'une part le captage du dioxyde de carbone aussi bien non enzymatique qu'enzymatique, et d'autre part, par la chimie-physique du captage du CO<sub>2</sub>(g) en milieu aqueux.

Dans le chapitre suivant, nous nous sommes concentrés sur l'anhydrase carbonique en étudiant son mécanisme et sa cinétique catalytique, puis en déterminant son activité à plusieurs températures mais également dans divers tampons possédant différentes molarités.

La réalisation d'un montage a nécessité des études préliminaires avec des montages plus simples et est explicité dans le chapitre 3. Grâce à ses montages, nous avons choisi la méthode de mesure de vitesse de transfert du CO<sub>2</sub> à travers la membrane. Les résultats nous ont permis de déterminer la gamme de pression dans laquelle un capteur de pression pouvait être utilisé. Une première approche de détermination de l'influence de la masse d'enzyme et du tampon, en l'occurrence sa molarité, a également été menée avec un tampon à base de NaHCO<sub>3</sub>. La construction d'une cellule de captage par membrane liquide, ainsi que des techniques de mesures utilisées est ensuite décrite. Il faut préciser que notre montage ne permettait pas d'étudier commodément l'effet de la température, de sorte que seuls les résultats obtenus à une température de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  ont été retenus, sauf mention particulière. Néanmoins, cela s'est avéré très suffisant pour étudier des paramètres caractéristiques importants des membranes liquides, ou sol-gel humide.

Le chapitre 4 décrit les paramètres étudiés pour une membrane liquide. En particulier, deux types de gaz de captage ont été testés, l'un contenant 10 % de CO<sub>2</sub> et représentatif de fumées industrielles, l'autre du CO<sub>2</sub> pur, essentiellement pour amplifier l'effet d'une pression partielle de CO<sub>2</sub> plus élevée, coté captage et d'appréhender son effet sur le captage enzymatique. Les questions de pH, de tampon, mais aussi d'épaisseur de la membrane liquide et de concentration enzymatique y sont examinées, puisque tous ces paramètres jouent un rôle complexe. Nous avons ainsi comparé les performances de notre membrane liquide aux performances publiées.

Les membranes sol-gel étudiées dans le chapitre 5 ont été adaptées des membranes liquides du chapitre précédent. En effet, les membranes ont été imprégnées d'un sol ou d'un gel de silice, avec ou sans enzyme, afin de réaliser de fines épaisseurs sol-gel constantes. Pour ces membranes sol-gel, une étude d'adsorption de l'enzyme a été réalisée ainsi que l'influence de l'enzyme sur la gélification de la silice. Un dernier point étudié consistait à remplacer la

silice par d'autres oxydes ayant une acidité différente de la silice afin de modifier la nature du solide déposé dans la membrane sol-gel.

Ces 5 chapitres sont coiffés d'un 6<sup>ème</sup> chapitre résumant les conclusions essentielles, suivies de perspectives concernant la voie enzymatique par membrane sol-gel de captage du CO<sub>2</sub>.

Il est important de préciser que le travail présenté dans ce mémoire a initié une direction de recherche. Une fois la cellule contenant la membrane liquide conçue, les paramètres choisis se sont avérés non optimaux ou inadaptés et ont donc été modifiés pour la suite des études. C'est, par exemple, le cas de la membrane hydrophile GV en PVDF utilisée dans le captage par membrane liquide, il a fallu la remplacer par une autre membrane à pores plus gros à base de nylon, en raison de la difficulté à l'imprégner par un sol de silice. Dans un tel cas, seule une étude partielle sur le captage en milieu liquide a été vérifiée sur la nouvelle membrane afin de pouvoir lui appliquer les conclusions obtenues sur la 1<sup>ère</sup> membrane. C'est le cas aussi du tampon à base de NaHCO<sub>3</sub>, qui s'est avéré être meilleur que le tampon phosphate alors que les études avec ce dernier étaient bien engagées. C'est également le cas du gaz de captage à 10 % de CO<sub>2</sub>, composition définie en cours de thèse lors d'une réunion du projet Acacia, alors que la conception et le principe de fonctionnement de la membrane liquide avaient été largement initiés sur du CO<sub>2</sub> pur.

Mais finalement, ces changements de paramètres en cours d'étude nous ont permis d'avoir une vue plus globale des aspects importants pour le captage du CO<sub>2</sub> par une membrane sol-gel humide.

## **Références bibliographiques**

[1] Albritton D., et al. "Climate Change 2001: Synthesis Report" [En ligne]. In: site [http://www.grida.no/publications/other/ipcc\\_tar/?src=/climate/ipcc\\_tar/vol4/french/index.htm](http://www.grida.no/publications/other/ipcc_tar/?src=/climate/ipcc_tar/vol4/french/index.htm) (Page consultée le 24-10-2008)



# **CHAPITRE 1**

# CHAPITRE 1: BIBLIOGRAPHIE

## 1.1. Captage du dioxyde de carbone

### 1.1.1. Impact du dioxyde de carbone sur l'effet de serre et techniques pour y remédier <sup>1</sup>

Le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> est l'un des principaux gaz à effet de serre, responsable du réchauffement climatique actuel de notre planète. Selon l'Agence Internationale de l'Energie (AIE), les rejets de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère augmentent chaque année et pourrait atteindre, en 2030, 37 milliards de tonnes. L'élimination du CO<sub>2</sub> de ces rejets permettrait donc de limiter la pollution atmosphérique. C'est pourquoi, la recherche s'oriente vers le captage, le transport et le stockage sous diverses formes de ce gaz. Le captage et le stockage du CO<sub>2</sub>, souvent désigné par l'acronyme « CCS », pour « CO<sub>2</sub> Capture and Storage » a pour objectif de séparer le CO<sub>2</sub> issu des industries pour le transporter dans un emplacement de stockage afin de l'isoler de l'atmosphère à long terme, comme illustré à la Fig.1.1.

#### a. Les grandes filières de Captage du CO<sub>2</sub> <sup>1-4</sup>

Le captage de ce gaz peut s'effectuer :

- en « post-combustion »: cette technique consiste à récupérer le CO<sub>2</sub> des fumées (par exemple contenant 73 % de N<sub>2</sub>, 15 % de CO<sub>2</sub>, 5 % d'O<sub>2</sub> et 7 % de H<sub>2</sub>O en volume) émises lors de la combustion en les lavant avec un solvant, en général des amines comme l'éthanolamine (MEA). Le CO<sub>2</sub> gazeux est absorbé dans une solution aqueuse de l'amine via une réaction de carbonatation réversible. Avec la MEA, il donne principalement un carbamate d'ammonium dont une partie peut être hydrolysée en carbonate. La fumée appauvrie en CO<sub>2</sub> est rejetée dans l'atmosphère. La régénération est effectuée en augmentant la température pour déplacer l'équilibre de carbonatation et libérer le CO<sub>2</sub>. Le mélange CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O libéré est

refroidi pour condenser l'eau qui est alors réinjectée dans le régénérateur. Le CO<sub>2</sub> libéré est compressé pour être transporté et stocké <sup>1</sup>.

C'est dans le cadre de cette filière que se placent les recherches présentées dans ce mémoire, si ce n'est que les amines y ont été remplacées par une enzyme du type anhydrase carbonique.

- en « oxy-combustion »: ce captage repose sur la combustion d'un carburant en présence d'oxygène pur ou d'un mélange d'oxygène, d'eau et de CO<sub>2</sub>. Les fumées sont ainsi constituées essentiellement d'eau et de dioxyde de carbone, facilement séparables par refroidissement <sup>2</sup>.

- en « pré-combustion »: cette méthode traite le carburant avant sa combustion, en le convertissant en gaz de synthèse, un mélange de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> <sup>3</sup>.

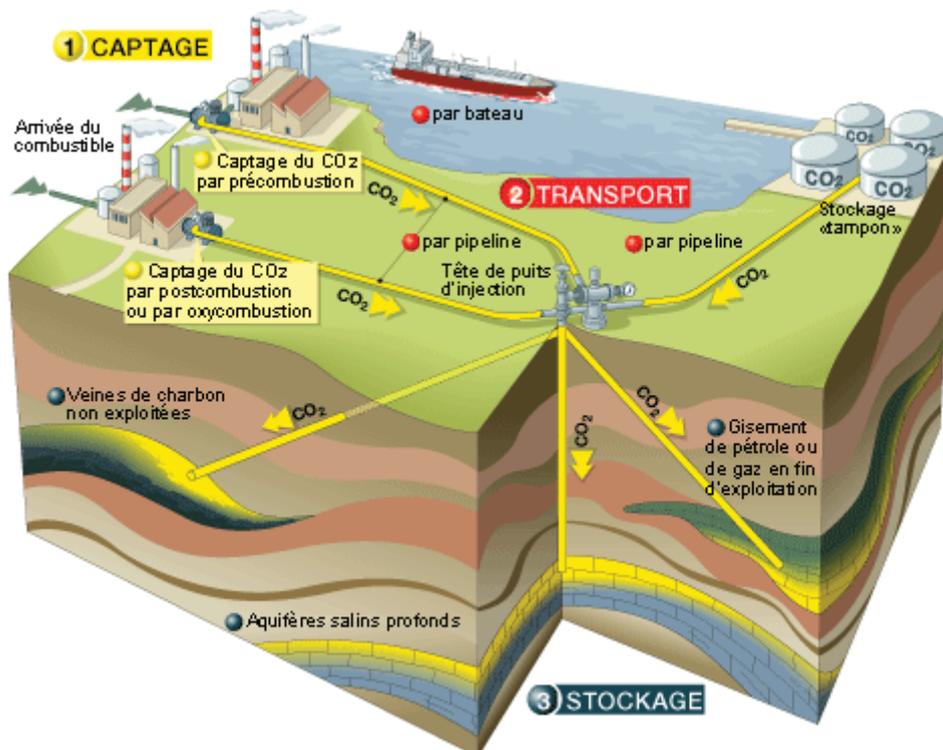


Figure 1.1: Schéma de captage et stockage du CO<sub>2</sub> (CCS) <sup>4</sup>

Après captage, le transport du CO<sub>2</sub> s'effectue par bateau ou par canalisation terrestre ou maritime. Le bateau est essentiellement utilisé pour de longues distances. Le CO<sub>2</sub> y est transporté sous forme liquide à basse température et à pression modérée (-20°C, 20 bar), contrairement au transport par pipeline où il est porté à l'état supercritique (température >31°C, pression > 7.4 MPa) <sup>3</sup>.

## **b. Stockage du CO<sub>2</sub>** <sup>2, 3, 5, 6</sup>

La principale technique de stockage faisant actuellement l'objet de tests expérimentaux consiste à injecter le CO<sub>2</sub> capté en sous-sol à une profondeur d'au moins 800 m, pour une période que l'on espère la plus longue possible <sup>2, 3, 5</sup>. Les principales zones de stockage considérées sont:

- des gisements d'hydrocarbures épuisés, selon une méthode inspirée d'un procédé de « Enhanced Oil Recovery » (EOR) de l'industrie pétrolière <sup>2, 3</sup>.
- des veines de charbon non exploitées: ce stockage permettrait de produire du méthane grâce à l'affinité du CO<sub>2</sub> pour le charbon <sup>2, 3</sup>.
- des nappes aquifères, formations salines profondes: leur capacité de stockage serait dix fois supérieure à celle des réservoirs de pétrole ou de gaz. De plus, leur grande étendue géographique favoriserait le rapprochement entre les sources de CO<sub>2</sub> et les sites de stockage <sup>3, 5, 6</sup>.

Il serait également possible d'injecter le CO<sub>2</sub> capté directement dans l'océan à une profondeur de plus de 1000 m en utilisant un gazoduc immergé ou un navire muni d'un système d'injection, selon une méthode encore en phase de recherche <sup>2</sup>.

D'autres techniques font l'objet de recherches fondamentales, comme la formation d'hydrates solides, l'adsorption sur des solides ou encore la formation de carbonates solides. Ce dernier cas est résumé plus en détail dans ce qui suit, en raison de son utilisation partielle dans les recherches présentées dans ce mémoire.

## **c. Le stockage sous forme de carbonates solides** <sup>2, 7 à 13</sup>

Ce type de stockage implique la conversion du CO<sub>2</sub> en carbonates inorganiques solides en utilisant des réactions chimiques de carbonations en milieu aqueux. Il est possible de réaliser la carbonatation de solutions alcalines <sup>2, 7, 8</sup>, de scories, de Ca(OH)<sub>2</sub> <sup>9</sup>, de cendres de lignites (décomposition naturelle incomplète de végétaux) riches en MgO et CaO <sup>10</sup>, de minéraux naturels comme la wollastonite (CaSiO<sub>3</sub>) ou autres silicates de calcium <sup>11</sup>. Des oxydes alcalins comme l'oxyde de magnésium (MgO) ou l'oxyde de calcium (CaO) sont présents dans des roches de silicates naturelles, comme par exemple la serpentine (Mg<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(OH)<sub>4</sub>) <sup>12</sup> et l'olivine (Mg<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) <sup>13</sup>. Des réactions chimiques entre ces matériaux et le CO<sub>2</sub> produisent des composés comme le carbonate de magnésium (MgCO<sub>3</sub>) et le carbonate de calcium CaCO<sub>3</sub>,

généralement connus sous le nom de calcaire, selon un mécanisme chimie-physique en présence d'eau résumé plus loin (1.2.5.). La carbonatation de silicates minéraux produit de la silice ainsi que des carbonates solides stables pouvant être, soit laissés en l'état dans des mines de silicate, soit réutilisés pour la construction. Il s'agit donc d'un stockage stable à très long terme ne nécessitant aucun contrôle et permettant d'éviter les risques de fuites éventuelles de CO<sub>2</sub> gazeux provenant de poches de stockage géologiques gazeuses par exemple <sup>2</sup>.

Il existe cependant quelques inconvénients à cette voie de stockage:

- le potentiel de stockage est encore inconnu : il serait limité par les réserves de silicate.
- ce processus, au sein de la nature, est très lent, il doit donc être accéléré.
- la carbonatation minérale exigerait de 1.6 à 3.7 tonnes de silicates par tonne de CO<sub>2</sub> extraite et produirait 2.6 à 4.7 tonnes de matières de stockage solides. Il s'agirait donc d'opérations à grandes échelles présentant un impact sur l'environnement semblable à celui d'opérations actuelles d'extraction de surface à grande échelle.

Des saumures provenant de nappes aquifères ou de rejets industriels, par exemple issus des industries pétrolières, pourraient être utilisées en tant que sources de carbonatation solide à grande échelle, dans la mesure où leur pH pourrait être maintenu à une valeur supérieure à 9. Le pH diminuant lors de l'injection du CO<sub>2</sub>, la difficulté est donc de maintenir un pH suffisamment élevé. Dans ce but, Soong <sup>10</sup> a examiné la possibilité d'utiliser des cendres basiques riches en CaO / MgO. Dans son approche schématisée à la Fig.1.2, la saumure est brassée avec du CO<sub>2</sub> pour former des carbonates, tout en contrôlant le pH à l'aide des cendres. Les carbonates solides formés sont extraits du milieu réactionnel et re-injectés en profondeur.

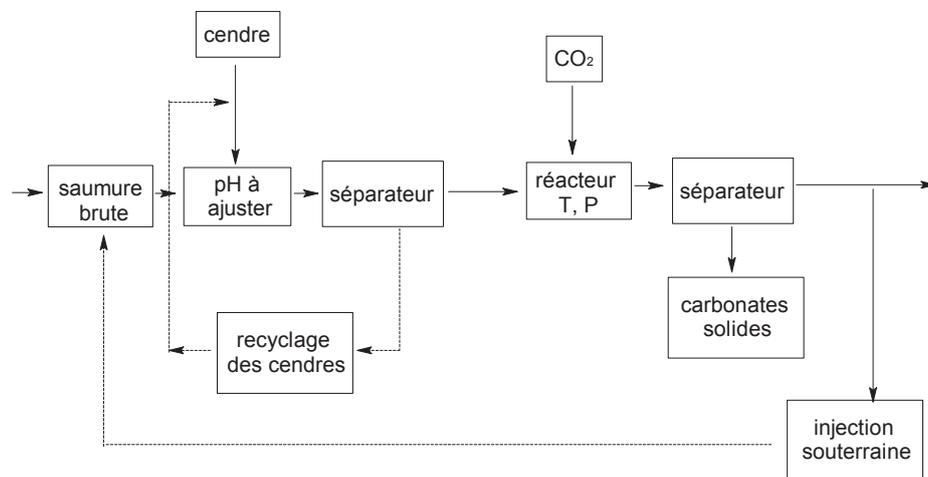


Figure.1.2: schéma du procédé de carbonatation de saumure <sup>10</sup>

### 1.1.2. La méthode enzymatique

Depuis quelques années, des chercheurs mais également des industriels étudient l'utilisation d'une enzyme, l'anhydrase carbonique, pour capter le dioxyde de carbone en « post combustion ».

Comme expliqué plus en détail au chapitre 2, cette enzyme intervient comme catalyseur de la 1<sup>ère</sup> réaction de déprotonation du CO<sub>2</sub> aqueux, que nous désignerons par CO<sub>2</sub>(aq) ou CO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O. Elle rajoute ainsi un composant ionique, les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, soluble en beaucoup plus grande quantité en milieu aqueux que les espèces neutres CO<sub>2</sub>(aq), relativement peu solubles. En conséquence, il devient possible de dissoudre une plus grande concentration totale de CO<sub>2</sub> en solution aqueuse, dans la mesure où le pH peut être maintenu à une valeur > 6.35 (voir section 1.2) où les espèces ioniques prédominent, à l'aide d'un tampon.

Trois procédés industriels de la technique de captage enzymatique sont en cours de développement et résumés dans les sections suivantes, auxquels il faut ajouter d'autres recherches publiées dans des journaux scientifiques.

#### **a. Procédé par « lavage de gaz » de la société « CO<sub>2</sub> Solution Inc. » <sup>14 à 20</sup>**

Cette société québécoise a développé et breveté une plateforme biotechnologique pour le captage du CO<sub>2</sub>, utilisant un biocatalyseur naturel: une enzyme « anhydrase carbonique ». Le procédé vise à apporter une solution de captage efficace dans un contexte industriel, permettant d'atteindre les objectifs des réglementations actuelles et futures d'une manière économiquement viable. Il utilise un bioréacteur dont le principe est schématisé à la Fig. 1.3. Ce bioréacteur est constitué d'un long cylindre contenant l'enzyme immobilisée sur un lit « fixe ». Une solution aqueuse pulvérisée depuis le niveau supérieur, lave les gaz à traiter qui circulent à contre-courant. Le CO<sub>2</sub> qu'ils contiennent est dissous et converti avec l'aide de l'enzyme en ions bicarbonate. Un processus séparé inverse permet d'extraire les ions bicarbonate de la solution aqueuse et de les transformer pour, soit régénérer du CO<sub>2</sub> pur, par une méthode non détaillée, pour entreposage souterrain, soit produire des carbonates solides éventuellement utilisables dans des cimenteries.

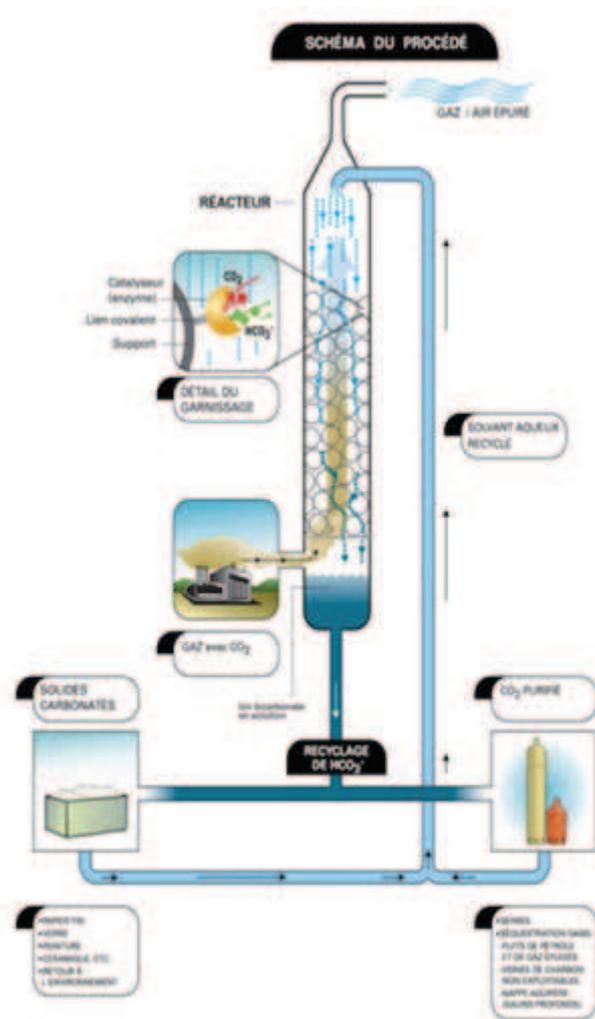


Figure.1.3. Schéma du procédé captage par lavage de gaz de la société CO<sub>2</sub> Solution Inc. <sup>15</sup>

Un prototype a été évalué en 2004 dans une aluminerie de la société Alcoa Inc. à Deschambault au Québec, où il a fonctionné en continu 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7 pendant 2 mois. Le système a permis de capter 80 % du CO<sub>2</sub> des fumées lavées <sup>16</sup> mais le résultat n'a pas été comparé au procédé sans enzyme.

Cette société a également étudié d'autres procédés de captage dont:

- un procédé traditionnel utilisant des solvants aminés. Mais ce procédé implique le réchauffage du solvant à une température élevée pour extraire le CO<sub>2</sub> et régénérer le solvant et son coût s'est avéré plus élevé que le captage enzymatique <sup>17</sup>.
- une solution où l'enzyme est elle-même dissoute dans des amines (sans eau) <sup>17</sup>. Ce procédé implique le réchauffage du solvant aminé à une température élevée pour extraire le CO<sub>2</sub> et

régénérer le solvant. Des résultats, ont montré que l'absorption du CO<sub>2</sub> dans le solvant aminé était accélérée par un facteur de 1.3 pour une concentration en enzyme de 1.2 10<sup>-2</sup> M <sup>18</sup>. Par ailleurs, l'enzyme permettrait de réduire les coûts de captage en permettant une réduction de la taille de la colonne du réacteur et une diminution des besoins en énergie associés au procédé.

### b. Procédé membranaire liquide

La National Aeronautics and Space Administration (NASA), <sup>21</sup> a travaillé sur le captage du CO<sub>2</sub> contenu dans les atmosphères ambiantes de cabines spatiales en utilisant des membranes liquides fixes contenant l'anhydrase carbonique. De telles atmosphères contiennent un faible pourcentage de CO<sub>2</sub>, de l'ordre de 0.1 %. Elle a ainsi élaboré un bioréacteur sous forme de sandwich illustré schématiquement à la Fig.1.4.

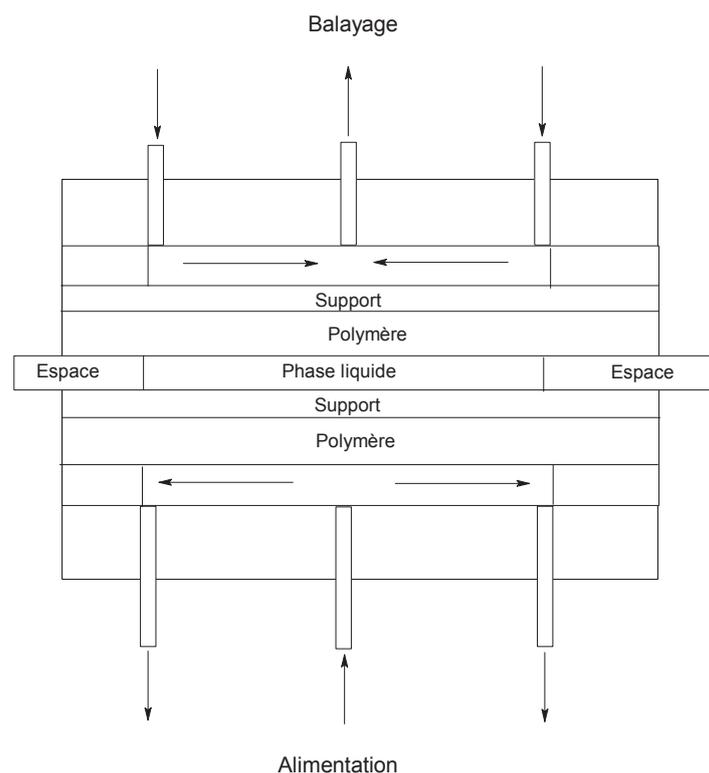


Figure.1.4: schéma du prototype de membrane liquide de la NASA <sup>21</sup>

La membrane liquide consiste en une fine couche de solution aqueuse d'enzyme (par ex: de 330 µm d'épaisseur) dans un tampon, par exemple à base de phosphate, contenue entre

deux membranes hydrophobes microporeuses en polypropylène, par exemple de 25.4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et 35 % de porosité. Le gaz relargué par la membrane a été analysé à l'aide d'un spectromètre de masse pour déterminer les concentrations en  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ , Ar,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  sous pression résiduelle. Les résultats ont montré que l'enzyme permettait une diffusion sélective du  $\text{CO}_2$ , dans un rapport de 1400 à 1 vis-à-vis de  $\text{N}_2$  et de 866 à 1 vis-à-vis de  $\text{O}_2$ , sélectivités supérieures à celles obtenues avec une amine ( $\text{CO}_2 / \text{N}_2 = 442$  et  $\text{CO}_2 / \text{O}_2 = 270$  avec 20 % en poids de diéthylamine (DEA)). La vitesse de captage avec l'anhydrase carbonique était également de 10 à 100 fois plus rapide qu'avec les amines. Par rapport à une membrane purement aqueuse, l'ajout d'enzyme a permis de diminuer la résistance au transport du  $\text{CO}_2(\text{g})$  à travers de la membrane de 71 %.

Ward et Robb furent les premiers à appliquer des membranes enzymatiques liquides à des gaz contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ , l'enzyme étant dissoute dans des solutions de bicarbonates de césium ou de potassium<sup>22</sup>. Suchdeo et Schultz l'étendirent à une solution d'enzyme dans du bicarbonate de sodium<sup>23</sup>. Matsuyama et ses collègues<sup>24, 25</sup> étudièrent des films liquides dans le captage de gaz contenant jusqu'à 15 % de  $\text{CO}_2$ , plus représentatives des fumées industrielles.

### **c. Procédé membranaire à base de microfibrilles poreuses de la société Carbozyme, Inc.**<sup>26 à 29</sup>

Parce qu'il n'est pas aisé de maintenir un film aqueux mince sans qu'il sèche, Trachtenberg et ses collaborateurs ont alors étudié des réseaux de microfibrilles poreuses dans lesquelles un gaz peut circuler, contenant jusqu'à 25 %  $\text{CO}_2$ <sup>27, 28</sup>. A la suite de ces travaux, la société Carbozyme a développé une technologie schématisée à la Fig.1.5, basée sur l'utilisation de microfibrilles creuses et microporeuses en polypropylène (taille des pores: 40 nm x 120 nm). Le gaz à traiter (ou rétentat) et le  $\text{CO}_2$  récupéré (ou perméat) circulent dans des microfibrilles séparées les unes des autres par une fine membrane liquide. Les enzymes sont directement immobilisées sur les parois externes des microfibrilles creuses. Ces microfibrilles par lesquelles le  $\text{CO}_2$  est récupéré sont balayées par un faible courant de vapeur d'eau et maintenues sous vide modéré (15 kPa). Elles contiennent environ 95 % de  $\text{CO}_2$ , alors que le gaz à traiter peut contenir en proportion jusqu'à 15 % de  $\text{CO}_2$ , typique des fumées industrielles riches en  $\text{CO}_2$ .

Ce concept s'est perfectionné en maximisant le rapport surface / volume des microfibrilles, en optimisant la géométrie du réseau de microfibrilles, en particulier pour éviter la stagnation

des gaz ainsi que le moussage. Plusieurs types de microfibrilles creuses microporeuses en polypropylène ont été développées: en spirales ou en feuillets bidimensionnels X-Y tissés. Dans un système à base de ces tissages, deux nappes de fibres séparées par une distance fixe sont noyées dans le milieu aqueux, les gaz circulant à l'intérieur des fibres. Le système est performant pour:

- des concentrations en  $\text{CO}_2$  allant de 0.05 à 40 % dans le gaz à traiter (rétentat).
- une température entre 15 et 85°C avec une isozyme (voir Chapitre 2) particulière ( $\gamma$ CA-CAM)<sup>26, 29</sup>
- un vide modéré du côté récupération du  $\text{CO}_2$  capté (perméat).

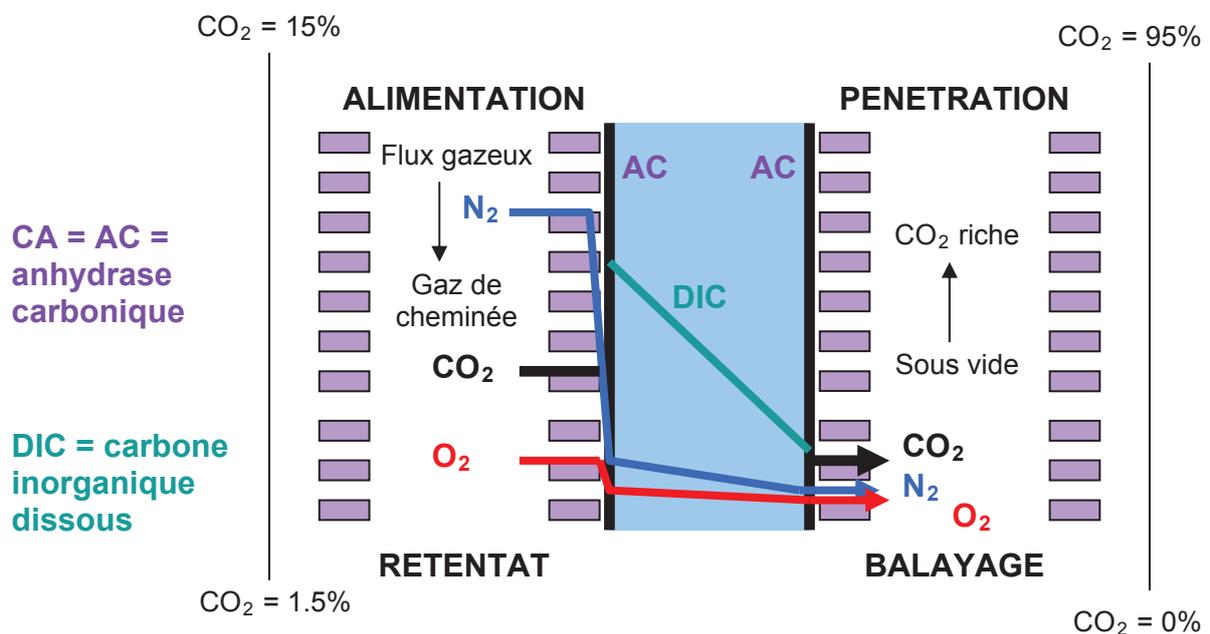


Figure.1.5: Schéma du prototype membranaire à base de microfibrilles creuses et poreuses de la société Carbozyme Inc.<sup>27</sup>

Les premiers résultats avec des gaz composés de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$  et Ar ont démontré l'efficacité de ce procédé pendant 20 tests successifs d'une durée de 6 jours, l'activité enzymatique n'ayant pas changé pendant cette période. Les résultats de Trachtenberg et ses collaborateurs avaient de plus montré que la perméance, qui mesure la vitesse de transfert global de la membrane (voir Chapitre 4), ainsi que la sélectivité par rapport au transfert d' $\text{O}_2$ , décroissaient lorsque le pourcentage en  $\text{CO}_2$  du gaz à capter augmentait<sup>27, 28</sup>.

#### d. Autres recherches expérimentales utilisant l'enzyme anhydrase carbonique <sup>30, 31</sup>

Le sujet du captage enzymatique du CO<sub>2</sub> est étudié par d'autres chercheurs. On peut citer les études de Dilmore et ses collaborateurs <sup>30</sup> ou encore de la société Novozymes <sup>31</sup>.

Dilmore et ses collègues utilisent l'anhydrase carbonique pour adsorber du CO<sub>2</sub> au sein de gel en polyacrylamide humidifiée, sous forme de perles (PABB). Ces gels en polyacrylamide sont synthétisés à partir d'acrylamide et de bisacrylamide (N, N méthylène-bisacrylamide = Bis), ce dernier en tant qu'agent pontant. La réaction de polymérisation est accélérée par ajout de deux substances réactives: le N,N,N',N''-tetraméthyléthylènediamine, appelé TEMED (Fig.1.6) et le persulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, qui, en réagissant avec la lumière, produisent des anions enclenchant les réactions de polymérisation. Les perles de polyacrylamide sont préparées par polymérisation en émulsion inverse d'eau dans l'huile.

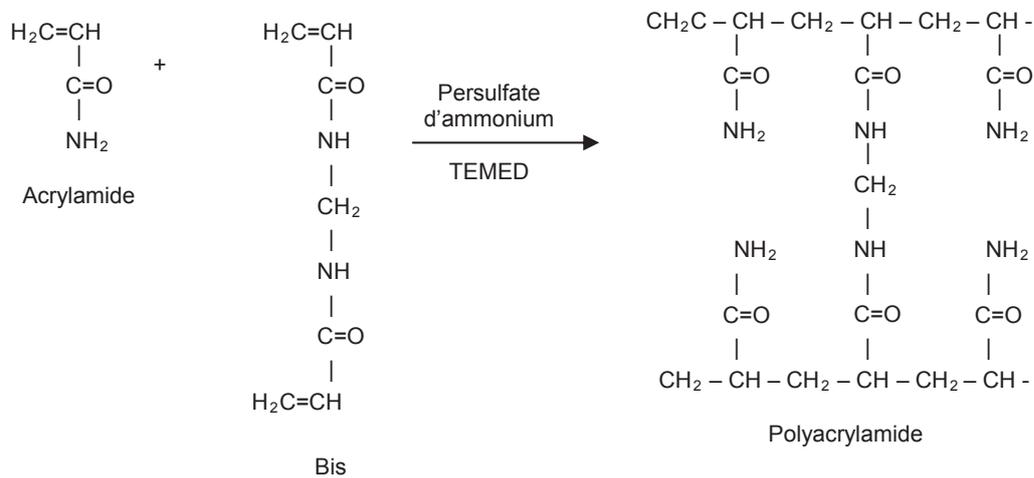


Figure.1.6: Réaction de polymérisation d'un mélange acrylamide et de bisacrylamide <sup>30</sup>

Le procédé de captage lui-même est schématisé à la Fig.1.7. Le concours d'une solution aqueuse contenant l'enzyme et de groupements amine facilite l'absorption du CO<sub>2</sub>. Les premiers résultats indiquent que l'ajout d'un tampon est nécessaire pour augmenter la capacité de captage du CO<sub>2</sub>. En effet, avec des PABB ayant une forte concentration en monomères et réticulés à l'aide d'amines tertiaires, la capacité d'absorption de CO<sub>2</sub> mesurée par thermogravimétrie (TGA) est de 1.4 mol de CO<sub>2</sub> / kg, alors que sans monomères cette capacité d'absorption n'est plus que de 0.32 mol de CO<sub>2</sub> / kg.

Concernant la société Novozymes, les brevets déposés décrivent l'assemblage, schématisé à la Fig.1.8, de différents modules tels que développés par les sociétés CO<sub>2</sub> Solution ou Carbozyme: modules d'absorption et désorption de types divers (par lavage de

gaz ou utilisant des membranes diverses, y compris à base de fibres creuses) contenant ou non de l'anhydrase carbonique et reliés entre eux par une circulation de fluide<sup>31</sup>.

Des résultats obtenus par cette société sont détaillés dans le Tableau.1.1 ci-dessous. Il s'agit d'essais effectués avec des membranes à base de microfibrilles poreuses en polypropylène, possédant une taille de pores de 10 nm x 40 nm. Le milieu aqueux utilisé était une solution de bicarbonate de sodium (1 M et pH = 8) contenant ou non 0.03 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme anhydrase carbonique  $\alpha$  originaire d'une bactérie appelée *Bacillus Clausii KSM-K16* et le gaz à filtrer était composé de 15 % de CO<sub>2</sub> et 85 % de N<sub>2</sub>.

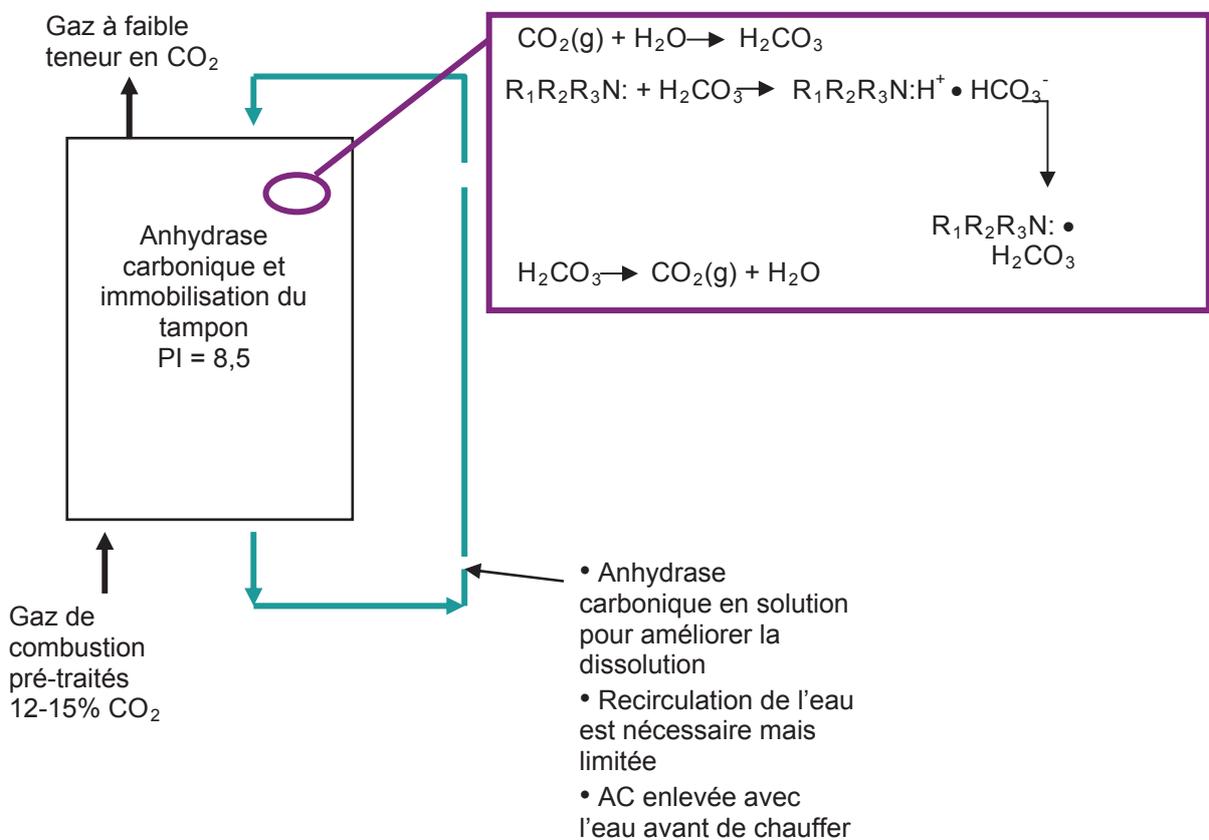


Figure.1.7 : Schéma du procédé à base d'enzyme et de PABB de Dilmore et ses collaborateurs

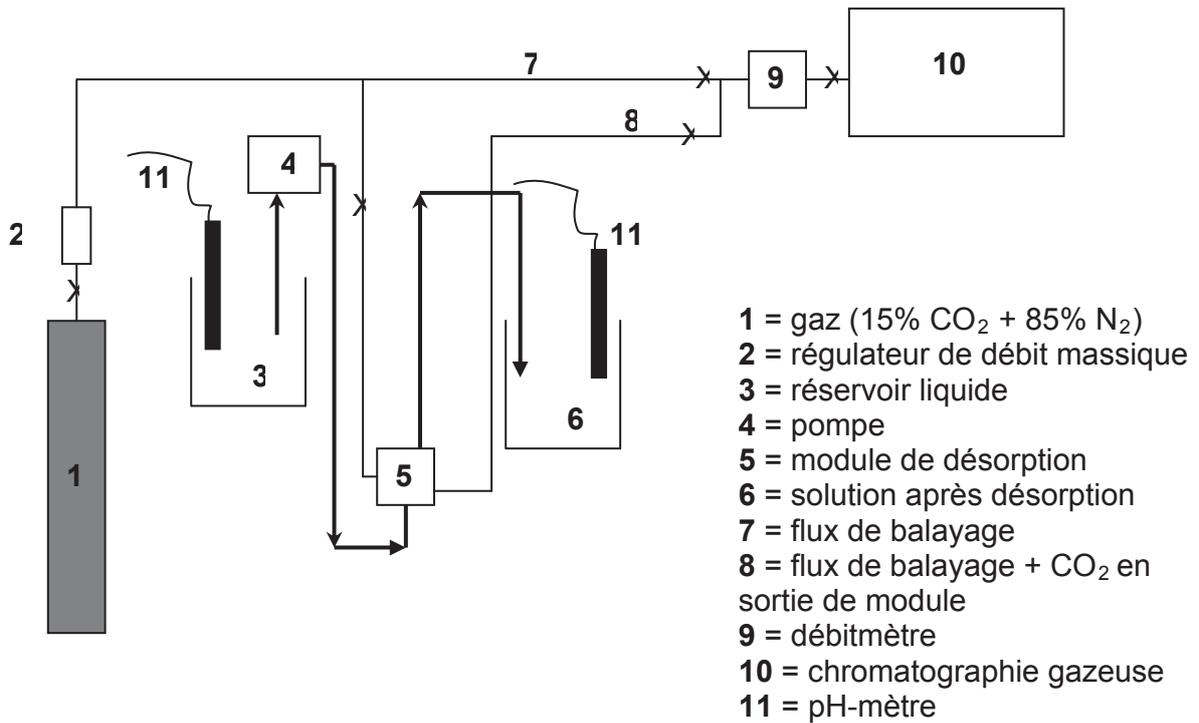


Figure.1.8: Schéma des brevets procédés par la société Novozymes <sup>31</sup>

Tableau.1.1: Pourcentage de CO<sub>2</sub> présent dans le gaz de sortie (perméat) à la fin des tests de captage (soit 75 min) dans divers liquides <sup>31</sup>

Liquide	% de CO <sub>2</sub> présent dans les gaz de sortie à la fin du test	pH initial du liquide	pH du liquide à la fin du test
eau	0	-	-
NaHCO <sub>3</sub> , 1 M	3.3	8	8.3
NaHCO <sub>3</sub> , 1 M + 0.03 mg mL <sup>-1</sup> d'enzyme	10	8.1	8.8

## 1.2. Chimie-physique du captage de CO<sub>2</sub> en milieu aqueux

On peut distinguer les étapes de :

- dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux dans le milieu aqueux coté captage, pour y introduire des espèces moléculaires neutres, que nous désignons par CO<sub>2</sub>(aq) ou CO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O
  - transformation en milieu aqueux, coté captage, des espèces moléculaires neutres CO<sub>2</sub>(aq) en espèces ionique HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
  - transport des espèces, neutres et ioniques, du coté captage vers le coté relargage, suivi de :
  - libération, coté relargage, du CO<sub>2</sub> capté dans le milieu aqueux vers le gaz
  - ou transformation des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et précipitation d'un carbonate solide
- Ces étapes sont résumées dans les sections suivantes <sup>32</sup>.

### 1.2.1. Dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux, coté captage

#### a. Equilibre de dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux

La dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux dans l'eau est décrite par l'équilibre chimique (Eq.1.1)



Dans cette réaction,  $k_H$  désigne la constante de Henry, CO<sub>2</sub>(g) le CO<sub>2</sub> gazeux, et CO<sub>2</sub>(aq) les molécules neutres (non ioniques) de CO<sub>2</sub> dissoutes en milieu aqueux. Selon la loi de Henry (Eq.1.2), la fraction molaire en CO<sub>2</sub> dissous dans l'eau, N(CO<sub>2</sub>(aq)) à l'équilibre est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz, P(CO<sub>2</sub>) et inversement proportionnelle à la constante de Henry  $k_H$  caractéristique de ce gaz.

$$N(\text{CO}_2(\text{aq})) = P(\text{CO}_2) / k_H \quad (\text{Eq.1.2})$$

Cette loi de Henry conduit à l'Eq.1.3 pour la concentration en CO<sub>2</sub>(aq) dans l'eau :

$$[\text{CO}_2(\text{aq})] = P(\text{CO}_2) / (0.018 k_H) \quad (\text{Eq.1.3})$$

En ce qui concerne les strates moléculaires d'eau en contact direct avec le gaz, cet équilibre entre les deux phases est considéré comme étant très rapide: il s'agit uniquement d'un problème de collisions moléculaires. La concentration en espèces neutres  $[\text{CO}_2(\text{aq})]$  dans l'eau en contact avec le gaz est donc considérée comme étant maintenue constante par le mécanisme de Henry, indépendamment des transformations en espèces ioniques décrites dans les paragraphes suivants<sup>18</sup>. Elle dépend uniquement de la pression partielle gazeuse de  $\text{CO}_2$  du gaz coté captage. Par contre l'équilibre avec un film d'eau épais est beaucoup plus lent, puisqu'il nécessite la diffusion des espèces moléculaires neutres  $\text{CO}_2(\text{aq})$  dans l'épaisseur de la couche liquide.

### **b. Valeur de la constante de Henry du $\text{CO}_2$**

La solubilité du  $\text{CO}_2$  dans l'eau pour une pression partielle  $P(\text{CO}_2)$  allant de 0.1 MPa (1 atm) à 100 MPa a été revue en 2003 par Diamond et Akinfiev<sup>33</sup>, et en 1991 pour une pression partielle plus faible correspondant aux présentes conditions de recherche, par Carroll et ses collaborateurs<sup>34</sup> et par Crovetto<sup>35</sup>. Ainsi, selon Crovetto :

$$\ln(k_H) = 4.800 + 3934.40 / T - 941290 / T \quad (\text{Eq.1.4})$$

où  $k_H$  est exprimé en bar (1 bar =  $10^5$  Pa) et la température T en Kelvin.

Pour de l'eau distillée saturée en  $\text{CO}_2$  sous une pression partielle  $P(\text{CO}_2) = 0.1$  MPa (= 1 bar  $\approx$  1 atm), cette équation conduit à une concentration à saturation en  $\text{CO}_2$  de  $[\text{CO}_2(\text{aq})]_{\text{sat}} \approx 33.7$  mmol  $\text{L}^{-1}$  à 25°C et 76.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  à 0°C. La température a donc un effet important, puisque la concentration de  $\text{CO}_2$  en solution à basse température est plus importante qu'à température plus élevée.

## 1.2.2. Transformation en milieu aqueux, coté captage, des espèces moléculaires neutres CO<sub>2</sub>(aq) en espèces ionique HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

### a. Equilibre de 1<sup>ère</sup> déprotonation de CO<sub>2</sub>(aq)

L'équilibre de 1<sup>ère</sup> déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq) (ou CO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O), pour former les ions bicarbonates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> peut s'écrire <sup>36</sup>:



Selon l'Eq.1.5, le pH devient rapidement acide dès que du CO<sub>2</sub> est dissous à saturation dans de l'eau distillée initialement à pH = 7 et les expériences dans les conditions du présent mémoire ont confirmé ce point, même à relativement faible pression partielle de CO<sub>2</sub>(g). En conséquence, ce sont bien les espèces moléculaires neutres CO<sub>2</sub>(aq) qui prédominent largement en solution, dès que de l'eau est saturée en CO<sub>2</sub>. C'était d'ailleurs le cas pour les déterminations expérimentales de la constante de Henry du CO<sub>2</sub>, résumées dans la section précédente.

Il est à noter que la nature des espèces CO<sub>2</sub>(aq) neutres est très controversée <sup>33, 37</sup>. Elles sont essentiellement constituées de molécules de CO<sub>2</sub> solvatées par des molécules H<sub>2</sub>O, auxquelles elles peuvent se lier par des liaisons hydrogène fluctuantes <sup>16</sup>. L'une de ces espèces neutres est la molécule d'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, qui a pu être synthétisée dans des conditions particulières à partir d'un rapport molaire stoechiométrique CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O ≈ 1 <sup>38</sup>. Mais ces molécules H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont métastables. Elles deviennent très instables et n'existent qu'en très petite quantité en présence d'un excès d'eau (< 3 / 1000 dans l'eau saturée à 25°C) <sup>35, 38 à 41</sup>.

### b. Mécanisme de la 1<sup>ère</sup> déprotonation de CO<sub>2</sub>(aq)

Le mécanisme cinétique d'établissement de l'équilibre correspondant à l'Eq.1.5 dépend largement des conditions prévalant dans le milieu aqueux. En l'absence de catalyseur, ce mécanisme est sujet à controverse.

En condition acide, la transformation de CO<sub>2</sub>(aq) en ions bicarbonates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, qui sont d'ailleurs très minoritaires comme nous l'avons vu, pourrait consister en la déprotonation

d'une molécule d'eau de solvation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$  ( $\text{H}_2\text{O}$  liée au  $\text{CO}_2$  par une liaison hydrogène), par une molécule d'eau libre, pour former un ion  $\text{H}_3\text{O}^+$  et un ion bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$ . Une autre voie pourrait consister en la formation un état de transition constitué de molécules d'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

En l'absence d'enzyme, la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone dans l'eau est caractérisée par une constante de vitesse de premier ordre  $\approx 0.15 \text{ s}^{-1}$ . Par contre, la déshydratation du bicarbonate est relativement rapide, avec une constante de temps  $\approx 50 \text{ s}^{-1}$  <sup>40, 41</sup>.

En condition basique où les ions  $\text{OH}^-$  sont abondants, le mécanisme principal de formation des anions bicarbonates repose sur une attaque directe de ces anions  $\text{OH}^-$  sur les espèces  $\text{CO}_2(\text{aq})$ . Les ions  $\text{OH}^-$ , ou toute autre base, constituent donc des compétiteurs des enzymes.

Enfin lorsqu'une enzyme du type anhydrase carbonique est présente, un autre mécanisme faisant intervenir le site actif de l'enzyme, présenté au Chapitre 2, catalyse la formation des anions bicarbonates.

### **1.2.3. Transport des espèces de $\text{CO}_2$ neutres et ioniques en solution, du coté captage vers le coté relargage**

Ce transport peut être forcé, par circulation du milieu aqueux au moyen d'une pompe. Il peut aussi se produire naturellement par simple diffusion moléculaire, au travers d'un film d'eau par ailleurs immobile, de toutes les espèces de  $\text{CO}_2$ , neutres comme ioniques. Ce 2<sup>ème</sup> mode de transport correspond au procédé de type NASA de simple membrane liquide, ou au procédé à base de microfibres poreuses, tous deux décrits précédemment (sections 1.1.2b et c). Un coté de la membrane est contact avec le gaz à capter, les équilibres décrits par les Eq.1.1 et Eq.1.5 conduisent à la dissolution du  $\text{CO}_2$ . L'autre coté de la membrane est en contact avec le vide partiel, ou un gaz de balayage (ex: vapeur d'eau) et les mêmes équilibres conduisent à libérer le  $\text{CO}_2$  sous forme gazeuse. C'est dans cette direction qu'ont été effectués les travaux expérimentaux de cette thèse. Plus la membrane liquide est fine, plus cette diffusion sera rapide.

#### 1.2.4. Libération, coté relargage, du CO<sub>2</sub> capté

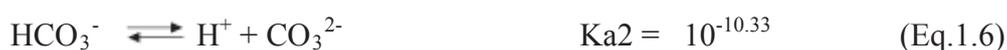
Cette étape fait intervenir les mêmes équilibres qu'en 1.2.2 (déprotonation – protonation de CO<sub>2</sub>(aq)) et 1.2.1 (dissolution du CO<sub>2</sub> gazeux), mais en sens inverse, pour tendre vers un nouvel équilibre avec le nouvel environnement gazeux.

#### 1.2.5. Transformation des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et précipitation d'un carbonate solide

Cette étape a concerné deux aspects qui sont traités dans cette thèse. La précipitation de carbonate solide a en effet été utilisée, d'une part, comme indice pour comparer les quantités de CO<sub>2</sub> relargué dans une série de tests, et d'autre part, pour constituer un environnement plus basique dans une membrane dont le matériau principal était de la silice synthétisée par procédé sol-gel.

##### a. Equilibre de 2<sup>ème</sup> déprotonation de CO<sub>2</sub>(aq)

L'équilibre de 2<sup>ème</sup> déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq) formant les ions carbonates CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> est décrit par l'Eq.1.6 <sup>42</sup>:



Comme la 1<sup>ère</sup> déprotonation, la 2<sup>ème</sup> déprotonation a pour effet de baisser le pH. Par contre elle est très rapide et ne nécessite pas de catalyseur du type enzymatique. Compte tenu de la valeur de la constante Ka<sub>2</sub>, il faut un pH > 10 pour que des ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> existent en concentration significative à l'équilibre. Ces ions prédominent à pH > 10.5.

### b. Précipitation de carbonate solide

Lorsqu'un sel métallique apportant des cations, par exemple des cations  $\text{Ca}^{2+}$ , est ajouté dans la solution aqueuse de  $\text{CO}_2$ , un carbonate solide peut précipiter. Ainsi, avec des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , cette précipitation est décrite par l'Eq.1.7.



Le produit des concentrations  $K_S = [\text{Ca}^{2+}] [\text{CO}_3^{2-}]$ , appelé produit de solubilité, détermine la limite de solubilité du carbonate de calcium solide. La valeur de  $K_S$  dépend de la variété cristallographique de ce solide, comme indiqué au Tableau.1.2 <sup>43</sup>. Dans ce tableau, la phase thermodynamiquement stable la plus souvent obtenue est la Calcite. Les autres variétés sont métastables. Ces solides sont très peu solubles à température élevée, mais leur solubilité s'accroît lorsque la température diminue.

Par ailleurs le pH est important. Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  retirés à la solution aqueuse par précipitation du solide, sont à nouveau remplacés par d'autres ions  $\text{CO}_3^{2-}$ , résultant du déplacement d'équilibre décrit par l'Eq.1.6. Ce déplacement d'équilibre produisant en plus des  $\text{H}^+$ , le pH s'en trouve abaissé, ce qui accroît la concentration en ions bicarbonates. En fait, dès que le pH devient  $< \text{pKa}_2$  (Eq.1.6), les ions  $\text{HCO}_3^-$  prédominent à nouveau. Or une telle diminution du pH se produit inévitablement lorsque du  $\text{CO}_2$ , provenant par exemple du gaz relargué, est dissous en continue dans de l'eau initialement à  $\text{pH} \approx 10.5$ . Dans un 1<sup>er</sup> temps, du carbonate solide précipite donc bien. Puis dans un 2<sup>ème</sup> temps, cette précipitation s'arrête, même si le  $\text{CO}_2$  continue à traverser la solution. Dans un 3<sup>ème</sup> temps, le carbonate solide peut même se re-dissoudre.

Tableau.1.2: Produit de solubilité  $K_S$  de différentes variétés cristallographiques de carbonate de calcium, d'après Gal et ses collaborateurs <sup>43</sup>

Forme minérale	Structure cristallographique	$-\log K_S$ (à 25°C)	$-\log K_S$ à T (K) ou $\theta$ (°C)
Amorphe	Amorphe	6.40	$= 6.1987 + 0.005336 \theta + 0.0001096 \theta^2$
Ikaïte	Monoclinique	6.62	$= 1696 / T + 0.9336$
Vatérite	Hexagonale	7.91	$= 172.1295 + 0.077993 T - 3074.688 / T - 71.595 \log T$
Aragonite	Orthorhombique	8.34	$= 171.9773 + 0.077993 T - 2903.293 / T - 71.595 \log T$
Calcite	Rhomboédrique	8.48	$= 171.9065 + 0.077993 T - 2839.319 / T - 71,595 \log T$

### 1.3. Références bibliographiques

[1] Lepaumier H., Picq D., Carrette P.L., (2010). "Capter le CO<sub>2</sub>", L'actualité chimique **337**: 36-41

[2] IPCC. Carbon dioxide capture and storage. Angleterre: Cambridge University Press, 2005

[3] Thybaud N., "Capter et stocker le CO<sub>2</sub> dans le sous-sol". Edité par IFP. 2007. p. 0-64. ISBN 978-2-90163811-7

[4] Total. Captage et stockage géologique du CO<sub>2</sub> [en ligne]. In : Site de Total. <http://www.total.com/fr/enjeux/captage-et-stockage-geologique-de-co2/mieux-comprendre/comprendre-captage-stockage-co2-900272.html> (Page consultée le 04-01-2010)

[5] Lecomte F., Broutin P., Lebas E., "Le captage du CO<sub>2</sub>: des technologies pour réduire les émissions de gaz à effet de serre". Edité par Editions Technip. 2009. p. 0-176. ISBN 978-2-7108-0938-8

[6] House, K.Z., Altundas B., Harvey C.F., Schrag D.P., (2010). "The immobility of CO<sub>2</sub> in Marine Sediments Beneath 1500 meters of water", ChemSusChem **3**: 905-912

- [7] “Carbon dioxide capture and related processes.” House K.Z., House C.H., Aziz M.J, Schrag D.P., International Patent WO 2008/018928A2, 14-02-2008
- [8] Perez-Lopez R., Montes-Hernandez G., Nieto J.M., Renard F., Charlet L., (2008). “Carbonation of alkaline paper mill waste to reduce CO<sub>2</sub> greenhouse gas emissions into the atmosphere”, Applied Geochemistry **23**: 2292-2300
- [9] Montes-Hernandez G., Perez-Lpoez R., Renard F., Nieto J.M., Charlet L., (2008). “Mineral sequestration of CO<sub>2</sub> by aqueous carbonation of coal combustion fly-ash”, Journal of Hazardous Materials **161**: 1347-1354
- [10] Soong, Y., Fauth D.L., Howard B.H., Jones J.R., Harrison D.K., Goodman A.L., Gray M.L., Frommell E.A., (2006). "CO<sub>2</sub> sequestration with brine solution and fly ashes", Energy Conversion and Management **47**(13-14): 1676-1685
- [11] Santos A., Toledo-Fernandez J.A., Mendoza-Serna R., Gago-Duport L., Rosa-Fox N., Pinero M., Esquivias L., (2007). “Chemically active silica aerogel – wollastonite composites for CO<sub>2</sub> fixation by carbonation reactions”, Industrial & Engineering Chemistry Research **46**: 103-107
- [12] Li W., Li W., Li B., Bai Z., (2002). “Electrolysis and heat pre-treatment methods to promote CO<sub>2</sub> sequestration by mineral carbonation”, Chemical Engineering Research and Design **87**(2): 210-215
- [13] Huijen W.J.J., Comans R.N.J., Witkamp G.J., (2007). “Cost evaluation of CO<sub>2</sub> sequestration by aqueous mineral carbonation”, Energy conversion and management **48**: 1923-1935
- [14] Hamilton T., “Capturing Carbon with enzymes [en ligne]. In: Site de Technology Review. <http://www.technologyreview.com/Energy/18217/> (Page consultée le 22-12-2008)

- [15] CO<sub>2</sub> Solution. Captage du CO<sub>2</sub> [en ligne]. In : Site de CO<sub>2</sub> solution. [http://www.quebechebdo.com/imgs/dynamique/articles/gros/schema\\_procede.jpg](http://www.quebechebdo.com/imgs/dynamique/articles/gros/schema_procede.jpg) (Page consultée le 10-05-2010)
- [16] Bond G. M., Stringer J., Brandvold D.K., Simsek F.A., Medina M.G., Egeland G., (2001). "Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase", Energy & Fuels **15**(2): 309-316
- [17] CO<sub>2</sub> Solution Inc. Innovation dans la capture du carbone. [En ligne]. <http://www.co2solution.com/fr/index.php> (Page consultée le 2 Février 2009)
- [18] CO<sub>2</sub> Solution Inc. CO<sub>2</sub> absorption solution. Fradette S., Ceperkovic O., United States Patent US 2008/0148939A1, 26-06-2008
- [19] CO<sub>2</sub> Solution Inc. Triphasic bioreactor and process for gas effluent treatment. Parent C., Dutil F., International Patent WO 2004/007058 A1, 22-01-2004
- [20] CO<sub>2</sub> Solution Inc. Gas purification apparatus and process using biofiltration and enzymatic reactions. Parent C., Barry A., Fradette S., Lepine R., Canadian Patent CA 2554395 A1. 27-06-2006
- [21] Ge J. Cowan R.M., Tu C., McGregor M.L., Trachtenberg M.C., (2002). "Enzyme-based CO<sub>2</sub> capture for advanced life support", Life support and biosphere Science **8**: 181-189
- [22] Ward W.J., Robb W.L., (1976). "Carbon dioxide–oxygen separation: facilitated transport of carbon dioxide across a liquid film", Science **156**: 1481–1484
- [23] Suchdeo S.R., Schultz J.S., (1974). "Mass transfer of CO<sub>2</sub> across membranes: facilitation in the presence of bicarbonate ion and the enzyme carbonic anhydrase", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) **352**: 412–440
- [24] Matsuyama H, Teramoto M, Iwai K., (1994). "Development of a new functional cation-exchange membrane and its application to facilitated transport of CO<sub>2</sub>", Journal of Membrane Science **93**: 237-244

- [25] Matsuyama H, Terada A, Nakagawara T, Kitamura Y, Teramoto M., (1999). “Facilitated transport of CO<sub>2</sub> through polyethylenimine/poly(vinyl alcohol) blend membrane”, Journal of Membrane Science **163**: 221-227
- [26] Trachtenberg M.C., Flue gas CO<sub>2</sub> capture by means of a biomimetic facilitated transport membrane [en ligne]. In: Site de Carbozyme. [http://www.carbozyme.us/pub\\_abstracts.shtml](http://www.carbozyme.us/pub_abstracts.shtml) (Page consultée le 06-10-2008)
- [27] Trachtenberg M.C., Cowan R.M., Smith D.A., Horazak D.A., Jensen M.D., Laumb J.D., Vucelic A.P., Chen H., Wang L., Wu X., (2009). “Membrane-based, enzyme-facilitated, efficient carbon dioxide capture”, Energy Procedia **1**: 353-360
- [28] Bao L., Trachtenberg M.C., (2006). “Facilitated transport of CO<sub>2</sub> across a liquid membrane: Comparing enzyme, amine, and alkaline”, Journal of Membrane Science **280**: 330–334
- [29] Tripp B.C., Smith K., Ferry J.G., (2001). “Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme”, The Journal of Biological Chemistry **52**: 48615-48618
- [30] Dilmore R., Griffith C., Liu Z., Soong Y., Hedges S.W., Koepsel R., Ataii M., (2009). “Carbonic anhydrase-facilitated CO<sub>2</sub> absorption with polyacrylamide buffering bead capture”, International Journal of Greenhouse Gas Control **3**: 401-410
- [31] Novozymes. “Modular membrane reactor and process for carbon dioxide extraction” Saunders P., Salmon S., Borchert M., Lessard L.P., International Patent WO 2010/014774 A2, 04-02-2010
- [32] Domingo C., Loste E., Gomez-Morales J., Garcia-Carmona J., Fraile J., (2006). “Calcite precipitation by high-pressure CO<sub>2</sub> carbonation route”, Journal of Supercritical Fluids **36**: 202-215

- [33] Diamond L.K., Akinfiyev N.N., (2003). "Solubility of CO<sub>2</sub> in water from -1.5 to 100 °C and from 0.1 to 100 MPa: evaluation of literature data and thermodynamic modelling", Fluid Phase Equilibria **208**(1-2): 265–290
- [34] Carroll J.J., Slupsky J.D., Mather A.E., (1991). "The Solubility of Carbon Dioxide in Water at Low Pressure", Journal of Physical and Chemical Reference Data **20**: 1201-1209
- [35] Crovetto R., (1991). "Evaluation of Solubility Data of the System CO<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O from 273 K to the Critical Point of Water." Journal of Physical and Chemical Reference Data **20**: 575-589
- [36] Lindskog S., Coleman J.E., (1973). "Catalytic Mechanism of Carbonic-Anhydrase.", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **70**(9): 2505-2508
- [37] Pocker Y., Bjorkquist D.W., (1977). "Stopped-flow studies of carbon dioxide hydration and bicarbonate dehydration in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. Acid-base and metal ion catalysis", Journal of the American Chemical Society **99**: 6537-6543
- [38] Tautermann C.S., Voegelé A.F., Loerting T., Kohl I., Hallbrucker A., Mayer E., Liedl K.R., (2002). "Towards the Experimental Decomposition Rate of Carbonic Acid (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) in Aqueous Solution", Chemistry A European Journal **8**: 66-73
- [39] Gibbons B.H., Edsall J.T., (1963). "Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25°C", The Journal of Biological Chemistry **238**(18): 3502-3507
- [40] Tsao G.T., (1972). "The effect of carbonic anhydrase on carbon dioxide absorption", Chemical Engineering Science **27**: 1593-1600
- [41] Berg J., Tymoczko J.L., Stryer L., "Biochemistry 5th edition." Edité par W.H. Freeman and company. 2002. p. 0-600. ISBN 0-7167-3051-0
- [42] Wang X.X., Fu H., Du D.M., Zhou Z.Y., Zhang A.G., Su C.F., Ma K.S., (2008). "The comparison of pKa determination between carbonic acid and formic acid and its application to prediction of the hydration numbers", Chemical Physics Letters **460**(1-3): 339-342

[43] Gal J.Y., Bollinger J.C., Tolosa H., Gache N., (1996). “Calcium carbonate solubility: a reappraisal of scale formation and inhibition”, Talanta **43**(9): 1497-1509

## **CHAPITRE 2**

## CHAPITRE 2: LES ANHYDRASES CARBONIQUES

### 2.1. Bibliographie sur les Anhydrases carboniques

#### 2.1.1 . Généralités sur les enzymes

##### a. Définition <sup>1,2</sup>

La première enzyme fut découverte par Anselme Payen et Jean-François Persoz en 1833 <sup>1</sup>. Après avoir traité un extrait aqueux de malt à l'éthanol, ces scientifiques ont précipité une substance sensible à la chaleur et capable d'hydrolyser l'amidon, qu'ils ont nommé diastase car elle séparait le sucre soluble de l'amidon. Il s'agit d'une enzyme aussi appelée  $\alpha$ -amylase. Les enzymes sont des protéines volumineuses, constituées de polymères d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Ce sont des catalyseurs des réactions biochimiques se produisant dans les organismes vivants. Comme tout catalyseur, elles ne modifient donc pas les équilibres thermodynamiques, mais elles permettent de les atteindre plus rapidement. Les propriétés catalytiques des enzymes sont liées à l'existence dans leur structure d'un site actif, que l'on peut schématiquement décrire comme ayant la forme d'une cavité adaptée spécifiquement aux substrats à transformer, auxquels elles se fixent par des liaisons chimiques faibles mais qui suppriment l'aspect aléatoire des contacts prévalant lors des collisions en milieu homogène. Ce site actif est en effet subdivisé en deux parties :

- le site de liaison (de fixation ou de reconnaissance) constitué d'acides aminés, caractérisé par une complémentarité de forme de la cavité avec un substrat spécifique à transformer
- le site catalytique qui réalise la transformation du substrat en produit.

Dès 1955, lors de la création de l' « **International Enzyme Commission** » au 3<sup>ème</sup> Congrès International de Biochimie à Bruxelles, en accord avec l' « International Union of Pure and Applied Chemistry » (IUPAC), les enzymes ont été divisées en classes en fonction de la réaction chimique qu'elles catalysaient, classification maintenue à jour par la Commission des Nomenclatures de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie

Moléculaire <sup>2</sup>. Ainsi, il existe 6 classes dénommées « E.C.n », pour « Enzyme Commission number », où n est un nombre de 1 à 6 désignant:

- E.C.1: les oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydo-réduction dans lesquelles un oxygène ou un hydrogène sont gagnés ou perdus
- E.C.2: les transférases qui transfèrent un groupe fonctionnel du type amino, acétyl ou phosphate d'une molécule à une autre
- E.C.3: les hydrolases qui catalysent l'hydrolyse (décomposition par l'eau) de diverses liaisons
- E.C.4: les lyases qui catalysent la formation d'une liaison C-C, C-O, C-S ou P-O par d'autres procédés que l'hydrolyse ou l'oxydation
- E.C.5: les isomérases qui catalysent l'isomérisation dans une simple molécule ou permettent des réarrangements intramoléculaires
- E.C.6: les ligases qui catalysent des liaisons C-C, C-S, C-O et C-N lors des réactions de condensation couplées à l'utilisation d'Adénosine TriPhosphate (=ATP).

Ces six classes ont été elles-mêmes divisées en sous-classes afin de définir avec plus de précision la réaction catalysée. Ainsi la désignation d'une enzyme anhydrase carbonique est E.C.4.2.1.1, où le chiffre 4 désigne une action d'addition (lyase) au niveau d'une liaison double ; le chiffre 2 la création d'une liaison entre un atome de carbone et un atome d'oxygène ; le premier chiffre 1 que cet atome d'oxygène appartient à une molécule d'eau ; et le deuxième chiffre 1 que l'eau est la première des espèces possédant un atome d'oxygène pouvant être lié.

### **b. Concentration en enzyme**

Il est possible de déterminer expérimentalement la concentration en protéine d'une préparation enzymatique mais, dans de nombreux cas, les préparations enzymatiques contiennent toute une gamme de protéines, y compris d'autres enzymes et de débris protéiques qui ne sont pas l'enzyme particulière considérée. En conséquence, la concentration réelle en enzyme d'une préparation enzymatique est souvent inconnue.

Cela a conduit en pratique à définir la concentration en une enzyme d'une préparation par son activité catalytique dans une réaction précise et pour des conditions bien spécifiques de température, nature du solvant et concentration en substrat. Cette concentration enzymatique exprimée en Unités (U) est donc en réalité une activité catalytique dans une réaction de

référence, 1 U étant défini comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'1  $\mu\text{mol}$  de substrat en 1 minute pour les conditions particulières qui doivent être précisées. L'activité spécifique, exprimée en nombre d'U par unité de masse en protéine ( $\text{U mg}^{-1}$ ) permet de définir l'état de pureté d'une préparation enzymatique.

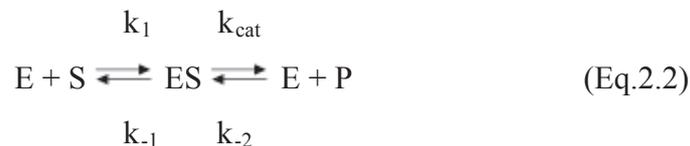
### c. Cinétique enzymatique <sup>3 à 11</sup>

En 1878, Barth constata que la vitesse de la réaction enzymatique du saccharose était indépendante des solutions suffisamment diluées en substrat <sup>8</sup>. En 1892, Adrian Brown <sup>9</sup> publia ses travaux sur la vitesse d'hydrolyse du saccharose, selon l'Eq.2.1, catalysée par une enzyme de la levure: *l'invertase*.



Il confirma les observations de Barth et montra que lorsque la concentration en saccharose était très supérieure à celle de l'enzyme, la vitesse de la réaction était indépendante de la concentration en saccharose, donc d'ordre zéro par rapport au saccharose. Henri <sup>10</sup> et Brown <sup>9</sup> proposèrent indépendamment que la réaction globale comporte deux étapes élémentaires regroupées dans l'Eq.2.2:

- la formation d'un complexe ES entre le substrat S et l'enzyme E
- la décomposition du complexe ES pour donner le produit P et restituer l'enzyme libre E



D'après l'analyse de Michaelis et Menten <sup>4</sup>, la réaction initiale inverse de l'enzyme E avec le produit P pour redonner le complexe ES peut être négligée, de sorte que l'expression de la vitesse initiale  $V_0$  de formation du produit peut s'écrire:

$$V_0 = d[\text{P}] / dt = k_{\text{cat}} [\text{ES}] \quad (\text{Eq.2.3})$$

Par ailleurs, la vitesse initiale de formation des complexes ES est :

$$d[\text{ES}] / dt = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_{\text{cat}}[\text{ES}] \quad (\text{Eq.2.4})$$

En 1913, Michaelis et Menten, reprenant un travail de Henri, ont émis l'hypothèse que  $k_{-1} \gg k_{\text{cat}}$ , (Eq.2.2) ce qui implique que les espèces E, S et ES atteignent rapidement

l'équilibre <sup>4</sup>. Ce quasi équilibre thermodynamique peut être caractérisé par la constante  $K_m$  appelée constante de Michaelis et définie par :

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = [E] [S] / [ES] \quad (\text{Eq.2.5})$$

Le complexe ES est connu sous le nom de complexe Michaelis et plus la constante  $K_m$  est petite, mieux l'enzyme E lie le substrat S.

La concentration totale en enzyme  $[E]_t$ , mesurée en « U » est connue. Elle est la somme des concentrations en enzyme libre [E] et en complexes [ES] (Eq.2.6), de sorte que la vitesse initiale maximale de formation du produit  $V_{\max}$ , est donnée par l'Eq.2.7, dérivée de l'Eq.2.6 lorsque la totalité des molécules d'enzymes sont engagées dans des complexes ES. On montre alors aisément que la vitesse initiale de formation du produit,  $V_0$ , peut s'écrire selon l'Eq.2.8 appelée loi de Michaelis-Menten.

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (\text{Eq.2.6})$$

$$V_{\max} = k_2 [E]_t \quad (\text{Eq.2.7})$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq.2.8})$$

Cette Eq.2.8 avait antérieurement été établie phénoménologiquement par Henri <sup>10</sup>.

La loi d'Henri-Michaelis-Menten est illustrée à la Fig.2.1. Une représentation graphique classique de cette loi, connue sous le nom de représentation de Lineweaver Burk, consiste à porter dans un graphe  $1 / V_0$  en fonction de  $1 / [S]$  est illustrée à la Fig.2.2. Elle permet de déterminer graphiquement les constantes  $K_m$  et  $V_{\max}$ , si la réaction suit bien cette loi.

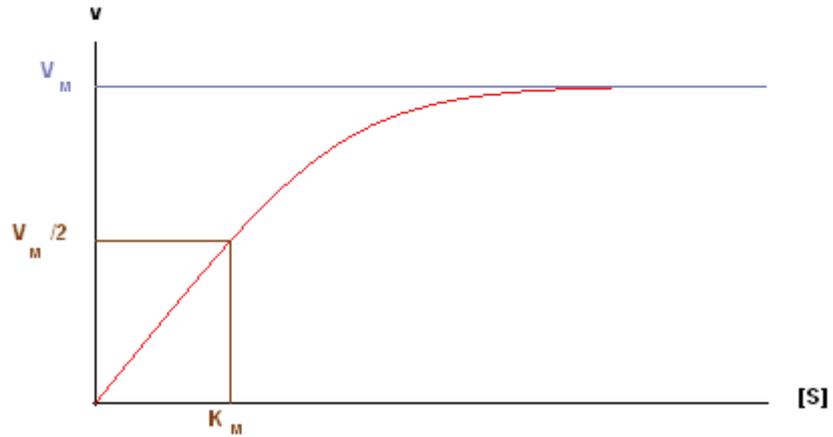


Figure.2.1: Evolution de la vitesse initiale en fonction de la concentration en enzyme, dans le modèle cinétique de Michaelis-Menten <sup>6</sup>

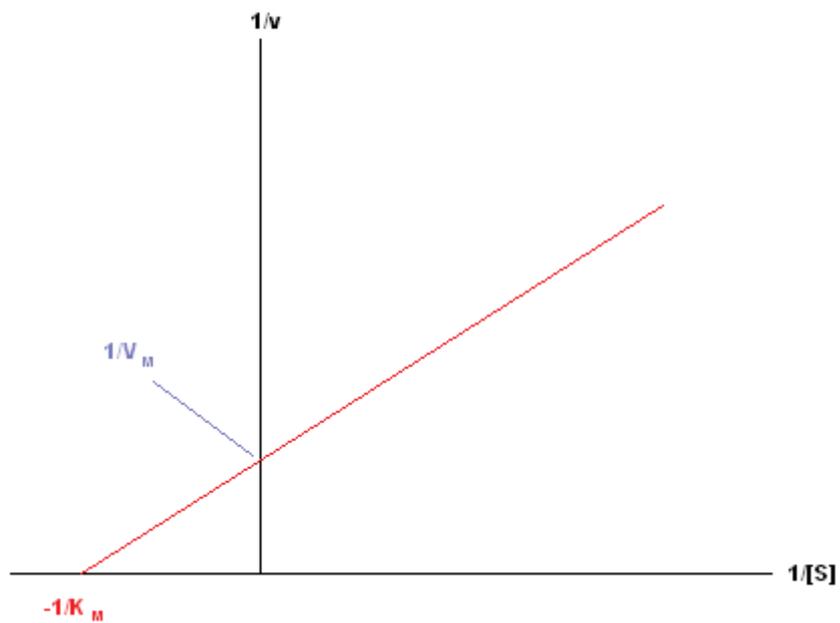


Figure.2.2: Représentation de l'équation de Michaelis-Menten selon Lineweaver Burk <sup>6</sup>

Une loi tout à fait semblable à celle de « Henri-Michaelis-Menten », dans laquelle la vitesse initiale  $V_0$  de l'Eq.2.8 est remplacée par la vitesse en régime stationnaire  $V_{st}$  de formation du produit, a été établie par Briggs et Haldane en 1925 <sup>4, 6, 11</sup>. Dans ce cas,  $K_m$  est lié aux autres constantes cinétiques par:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (\text{Eq.2.9})$$

Les courbes d'évolution des concentrations des différents constituants correspondants à ce modèle, sont illustrées à la Fig.2.3. Cette dernière montre l'existence d'une courte étape initiale d'auto-accélération, absente dans la loi d'Henri-Michaelis-Menten.

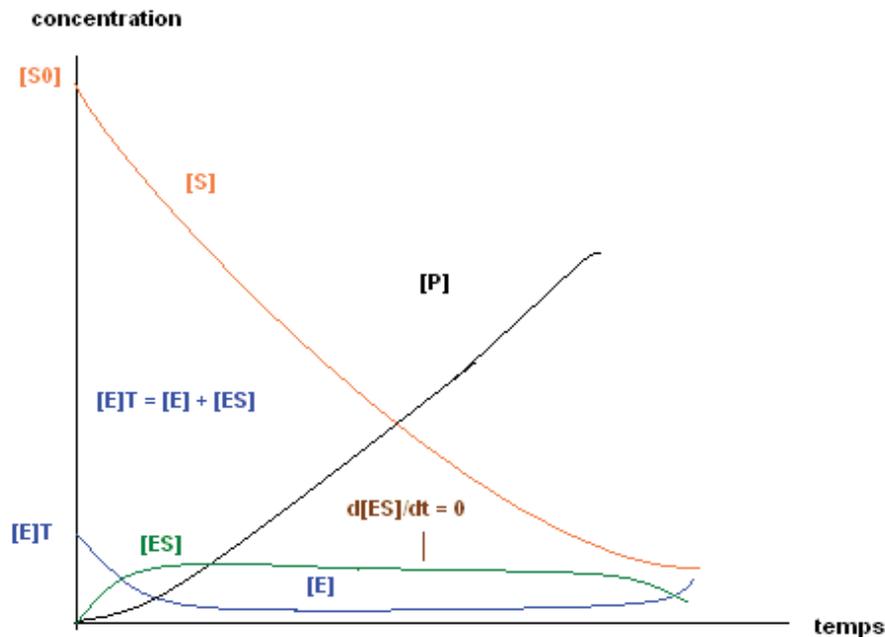


Figure.2.3: Courbes d'évolution des constituants d'une réaction enzymatique, selon la loi de Briggs Haldane. [S], [E], [ES] et [P] désignent respectivement les concentrations en substrat, enzyme libre, complexe enzyme substrat et produit d'après la référence <sup>4</sup>

#### d. Inhibition <sup>4 à 6, 11</sup>

De nombreuses substances modifient l'activité d'une enzyme en s'y combinant ce qui altère la liaison du substrat et / ou sa constante catalytique. Les substances qui diminuent l'activité d'une enzyme sont appelées des inhibiteurs. L'inhibition la plus fréquente est appelée inhibition non compétitive mixte. En effet, les inhibiteurs non compétitifs interagissent à la fois avec E et avec ES, ce qui ajoutent les équilibres et équations suivantes aux équations simples de Michaelis-Menten décrites par l'Eq.2.2 et l'Eq.2.5.



dont la constante d'inhibition est  $K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$  (Eq. 2.11)



de constante d'inhibition  $K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$  (Eq. 2.13)



de constante de Michaelis  $K_{M1} = \frac{[EI][S]}{[ESI]}$  (Eq. 2.15)

La concentration totale en enzyme  $[E]_t$ , étant la somme des concentrations en enzyme libre  $[E]$  et en complexes  $[ES]$ ,  $[EI]$  et  $[ESI]$  (Eq.2.16) et la vitesse initiale et la vitesse maximale de formation du produit étant données par les Eq.2.17 et Eq.2.18, la vitesse initiale de formation du produit,  $V_0$  peut être décrite selon l'Eq.2.19.

$$[E]_t = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (\text{Eq.2.16})$$

$$V_0 = k_3 [ES] \quad (\text{Eq.2.17})$$

$$V_{\max} = k_3 [E]_t \quad (\text{Eq.2.18})$$

$$\frac{V_0}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{[ES]}{[E] + [EI] + [ESI] + [ES]} = \frac{[S]}{K_m + (1 + I/K_I) + [S](1 + I/K')}$$
 (Eq.2.19)

La loi de Michaelis-Menten doit alors être remplacée par l'Eq.2.20:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (\text{Eq.2.20})$$

où  $\alpha$  et  $\alpha'$  sont définies par les relations:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_1} \quad \text{et} \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_1} \quad (\text{Eq.2.21a et b})$$

La nouvelle loi de Michaelis-Menten est illustrée à la Fig.2.4. Une représentation graphique classique de cette loi selon la méthode de Lineweaver Burk est illustrée à la

Fig.2.5. Elle donne une série de droites de pente  $\frac{\alpha K_m}{V_{\max}}$  dont les interceptions avec  $\frac{1}{V_0}$  et

$\frac{1}{[S]}$  donnent respectivement les valeurs des rapports  $\frac{\alpha'}{V_{\max}}$  et  $\frac{\alpha'}{\alpha K_m}$ .

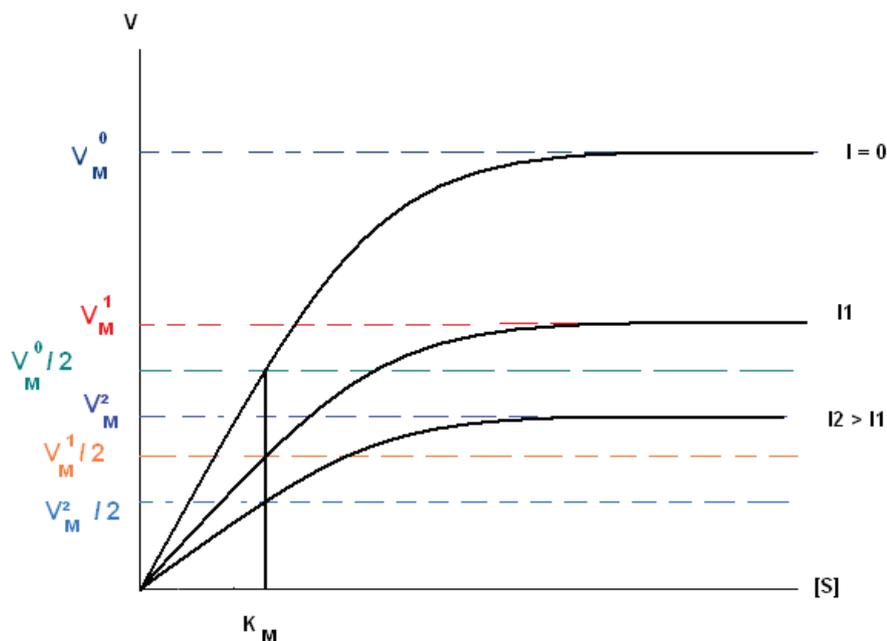


Figure.2.4: Evolution de la vitesse initiale en fonction de la concentration en enzyme, dans le modèle cinétique de Michaelis-Menten avec inhibition <sup>5</sup>

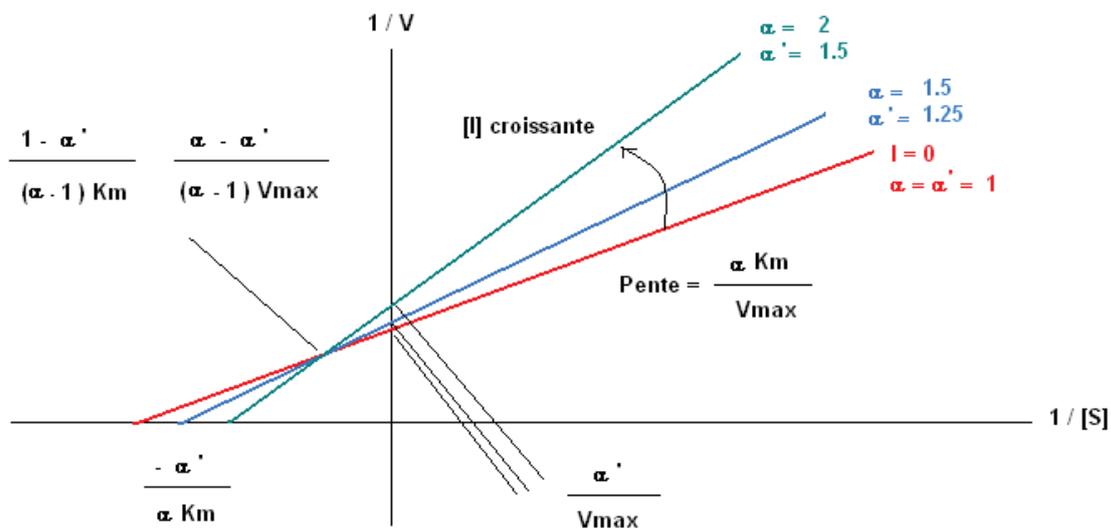


Figure.2.5: Représentation selon Lineweaver Burk de la loi de Michaelis-Menten avec inhibition <sup>4</sup>

## 2.1.2 . Description des enzymes anhydrase carbonique (AC)

### a. Historique <sup>1, 12 à 17</sup>

L'anhydrase carbonique (AC), notée E.C.4.2.1.1 selon la nomenclature précédemment indiquée, fut découverte en 1933 par Meldrum et Roughton en étudiant les facteurs responsables du passage rapide des anions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$  des érythrocytes (globules rouges) vers les capillaires pulmonaires <sup>12</sup>. En 1940, Keilin et Mann sont parvenus à purifier l'érythrocyte bovin <sup>13</sup>. Trois décennies plus tard, en 1963, Veitch et Blankenship ont découvert la AC dans les procaryotes (êtres cellulaires sans noyau), la première AC d'origine procaryote ayant été purifiée en 1972 par Neisseria Sicca <sup>1</sup>.

Il a fallu attendre le début des années 1990 pour que la première séquence génétique d'une AC, purifiée à partir d'un procaryote (bactérie *Escherichia coli*), soit établie <sup>14</sup>. Puis les progrès se sont accumulés pour découvrir de nouvelles variétés d'AC, et comprendre le fonctionnement de ces enzymes, en particulier de la AC d'origine humaine <sup>15 à 17</sup>.

## **b. Les différentes variétés d'anhydrase carbonique** <sup>7, 15, 18</sup>

La plupart des organismes du règne animal, au niveau sanguin, mais aussi végétal ou microbien, contiennent une variété d'anhydrase carbonique. Globalement, on distingue 5 classes de cette biomolécule, appelées  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\varepsilon$ .

- Les anhydrases carboniques  $\alpha$

On les trouve dans les érythrocytes des mammifères, mais aussi dans le cytoplasme des plantes vertes et dans des algues (Fig.2.6).

Elles sont divisées en quatre sous-groupes :

- Les AC $\alpha$  cytosoliques (dans le cytoplasme des cellules) comprenant divers sous-sous groupes labellisés AC I, II, III et VII
- Les AC $\alpha$  mitochondriales, localisées dans les mitochondries cellulaires (AC V)
- Les AC $\alpha$  sécrétées dans la salive ou le lait (AC VI)
- Les AC $\alpha$  de liaison membranaire (AC IV, IX, XII, XIV et XV)

Chez les mammifères, on peut répertoriées 16 formes différentes d'isozymes (ou isoenzymes: différentes formes d'une enzyme pouvant coexister dans un organisme vivant) et chez les humains au moins 10 isozymes.

Dans tous les AC $\alpha$ , le centre actif comprend un atome de zinc coordonné en configuration tétraédrique à 3 résidus histidine d'acides aminés (His94, His96, His119) et une molécule d'eau, comme illustré à la Fig.2.6. L'anhydrase carbonique d'érythrocytes bovins  $\alpha$  (BAC $\alpha$ ), utilisée dans cette thèse, est une protéine comprenant une chaîne polypeptidique de 260 acides aminés, pour une masse molaire de  $29 \text{ kg mol}^{-1}$  (soit 29 kDalton).

- Les anhydrases carboniques  $\beta$

Elles prédominent chez les plantes et les algues. La principale différence entre cette variété et les AC $\alpha$  est que les premières ont une structure quaternaire oligomérique, formée de 2 à 6 monomères dont chacun a une masse moléculaire équivalente à celle d'une AC $\alpha$ , soit de 25 et 30 kDa. Le zinc y est coordonné à deux cystéines, une histidine et un aspartate, via sa terminaison carboxylate.

- Les anhydrases carboniques  $\gamma$

Elles sont d'origine bactérienne. Contrairement aux autres AC précédentes, le zinc y est coordonné en mode penta, à trois histidines et deux molécules d'eau.

- Les anhydrases carboniques  $\delta$  et  $\epsilon$

Elles sont présentes dans les algues eucaryotes dont le phytoplancton. Le zinc y est coordonné à 2 cystéines, une histidine et une molécule d'eau.

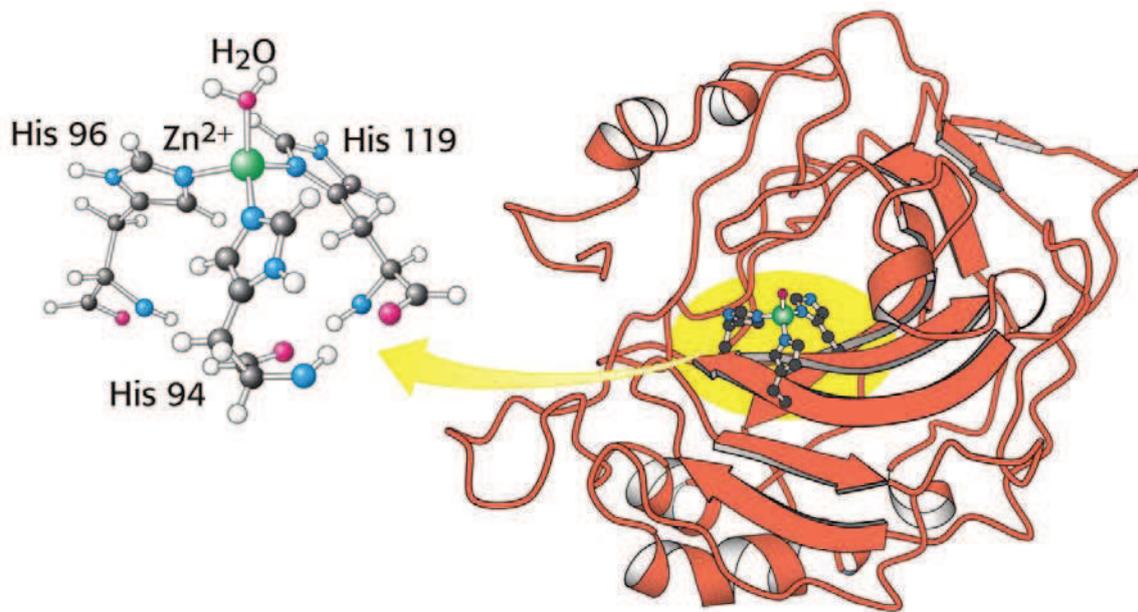


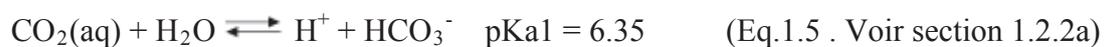
Figure.2.6: Schéma structurel de l'anhydrase carbonique  $\alpha$  humaine <sup>18</sup>

### 2.1.3 . Mécanismes et cinétique catalytique de l'anhydrase carbonique (AC)

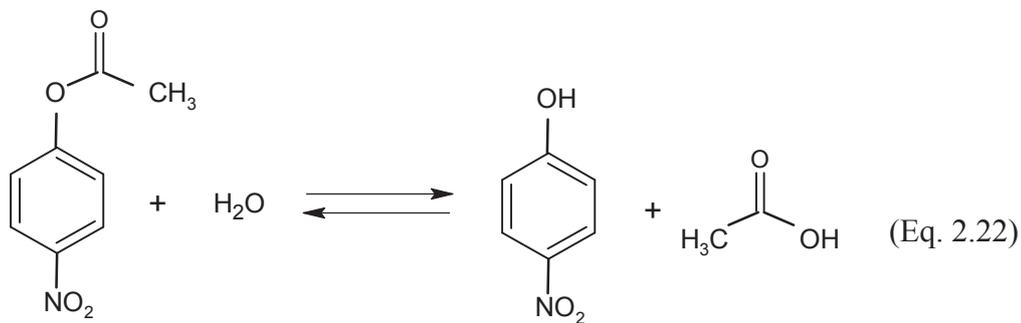
#### a. Réactions catalysées par les anhydrases carboniques <sup>19</sup>

Les enzymes anhydrase carbonique catalysent deux types de réactions très différentes:

- d'une part en tant qu'hydratase, l'hydratation et la déshydratation du dioxyde de carbone, selon l'Eq.1.5 déjà décrite Chapitre 1 (section 1.2.2a) <sup>19</sup>:



- d'autre part en tant qu'estérase, des hydrolyses comme celle du para-nitrophényleacétate (p-NPA) en para-nitrophénol (p-NP) selon l'Eq.2.22:



### **b.Méthodes expérimentales de détermination de l'activité enzymatique dans la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub>** <sup>20 à 25</sup>

Ces études sont nombreuses et certaines sont anciennes. Les mesures d'activité en tant qu'hydratase sont toutes dérivées d'une méthode électrochimique de Wilbur et Anderson <sup>20</sup>. Cette méthode a souvent été appliquée à 4°C, par exemple dans un mélange de 8 mL d'eau saturée en CO<sub>2</sub>, de 12 mL de tampon Tris à pH = 8.3 de concentration de 20 mM et une quantité d'enzyme variable (quelques mg). La décroissance du pH est suivie en fonction du temps, par exemple pour passer de pH = 7.5 à 6.5. L'activité de l'enzyme *v* est alors calculée par la formule:

$$v = (\text{Units} / \text{mg}) = \frac{t_0 - t_{enz}}{t_{enz} * m_{enz}} \quad (\text{Eq.2.23})$$

où  $t_0$  et  $t_{enz}$  représentent respectivement les temps en s, pour une décroissance du pH de 7.5 à 6.5 respectivement sans enzyme (un « blanc ») et avec une masse  $m_{enz}$  (en mg) d'enzyme.

Différents groupes de scientifiques ont utilisé cette méthode avec de légères modifications au niveau de paramètres tels que la concentration enzymatique et le volume du milieu réactionnel, tout en conservant des proportions similaires de tampon et d'eau saturée en CO<sub>2</sub>. Cependant, les données obtenues sont souvent entachées de grandes incertitudes comme l'indique des études rapportées par Mirjafari et ses collaborateurs <sup>21</sup>, Bond et ses collègues <sup>22</sup> et Ozdemir <sup>23</sup>. Les techniques récentes les plus précises suivent l'évolution du pH

par absorption dans le visible à l'aide d'un indicateur coloré dépendant du pH, lorsque de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et une solution d'enzyme dans un tampon contenant l'indicateur coloré sont rapidement mélangées dans une cellule du type « stop-flow » <sup>24, 25</sup>.

### c. Cinétique enzymatique de la réaction d'hydratation du $\text{CO}_2$ <sup>4, 24 à 29</sup>

La cinétique d'hydratation du  $\text{CO}_2$  par l'anhydrase carbonique a beaucoup été étudiée par des biochimistes. Le turnover élevé obtenu avec l'enzyme,  $k_{\text{cat}} \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$  et la valeur élevée de ce turnover par rapport à la constante de Michaelis du  $\text{CO}_2$ ,  $k_{\text{cat}} / K_m^{\text{CO}_2} \approx 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ont ensuite attiré l'attention pour de potentielles applications en captage du  $\text{CO}_2$ .

Le mécanisme catalytique est très souvent présenté sous la forme simplifiée illustré Fig.2.7 et comprend 4 étapes <sup>26 à 28</sup>:

- 1: les ligands protéiques facilitent la déprotonation de la molécule d'eau coordonnée au zinc, lequel conserve un ligand  $\text{OH}^-$ .
- 2: une attaque nucléophile de l'atome d'oxygène du ligand  $\text{OH}^-$  se produit sur le carbone du dioxyde de carbone
- 3: l'attaque précédente permet de lier un anion  $\text{HCO}_3^-$  au zinc du site actif
- 4: le ligand  $\text{HCO}_3^-$  est labile et peut facilement être échangé à son tour par un ligand  $\text{H}_2\text{O}$ , ce qui régénère l'enzyme dans son état initial.

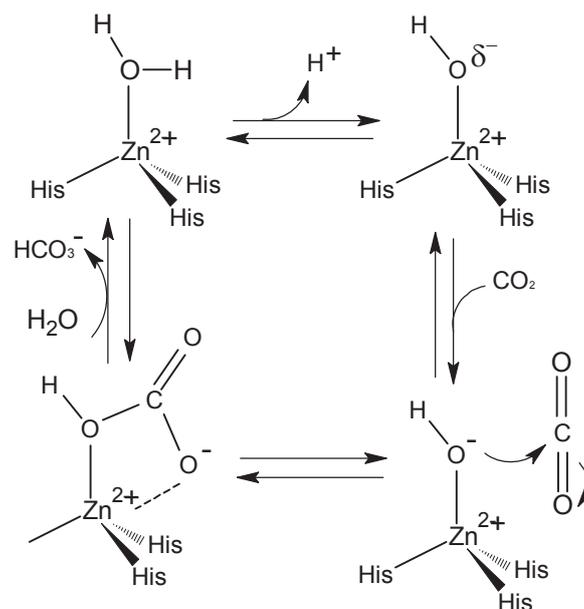


Figure.2.7: Schéma du mécanisme catalytique simplifié d'une anhydrase carbonique <sup>26</sup>

Parmi les nombreuses publications sur ce sujet, on peut citer des constantes cinétiques simplifiées récapitulées au Tableau.2.1.

Tableau.2.1: Constantes cinétiques de Michaelis-Menten déterminées pour la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub>(aq) <sup>4, 29</sup>

	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (M)	$K_{cat} / K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
CO <sub>2</sub> (aq)	10 <sup>6</sup>	0.012	8.33 10 <sup>7</sup>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4 10 <sup>5</sup>	0.026	1.54 10 <sup>7</sup>

Mais ces modèles ignorent l'importance du tampon, les échanges de protons entre le tampon et l'enzyme, et la concurrence du tampon pour hydrater le CO<sub>2</sub>. Des modèles cinétiques plus élaborés ont donc été développés. En particulier les différents modèles cinétiques d'hydratation du CO<sub>2</sub>, catalysée par une anhydrase carbonique d'origine humaine (HCAII), ont récemment été analysés en détail par Larachi <sup>24</sup>. Il est apparu que le modèle cinétique le plus en accord avec l'ensemble des résultats expérimentaux publiés antérieurement par différents chercheurs était un mécanisme appelé « pseudo random Quad Quad Iso Ping Pong », comportant un état de transition. Ce mécanisme, implique une compétition de transfert de proton entre d'une part le couple CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, d'autre part le couple B / BH<sup>+</sup> du tampon. Le modèle suggère aussi que cette compétition est accrue par l'inhibition des produits (CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou BH<sup>+</sup>) lorsque la concentration de ces produits devient importante. Le terme « Ping-Pong » vient du fait que les anions bicarbonates doivent quitter le site actif de l'enzyme, avant que le tampon n'interagisse avec eux. Le terme « Pseudo », vient du fait que le mécanisme ne fait pas intervenir un complexe central enzyme-substrat unique mais plusieurs, puisqu'un proton doit être transféré vers l'extérieur de l'enzyme, tout en lui restant lié, avant de réagir avec le tampon.

La 1<sup>ère</sup> étape du mécanisme (Fig.2.8) reprend les étapes 2 à 3 du modèle simplifié présenté Fig.2.7. Elle se déroule à l'intérieur de la cavité enzymatique amphiphile autour du site catalytique Zn(II)-OH<sup>-</sup>. Le substrat pénètre d'abord à l'intérieur de l'enzyme jusqu'à son site actif pour former un complexe enzyme substrat ES. Le départ du produit P est accompagné de la rentrée d'une molécule d'eau W, qui change le site actif de l'enzyme en complexe à Zn(II)-H<sub>2</sub>O et désigné dans ce qui suit par E<sub>w</sub>.

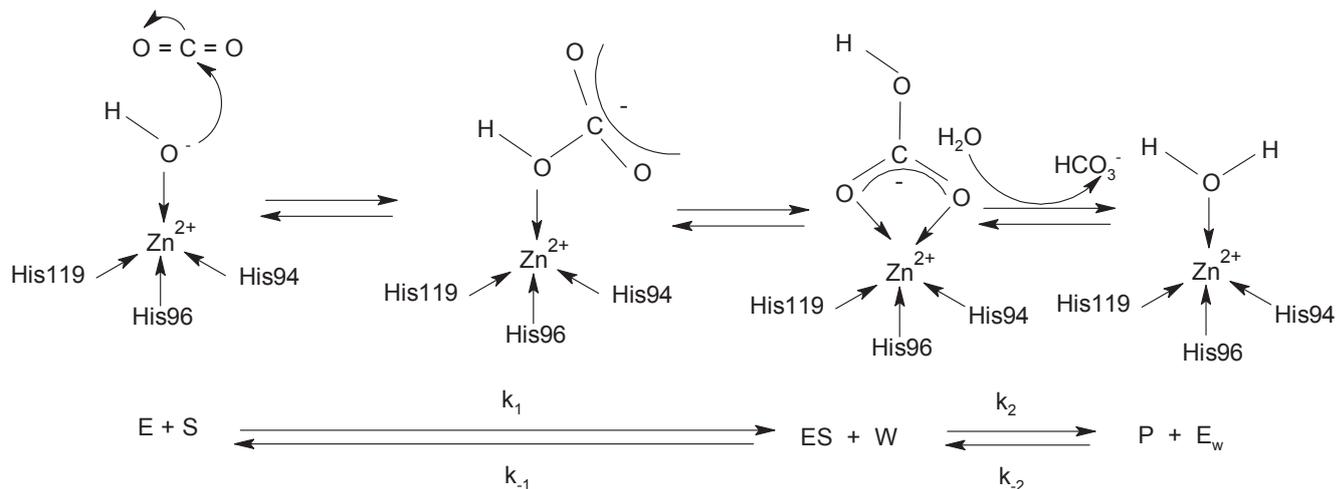


Figure.2.8: 1<sup>ère</sup> étape du modèle catalytique « Random Quad Quad Pseudo Iso Ping Pong » d'hydratation réversible du CO<sub>2</sub>, catalysée par l'anhydrase carbonique humaine (HCA), présentation adaptée de Larachi <sup>24</sup> et de Rowlett et Silvermann <sup>25</sup>

La 2<sup>ème</sup> partie (Fig.2.9) décrit l'étape 1 du mécanisme simplifié de la Fig.2.7, c'est-à-dire la restauration du site Zn(II)–OH<sup>-</sup>. Pour cela il est nécessaire qu'un proton soit arraché à E<sub>W</sub>. Dans un 1<sup>er</sup> temps, ce proton est transféré du site actif E<sub>W</sub> vers l'extérieur de l'enzyme, par un « tunnel protique ». Ce tunnel consiste en une suite de molécules d'eau liées aux sites latéraux de la cavité enzymatique. A l'issue de ce transfert, l'enzyme se trouve alors dans la conformation où le proton transféré reste lié à l'enzyme par le groupe imidazole d'un résidu histidine (His64) situé à l'extérieur de la cavité de l'enzyme. Ce complexe enzymatique noté <sub>H</sub>E peut donc être considéré comme un isomère de E<sub>W</sub>.

Ce proton est ensuite transféré de <sub>H</sub>E au tampon B, pour produire BH<sup>+</sup>. Mais une protonation concurrente du produit P est possible, pour former à nouveau le substrat S. Cette dernière réaction concurrente est en particulier à prendre en compte lorsque la concentration en produit P est importante.

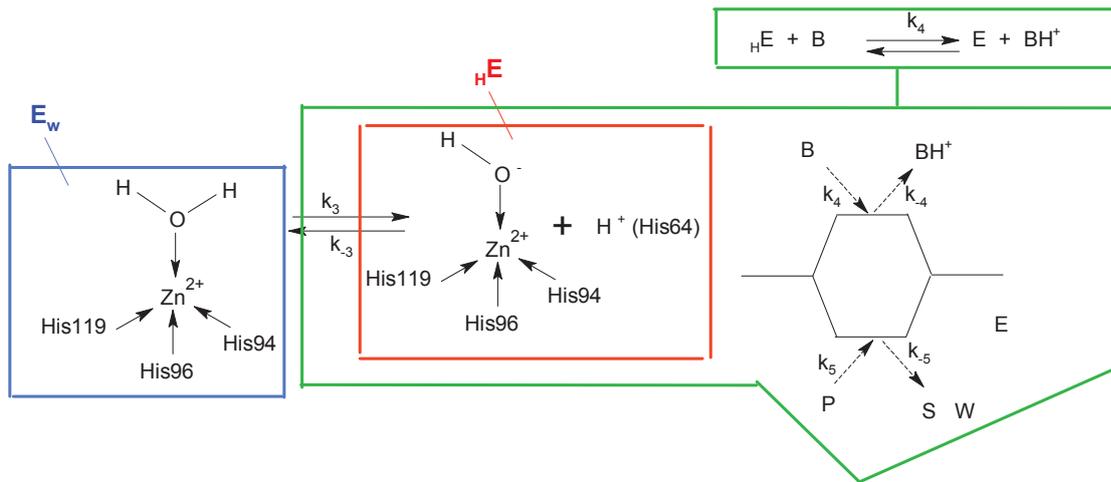


Figure.2.9: 2<sup>ème</sup> étape du modèle catalytique “Random Quad Quad Pseudo Iso Ping Pong” d’hydratation réversible du CO<sub>2</sub>, catalysée par l’anhydrase carbonique humaine (HCA),  
Présentation adaptée de Larachi <sup>24</sup> et de Rowlett et Silvermann <sup>25</sup>

Nous ne présentons pas ici les équations, fort complexes, du modèle synthétique de Larachi <sup>24</sup>. Une équation plus simple (Eq.2.24) prenant uniquement en compte la constante de Michaelis  $K_m^{CO_2}$  du CO<sub>2</sub> et la constante de turnover  $k_{cat}$  du modèle de Michaelis, ainsi qu’une constante de vitesse  $k_4$ , décrivant la cinétique de transfert du proton de  $H_2E$  au tampon B a été donnée par Rowlett et Silvermann <sup>25</sup>. Les valeurs de ces constantes sont regroupées au Tableau.2.2.

$$v = (\text{Units} / \text{mg}) = \frac{[E]_t}{v} = \frac{1}{k_4[B]} + \frac{1}{k_{cat}[B]} \left(1 + \frac{K_m'}{[CO_2]}\right) \quad (\text{Eq.2.24})$$

Avec  $K_m' = K_m^{CO_2} = \text{constante de Michaelis de } CO_2$

A forte concentration en substrat qui se traduit par une inhibition par  $HCO_3^-$  et /ou  $CO_2$ , cette équation devient:

$$\frac{[E]_t}{v} = \frac{k_{cat}[B]}{K_m''[1 + ([HCO_3^-]/K_i'')(1 + K_i'/[CO_2]) + [B](1 + K_m'/[CO_2])]} \quad (\text{Eq.2.25})$$

Avec  $K_m' = K_m^{CO_2}$  = constante de Michaelis de  $CO_2$

$K_m'' = K_m^B$  = constante de Michaelis du tampon

$K_i' = K_i^{CO_2}$  = constante d'inhibition de  $CO_2$

$K_i'' = K_i^{HCO_3^-}$  = constante d'inhibition de  $HCO_3^-$

Dans cette équation:

$$k_{cat} / K_m^B = k_4 \quad (\text{Eq.2.26})$$

$$K_i^{HCO_3^- \text{ app}} = K_i'' / (1 + \frac{K_i'}{[CO_2]}) \quad (\text{Eq.2.27})$$

Avec  $K_i' = K_i^{CO_2}$  et  $K_i'' = K_i^{HCO_3^-}$

Tableau.2.2: Récapitulatif des constantes de Michaelis, de  $k_4$  et des constantes d'inhibition de  $CO_2$  et  $HCO_3^-$  dans plusieurs tampons <sup>25</sup>

Tampon	pH	pKa	$K_m'' = K_m^B$ (mM)	$k_4$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_i^{CO_2} =$ $K_i^{HCO_3^- \text{ app}}$ (mM)
Triétanolamine	8.4	7.8	1.2	$5.4 \cdot 10^8$	$10 \pm 1$
Hepes	8.2	7.5	3.5	$2.1 \cdot 10^8$	$10 \pm 1$
4-méthylimidazole	8.4	7.8	1.3	$1.2 \cdot 10^9$	$5.4 \pm 0.3$
1-méthylimidazole	8.0	7.2	2.4	$2.9 \cdot 10^8$	$6.5 \pm 0.4$

#### d. Autres paramètres influant sur la catalyse enzymatique d'hydratation du CO<sub>2</sub> <sup>18, 30</sup>

Le pH agit sur la catalyse de l'anhydrase carbonique d'hydratation du CO<sub>2</sub>. En effet, les changements de pH modifient le taux d'hydratation du dioxyde de carbone catalysée par l'anhydrase carbonique II. L'enzyme est plus active à pH > 8 (Fig.2.10).

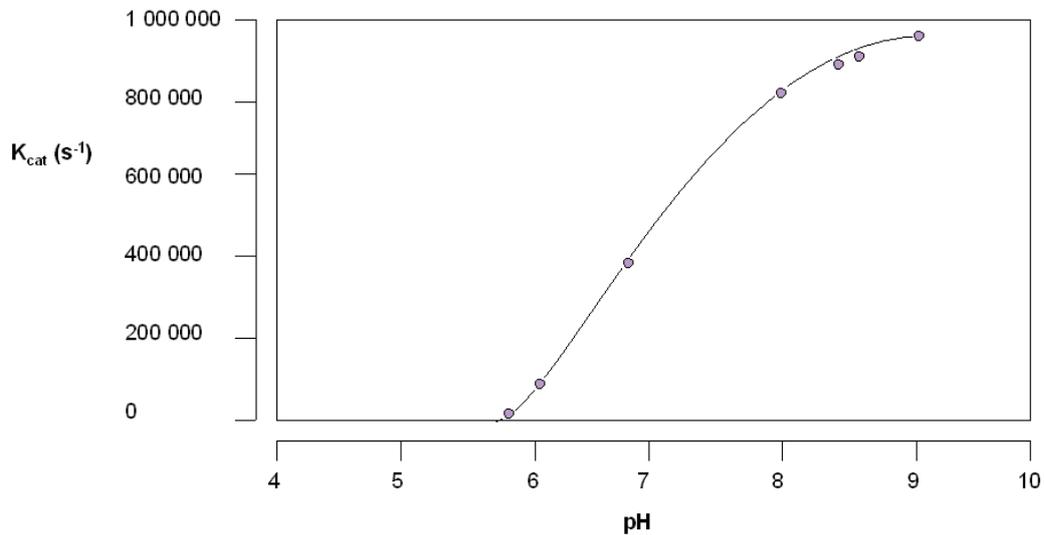


Figure.2.10: Effet du pH sur l'activité anhydrase carbonique  $\alpha$  humaine <sup>18</sup>

La catalyse enzymatique d'hydratation du CO<sub>2</sub> dépend également de la température. En effet, Ghannam et ses collègues <sup>30</sup>, ont étudié la température mais également des solvants à pH élevé (pH = 9) dans une solution tampon (10 mM de N-Cyclohexyltaurine appelé aussi CHES). Pour cela, ils ont mesuré  $k_{cat}$  et  $K_m$  pour l'hydratation du CO<sub>2</sub> par l'anhydrase carbonique humaine et par l'anhydrase carbonique bovine (Fig.2.11 et Fig.2.12) <sup>30</sup>.

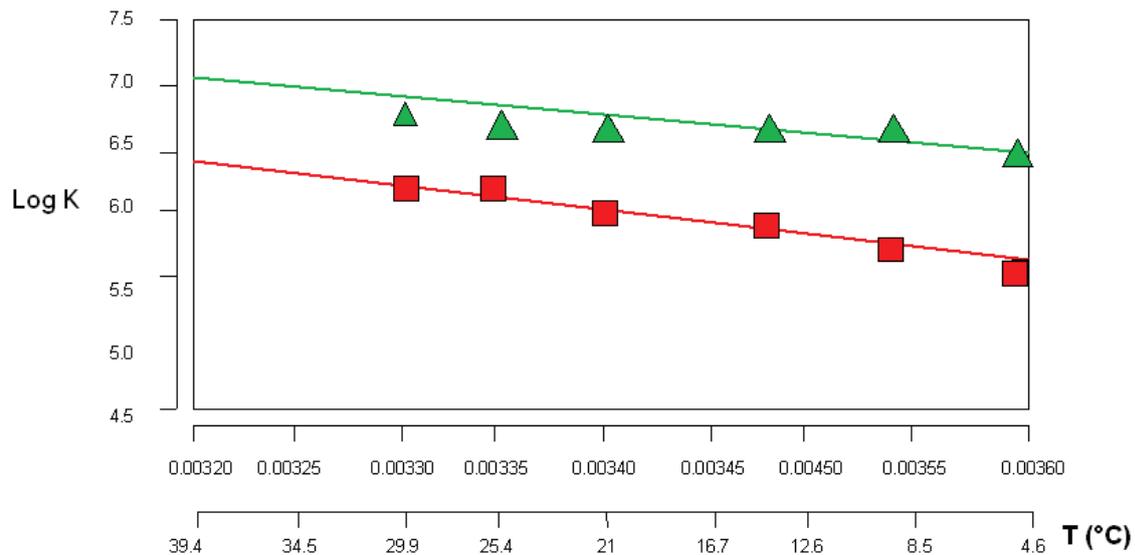


Figure.2.11: Influence de la température sur  $k_{cat}$  (en  $s^{-1}$ ) (□) et  $K_m$  (en  $mol L^{-1}$ ) (Δ) pour l'anhydrase carbonique humaine<sup>30</sup>

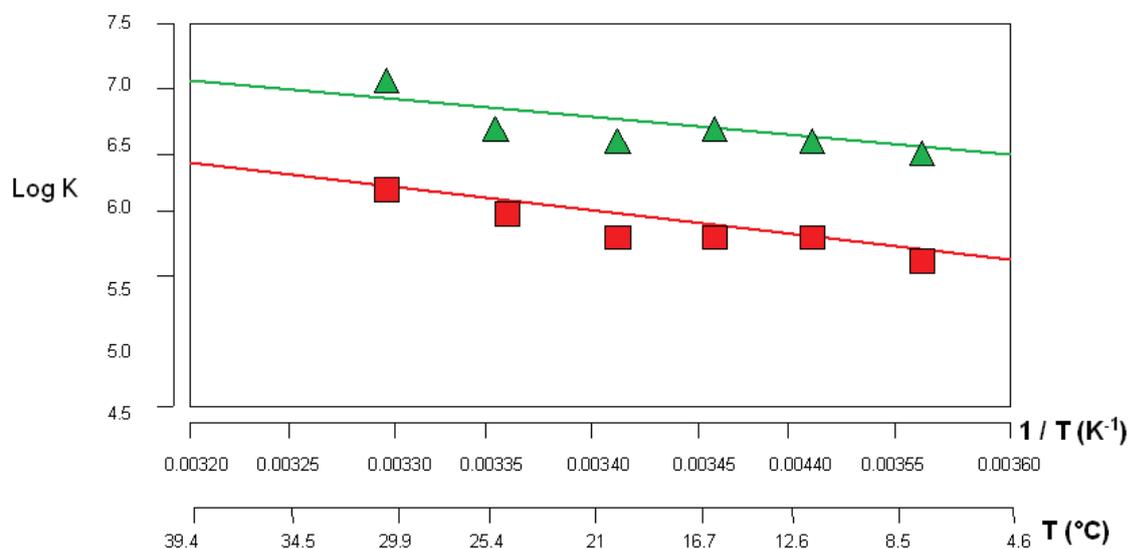


Figure.2.12: Influence de la température sur  $k_{cat}$  (en  $s^{-1}$ ) (□) et  $K_m$  (en  $mol L^{-1}$ ) (Δ) pour l'anhydrase carbonique bovine<sup>30</sup>

Il existe également de nombreux inhibiteurs des anhydrases carboniques, en particulier les anions inorganiques et organiques.

### e. Etudes du mécanisme enzymatique dans l'hydrolyse du para-nitrophénylacétate

23, 31 à 34

En raison des difficultés pour mesurer l'activité d'une préparation d'anhydrase carbonique dans la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub>, on préfère souvent déterminer l'activité de l'enzyme en tant qu'estérase, en milieu organique (ex : acétonitrile), par hydrolyse du para-nitrophénylacétate en paranitrophénol, à 25°C et à pH constant. Dans ce cas, l'activité enzymatique est mesurée dans une cellule UV-visible de 1 mL, sur un mélange constitué par exemple de 800 µL de tampon Tris à 0.05 M et à pH = 7.5, 100 µL de substrat et de 100 µL de solution aqueuse d'enzyme. L'absorbance du p-NP est alors mesurée à la longueur d'onde de 400 nm. Cependant, le p-NPA subit une dissociation en fonction de sa concentration et de la température. Aussi ce taux de dissociation doit être soustrait de la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme afin d'obtenir l'activité estérase d'une AC<sup>23</sup>.

Les résultats ont montré que cette réaction suit un modèle cinétique de Michaelis-Menten. Quelques constantes cinétiques d'anhydrases carboniques libres (non immobilisées) à 25°C en présence de divers tampons, dans cette réaction, sont résumées au Tableau.2.3.

Tableau.2.3: Quelques valeurs de  $k_{cat}$ , et  $K_m$  dans l'hydrolyse du p-NP

Enzyme	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat} / K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Solvant
AC bovine <sup>23</sup>	2.02	12.2	166.4	Tampon Tris (50 mM / pH = 7.5) + 10 % d'acétonitrile
AC bovine II <sup>31</sup>	73.824	76.9	960	Tampon Tris-Sulfate (0.1 M / pH = 7.6) + 3 % d'acétone
AC humaine I <sup>32</sup>	2.274	3.02	753	
AC humaine II <sup>32</sup>	79.592	30.53	2607	

Les effets de la température dans la réaction d'hydrolyse du para-nitrophényleacétate (p-NPA) en para-nitrophénol (p-NP) ont été étudiés par Kanba <sup>33</sup>. Lorsque la température augmente, les anhydrases carbonique subissent des altérations de leur conformation ce qui entraînent une perte de leur activité. En effet, à cause de la dénaturation thermique des enzymes, celles-ci deviennent inactives et leur productivité est réduite <sup>34</sup>. La dénaturation enzymatique par la température est beaucoup plus rapide que l'activation des enzymes, la cinétique de dénaturation des enzymes peut s'exprimer par l'Eq.2.28:

$$\frac{-d[E]}{dt} = k_d [E] \quad (\text{Eq.2.28})$$

où [E] représente la concentration enzymatique et  $k_d$  la constante de dénaturation de l'enzyme

Sachant que la concentration enzymatique est directement proportionnelle à la vitesse de la réaction, la constante de vitesse ( $k_d$ ) d'inactivation des enzymes et l'énergie de dénaturation ( $E_d$ ) peuvent être estimées à partir de l'équation d'Arrhénius ci-dessous (Eq.2.29):

$$k_d = A_d e^{(-E_d / RT)} \quad (\text{Eq.2.29})$$

Des valeurs de  $k_d$  calculées par Kanbar pour quelques températures sont rapportées au Tableau.2.4 <sup>33</sup>. Ce chercheur a observé qu'après 120 min à 40°C, 50°C ou 60°C, l'activité finale de l'enzyme chutait à 90 %, 70 % et 20 %, respectivement, de l'activité initiale. Au delà de 63°C, l'enzyme perd son activité en un temps court, l'activité finale n'étant plus que respectivement de 50 % et de 10 % de la valeur initiale, après 10 min et 20 min à cette température. Au delà de 40 min à cette température, l'enzyme ne présentait plus d'activité <sup>33</sup>.

Tableau.2.4: Constantes de dénaturation de l'enzyme libre<sup>33</sup>

T (°C)	k <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )
40	0.001
50	0.004
54	0.007
58	0.0112
60	0.0164
63	0.1143

## 2.2. Partie expérimentale

### 2.2.1. Source d'enzyme utilisée et caractérisation de la répartition en masse de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

#### a. Source d'enzyme utilisée

L'anhydrase carbonique (CA) (E.C.4.2.1.1) d'érythrocyte bovin de type  $\alpha$  utilisée dans cette thèse a été achetée sous forme de poudre blanche lyophilisée, sans sel, à SERVA Electrophoresis (Allemagne). Son activité spécifique commerciale était d'environ 1.3 U mg<sup>-1</sup>, où 1 U est la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1  $\mu$ mol de p-nitrophénylacétate par minute à 25°C et pH 7.6.

#### b. Analyse par électrophorèse de la source d'anhydrase carbonique utilisée dans cette thèse

L'analyse par électrophorèse de l'anhydrase carbonique a été effectuée à l'Université de Paris V - René Descartes sous la direction de Madame Claude Chopard.

La Fig.2.13 montre les résultats de la technique d'électrophorèse utilisée et détaillée en Annexe A. De gauche à droite elle comprend: (1) les raies correspondant aux masses moléculaires en kDalton (1 kDa = 1 kg mol<sup>-1</sup>) des protéines d'une solution étalon; puis les

raies obtenues avec des solutions d'anhydrase carbonique commerciales à: (2) 2 mg mL<sup>-1</sup> ; (3) 1 mg mL<sup>-1</sup> ; (4) 0.5 mg mL<sup>-1</sup> ; (5) 0.2 mg mL<sup>-1</sup> ; (6) 2 mg mL<sup>-1</sup> ; (7) 1 mg mL<sup>-1</sup> ; (8) 0.5 mg mL<sup>-1</sup> ; (9) 0.2 mg mL<sup>-1</sup> ; et (11) les raies de la même solution étalon qu'en (1).

Ces électrophorèses montrent qu'une seule protéine de masse molaire située entre 25 et 30 kDa était présente dans la préparation commerciale utilisée. Ce résultat est également en accord avec une anhydrase carbonique dont la masse molaire est plus précisément de 29 kDa. La préparation enzymatique commerciale utilisée était donc relativement pure.

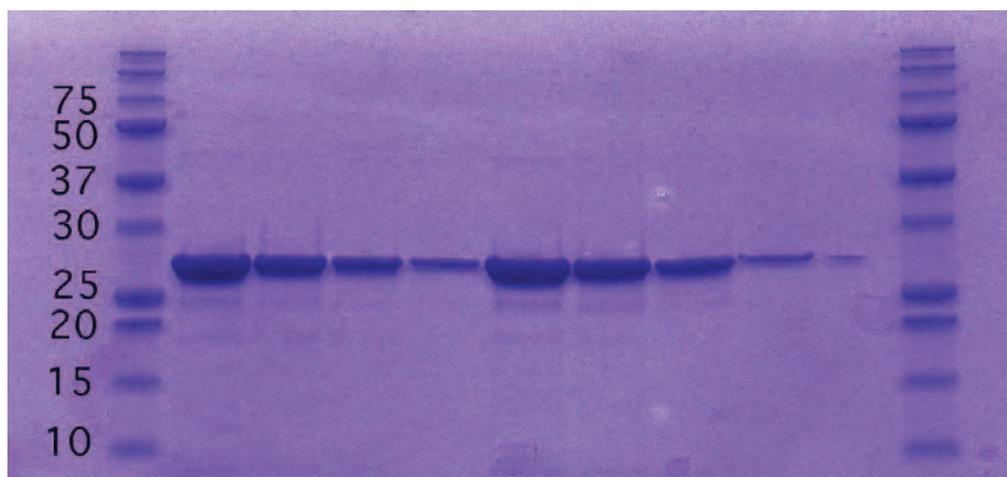


Figure.2.13: Résultats de l'électrophorèse sur couche mince de la préparation enzymatique commerciale pour des concentrations, de gauche à droite, de 2 ; 1 ; 0.5 ; 0.2 ; 2 ; 1 ; 0.5 ; 0.2 et 0 mg mL<sup>-1</sup>, encadrés à gauche et à droite par l'électrophorèse d'une solution étalon de protéines

### 2.2.2. Détermination de l'activité enzymatique

#### a. Objectif des tests d'activité catalytiques utilisés

Le but de la présente étude n'était pas d'étudier le mécanisme catalytique de l'anhydrase carbonique qui a été abondamment étudié comme l'a montré la bibliographie (Section.2.1 ci-dessus), mais simplement de disposer d'un test simple permettant de vérifier si l'enzyme en solution était active, dans des conditions compatibles avec l'application visée: le captage enzymatique du CO<sub>2</sub>.

Actuellement, l'activité de ces enzymes est souvent déterminée dans la réaction d'hydrolyse du p-NPA en p-NP dans un solvant organique (voir bibliographie), ce qui permet de travailler par exemple à pH constant. Mais historiquement, comme indiqué dans la bibliographie, l'activité des anhydrases carboniques a d'abord été étudiée dans l'hydratation du CO<sub>2</sub> à la suite des travaux de Wilbur et Anderson<sup>20</sup>. Ceci a permis de déterminer leur mécanisme catalytique dans cette réaction, un mécanisme assez complexe résumé dans la section.2.1. Nous avons cherché ici à mettre au point une méthode simple, dérivée de Wilbur et Anderson, mais qui reflète un peu le captage dynamique en continu du CO<sub>2</sub> gazeux.

### **b. La méthode de Wilbur et Anderson et son adaptation**

L'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique a été étudiée par Wilbur et Anderson en 1948 selon trois procédures utilisant la manométrie, la colorimétrie et l'électrométrie<sup>20</sup>.

La méthode manométrique est basée sur la mesure de pression due à l'évolution du CO<sub>2</sub> en un gaz équilibre avec une solution de bicarbonate de sodium mélangée à un tampon, par exemple de phosphate à pH = 6.8<sup>13</sup>. La méthode colorimétrique fut tout d'abord mise en place par Brinkman en 1933<sup>35</sup>, puis successivement modifiée par Meldrum et Roughton<sup>12</sup>, Philpot et Philpot en 1936<sup>36</sup> et Wilbur et Anderson en 1940<sup>20</sup>. Dans un exemple d'application de cette méthode, du rouge de phénol (phénolsulfonephtaléine ou PSP) est ajouté à une solution de NaHCO<sub>3</sub> conservée à 0°C. Une solution de PSP est de couleur rouge à pH > 8 (forme PSPH<sub>2</sub>) et jaune due à l'anion PSPH<sup>-</sup> à pH < 6.6. Dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et NaHCO<sub>3</sub> à pH initial ≈ 11, cet indicateur coloré est rouge violacé. Mais dès que le milieu devient acide, en raison de la libération de protons produits par hydratation du CO<sub>2</sub> (voir Chapitre 1.2), dès que l'ion fait buller du CO<sub>2</sub> dans la solution, sa coloration change progressivement du rouge au jaune pâle. Ce changement de couleur visuel est chronométré. Pour la réaction non catalysée, le temps de changement de coloration se situe typiquement entre 65 à 75 s. L'addition d'anhydrase carbonique bovine réduit ce temps à une valeur comprise entre 25 et 30 s<sup>13</sup>.

La méthode électrométrique est souvent appliquée à 0°C, ou proche de 0°C avec un appareil du type « stopped flow » comprenant deux seringues. Ces seringues contiennent respectivement, par exemple un tampon au véronal et une solution aqueuse saturée en CO<sub>2</sub>. Le tampon au véronal est constitué d'une solution de barbiturate de sodium dans de l'eau déminéralisée, dont on ajuste le pH à une valeur ≈ 8 par ajout d'acide barbiturique et contenant ou non l'enzyme. La solution d'eau saturée en CO<sub>2</sub> est préparée avant le test

d'activité catalytique, par exemple par sublimation de  $\text{CO}_2$  solide placé au fond d'un vase Dewar contenant de l'eau déminéralisée. Le contenu des deux seringues est mélangé brutalement dans une cellule contenant une électrode en verre permettant de mesurer le pH. La conversion du  $\text{CO}_2(\text{aq})$  provenant de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , en ions  $\text{HCO}_3^-$  qui prédominent pour  $\text{pH} > 6.35$  se traduit par une diminution du pH, qui est initialement  $> 8$  juste après le mélange. Le temps mis par le pH pour décroître, par exemple de 7.5 à 6.5, est mesuré soit par pH-métrie soit par suivi de l'absorbance dans l'UV-visible à une longueur d'onde précise si un indicateur coloré est ajouté <sup>20</sup>.

Ces tests du type Wilbur et Anderson partent de mélanges de solution initialement équilibrées, l'une saturée en  $\text{CO}_2$ , l'autre contenant une concentration initiale prédéterminée en ions  $\text{HCO}_3^-$  (ou  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$ ), de façon à limiter au maximum les problèmes de limitation par la diffusion des réactifs. Il s'agit donc de conditions très différentes du fonctionnement d'une membrane liquide, ou la solution aqueuse initiale n'est pas saturée en  $\text{CO}_2$ , mais dissoute en continu du  $\text{CO}_2$  provenant d'un gaz, selon la loi de Henry. De plus, ce  $\text{CO}_2$  dissous ainsi que le  $\text{HCO}_3^-$  formés doivent diffuser à travers la membrane liquide.

Nous avons donc adapté la méthode électrométrique de Wilbur et Anderson pour refléter à la fois la cinétique de dissolution continue du  $\text{CO}_2$  en milieu aqueux et la cinétique de diffusion des espèces dissoutes. Pour cela, la technique utilisée comprend un ballon monocol de 100 mL contenant 10 mL de tampon, soit sans enzyme, soit dans lequel 2 mg d'enzyme ont été dissous (Fig.2.14). Une électrode à réponse relativement rapide permettant de mesurer le pH en fonction du temps est plongé dans le ballon. Le pH-mètre utilisé est du type « ISFET » provenant de Fischer Scientific, équipé d'une électrode en acier inox comprenant un capteur électronique solide dont le temps de réponse selon le constructeur est  $< 10$  s. Du  $\text{CO}_2$  gazeux est alors injecté dans le fond du ballon et traverse le milieu aqueux sous forme de fines bulles. Dans tous les tests, le  $\text{CO}_2$  était alimenté sous une pression  $\approx 0.1$  MPa (1 atm) et un débit de  $9.95 \text{ L h}^{-1}$ . Le pH a été enregistré toutes les 5 s jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur  $\leq 6.5$ . Par ailleurs, le ballon monocol pouvait être immergé dans un bain d'huile, ou un bain d'eau glacée, pour étudier l'influence de la température.

L'activité de l'enzyme a été définie à partir des temps mis par le pH pour décroître d'une valeur 7.5 à 6.5, soit «  $t_0$  » et «  $t_{\text{enz}}$  » respectivement sans enzyme et avec une masse d'enzyme  $m_{\text{enz}} = 2$  mg, dans une solution aqueuse de tampon initialement à  $\text{pH} \approx 8$ . L'activité supplémentaire relative  $v_r$  de l'enzyme par rapport au même milieu liquide sans enzyme est exprimée en « Unités » par mg ( $\text{U mg}^{-1}$ ) selon la présentation initiée par Wilbur, et donnée par

l'Eq.2.30 où  $v_{enz}$  est la vitesse de production d'ions  $\left(\frac{d[H^+]}{dt}\right)$  autour de pH = 7 avec les enzymes et  $v_0$  cette vitesse sans enzyme (voir annexe B):

$$v_r \text{ (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{V_{enz} - V_0}{V_0 m_{enz}} = \frac{t_0 - t_{enz}}{t_{enz} \cdot m_{enz}} \quad \text{(Eq.2.30 – voir aussi Eq.2.23)}$$

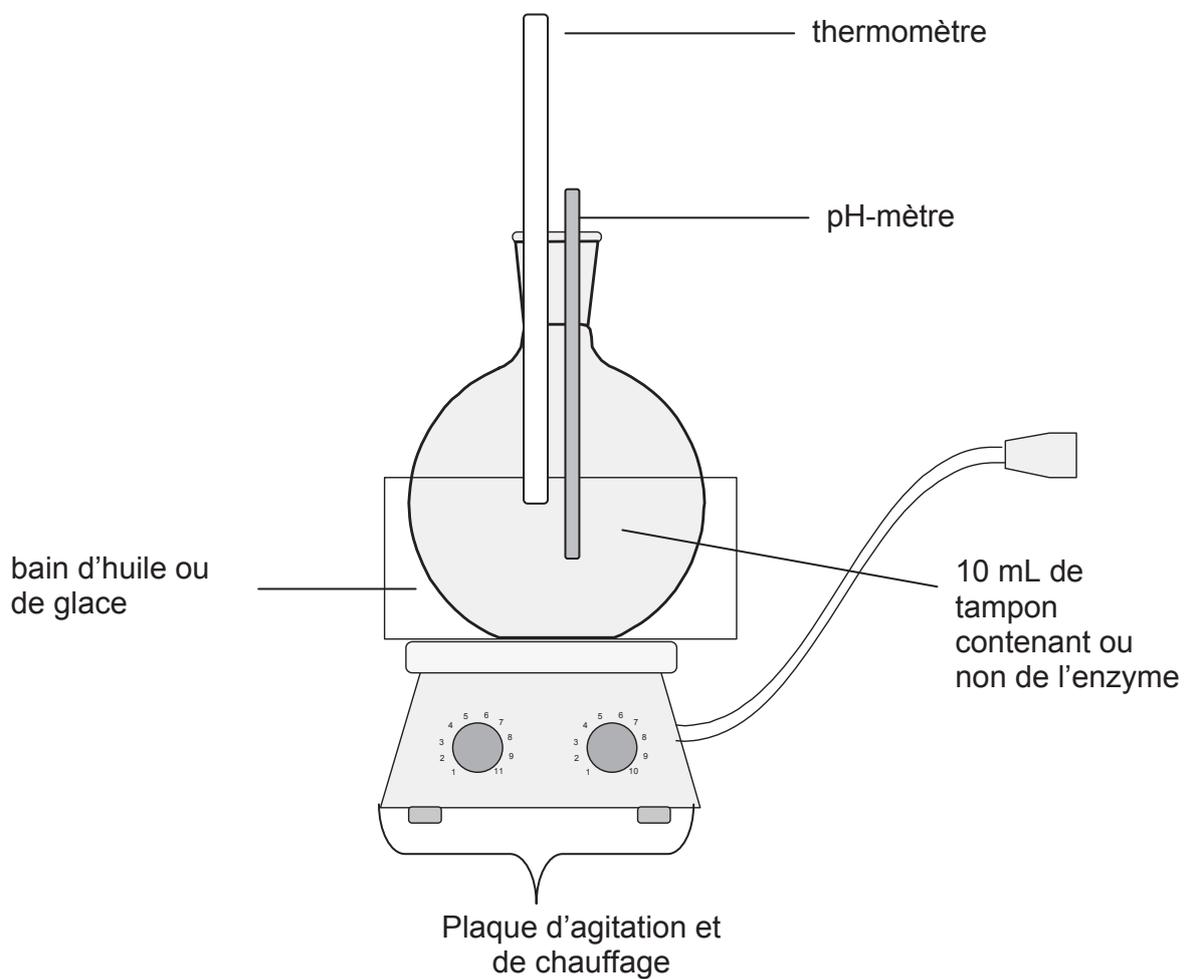


Figure.2.14: Schéma du montage utilisé pour tester l'activité enzymatique de l'anhydrase carbonique commerciale

### c. Tampons utilisés

Plusieurs types de tampons ont été utilisés pour appréhender l'importance, d'une part de la concentration de ce tampon, d'autre part de sa nature.

Dans le cas présent, ont été sélectionnés des tampons Tris-HCl de molarité 0.1 M ou 1 M, déjà utilisés avec des enzymes dans d'autres études du groupe <sup>37 à 39</sup>, mais également des tampons phosphates 1 mM, 0.1 M et 1 M, utilisés dans certaines références bibliographiques avec l'anhydrase carbonique <sup>40</sup>. L'effet de la température a également été étudié à 4°, 22°, et 33.5°C. Enfin des solutions de 0.1 M à base de bicarbonates NaHCO<sub>3</sub> et KHCO<sub>3</sub>, qui apportent des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pouvant déplacer l'équilibre de déprotonation de H<sub>2</sub>O.CO<sub>2</sub> vers des pH plus élevés ont également été testés. La désignation des tampons ou solutions utilisés, leur molarité, pH, produits chimiques à partir desquels ils ont été réalisés et réaction de tampon mise en jeu, sont récapitulés au Tableau.2.5.

Tableau.2.5: Tampon et solution utilisés pour les membranes liquides dans ce mémoire

Nature	Molarité	pH	Produits utilisés
<b>Tris-HCl</b>	0.1 M ou 1 M	≈ 8 (7.87 à 8.12) ou ≈ 9 (9.13 à 9.17)	HCl (Prolabo) Tris-aminométhane (Tris) (Sigma Aldrich)
$\text{RNH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{RNH}_3^+$ $\text{pK}_a \approx 8.1$ Où R désigne (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C (Eq.2.31)			
<b>Phosphate</b> (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O et KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.1 M ou 1 M	≈ 8 (7.93 à 8.17)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O (Roth) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth)
$\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$ $\text{pK}_a \approx 7.2$ (Eq.2.32)			
<b>Na<sup>+</sup>(aq) + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(aq)</b> (en solution)	1 M	≈ 8 (8.05)	NaHCO <sub>3</sub> (Riedel-DeHaën)
$\text{NaHCO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{pK}_a \approx -6.35$ (Eq.2.33)			
<b>Ca<sup>2+</sup>(aq) + 2Cl<sup>-</sup>(aq)</b> (en solution)	0.292 M	≈ 10.5 (10.43)	Tris (1.4M ; pH=10.5) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich)

#### d. Résultats

La Fig.2.15 montre un exemple de cinétique d'évolution du pH en fonction du temps dans un tampon Tris-HCl de molarité 0.1 M (pH initial = 7.86) à 22°C. Les temps  $t$  et  $t_0$  pour passer de pH = 7.5 à 6.5 avec 2 mg d'enzyme et sans enzyme sont respectivement de 20 et 45 s. Compte tenu du temps de réponse de l'électrode ( $< 10$  s selon le fournisseur), la cinétique est dans ce cas suffisamment lente pour montrer l'accélération du captage de  $\text{CO}_2$  par l'enzyme. Mais elle ne peut fournir qu'une estimation sous-évaluée de l'activité enzymatique,  $v_r = 0.63 \text{ U mg}^{-1}$  selon l'Eq.2.30.

Il est à noter qu'à 4°C la cinétique de libération de protons est nettement plus lente sans enzyme (Fig.2.16a), alors qu'elle est pratiquement restée inchangée avec 2 mg d'enzyme. L'activité relative calculée pour l'enzyme selon l'Eq.2.30 est donc nettement plus élevée, soit  $v_r = 3.5 \text{ U mg}^{-1}$  mais elle est encore sous-évaluée, le temps «  $t_{\text{enz}}$  » avec l'enzyme restant trop proche du temps de réponse de l'électrode. Il est également plus difficile de réguler la température compte tenu du bullage du  $\text{CO}_2$  qui réchauffe le milieu aqueux.

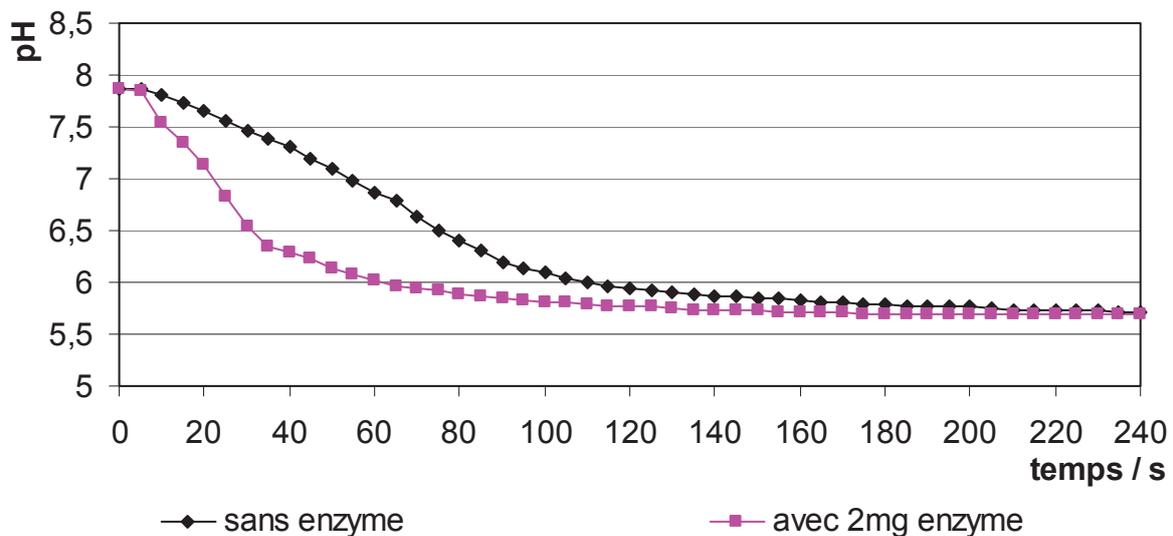


Figure.2.15: Suivi du pH en fonction du temps à 22°C dans du tampon Tris-HCl 0.1 M sans enzyme et avec 2 mg d'enzyme

A l'inverse, la vitesse de captage du  $\text{CO}_2$  est plus rapide à 33.5°C qu'à 22°C, comme le montre la Fig.2.16b. Bien que le graphique continue à montrer une plus grande vitesse de captage avec l'enzyme, l'Eq.2.30 fournit toujours une valeur  $v_r = 0.14 \text{ U mg}^{-1}$ , très sous-

estimée, en raison de l'inertie de l'électrode. Mais de plus, le captage du CO<sub>2</sub> sans enzyme est plus rapide à cette température qu'à 22°C, d'où une moindre amélioration relative de ce captage par l'enzyme.

De même, un tampon Tris-HCl à pH ≈ 8 de molarité 1 mM à 22°C ne permet pas de ralentir suffisamment la décroissance du pH (Fig.2.17). Dans ce cas également, compte tenu du temps de réponse de l'électrode, il n'est donc plus du tout possible de déterminer réellement l'activité due à l'enzyme.

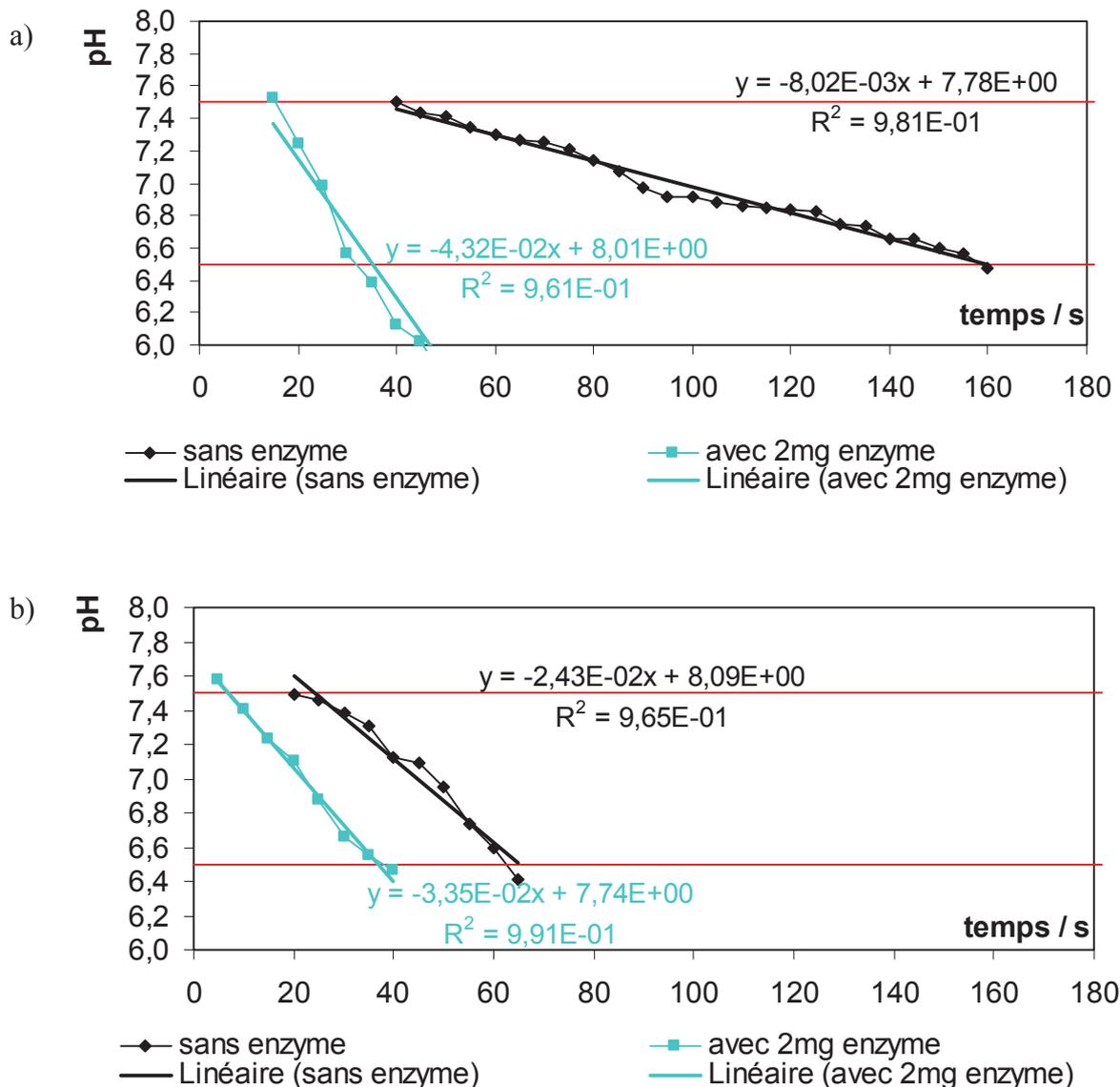


Figure.2.16: Suivi du pH en fonction du temps dans du tampon Tris-HCl 0.1 M sans enzyme et avec 2 mg d'enzyme: (a) à 4°C ; (b) à 33.5°C (les lignes droites de régression représentent le  $\text{dpH}/\text{dt}$  utilisé pour calculer l'activité enzymatique)

L'importance de la nature du tampon est mise en valeur par une comparaison des résultats précédents obtenus avec le Tris-HCl, avec ceux de tampons phosphate de pH initial similaire ( $\approx 8$ ) à 22°C et pour des molarités similaires (1 mM ; 0.1 M: Fig. 2.17 et 2.15 pour Tris-HCl, Fig.2.18 pour le tampon phosphate).

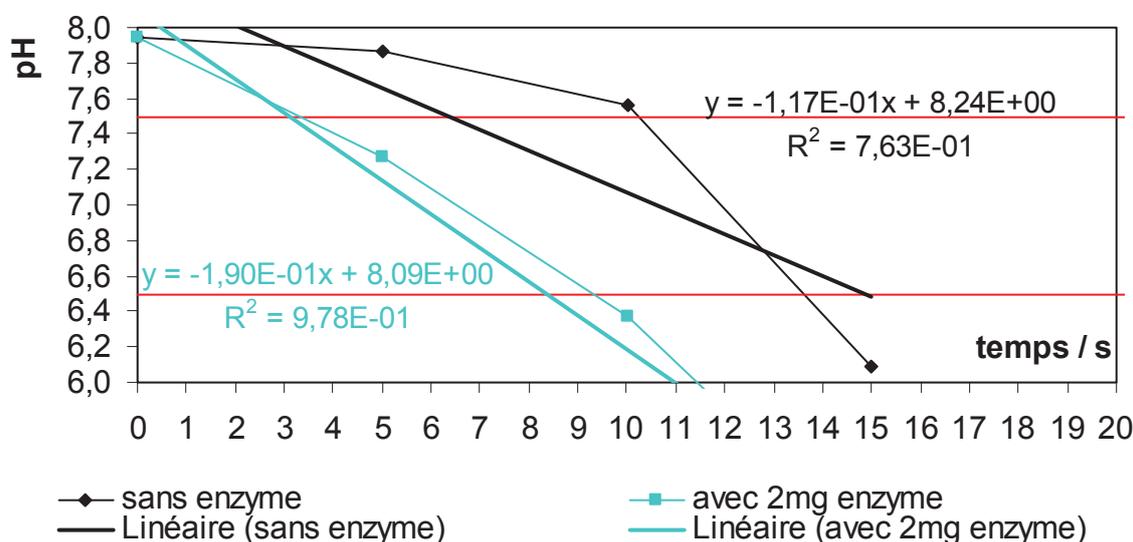


Figure.2.17: Suivi du pH en fonction du temps à 22°C dans du tampon Tris-HCl 1 mM sans enzyme et avec 2 mg d'enzyme (les lignes droites de régression représentent le  $dpH/dt$  utilisé pour calculer l'activité enzymatique)

Les figures 2.18a, b et c montrent les résultats d'évolution du pH en fonction du temps, entre les valeurs de 7.5 et 6.5. Cette cinétique est de plus en plus lente lorsque la molarité du tampon s'accroît. Ce fait peut s'expliquer simplement par une compétition entre l'enzyme qui produit des ions  $H^+$  et la base B du tampon qui capture ces ions  $H^+$ , comme détaillé dans la section 2.1.3c. La quantité de base B disponible pour capturer les protons produits par hydratation du  $CO_2$  croît avec la molarité du tampon, il en résulte une décroissance moins rapide du pH lorsque cette molarité croît.

De plus, à l'exception de la molarité 1 mM où le pH décroît très rapidement par rapport au temps de réponse de l'électrode, les temps  $t$  et  $t_0$  pour les molarités de 0.1 M et 1 M sont cette fois suffisamment longs pour fournir une estimation de  $v_r$ , dont la valeur est respectivement de 1.50 et 0.28, soit une valeur très différente de celle obtenue avec le Tris-HCl. Ceci indique clairement que la méthode utilisée fournit une activité qui dépend de la nature du tampon ainsi que de sa molarité.

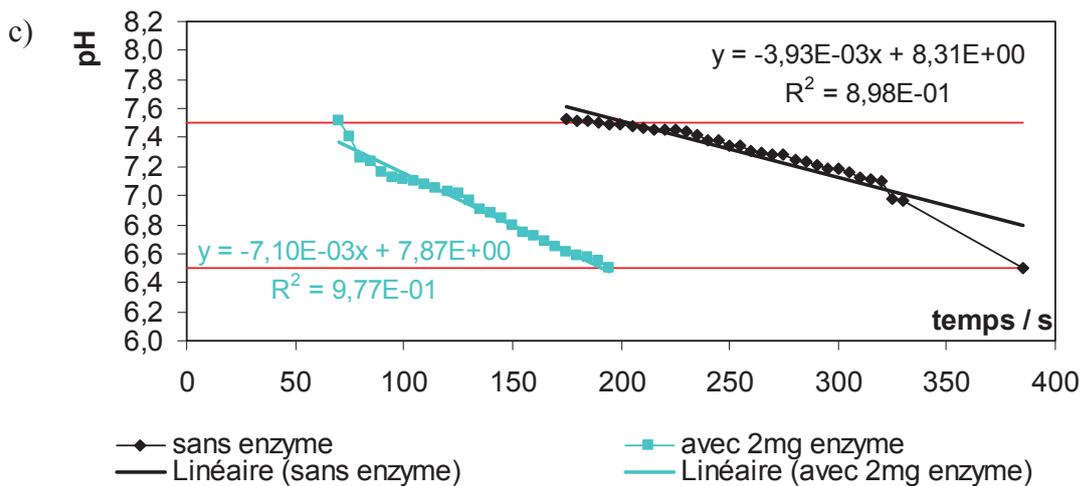
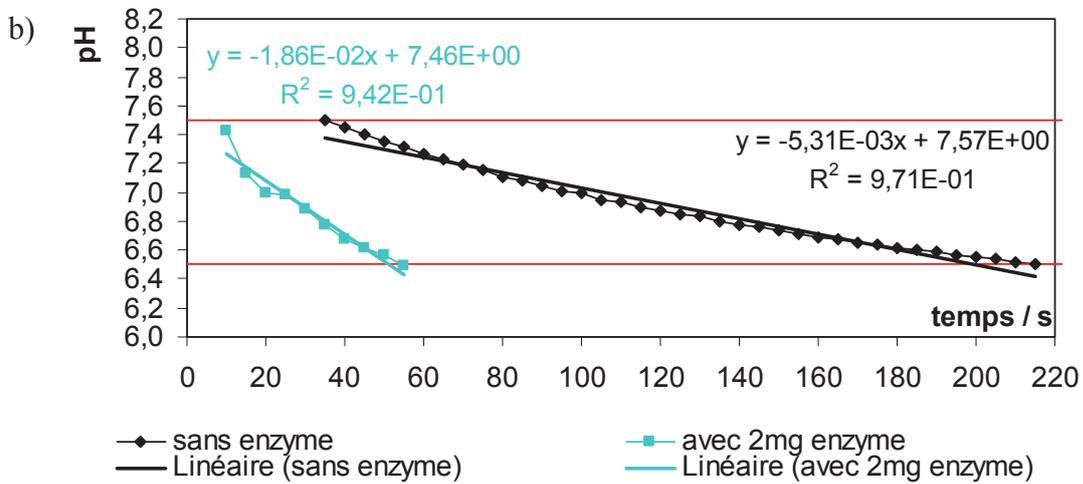
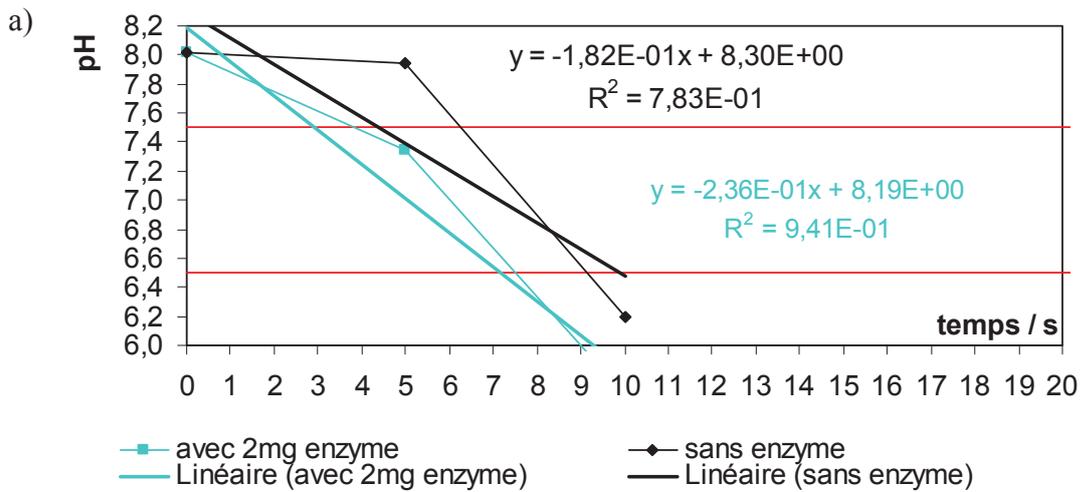


Figure.2.18: Suivi du pH en fonction du temps dans des tampons phosphate à 22°C:  
 (a) 1 mM ; (b) 0.1 M ; (c) 1 M (pH initiaux, respectivement: 8.02 ; 7.75 et 8.17) (les lignes droites de régression représentent le  $dpH/dt$  utilisé pour calculer l'activité enzymatique)

D'ailleurs, le pH se stabilise finalement à une valeur qui croît avec la molarité du tampon, comme le montre la Fig.2.19. Enfin cette compétition base B / enzyme dépend également de la température comme nous l'avons vu avec le Tris-HCl.

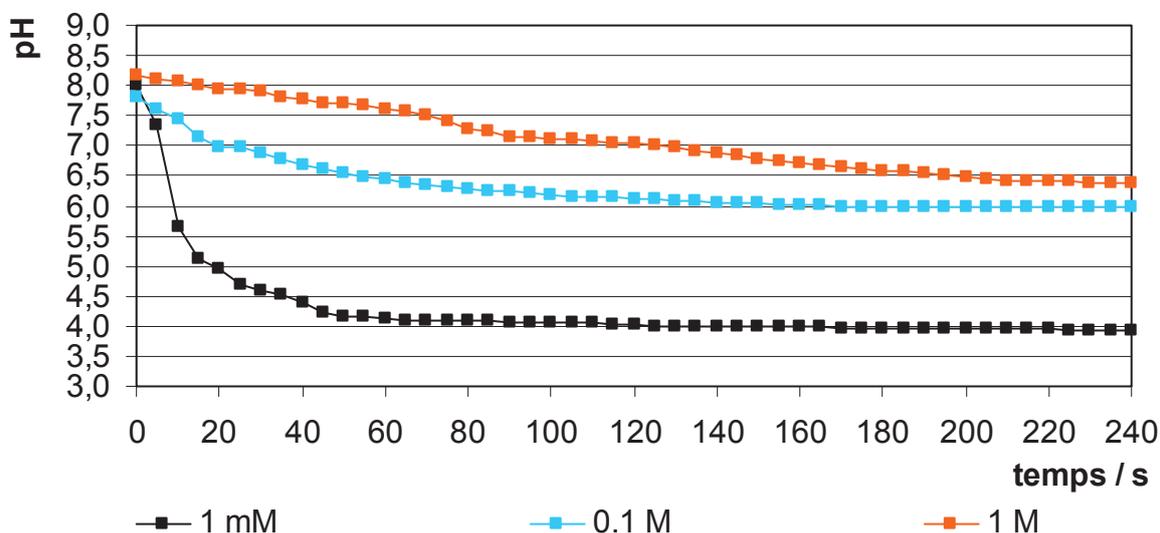
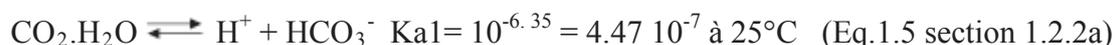


Figure.2.19: Suivi du pH en fonction du temps avec 2 mg d'enzyme dans des tampons phosphate de molarité croissante à 22°C

En ce qui concerne les solutions  $\text{NaHCO}_3$  et  $\text{KHCO}_3$  0.1 M, de pH initial respectif 8.15 et 8.3, le pH se stabilise à une valeur proche du  $\text{pKa}_1$  de  $\text{CO}_2(\text{aq})$  (Fig.2.20). Ce résultat peut s'expliquer par un déplacement de l'équilibre final de déprotonation de  $\text{CO}_2(\text{aq})$  (Eq.1.5, section 1.2.a) vers un pH plus élevé selon l'Eq.2.34, en raison de l'apport par la solution d'ions bicarbonates, eux-mêmes équilibrés par des cations  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ .



$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}]} \quad \text{pKa}_1 = 6.35 \quad (\text{Eq.2.34})$$

De plus, la cinétique de décroissance du pH était à peine plus rapide avec enzyme que sans enzyme, les courbes du pH en fonction du temps sans enzyme (non montrées Fig.2.10) se superposant pratiquement à celles obtenues avec 2 mg d'enzyme.

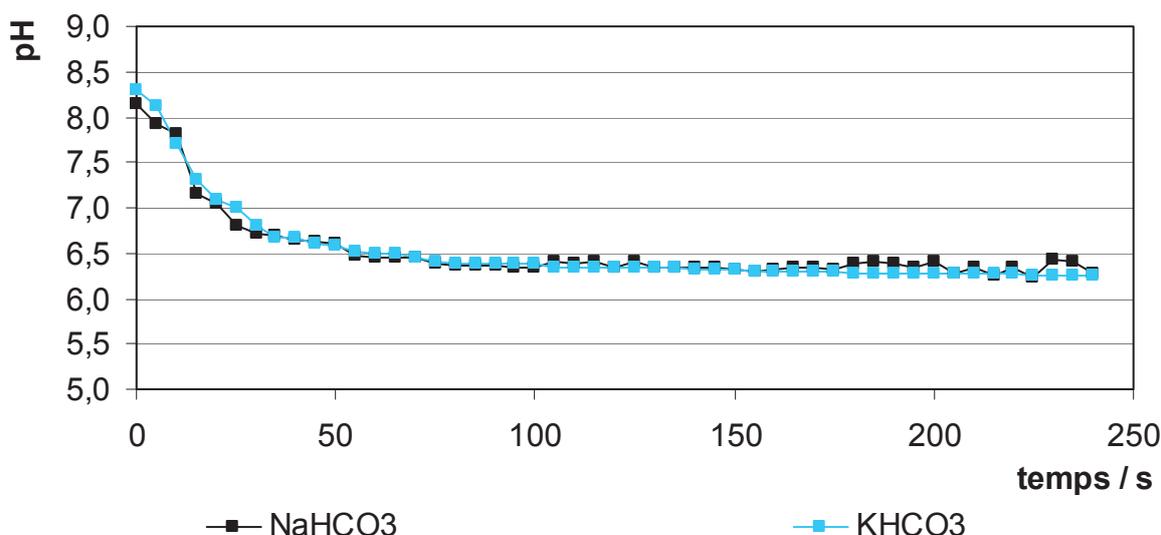


Figure.2.20: Suivi du pH en fonction du temps pour 2 mg d'enzyme dans des solutions KHCO<sub>3</sub> et NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M à 22°C

### 2.3. Conclusions du chapitre sur l'anhydrase carbonique

Ce chapitre a montré que les anhydrases carboniques étaient des enzymes dont le mécanisme catalytique avait très largement été étudié. Une étude supplémentaire du mécanisme, dans cette thèse, aurait été superflue. Un 1<sup>er</sup> objectif de ce chapitre, atteint avec succès, a donc été de mettre au point un test simple permettant de vérifier l'activité catalytique de l'anhydrase carbonique commerciale achetée, dans l'hydratation du CO<sub>2</sub>. Ce test par bullage de CO<sub>2</sub> dans un milieu aqueux contenant l'enzyme, simule un processus de captage du CO<sub>2</sub>, puisqu'il est dynamique, sous pression et débit constant, dans un milieu aqueux initialement non saturé en CO<sub>2</sub>. Il diffère ainsi des procédés tels qu'utilisés dans les méthodes dérivées de Wilbur et Anderson pour étudier les mécanismes catalytiques, où l'on part de milieux aqueux initialement équilibrés à saturation en CO<sub>2</sub>. Ces tests ont montré que notre enzyme commerciale était active à une température de 22°C, même par bullage de CO<sub>2</sub> sous une pression de 1 atm, et restait active à 33°C. Des tests réguliers, ont montré ultérieurement que cette activité n'évoluait pas de manière importante, d'une part lors d'un stockage de quelques mois à 4°C, d'autre part dans des lots successifs. Par ailleurs, lorsqu'un

paramètre a été balayé dans les études effectuées (tampon: sa nature et sa molarité, concentration en enzyme, etc...), une préparation unique d'enzyme a été utilisée à chaque fois en un court temps (quelques jours). La stabilité de cette activité est peut être à relier au fait que l'analyse du produit commercial effectuée par électrophorèse à l'Université de Paris V - René Descartes, a montré qu'il s'agissait d'un produit relativement pur en enzyme.

Une caractéristique originale de la réaction catalysée par l'enzyme, c'est-à-dire la déprotonation d'espèces  $\text{CO}_2(\text{aq})$  en solution aqueuse pour former des ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$ , est que l'eau pure elle-même est active. De plus, la thermodynamique impose d'ajouter un tampon pour se situer à un pH supérieur au  $\text{pKa}_1$  de cet équilibre de déprotonation. Or le composant basique de tout tampon est lui-même un catalyseur de la même réaction. De sorte qu'il n'est pas possible de mesurer directement une activité « intrinsèque » de l'enzyme, qui soit indépendante des catalyseurs concurrents. Le résultat des tests catalytiques dépend du milieu concurrent aqueux environnant, ce qui a bien été mis en valeur dans les modèles cinétiques les plus élaborés, de Larachi <sup>24</sup> et de Rowlett et Silvermann <sup>25</sup> (Section 2.1.3c) et qui reflètent le mieux les expériences publiées. Les questions de tampon ont donc constitué un sujet essentiel dans les chapitres suivants, aussi bien dans les études préliminaires en milieu aqueux (Chapitre 3), que sur membranes liquides minces (Chapitre 4) et sur membranes sol-gel minces (Chapitre 5).

## 2.4. Références bibliographiques

[1] Adler L., Brundell J., Falkbring S.O., Nyman P.O., (1972). "Carbonic anhydrase from *Neisseria sicca*, strain 6021 I. Bacterial growth and purification of the enzyme", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology **284**(1): 298-310

[2] Webb E.C., "Enzyme Nomenclature". Edité par Academic Press. 1992. p. 0-862. ISBN 0-12-227164-5 (hardback), 0-12-227165-3 (paperback). Avec Supplément 1 (1993), Supplément 2 (1994), Supplément 3 (1995), Supplément 4 (1997) et Supplément 5 (dans respectivement Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), (1994). European Journal of Biochemistry **223**(1): 1-5 ; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), (1995). European Journal of Biochemistry **232**(1): 1-6 ; Nomenclature

Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), (1996). European Journal of Biochemistry **237**:1-5 ; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), (1997). European Journal of Biochemistry **250**: 1-6 ; et Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), (1999). European Journal of Biochemistry **264**: 610-650)

[3] Karp G., Bouharmont J., “Biologie Cellulaire et moléculaire”. Edité par De Boeck. 2004. P. 0-850. ISBN 978-2-8041-6011-1

[4] Voet D., Voet J.G., Rousseau G., “Biochimie”. Edité par De Boeck Université. 2005. P. 0-1600. ISBN 2-8041-4795-9

[5] Audigié C., Zonszain F., “Biochimie métabolique”. Edité par Impr. Maisonneuve. 1993. P. 0-259. ISBN 2-7040-0715-2

[6] Garrett R.H., Grisham C.M., “Biochimie”. Edité par De Boeck. 2000. P. 0-1254. ISBN 978-2-7445-0020-6

[7] Supuran C.T., Scozzafava A., (2007). “Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry”, Bioorganic and Medicinal Chemistry **15**(13): 4336-4350

[8] Gay-Lussac J.L., Arago F., “Annales de chimie et de physique tome 53”. Edité par Crochard. 1833. P. 0-452.

[9] Brown A.J., (1902). “Enzyme action”, Journal of the Chemistry Society (Transitions) **81**: 373-388

[10] Henri V., (1902). “Théorie générale de l’action de quelques diastases”, Comptes Rendus de l’Académie des Sciences de Paris **135**: 916-919

[11] Cornish-Bowden A., Jamin M., Saks V., “Cinétique enzymatique”. Edité par EDP Sciences. 2005. p. 0-420. ISBN 2-86883-742-5

- [12] Meldrum N., Roughton F.J.W., (1933). "Carbonic anhydrase: Its preparation and properties", Journal of physiology **80**: 113-142
- [13] Keilin D., Mann T., (1940). "Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme", Biochemical Journal **34**: 1163-1176
- [14] Guilloton M.B., Korte J.J., Lamblin A.F., Fuchs J.A., Anderson P.M., (1992). "Carbonic anhydrase in Escherichia coli, a product of the cyn operon", The journal of biological chemistry **267**: 3731-3734
- [15] Lindskog S., (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase", Pharmacology and Therapeutics **74**: 1-20
- [16] Rickli E.E., Ghazanfar S.A.S., Gibbons H., Edsall J.T., (1964). "Carbonic anhydrase from Human Erythrocytes", The journal of biological chemistry **239**: 1065-1078
- [17] Miscione G.P., Stenta M., Spinelli D., Anders E., Bottoni A., (2007). "New computational evidence for the catalytic mechanism of carbonic anhydrase", Theoretical Chemistry Accounts **118**: 193-201
- [18] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., "Biochemistry 5th edition." Edité par W.H. Freeman and Company. 2002. p. 0-1100. ISBN 0716746840
- [19] Lindskog S., Coleman J.E., (1973). "Catalytic Mechanism of Carbonic-Anhydrase", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **70**(9): 2505-2508
- [20] Wilbur K.M., Anderson N.G., (1948). "Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase", Journal of Biological Chemistry **176**(1): 147-154
- [21] Mirjafari P., Asghari K., Mahinpey N. (2007). "Investigating the Application of Enzyme Carbonic Anhydrase for CO<sub>2</sub> Sequestration Purposes", Industrial & Engineering Chemistry Research **46**: 921-926

- [22] Bond G.M., Stringer J., Brandvold D.K., Simsek F.A., Medina M.G., Egeland G., (2001). "Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase", Energy & Fuels **15**(2): 309-316
- [23] Ozdemir E., (2009). "Biomimetic CO<sub>2</sub> Sequestration: 1. Immobilization of Carbonic Anhydrase within Polyurethane Foam", Energy & Fuels **23**: 5725-5730
- [24] Larachi F., (2010). "Kinetic Model for the Reversible Hydration of Carbon Dioxide Catalyzed by Human Carbonic Anhydrase II", Industrial & Engineering Chemistry Research **49**: 9095-9104
- [25] Rowlett R. S., Silverman D. N., (1982). "Kinetics of the protonation of buffer and hydration of CO<sub>2</sub> catalyzed by human carbonic anhydrase II", Journal of the American Chemical Society **104**: 6737-6741
- [26] Domsic J.F., McKenna R., (2010). "Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases", Biochimica et biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1804**(2): 326-331
- [27] Supuran C.T., (2008). "Carbonic anhydrases – an overview", Current Pharmaceutical Design **7**: 603-614
- [28] Supuran C.T., (2008). "Carbonic anhydrase inhibitors: possible anticancer drugs with a novel mechanism of action", Drug Development Research **69**: 297-303
- [29] Whitford D., "Proteines: structure and function". Edité par John Wiley & Sons. 2005. p. 0-528. ISBN 2111100469470
- [30] Ghannam A.F., Tsen W., Rowlett R.S., (1986). "Activation parameters for the carbonic anhydrase II- catalyzed hydration of CO<sub>2</sub>", The journal of biological chemistry **261**(3): 1164-1169

- [31] Thorslund A., Lindskog S. (1967). "Studies of the esterase activity and the anion inhibition of bovine zinc and cobalt carbonic anhydrases", European Journal Biochemistry **3**: 117-123
- [32] Innocenti A., Scozzafava A., Parkkila S., Puccetti L., De Simone G., Supuran C.T. (2008). "Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates", Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**: 2267-2271
- [33] Kanbar B., (2008). "Enzymatic CO<sub>2</sub> sequestration by carbonic anhydrase" Th. Doct.: Biotechnology: Izmir: 55
- [34] Sheldon R.A., (2007). "Enzyme immobilization: the quest for optimum performance", Advanced Synthesis & Catalysis **349**: 1289-1307
- [35] Brinkman R., (1933). "The occurrence of carbonic anhydrase in lower marine animals", The journal of physiology **80**: 171-173
- [36] Philpot F.J., Philpot J.S.L., (1936). "CCCVI. A modified colorimetric estimation of carbonic anhydrase", 2191-2193
- [37] Karout A., Chopard C., Pierre A.C., (2007). "Immobilization of a lipoxygenase in silica gels for application in aqueous media" Journal of molecular catalysis B: Enzymatic **44**: 117-127
- [38] Maury S., Buisson P., Perrard P., Pierre A.C., (2005). "Compared esterification kinetics of the lipase from Burkholderia cepaciae either free or encapsulated in a silica aerogel", Journal of molecular catalysis B: Enzymatic **32**: 193-203
- [39] Karout A., Pierre A.C., (2007). "Silica xerogels and aerogels synthesized with ionic liquids", Journal of non-crystalline solids **353**: 2900-2902
- [40] Ge J., Cowan R.M., Tu C., McGregor M.L., Trachtenberg M.C., (2002). "Enzyme-based CO<sub>2</sub> capture for advanced life support", Life support and biosphere Science **8**: 181-189

## **CHAPITRE 3**

# CHAPITRE 3: ESSAIS PRELIMINAIRES ET CONSTRUCTION DE LA CELLULE A MEMBRANE LIQUIDE

## 3.1. Objectifs des études préliminaires

Le montage final sélectionné s'est inspiré du procédé de la Nasa <sup>1</sup>, élaboré afin de régénérer l'atmosphère de cabines spatiales en captant le CO<sub>2</sub> produit par la respiration humaine. L'unité centrale illustrée par un schéma a été décrite dans la bibliographie (voir Fig.1.4). Rappelons qu'elle comprend un bioréacteur sous forme de sandwich constitué d'une fine couche de liquide immobile, coincée entre deux membranes microporeuses en polypropylène. La fine couche de liquide est une solution aqueuse contenant l'anhydrase carbonique dans un tampon à base de phosphate. Cette membrane liquide est en contact par une de ses faces, que nous appellerons « face captage » avec l'atmosphère contenant le CO<sub>2</sub> à capter, par son autre face que nous appellerons « face relargage » avec le milieu gazeux contenant le CO<sub>2</sub> relargué. Cette simple membrane liquide offre l'avantage de pouvoir être potentiellement remplacée par une membrane céramique hydrophile poreuse contenant la solution enzymatique et l'objectif ultime de cette thèse était d'aborder l'étude de membranes de silice synthétisées par sol-gel, sur ou dans lesquelles l'enzyme serait immobilisée. Le caractère hydrophile de la membrane devrait permettre de la maintenir aisément humide, si les gaz de captage et / ou de relargage contiennent une pression de vapeur appropriée. Ultérieurement, il serait d'ailleurs possible d'alimenter les gaz par des nappes de fines fibre poreuses, séparées par de fines couches sol-gel humides, le tout noyé dans un léger excès d'eau pour éviter de sécher les membranes sol-gel.

Toutefois, la réalisation d'un tel montage a d'abord nécessité des études préliminaires sur des montages plus simples afin de choisir, par exemple, le type de tampon ou la méthode de mesure de vitesse de transfert du CO<sub>2</sub> à travers la membrane. Par exemple, il est possible de mesurer une vitesse de captage (ou de relargage) de CO<sub>2</sub>, en suivant l'évolution de la pression du gaz capté (ou relargué). Une telle méthode simplifiée a d'abord été appliquée au captage dans un système simple en ballon. Les résultats attendus étaient de déterminer la gamme de pression dans laquelle un capteur de pression pouvait ensuite être éventuellement

utilisé. Une première approche de détermination de l'influence de la masse d'enzyme et du tampon, en l'occurrence sa molarité, a également été menée avec un tampon à base de  $\text{NaHCO}_3$ .

Par ailleurs, un système en ballon permet à priori de suivre le débit de  $\text{CO}_2$  relargué en faisant barboter le gaz dans une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  à  $\text{pH} = 10$ . Le  $\text{CO}_2$  induit la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  solide, comme résumé au Chapitre 1, dont il est possible de mesurer la masse précipitée pour une durée donnée de relargage. Mais auparavant, il a été nécessaire d'approfondir la cinétique de précipitation du  $\text{CaCO}_3$  solide. Cette méthode de suivi a été ensuite appliquée à une étude préliminaire sur une adaptation du montage en ballon comprenant un film d'eau, dont l'épaisseur était de l'ordre de quelques mm. Les paragraphes qui suivent présentent ces essais préliminaires.

## **3.2. Etudes préliminaires du captage de $\text{CO}_2$ par suivi de pression au-dessus d'un ballon d'eau**

### **3.2.1. Montage expérimental**

Le montage (Fig.3.1) comprend un ballon de 250 mL contenant  $\approx 27$  mL d'une solution aqueuse avec ou sans enzyme, maintenue sous agitation magnétique à  $500 \text{ tours min}^{-1}$ , dans laquelle plonge un tube de diamètre interne de 2 cm. Ce tube est d'abord rempli de  $\text{CO}_2$  gazeux à la pression atmosphérique par circulation de ce gaz depuis une bouteille de  $\text{CO}_2$  commercial (Air Liquide, bouteille de 50 L sous une pression de 50 MPa) pendant 10 min. Puis cette circulation est arrêtée et le tube isolé. Le  $\text{CO}_2$  gazeux du tube se dissout dans l'eau où il diffuse, ce qui induit une diminution de sa pression dans le tube. La montée du niveau de l'eau fournit directement la différence de pression gazeuse entre le tube et la pression atmosphérique externe.

Pour éviter les fortes pressions différentielles qui induiraient des fuites difficiles à contrôler, le temps nécessaire à une élévation du niveau de l'eau de 1 cm a été mesuré successivement plusieurs fois (typiquement 6 fois), un balayage au  $\text{CO}_2$  entre deux mesures permettant de rétablir une pression  $P(\text{CO}_2) \approx 1 \text{ atm}$  dans le tube. Le temps moyen a ensuite

été directement converti en vitesse de captage du  $\text{CO}_2$  dans l'eau du ballon, mesurée en  $\text{mol s}^{-1} \text{ m}_{\text{membrane}}^{-2}$ , en utilisant pour simplifier la loi des gaz parfaits pour convertir le volume de  $\text{CO}_2$  capté en moles.

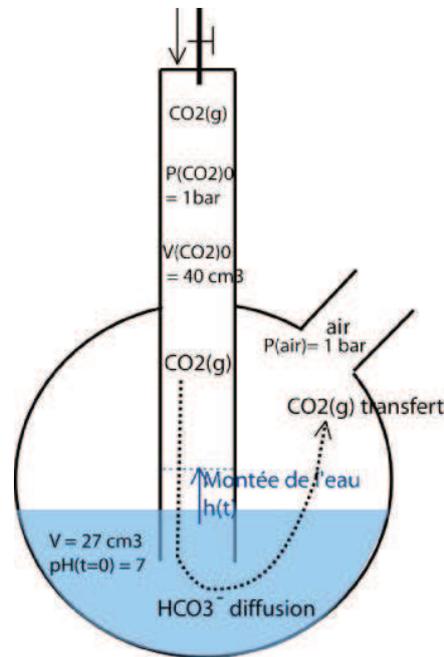


Figure.3.1: Montage préliminaire de mesure de vitesse de captage du  $\text{CO}_2$ , sous une pression initiale  $P(\text{CO}_2) = 1 \text{ atm}$

Les résultats ont montré que, sans enzyme dans l'eau déionisée contenant une solution  $\text{NaHCO}_3\text{-HCl}$  à 0.1 M et  $\text{pH} = 7$ , une montée du niveau d'eau de 1 cm qui correspond à une différence de pression d'environ 98 Pa, se faisait typiquement en environ 756 sec. Cet ordre de grandeur des pressions différentielles nous a conduit à choisir un capteur de pression différentielle adéquate pour le montage final. Il s'agit d'un capteur de pression différentielle de chez Testo (référence 0638 1547) mesurant des pressions différentielles dans une gamme de  $\pm 100 \text{ hPa}$  avec une précision de  $\pm 0.1 \text{ hPa}$ .

### 3.2.2. Résultats: Influence de la masse d'enzyme et de la concentration en tampon pH $\approx 7$ à base de $\text{NaHCO}_3$ (0.1M)

Le système simplifié précédent a permis de mesurer dans une 1<sup>ère</sup> approche, la vitesse de captage du  $\text{CO}_2$ , sous une pression initiale  $P(\text{CO}_2) = 1 \text{ atm}$ , à pH initial  $\approx 7$ , en fonction de la concentration en enzyme dans la solution. Le pH initial était obtenu par ajout de 5 mL de solution  $\text{NaHCO}_3\text{-HCl}$  à 0.1 M et pH = 7 à 22 mL d'eau déionisée. La Fig.3.2 montre la vitesse de captage de ce  $\text{CO}_2$ , en fonction de la masse d'enzyme dissoute dans le milieu aqueux. Il apparaît clairement que cette vitesse de captage augmente avec la masse d'enzyme dissoute, mais que la pente de cette augmentation est relativement modeste, sous une pression de captage  $P(\text{CO}_2) \approx 1 \text{ atm}$ .

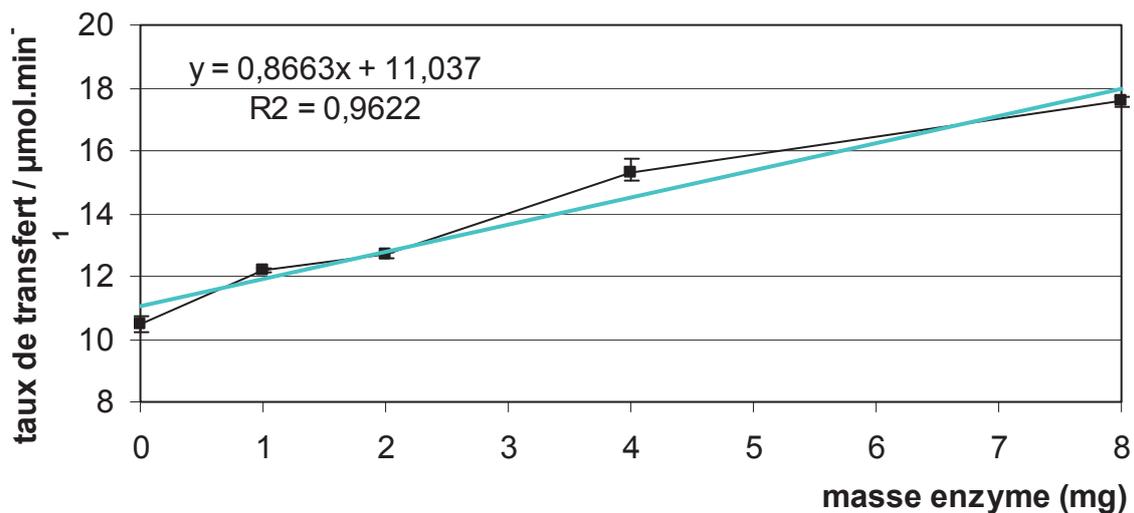


Figure.3.2: Vitesse de captage du  $\text{CO}_2$  sous une pression initiale  $P(\text{CO}_2) = 1 \text{ atm}$ , en fonction de la masse d'enzyme dissoute dans la solution aqueuse, pH initial  $\approx 7$

Dans une autre série de mesures, le volume de solution  $\text{NaHCO}_3\text{-HCl}$  à 0.1 M et pH initial = 7 mis dans le ballon, a été varié de 0 à 20 mL, en le complétant à 27 mL par de l'eau déionisée. Les résultats obtenus en ce qui concerne la vitesse de captage du  $\text{CO}_2$ , avec 4 mg d'enzyme ou sans enzyme, sont présentés à la Fig.3.3.

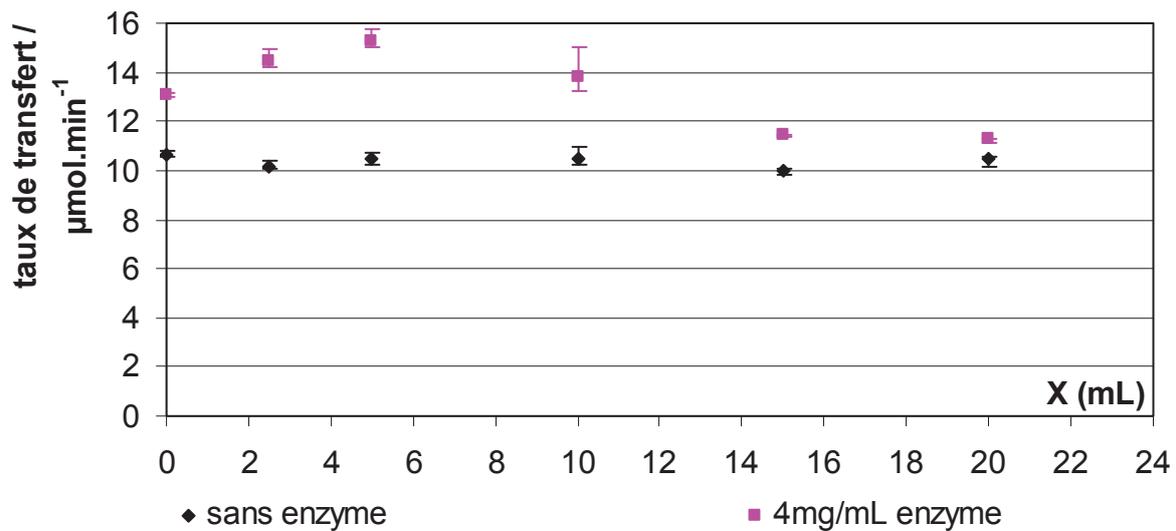


Figure.3.3: Vitesse de captage du CO<sub>2</sub> sous une pression initiale P(CO<sub>2</sub>) = 1 atm, en fonction du volume de tampon, dans un mélange de solution NaHCO<sub>3</sub>-HCl 0.1 M pH = 7, contenant 4 mg d'enzyme, ou sans enzyme

Ces résultats montrent que le tampon améliore modérément le captage à faible proportion, en présence d'enzyme, mais inhibe cette enzyme à forte concentration.

### 3.3. Etudes préliminaires du captage de CO<sub>2</sub> par précipitation de CaCO<sub>3</sub>

#### 3.3.1. Montage expérimental

Un système de captage en ballon permet de suivre le débit de CO<sub>2</sub> relargué en faisant barboter le gaz dans une solution aqueuse de CaCl<sub>2</sub> à pH = 10. Le CO<sub>2</sub> induit la précipitation de CaCO<sub>3</sub> solide dont il est possible de mesurer la masse précipitée pour une durée donnée de relargage. Mais il a été indiqué au Chapitre 1 que la précipitation de CaCO<sub>3</sub> diminue le pH de

la solution où le précipité est effectué, de sorte que la précipitation finit par s'arrêter, voire le précipité se re-dissoudre, lorsque le pH devient trop faible.

Afin de pouvoir utiliser la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée pour comparer les quantités de  $\text{CO}_2$  transférées à travers la membrane liquide, la cinétique de précipitation de ce solide a été d'abord étudiée. Plusieurs chercheurs ont abordé ce sujet. Ainsi, Bond et ses collaborateurs<sup>2,3</sup> ont mesuré le temps de début de précipitation de  $\text{CaCO}_3$  dans des saumures industrielles contenant des cations  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi que la vitesse de décroissance du pH<sup>4</sup>. Mirjafari et ses collègues ont mesuré la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée à partir d'une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans un tampon, lors de l'ajout d'une solution saturée en  $\text{CO}_2$ <sup>5</sup>. Ils ont aussi suivi l'évolution de la turbidité en fonction du temps. Dans la présente étude, la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  a été examinée à  $5^\circ\text{C}$  et  $20^\circ\text{C}$ , dans une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  avec ou sans anhydrase carbonique, pour des concentrations initiales en  $[\text{CO}_2(\text{aq})]$  et des capacités et forces ioniques de tampons différentes.

Afin que la précipitation soit plus rapide, une quantité totale d'enzyme de 4 mg (5.2 U; concentration de  $\approx 0.15 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a été ajoutée pour la plupart des mesures effectuées ici. Cependant, dans une série de tests, l'influence de la quantité d'enzyme dans une gamme allant de 0 à 10.4 U (8mg; concentration de  $\approx 0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ), a aussi été étudiée.

Le  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99.5 %) utilisé provenait de chez Aldrich. Les tampons étaient en Tris-HCl (pH 10.5 ; 9.4 ou 8.4) préparés par mélange de 12.5 mL de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris: Sigma Aldrich 1.4 M) avec des volumes croissants en HCl (Prolabo 1.4 M), le tout complété à 25 mL avec de l'eau déionisée. La capacité  $\beta$  du tampon et sa force ionique  $I$ , dans chaque solution tampon initiale ainsi que dans le milieu réactionnel après 1 min de réaction, sont rassemblées dans le Tableau.3.1. Le calcul de la force ionique  $I_1$  après une minute de transfert du  $\text{CO}_2(\text{g})$  est difficile à calculer en raison de la grande diversité des ions présents ( $\text{RNH}_3^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ). De plus, il n'est pas possible de distinguer les ions  $\text{Cl}^-$  venant du tampon Tris-HCl et ceux de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

La capacité  $\beta$  du tampon est ici définie par l'équation (Eq.3.1):

$$\beta = \frac{dn(\text{RNH}_3^+)}{d(\text{pH})} \quad (\text{Eq.3.1})$$

où  $dn(\text{RNH}_3^+)$  est le nombre incrémental de moles de Tris transformé pour un incrément  $d(\text{pH})$

Comme le montre ce tableau, la force ionique  $I$  et la capacité  $\beta$  des solutions croissent lorsque le pH décroît de 10.5 à 8.4, le tampon étant de plus en plus proche de son  $\text{pK}_a$ .

Tableau.3.1: pH, force ionique et capacité  $\beta$  du tampon, dans les solutions de tampon initiales et après 1 min de réaction à 20°C

	Solutions tampon			Milieu réactionnel après 1 min	
	$\text{pH}_s$	$I_s$	$\beta_s$	$\text{pH}_1$	$\beta_1$
Sans enzyme	10.5	$5.55 \cdot 10^{-3}$	0.014	8.32	0.225
Avec enzyme				8.02	0.326
Sans enzyme	9.4	$6.68 \cdot 10^{-2}$	0.154	7.66	0.438
Avec enzyme				7.19	0.532
Sans enzyme	8.4	$4.67 \cdot 10^{-1}$	1.076	6.99	0.554
Avec enzyme				6.92	0.560

Dans un 1<sup>er</sup> temps, un volume  $X$  (de 1 à 20 mL) d'eau qualité HPLC, produite avec un système de purification d'eau « ELGA PURELAB UHQ », était placée dans un ballon bicol sphérique de 100 mL. Cette eau était ensuite saturée en  $\text{CO}_2(\text{g})$  par bullage au moyen d'une aiguille trempant dans l'eau et alimentée en  $\text{CO}_2(\text{g})$  sous une pression d'environ 0.1 MPa, pendant 60 min. Durant cette opération, la solution était maintenue sous agitation constante à 800 tours  $\text{min}^{-1}$  avec un agitateur magnétique et le ballon était maintenu ouvert à l'air. Après arrêt du bullage, les 2 sorties du ballon étaient ensuite hermétiquement fermées à l'aide d'un septum en caoutchouc. L'atmosphère initiale au-dessus de l'eau du ballon était donc essentiellement du  $\text{CO}_2(\text{g})$  à la pression initiale  $P(\text{CO}_2(\text{g}))_0 \approx 0.1 \text{ MPa}$ . La concentration en  $\text{CO}_2(\text{aq})$  dans le volume  $X$  d'eau après bullage a été déterminée par titration avec de la soude  $\text{NaOH} \text{ } 0.1 \text{ M}$ , en utilisant du phénolphthaléine comme indicateur coloré de point terminal. Une petite quantité ( $\approx 1 \text{ mg}$ ) d'anhydrase carbonique avait aussi été ajoutée dans le but d'observer

une transition colorée plus nette, comme recommandé par Underwood <sup>6</sup>. Ces titrations ont donné une concentration  $[\text{CO}_2(\text{aq})]$  légèrement inférieure à la valeur à saturation déduite des lois expérimentales de Henry publiées par Carroll et ses collègues <sup>7</sup> et par Crovetto <sup>8</sup> ( $[\text{CO}_2(\text{aq})]_{\text{sat}} \approx 39.83 \text{ mmol L}^{-1}$  sous une pression de  $\text{CO}_2(\text{g}) = 0.1 \text{ MPa}$ ). Mais les résultats présents ont été affectés par la durée de l'opération de titration ( $\approx 10 \text{ min}$ ), durant laquelle une désorption progressive du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ , s'est produite. En conséquence, une concentration initiale de  $[\text{CO}_2(\text{aq})] = 39.83 \text{ mmol L}^{-1}$ , en accord avec les lois expérimentales de Henry sous une pression  $P(\text{CO}_2) = 0.1 \text{ MPa}$  <sup>7,8</sup>, a été retenue.

Dans un 2<sup>ème</sup> temps, un volume T (de 1 à 10 mL) de tampon Tris-HCl, de pH initial 8.4 ; 9.4 ou 10.5, a été ajouté au ballon au moyen d'une seringue au travers du septum en caoutchouc, afin de maintenir la pression de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à 0.1 MPa. Deux tests ont toujours été réalisés en parallèle, l'un avec une quantité totale en enzyme  $m_{\text{enz}} \approx 4 \text{ mg}$  (5.2 U) dissoute dans le tampon, l'autre sans enzyme. Dans certaines expériences, le ballon était au préalable refroidi à  $\approx 5^\circ\text{C}$  dans un ban d'eau glacée.

Immédiatement après, dans un 3<sup>ème</sup> temps, un volume Y d'eau HPLC dans lequel 0.3 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.054 mmol) était préalablement dissous, a également été introduit dans le ballon via le septum. La vitesse d'agitation a alors été augmentée à 1200 tours  $\text{min}^{-1}$  et maintenue pendant un temps t allant de 1 à 15 min au bout duquel le contenu du ballon a été filtré, le solide obtenu séché et sa masse déterminée. Le pH du liquide supernatant a également été mesuré avec une électrode saturée en Ag / AgCl, couplée à un pH-mètre (Analytical PHC 3001-9).

Dans tous les tests, le volume aqueux total (X+T+Y) était d'environ 27 mL. La concentration initiale de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  était de 76 mM et la contribution initiale du  $\text{CaCl}_2$  à la force ionique du milieu était de 0.082. De plus, un volume d'environ 73 mL de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à la pression initiale  $\approx 0.1 \text{ MPa}$  correspond à 3.12 mmol  $\text{CO}_2(\text{g})$  introduit durant l'étape initiale de bullage, était toujours présent au-dessus du liquide.

### 3.3.2. Résultats sur la cinétique de précipitation du $\text{CaCO}_3$

#### a. Influence des caractéristiques du tampon

Une 1<sup>ère</sup> série d'expériences a été menée à  $\approx 20^\circ\text{C}$  et la masse de carbonate solide  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipitée, déterminée en fonction des caractéristiques du tampon. Le Tableau.3.1 précédent montre que la capacité du tampon atteinte après 1 min, dans le milieu où était réalisée la précipitation, croissait avec le pH initial du tampon utilisé. Ce résultat est dû aux ions  $\text{H}^+$  formés lors de la saturation de l'eau en  $\text{CO}_2(\text{g})$  qui décroissent le pH, (équilibre à  $\text{pH} \approx 5.7$ , avant addition du tampon et de  $\text{CaCl}_2$ ). Après 1 min de réaction, le pH du milieu aqueux était donc plus proche du  $\text{pK}_a$  du tampon, pour un tampon à pH initial 10.5 que pour un tampon à pH initial 8.4. La force ionique initiale de ce milieu aqueux était essentiellement due au  $\text{CaCl}_2$  dissous et pratiquement constant ( $I \approx 0.082$ ) dans toutes les expériences.

La cinétique de formation de  $\text{CaCO}_3$  en fonction du temps a été suivie pour l'addition de  $T = 5 \text{ mL}$  de tampon, dans  $X = 20 \text{ mL}$  d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ . Dans ce but, une série de 4 tests similaires ont été menés et le précipité filtré après respectivement 1 ; 5 ; 10 et 15 min de réaction. La répétition d'un nombre limité de tests a montré que la masse solide était connue avec une incertitude de  $\approx 5 \%$  après 1 min,  $\approx 2 \%$  après 5 min et  $\approx 1 \%$  pour des temps plus longs. Le pH du liquide supernatant a également été mesuré. Les résultats sont présentés Fig.3.4 en ce qui concerne la masse de  $\text{CaCO}_3$  et Fig.3.5 en ce qui concerne le pH.

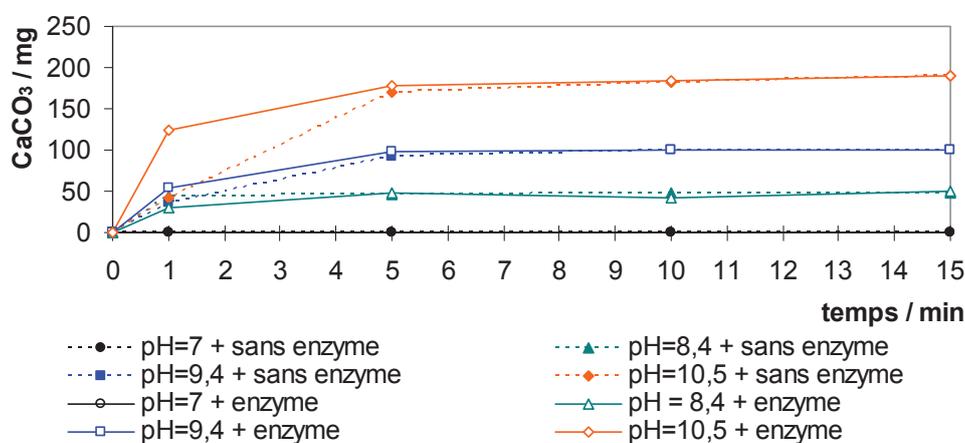


Figure.3.4: Cinétique de formation du  $\text{CaCO}_3$  dans un volume  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , après ajout d'un volume de tampon  $T = 5$  mL et d'un volume de solution de  $\text{CaCl}_2$   $Y = 2$  mL, pour des tampons de  $\text{pH} = 7 ; 8.4 ; 9.4$  et  $10.5$  à  $20^\circ\text{C}$

Selon la Fig.3.4, la masse de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipitée a augmenté rapidement durant la 1<sup>ère</sup> min, pour se stabiliser au delà de 5 min où le  $\text{pH}$  a atteint une valeur  $< 8$ . Comme le montre la Fig.3.6, la masse finale de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipité ne dépend que du  $\text{pH}$  du tampon initial. Il ne se forme plus aucun précipité quand le  $\text{pH}$  tombe à 7, où les ions  $\text{HCO}_3^-$  prédominent largement par rapport aux ions  $\text{CO}_3^{2-}$ , comme indiqué dans la bibliographie (Chapitre 1).

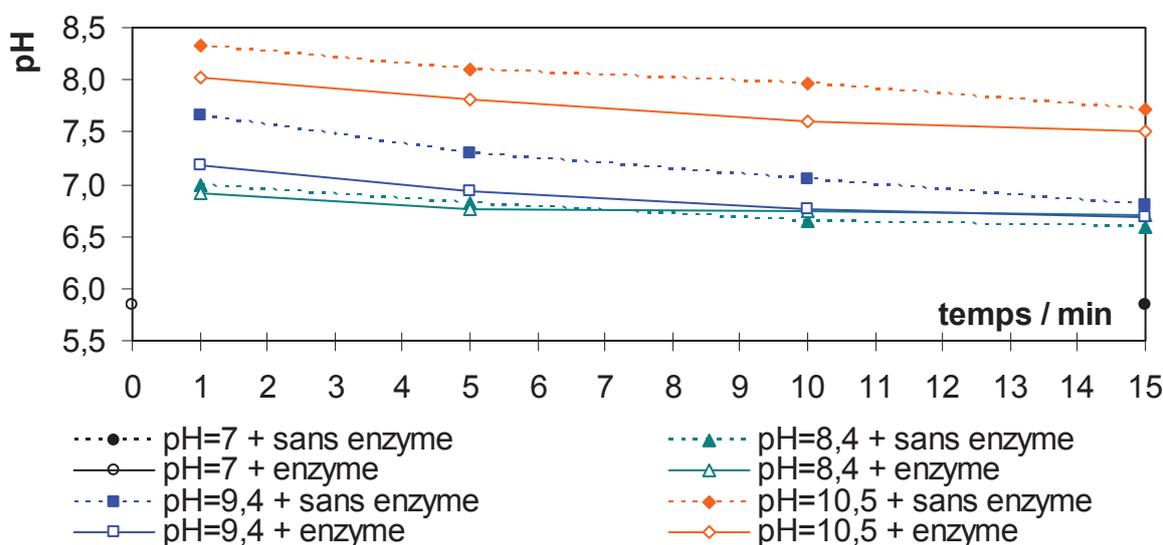


Figure.3.5: Evolution du  $\text{pH}$  en fonction du temps dans le liquide surnatant au précipité pour un volume  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , après ajout d'un volume de tampon  $T = 5$  mL et d'un volume de solution de  $\text{CaCl}_2$   $Y = 2$  mL, pour des tampons de  $\text{pH} = 7 ; 8.4 ; 9.4$  et  $10.5$  à  $20^\circ\text{C}$

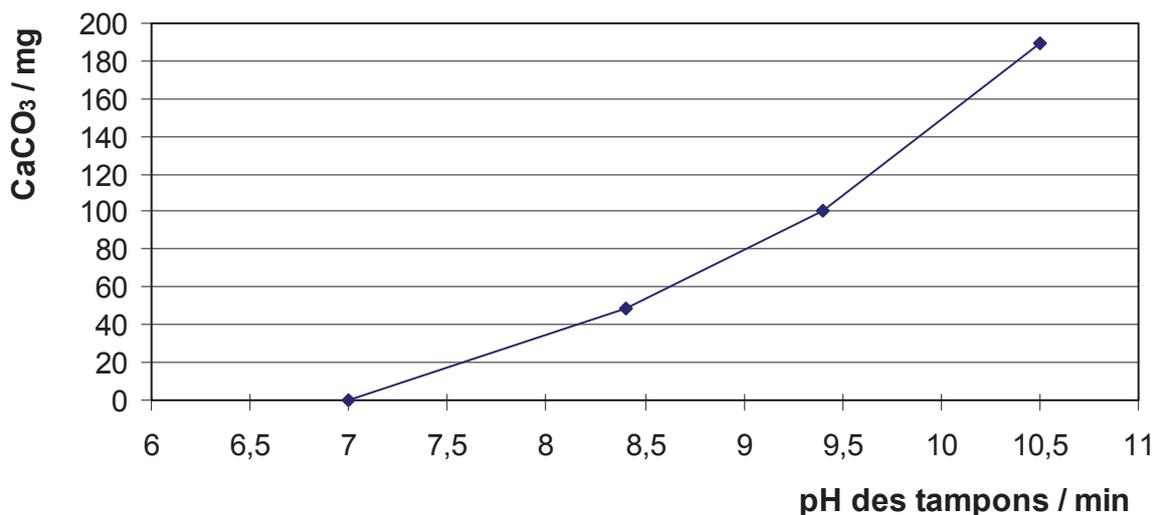


Figure.3.6: Masse de CaCO<sub>3</sub>(s) précipitée après 15 min par addition de 5 mL de tampon (volume de la solution de CaCl<sub>2</sub> Y = 2 mL), en fonction du pH initial du tampon à 20°C

**b. Influence de la proportion d'eau saturée en CO<sub>2</sub> et de la proportion de tampon, pour un tampon 1.4 M à pH = 10.5**

Dans une 2<sup>ème</sup> série d'expériences, la vitesse initiale de formation du CaCO<sub>3</sub>(s) a été mesurée pour plusieurs valeurs de X (1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 mL) et T (1 ; 5 et 10 mL), tout en conservant un volume total X+T+Y = 27 mL, dans un tampon à pH = 10.5 et à ≈ 20°C ou ≈ 5°C. Il s'agit ici d'une vitesse de formation initiale déterminée durant la 1<sup>ère</sup> min de précipitation du CaCO<sub>3</sub>(s). Les résultats sont regroupés Fig.3.7 et 3.8, respectivement à 20°C et à 5°C.

Ces graphiques montrent que du CaCO<sub>3</sub>(s) solide a précipité avec ou sans enzyme, mais qu'un volume de tampon T ≥ 5 mL était nécessaire pour observer une différence entre les vitesses initiales avec ou sans enzyme, respectivement V<sub>0E</sub> et V<sub>0</sub>. Ceci peut s'expliquer en considérant qu'un volume de tampon T plus élevé permet de maintenir le pH à une valeur plus élevée, bien que décroissante en fonction du temps, ce qui favorise la présence d'ions carbonates CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> et donc accroît la possibilité de précipiter du CaCO<sub>3</sub>.

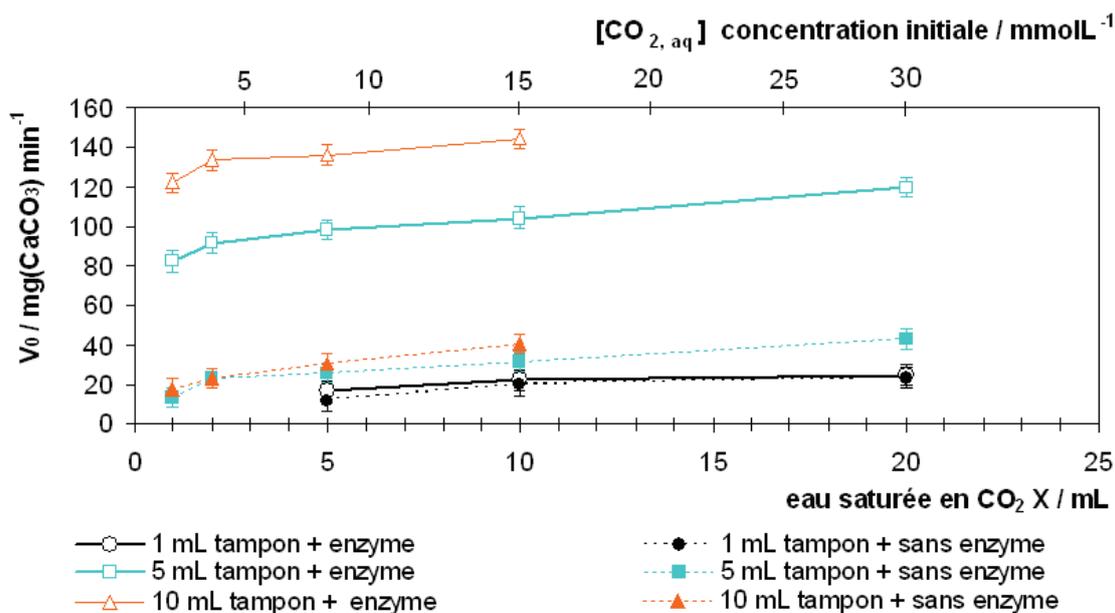


Figure.3.7: Vitesses initiales de formation de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  sans enzyme  $V_0$  ou avec enzyme  $V_{0E}$  en fonction du volume  $X$  d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , après ajout d'un volume  $T = 1 ; 5$  et  $10$  mL de solution tampon à  $\text{pH} = 10.5$ , pour volume total de solution aqueuse de  $27$  mL dans lequel est dissous  $0.3$  g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , à  $20^\circ\text{C}$

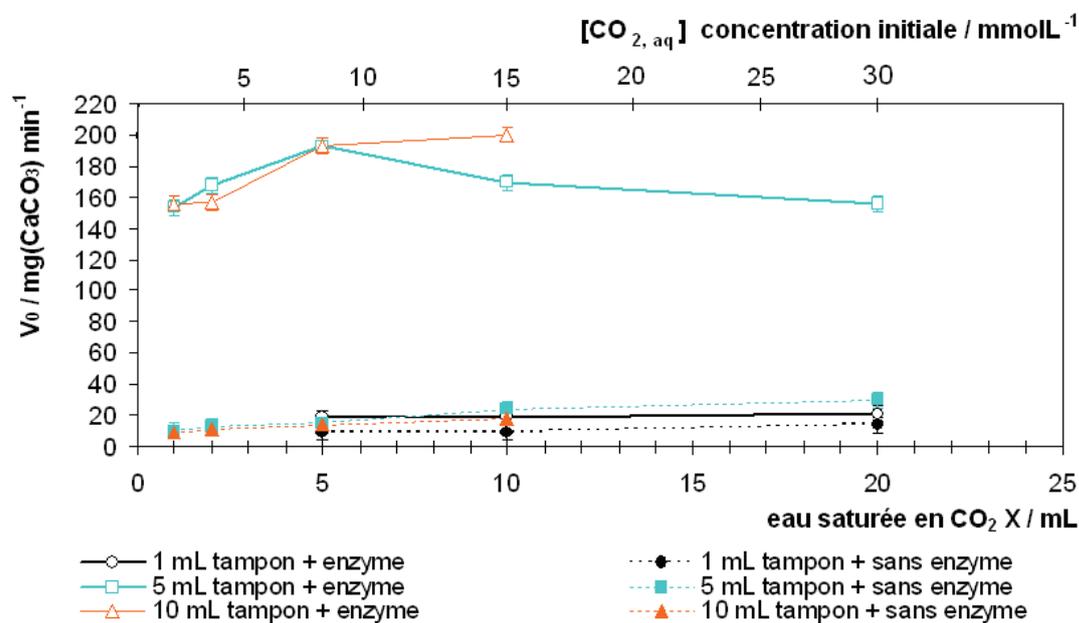


Figure.3.8: Vitesses initiales de formation de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  sans enzyme  $V_0$  ou avec enzyme  $V_{0E}$  en fonction du volume  $X$  d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , après ajout d'un volume  $T = 5$  mL de solution tampon de  $\text{pH} 10.5$ , pour volume total de solution aqueuse de  $27$  mL dans lequel est dissous  $0.3$  g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , à  $5^\circ\text{C}$

Par comparaison avec les résultats sur la vitesse initiale de précipitation, la masse de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipitée au bout d'1 h de précipitation était similaire pour des volumes de tampon  $T = 5 \text{ mL}$  et  $10 \text{ mL}$ , à  $5^\circ\text{C}$  comme à  $20^\circ\text{C}$  (Fig.3.8). Dans le cas présent, cette masse finale était également similaire à celle à laquelle on pouvait s'attendre pour une conversion totale du  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dissous en  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  (204 mg). Une telle masse constante de précipité est cohérente avec la présence d'un excès disponible de  $\text{CO}_2$  dans le volume X d'eau saturée utilisée, cet excès de  $\text{CO}_2$  comprenant l'atmosphère gazeuse disponible au dessus du milieu aqueux du ballon de précipitation.

### **c. Conclusion sur l'utilisation de la masse de $\text{CaCO}_3$ précipité pour caractériser le transfert de $\text{CO}_2$**

Globalement, les résultats précédents montrent qu'il n'est pas possible d'utiliser la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée pour déterminer un vitesse de transfert de  $\text{CO}_2$ , puisque la précipitation finit par ralentir puis s'arrêter, bien que le  $\text{CO}_2$  continue à être transféré à une vitesse constante. Néanmoins, cette masse peut être utilisée comme indice de comparaison, dans la mesure où le pH correspondant à une masse finale constante de  $\text{CaCO}_3$  n'a pas été atteint, et où cette masse de  $\text{CaCO}_3$  est mesurable.

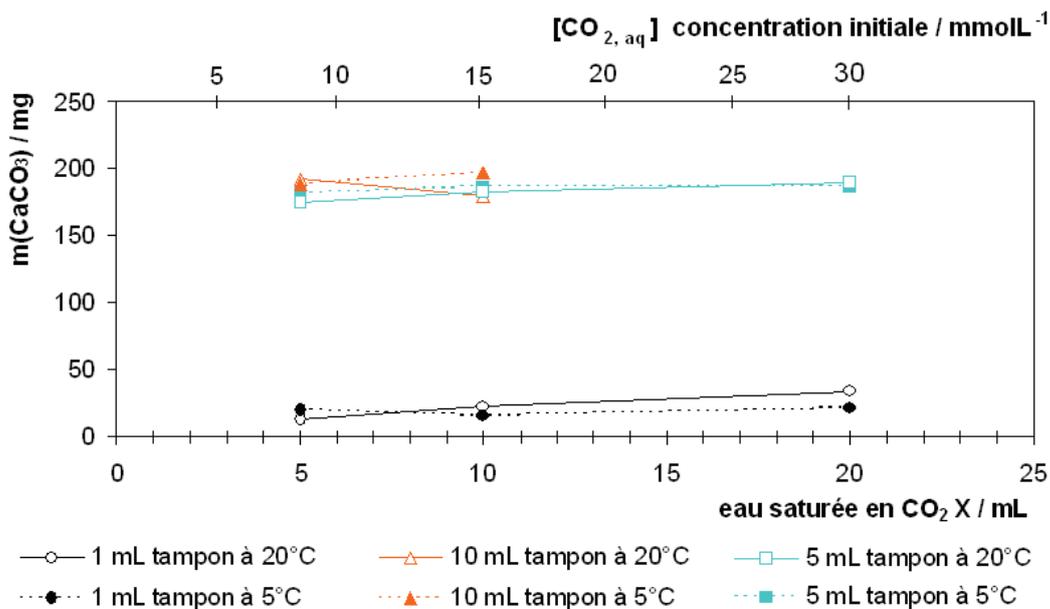


Figure.3.9: Masse de CaCO<sub>3</sub>(s) formée après 1 h, sans enzyme, en fonction du volume X d'eau saturée en CO<sub>2</sub>(g) et du volume de tampon T à pH = 10.5, à 20°C et à 5°C

A la suite de cette étude, pour tous les systèmes membranaires étudiés dans cette thèse, la masse de CaCO<sub>3</sub> précipité a été utilisée comme indice de captage du CO<sub>2</sub> pour un volume constitué par mélange de X = 15 mL d'eau déionisée, T = 30 mL de tampon, (Tris, 1.4 M et pH = 10.5) et Y = 3 g de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O et sans enzyme.

### 3.4. Etudes préliminaires de captage du CO<sub>2</sub> par un film aqueux simplifié

Les études préliminaires se sont poursuivies sur un montage simplifié comprenant un film d'eau dont l'épaisseur, variable, était de quelques mm et la concentration en enzyme variable. Dans ce cas, la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée a été utilisée comme un indice de transfert du CO<sub>2</sub> à travers le film liquide

### 3.4.1. Montage

Le tube vertical de 2 cm de diamètre interne qui plongeait dans l'eau du ballon de la Fig.3.1, est maintenant positionné au-dessus du niveau d'eau de ce ballon (Fig.3.10). Ce tube comprend 2 parties séparées dans une position intermédiaire par un fritté de numéro « 0 ». Une membrane polymérique circulaire de diamètre 100 mm est elle-même coincée au-dessus du fritté, entre les 2 parties du tube vertical. Dans ces études préliminaires, une membrane en cellulose régénérée « RC Spectra-Por MWCO 3.5 », dont la taille des pores correspond à des molécules de masse 3500 u.m.a a été utilisée. Le film d'eau avec ou sans enzyme est placé au-dessus de cette membrane.

Le liquide contenu dans le ballon est une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (6 g) dans 30 mL de tampon Tris à 1.4 M et à  $\text{pH} = 10.5$  maintenue sous agitation magnétique à 500 tours  $\text{min}^{-1}$ . Ce montage permet d'effectuer une mesure comparative du  $\text{CO}_2$  transféré à travers la membrane liquide, par la masse de  $\text{CaCO}_3$  solide précipité pendant une durée prédéterminée. Il s'agit d'une mesure qualitative car, comme montré dans la section précédente, cette masse de solide ne représente pas le flux de  $\text{CO}_2$  relargué en régime permanent, puisque le pH du ballon diminue constamment et la précipitation de  $\text{CaCO}_3$  finit par s'arrêter lorsque ce pH est trop bas. La durée à laquelle la masse de  $\text{CaCO}_3$  est déterminée, doit être telle qu'un tel pH ne soit pas encore atteint. Une durée de 2 h 15 a ici été sélectionnée. Il n'est en effet plus possible d'effectuer des mesures de pression avec ce montage.

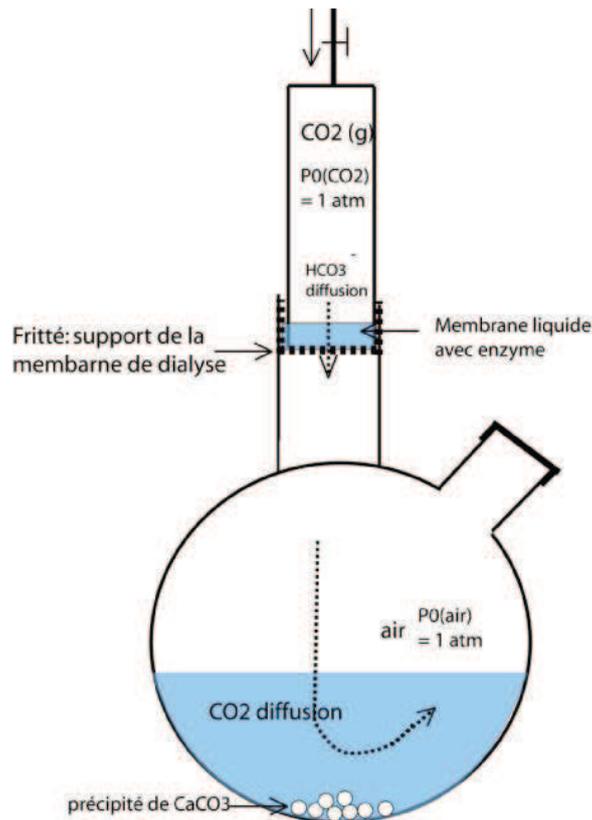


Figure.3.10: Montage préliminaire de mesure de mesure de captage du CO<sub>2</sub>, sous une pression initiale  $P(\text{CO}_2) = 1 \text{ atm}$ , à travers un film liquide

### 3.4.2. Résultats

#### a. Influence de la masse d'enzyme et de la concentration en tampon pH $\approx 7$ à base de NaHCO<sub>3</sub>

La solution aqueuse versée au-dessus de la membrane polymérique, dans le tube vertical, était constituée à partir d'un mélange de 2 mL d'eau déionisée, 2 mL de solution NaHCO<sub>3</sub>-HCl (pH = 7 et 0.1 M), et de quantités croissantes d'enzyme (0 ; 2 ; 4 ; 6 et 8 mg). Le volume de cette solution versée au dessus de la membrane polymérique était de 3 mL, ce qui correspond à une épaisseur de film liquide d'environ 9.6 mm. Un balayage de CO<sub>2</sub> sous une pression de 1 atm a été maintenu au-dessus du film liquide pendant 20min. Une fois la circulation de CO<sub>2</sub> arrêtée, on a alors noté le temps mis pour que le début de précipitation de CaCO<sub>3</sub> puisse être observé dans le ballon. Il s'agit du temps pour observer visuellement

l'apparition d'une fine suspension blanche. Au bout de 2 h 15, le pH de l'eau du ballon a également été mesuré, puis le contenu du ballon filtré, séché et la masse de  $\text{CaCO}_3$  formée déterminée, ainsi que le pH final du ballon. Cette dernière mesure est entachée d'une incertitude difficilement estimable, du  $\text{CaCO}_3$  pouvant rester sur les parois du ballon et le séchage du filtre pouvant être imparfait.

La Fig.3.11 montre que le temps d'apparition du précipité a décreu lorsque la concentration en enzyme du film liquide croissait, ce qui indiquerait que la vitesse de relargage du  $\text{CO}_2$  a augmenté avec la concentration en enzyme dans le film liquide. Par contre, la masse de précipité déterminée après 2 h 15 passe par un maximum, alors que le pH passe par un minium pour une concentration de  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme dans le film liquide.

Ces deux extrema sont cohérents entre eux. En effet, le pH baisse lorsque du carbonate se forme puisque le processus de précipitation comprend 2 étapes produisant des ions  $\text{H}^+$ : la 1<sup>ère</sup> déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ , (Eq.1.5 – Chapitre 1) qui produit des ions bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  peut être catalysée par l'enzyme et la 2<sup>ème</sup> déprotonation (Eq.1.6 – Chapitre 1) qui produit des ions carbonates  $\text{CO}_3^{2-}$  et n'est pas catalysée par l'enzyme. Ainsi il est normal qu'un pH final plus bas corresponde à une masse plus grande de précipité. Les extrema des Fig.3.11b et c suggéreraient donc l'existence d'une concentration optimale d'enzyme dans le film liquide, correspondant à une vitesse de transfert maximale (captage + relargage) de  $\text{CO}_2$ .

Pourtant, la Fig.3.11a montre que le temps de première apparition du précipité dans le ballon continue à décroître lorsque la concentration en enzyme croît. Toutefois, ces résultats ne sont pas réellement contradictoires. En effet, d'une part le premier précipité formé, observé visuellement, ne correspond pas forcément à la phase thermodynamique stable de  $\text{CaCO}_3$ , mais à une forme métastable, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1 à la section 1.2. Cette forme métastable peut se re-dissoudre ensuite pour reprécipiter sous une forme plus stable (Vatérite puis Calcite), mais plus lente à former. Par ailleurs, la formation de carbonate solide est un phénomène complexe (voir Chapitre 1, section 1.2). Si le pH baisse trop vite lors de la formation des anions  $\text{HCO}_3^-$ , il peut atteindre rapidement une valeur où non seulement  $\text{CaCO}_3$  ne précipite plus, mais où celui initialement formé peut se redissoudre. Au mieux, il ne se forme plus de nouveau carbonate solide, de sorte que la masse de celui-ci finit par se stabiliser. Comme nous l'avons vu section 3.2, cette masse précipitée ne peut être utilisée que comme indice de comparaison dans une série de tests similaires, non comme mesure de la vitesse de transfert de  $\text{CO}_2$ .

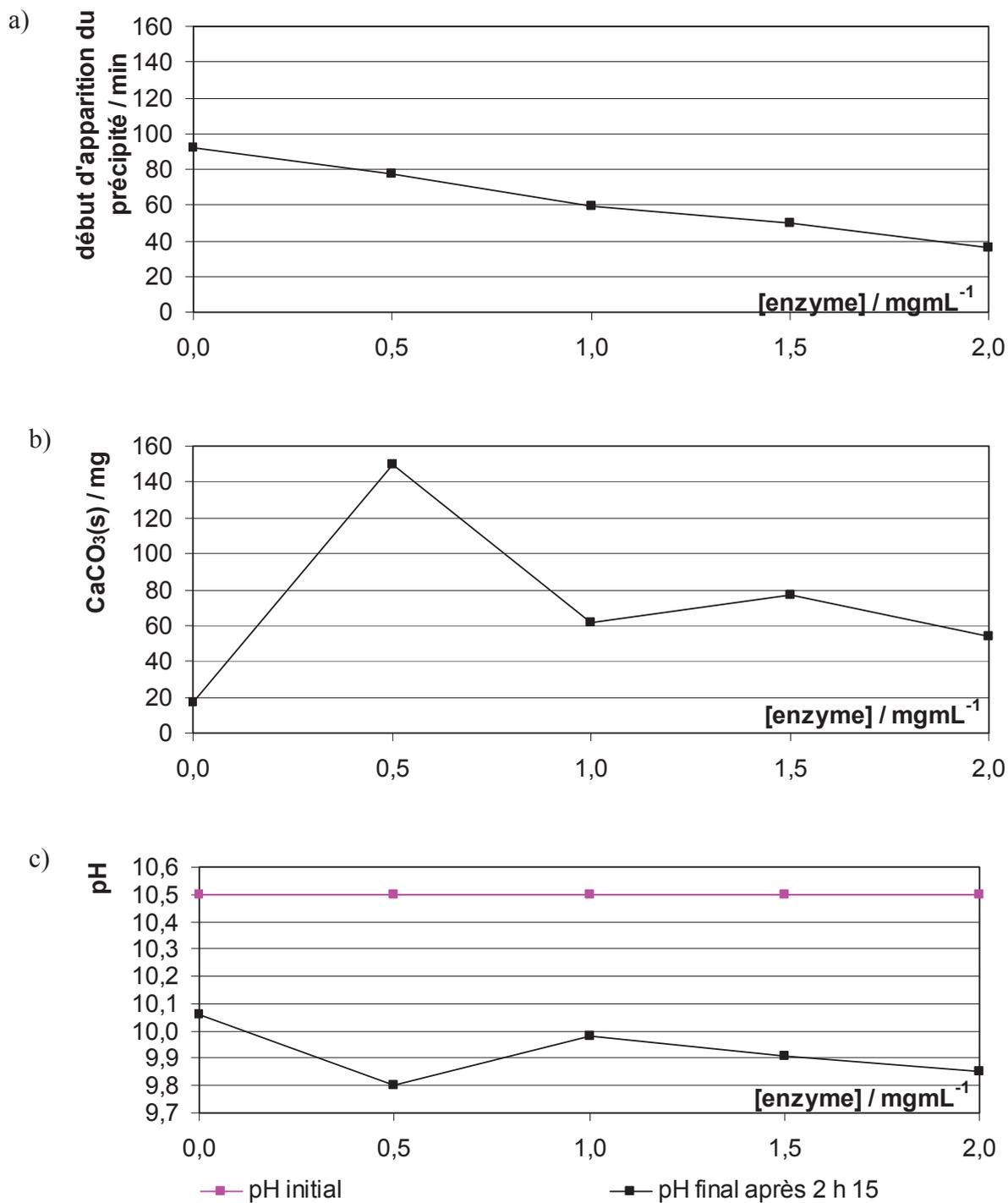


Figure.3.11: Evolution en fonction de la concentration d'enzyme dans le film liquide: (a) du temps d'apparition du précipité dans le ballon ; (b) de la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée après 2 h 15 ; (c) du pH initial et du pH après 2 h 15 de précipitation dans le ballon

### **b. Influence de l'épaisseur du film liquide**

Le montage de la Fig.3.10 a permis également de tester l'influence de l'épaisseur du film liquide concernant l'enzyme, sur la vitesse de transfert du  $\text{CO}_2$ . La masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée dans le ballon après 2 h 15 a servi dans ce cas d'indice comparatif. Comme précédemment, le liquide était placé au-dessus de la membrane polymérique. Ce liquide était constitué de 1.5 ; 3 ou 6 mL d'une solution à base de 3 mL d'eau déionisée et 3 mL de solution  $\text{NaHCO}_3$ -HCl (0.1 M ; pH = 7), correspondant à des épaisseurs calculées de film liquide de 4.78 ; 9.55 et 19 mm. Pour chaque test, une même masse de 2 mg d'enzyme était dissoute dans le film liquide. Les résultats sur le temps de début d'observation visuelle de précipitation, puis de masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée et de pH dans le liquide du précipité après 2 h 15 sont présentés Fig.3.12.

La Fig.3.12a montre que le temps de 1<sup>ère</sup> apparition du précipité a diminué lorsque l'épaisseur du film liquide diminuait. Ce résultat était attendu, puisque la distance de diffusion des espèces de  $\text{CO}_2$  dissoutes diminue avec l'épaisseur du film liquide. La vitesse de transfert de  $\text{CO}_2$  doit donc être plus rapide lorsque l'épaisseur du film diminue. Mais ce temps de 1<sup>ère</sup> apparition du précipité augmente relativement lentement avec l'épaisseur du film aqueux. Il semble donc qu'une épaisseur, même de 4.78 mm, offre une distance de diffusion des espèces trop importante pour un captage enzymatique efficace. Ceci suggère l'utilisation d'un système membranaire encore plus fin, par exemple une épaisseur de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{m}$ .

Par ailleurs, les Fig.3.12b et c montrent des réponses à la fois cohérentes entre elles mais plus complexes à interpréter, en ce qui concerne la masse de  $\text{CaCO}_3$  et le pH après 2 h 15 de transfert. Le résultat montrant que la masse de carbonate précipitée est moins élevée pour 1.5 mL de film aqueux (4.78 mm d'épaisseur équivalente) que pour 3 mL (9.55 mm) semble en contradiction avec le temps de 1<sup>ère</sup> apparition de ce précipité. Comme précédemment, la complexité de la cinétique de formation de carbonate solide en fonction du pH pourrait expliquer ce résultat. Par contre l'évolution de 3 à 6 mL du film aqueux (9.55 mm à 19 mm d'épaisseur équivalente) donne des résultats cohérents sur les 3 types de mesures.

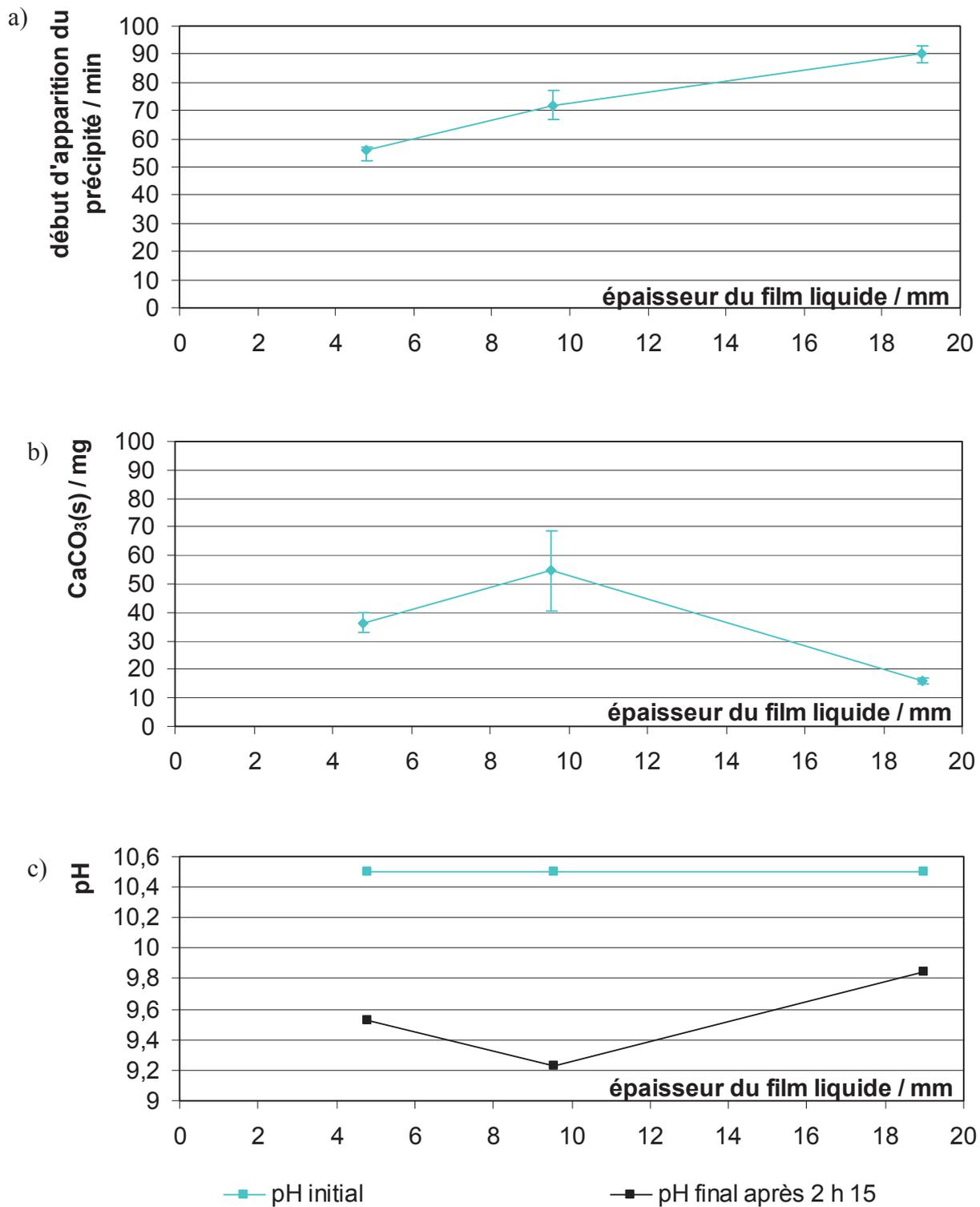


Figure.3.12: Evolution en fonction de l'épaisseur d'un film liquide contenant une masse totale de 2 mg d'enzyme: (a) du temps d'apparition du précipité dans le ballon ; (b) de la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée après 2 h 15 ; (c) du pH initial et après 2 h 15 dans le ballon

## 3.5. Construction de la membrane liquide mince

Suite aux essais préliminaires décrits dans les sections précédentes, un montage final de captage du CO<sub>2</sub> a été construit, qui comprend une cellule centrale contenant un film mince ( $\ll 1$  mm) de liquide pouvant contenir l'enzyme, un système d'alimentation en continu de gaz contenant du CO<sub>2</sub> (10 % ou 100 % sous une pression totale  $\approx 1$  atm) et un système de récupération du gaz relargué par balayage sous azote et d'analyse du contenu en CO<sub>2</sub> dans ce gaz (Fig.3.13).

### 3.5.1. Cellule contenant la membrane liquide

La cellule contenant la membrane liquide se présente sous la forme d'un disque en Chlorure de Polyvinyle (PVC) transparent, de diamètre externe 6 cm et de diamètre interne 2.4 cm (Fig.3.14). Elle est divisée à mi-épaisseur en deux parties.

La partie inférieure constitue la chambre de captage du CO<sub>2</sub>. Elle est alimentée en continu à partir d'une bouteille de gaz (CO<sub>2</sub> pur ou mélange gazeux contenant du CO<sub>2</sub>), via un ballon tampon intermédiaire permettant de mesurer et réguler la pression totale d'admission ( $\approx 1$  atm) et le débit. La partie supérieure constitue la chambre de relargage. Elle peut être alimentée en continu par de l'azote sous un débit constant mesurable, ou être isolée de ce balayage. Elle comprend sur sa face inférieure une grille métallique d'un diamètre de 2.4 cm dont le rôle est de supporter mécaniquement la membrane liquide. Comme suggéré par la bibliographie ainsi que par les expériences préliminaires, en particulier le temps de 1<sup>ère</sup> apparition d'un précipité de CaCO<sub>3</sub>, la membrane liquide doit être fine, typiquement de l'ordre 100  $\mu$ m. Afin de maintenir une telle épaisseur constante dans la cellule de captage, elle a été réalisée par l'intermédiaire d'une membrane polymérique à porosité ouverte, imprégnée par le milieu aqueux contenant l'enzyme. Cette membrane imprégnée est ensuite placée en sandwich entre deux membranes polymériques hydrophobes à porosité ouverte. Le tout placé au-dessus de la grille métallique de la chambre de relargage, et coincé hermétiquement entre les chambres de captage et de relargage de la cellule. Une rainure dans le cadre de la partie

inférieure (chambre de captage), peut être remplie d'eau pour maintenir l'humidité de la membrane hydrophile imprégnée.

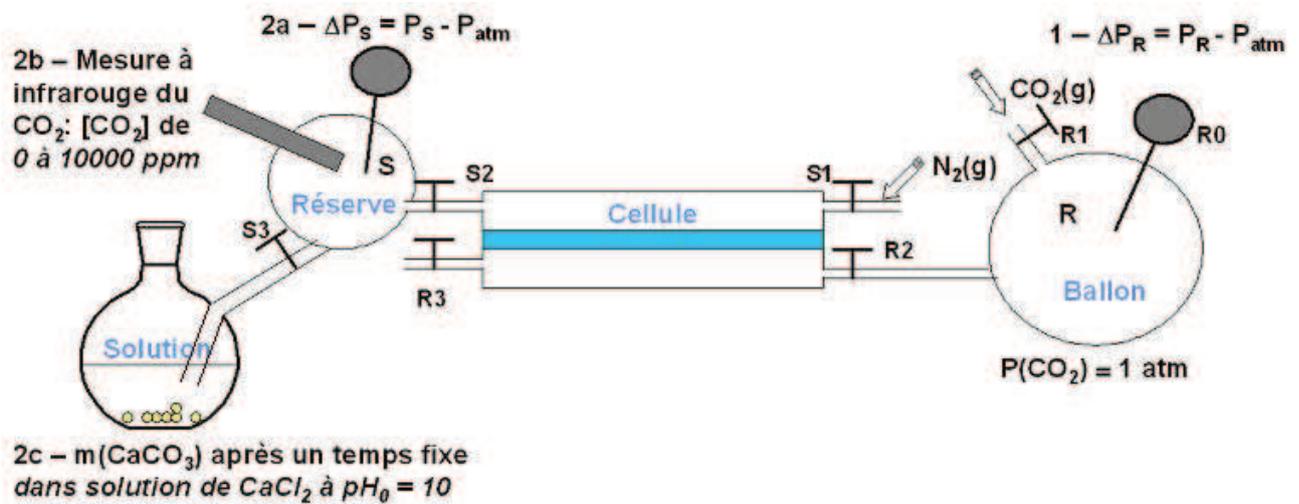


Figure.3.13: Schéma global du montage membranaire liquide de captage du  $CO_2$

Toutes les membranes polymériques utilisées étaient circulaires, de diamètre 47 mm. Les membranes polymériques hydrophobes étaient du type « GVHP » de chez Durapore®, à base de fluorure de polyvinylidène (PVDF), d'épaisseur  $\approx 125 \mu m$ , taille de pores de  $\approx 0.22 \mu m$ , porosité  $\approx 75 \%$ .

Plusieurs types de membranes polymériques hydrophiles ont été utilisés :

- des membranes GVWP de chez millipore à base PVDF modifié (épaisseur  $\approx 125 \mu m$ , taille de pores de  $\approx 0,22 \mu m$ , porosité  $\approx 70 \%$ )
- des membranes en cellulose régénérée de coton de chez Spectra-Por, caractérisées par une porosité symétrique et une taille de pore décrite par une « ouverture limite aux masses molaires » (MWCO de 3,5 kD ; 6-8 kD et 12-14 kD)
- des membranes en filet nylon tissé de chez Millipore (Nylon Net Filters NY20 et NY60), ayant une porosité de 14 % ou 41 % respectivement pour une taille de pores 20  $\mu m$  ou 60  $\mu m$  respectivement et une épaisseur de 55  $\mu m$  ou 50  $\mu m$  respectivement.

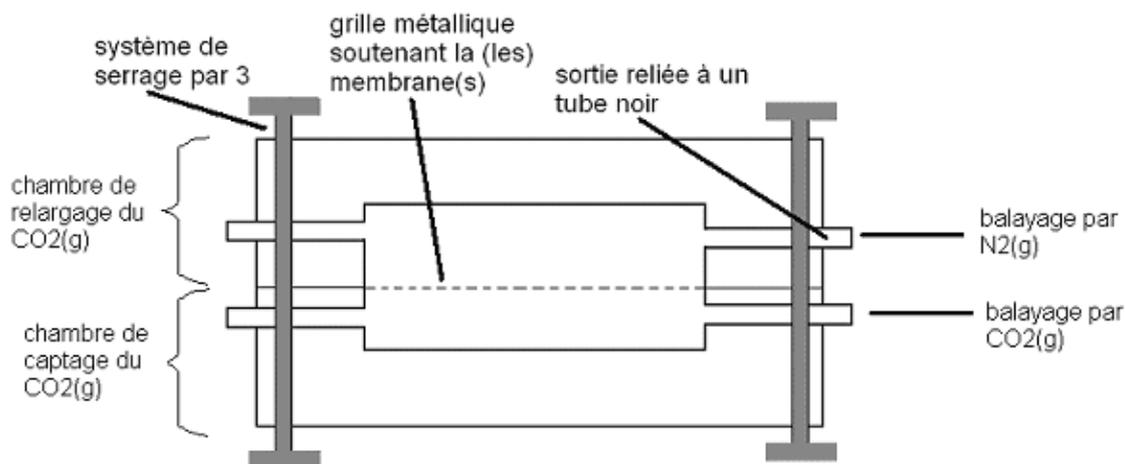


Figure.3.14: Schéma de la cellule contenant la membrane liquide

### 3.5.2. Système d'alimentation en continu du CO<sub>2</sub> à capter

L'alimentation en CO<sub>2</sub>, c'est-à-dire la chambre de captage alimentée en CO<sub>2</sub> est située dans la partie inférieure de la cellule.

Le système d'alimentation permet de balayer la membrane, coté chambre de captage, en gaz contenant du CO<sub>2</sub>, sous une pression d'environ 1 atm et un débit constant: le plus souvent un débit  $\approx 1.08 \text{ L h}^{-1}$  a été sélectionné. L'expérience a montré qu'un balayage de 16 min suffisait à expulser un volume de gaz supérieur au volume du circuit coté captage: une durée de balayage de 20 min a donc été sélectionnée avant d'effectuer toute mesure.

### 3.5.3. Système de récupération et d'analyse du gaz relargué

La chambre de relargage peut être balayé par de l'azote sous un débit ajustable, soit pour diluer le CO<sub>2</sub> relargué dans une gamme de concentration analysable avec le capteur à CO<sub>2</sub> décrit plus loin, soit pour évacuer le CO<sub>2</sub> résiduel après un test de transfert. Coté sortie, elle est branchée en série sur une enceinte cylindrique opaque en PVC contenant un capteur

de CO<sub>2</sub> à infrarouge (référence 0632 de chez « Testo », Fig.3.15a) puis, d'une part sur un capteur de pression différentielle (référence 0638 1547 de chez Testo, Fig.3.15b), d'autre part sur un ballon de 100mL contenant une solution aqueuse de 30 mL de Tris (1.4 M et pH initial = 10.5), 3 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O et 15 mL d'eau déionisée, permettant de précipiter du CaCO<sub>3</sub> à partir du gaz relargué. Le capteur à infrarouge permettait de mesurer la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz relargué dans une gamme de 0 à environ 10000 ppm (0 à 1 %) avec une précision de 50 ppm, le capteur de pression différentielle dans une gamme de ± 100 hPa avec une précision de ± 0.1 hPa, les deux capteurs (CO<sub>2</sub> et pression) étant connectés à une unité d'acquisition de données « Testo 650 » de chez «Testo » (Fig.3.15c). Par comparaison avec les expériences préliminaires sur film liquide (section 2.3.3), le tube provenant de l'enceinte contenant le capteur à infrarouge plongeait d'une profondeur ≈ 1 cm dans la solution du CaCl<sub>2</sub>. Ce montage permettait donc de déterminer, outre la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée, la vitesse d'établissement d'une surpression par rapport à l'atmosphère du laboratoire, jusqu'à ce qu'une bulle de gaz relargué s'échappe dans le ballon de CaCl<sub>2</sub>, et à condition pour ces dernières mesures d'arrêter le balayage du gaz porteur N<sub>2</sub>.

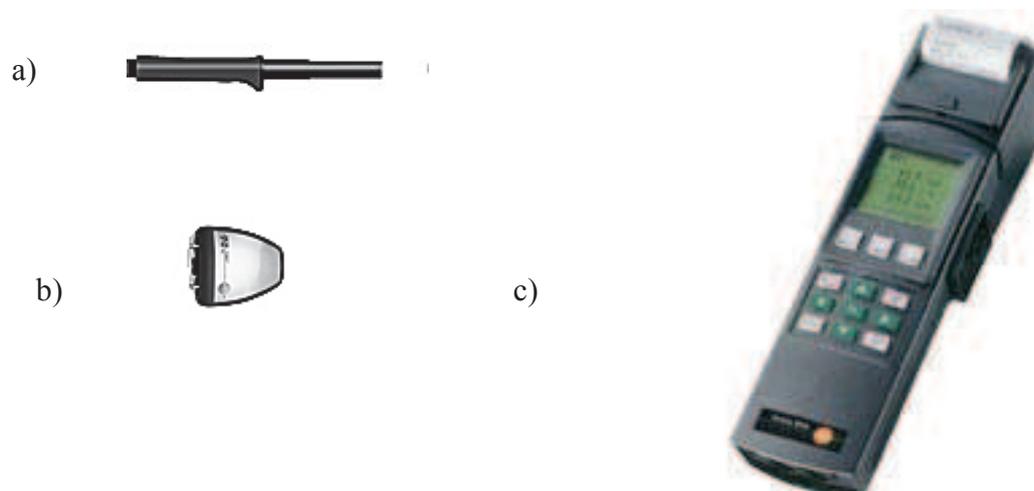


Figure.3.15: Capteurs « Testo » utilisés: (a) capteur de CO<sub>2</sub> à infrarouge; (b) sonde de pression différentielle ; (c) unité d'enregistrement « Testo 650 »

### 3.6. Conclusions des études préliminaires

Les études préliminaires de transfert de CO<sub>2</sub> par suivi de la pression différentielle ont montré des résultats intéressants. Mais les risques de fuites sont difficiles à contrôler pour de faibles pressions différentielles de l'ordre de 1 hPa. Il conviendra donc de la tester avec des capteurs de pressions différentielles fiables et de s'assurer que de faibles fuites ne perturbent pas trop les mesures. De nouvelles techniques de mesures, par exemple par capteurs à infrarouge permettant de mesurer de faibles concentrations de CO<sub>2</sub> en régime continu, et où la composition du flux principal est a priori la même que celle des fuites coté relargage, apparaissent a priori plus intéressantes de ce point de vue et devront être testées.

Les études de captage en ballon ont également montré l'importance d'un tampon, de sa molarité et de sa nature. Cet aspect, ainsi que l'importance de la concentration en enzyme du milieu aqueux, devront être étudiés sur le montage membranaire final. Les études sur film aqueux ont d'ailleurs suggéré que celui-ci devrait être le plus fin possible, par exemple inférieur ou de l'ordre de la centaine de µm, pour atténuer la limitation par la diffusion des espèces en solution aqueuses. A ce titre, un film fin d'épaisseur constant pourra être réalisé en imprégnant une membrane hydrophile poreuse, elle-même placée en sandwich entre deux membranes poreuses hydrophobes.

Enfin la précipitation de CaCO<sub>3</sub>, si elle ne peut pas fournir une mesure de la vitesse de transfert de CO<sub>2</sub>, peut néanmoins être utilisée comme indicateur, dans la mesure où la mesure de masse se situe avant qu'un pH trop bas n'ait été atteint dans le milieu où s'effectue la précipitation.

L'ensemble de ces résultats préliminaires a largement contribué à définir la cellule à membrane fine que nous avons construite, et les mesures qui pourrait être effectuées. La membrane fine pourra être imprégnée soit d'une solution aqueuse enzymatique, soit d'un gel de silice dans lequel l'enzyme sera adsorbé, ces deux volets constituant l'objet des chapitres suivants.

### 3.7. Références bibliographiques

- [1] Ge J., (2002). "Enzyme-based CO<sub>2</sub> capture for advanced life support", Life support and biosphere Science **8**: 181-189
- [2] Liu N., Bond G.M., Abel A., McPherson B.J., Stringer J., (2005). "Biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> in carbonate form: Role of produced waters and other brines", Fuel Processing Technology **86**: 1615– 1625
- [3] Bond G.M., Stringer J., Donald K., Brandvold F., Simsek A., Medina M., Egelandet G., (2001). "Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase", Energy & Fuels **15**(2): 309-316
- [4] Pocker Y., Bjorkquist D.W., (1977). "Stopped-Flow Studies of Carbon Dioxide Hydration and Bicarbonate Dehydration in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. Acid-Base and Metal Ion Catalysis", Journal of the American Chemical Society **99**: 6537-6543
- [5] Mirjafari P., Asghari K., Mahinpey N., (2007). "Investigating the Application of Enzyme Carbonic Anhydrase for CO<sub>2</sub> Sequestration Purposes", Industrial & Engineering Chemistry Research **46**: 921-926
- [6] Underwood A.L., (1961). "Carbonic anhydrase in the titration of carbon dioxide solutions", Analytical Chemistry **33**: 955-956
- [7] Carroll J.J., Slupsky J.D., Mather A.E., (1991). "The Solubility of Carbon Dioxide in Water at Low Pressure", Journal of Physical and Chemical Reference Data **20**: 1201-1209
- [8] Crovetto R., (1991). "Evaluation of Solubility Data of the System CO<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O from 273 K to the Critical Point of Water" Journal of Physical and Chemical Reference Data **20**: 575-589

## **CHAPITRE 4**

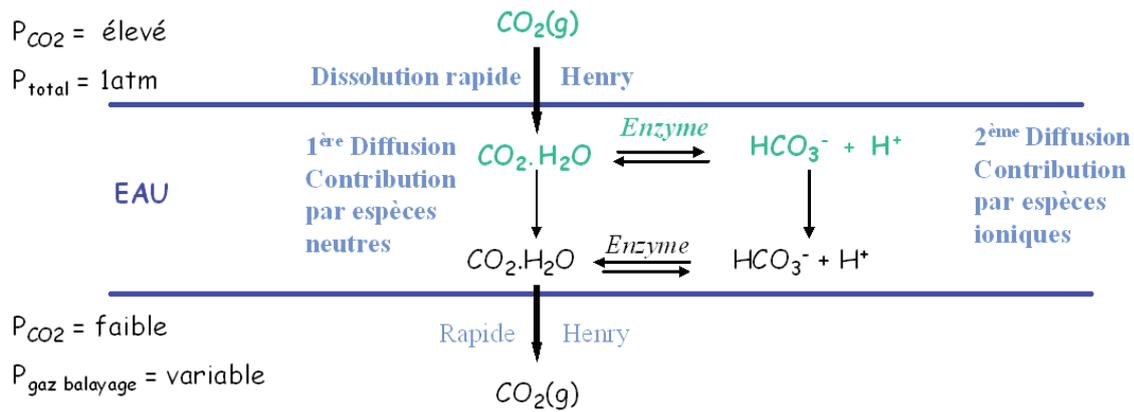
# **CHAPITRE 4: CAPTAGE DU CO<sub>2</sub> PAR MEMBRANES LIQUIDES**

## **4.1. Conditions générales de captage**

Le montage de captage utilisé comprend une cellule à membrane liquide et a été décrit au Chapitre 3.5 et à la Fig.3.13. La membrane liquide a été réalisée par imprégnation d'une membrane polymérique poreuse hydrophile et placée en sandwich entre deux membranes polymériques poreuses hydrophobes. Les caractéristiques des membranes utilisées ont été décrites à la section 3.5.1. Nous rappelons simplement, ci-dessous, son principe de fonctionnement et quelques conditions générales d'utilisation.

### **4.1.1. Rappel du principe de fonctionnement d'une membrane de captage liquide**

Dans une membrane de captage liquide, la fine couche de liquide contenant ou non l'enzyme est immobile. Le transfert des espèces gazeuses entre la face captage et la face relargage se fait donc par dissolution du gaz dans le liquide coté captage, diffusion des espèces dissoutes au travers de la membrane et relargage du gaz dissous coté relargage (Fig.4.1).



(\*)  $\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}$  désigne toutes les espèces moléculaires neutres dans la solution (incluant  $\text{H}_2\text{CO}_3$ )

Figure.4.1: Schéma du principe de fonctionnement d'une membrane de captage de  $\text{CO}_2$  liquide

La concentration d'un gaz dissous dans le milieu aqueux, soit  $[\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}]$ , dépend de la pression partielle de ce gaz en contact avec la face liquide, soit  $P(\text{CO}_2)$ . Il s'agit d'un équilibre dynamique statistique donné par la loi de Henry déjà décrit dans la bibliographie:

$$[\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}] = P(\text{CO}_2) / (0.018 k_H) \quad (\text{Eq.1.3 –section 1.2.1a})$$

où  $k_H$  représente la constante de Henry pour le gaz et le liquide considérés

Puisque la pression partielle de  $\text{CO}_2$  sur la face captage est supérieure à celle sur la face relargage (Eq.4.1) :

$$P(\text{CO}_2(\text{captage})) > P(\text{CO}_2(\text{relargage})) \quad ) \quad (\text{Eq.4.1})$$

Il en résulte un gradient de concentration en  $\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}$  dans l'épaisseur de la membrane liquide, entre le côté captage et le côté relargage (Eq.4.2):

$$[\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}](\text{captage}) > [\text{CO}_2.\text{H}_2\text{O}](\text{relargage}) \quad (\text{Eq.4.2})$$

Le  $\text{CO}_2(\text{aq})$  diffuse donc à travers cette membrane liquide, depuis le coté captage vers le coté relargage, où il est libéré sous forme de  $\text{CO}_2(\text{gaz})$  pour tendre vers l'équilibre avec le gaz coté relargage, selon la loi de Henry. Globalement, le  $\text{CO}_2$  est transféré par diffusion à travers la membrane liquide selon une loi (Eq.4.3) que l'on peut écrire :

$$\Phi \text{ CO}_2 = \mathcal{P} [P(\text{CO}_2(\text{captage})) - P(\text{CO}_2(\text{relargage}))] \quad (\text{Eq.4.3})$$

où  $\Phi \text{ CO}_2$ , exprimé en  $\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ , est la densité de flux de  $\text{CO}_2$  par seconde et par  $\text{m}^2$  de surface de la membrane liquide;  $P(\text{CO}_2(\text{captage}))$  et  $P(\text{CO}_2(\text{relargage}))$  les pressions partielles de  $\text{CO}_2(\text{gaz})$  en Pascal de chaque coté de la membrane liquide et  $\mathcal{P}$  définit la perméance de la membrane liquide, mesurée en  $\text{mol s}^{-1} \text{ m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$ .

La formule de calcul de cette perméance à partir des pressions partielles de  $\text{CO}_2$ , de la surface de la membrane, et du débit d'azote coté relargage, est détaillée en annexe C. C'est cette perméance qui est l'objet des déterminations expérimentales dans la présentation des résultats qui suivent.

Il est important de remarquer que ce mécanisme prévaut pour tous les gaz, y compris  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  ou les autres polluants du gaz dont le  $\text{CO}_2$  doit être capté. Néanmoins, en ce qui concerne  $\text{CO}_2$ , les espèces neutres  $\text{CO}_2(\text{aq})$  sont en plus soumises à la réaction de déprotonation déjà décrite précédemment qui produit des ions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$  solubles en beaucoup plus grande concentration que les espèces neutres  $\text{CO}_2(\text{aq})$ . Au flux trans-membranaire des espèces neutres  $\text{CO}_2(\text{aq})$ , s'ajoute donc un flux trans-membranaire d'ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$  (voir Fig.4.4). Si ces espèces chargées sont rapidement produites à partir de  $\text{CO}_2(\text{aq})$  du coté captage, et rapidement re-transformées en espèces neutres coté relargage, ce second flux d'espèces ioniques peut devenir un contributeur important du transfert global de  $\text{CO}_2$ . C'est en accélérant fortement la vitesse de formation ou de re-transformation de ces espèces ioniques, qu'une anhydrase carbonique est susceptible d'accélérer sélectivement le transfert de  $\text{CO}_2$ . Un tel mode ionique de transfert ne peut en effet pas se produire avec des espèces comme  $\text{N}_2$  ou  $\text{O}_2$ .

Encore faut-il que le pH soit en faveur de la formation de ces ions bicarbonates coté captage, car une enzyme est un catalyseur: elle accélère la cinétique pour atteindre un équilibre sans modifier l'équilibre lui-même. Or le pH baisse du coté de la face captage de la

membrane liquide, en raison de la formation d'ions  $H^+$ , alors qu'il ré-augmente du côté de la face relargage en raison de la recombinaison de ces ions  $H^+$  avec les ions bicarbonates. Les questions de pH et de tampon, mais aussi d'épaisseur de membrane et de concentration enzymatique vont donc jouer un rôle complexe, que ce chapitre a eu pour objectif d'aborder, avant d'appliquer le procédé à une membrane sol-gel.

#### **4.1.2. Température et gaz de captage sélectionnés**

##### **a. Température prévalant dans tous les tests sur membrane fine présentés dans ce mémoire**

La température est un paramètre important de fonctionnement des enzymes. Néanmoins, il s'est avéré difficile, avec le montage de la Fig.3.13, de travailler à des températures différentes de la température ambiante. D'une part le volume liquide la membrane est faible et ne peut constituer un réservoir thermique. D'autre part les débits de gaz balayant la membrane, côté captage comme relargage, sont importants et leur maintien à une valeur contrôlable différente de l'ambiante s'est avéré très difficile. Nous avons donc opté pour un travail à température ambiante, et tous les résultats présentés dans ceux qui suivent ont été obtenus à une température de  $21 \pm 2$  °C.

##### **b. Choix des pourcentages de $CO_2$ dans les gaz soumis au captage**

Les équilibres chimie-physique de captage du  $CO_2$  en milieu aqueux, présentés dans la section 1.2, indiquent que la quantité de  $CO_2(aq)$  dissoute dans l'eau augmente avec la pression partielle de  $CO_2$  en contact avec le liquide (loi de Henry, Eq.1.2, section 1.2.1a), et que la concentration d'ions  $H^+$  augmente également avec la concentration en  $CO_2(aq)$ , afin de satisfaire l'équation d'équilibre décrit par la constante de déprotonation  $K_{a1}$  (Eq.1.5, section 1.2.1b). Le pH moyen dans la membrane liquide devrait donc diminuer lorsque la pression partielle en  $CO_2$  du gaz soumis au captage augmente et la perméance du  $CO_2$  devrait diminuer. Les données expérimentales regroupées par Bao et Trachtenberg <sup>1</sup> et reproduites Fig.4.2 confirment ce point. Les meilleures perméances obtenues avec un gaz de captage contenant 10 % de  $CO_2$ , sont de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ .

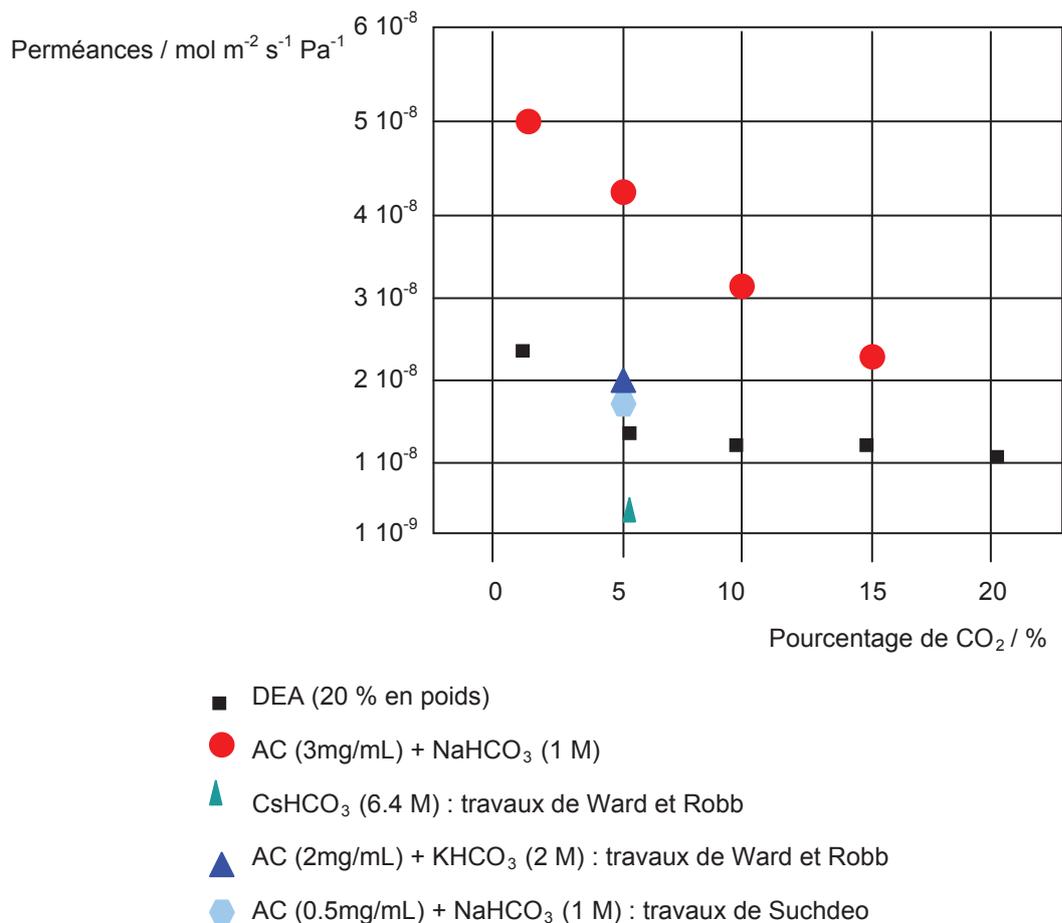


Figure.4.2. Comparaison des valeurs expérimentales de la perméance en CO<sub>2</sub> en fonction du pourcentage en CO<sub>2</sub> dans le gaz de captage, d’après Bao et Trachtenberg, à partir de leurs propres résultats <sup>1</sup> et de ceux de Ward et Robb <sup>2</sup> et de Suchdeo et Schultz <sup>3</sup>

Ceci nous a amené à désirer comparer le comportement de notre membrane liquide lorsque le gaz soumis au captage était, soit du CO<sub>2</sub> pur, soit un mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 % de CO<sub>2</sub>. Dans les deux cas, le gaz était fourni en bouteilles de 50 L, sous une pression de 50 MPa provenant de chez Air liquide pour le CO<sub>2</sub> pur, sous une pression de 15 MPa pour le mélange provenant de chez Linde. Les objectifs étaient, d’abord de comparer les performances de notre membrane aux performances publiées, puis d’étudier l’influence de paramètres comme le tampon et la concentration en enzyme, enfin de regarder le comportement de cette membrane dans un cas extrême pour du CO<sub>2</sub> pur.

## **4.2. Résultats obtenus sur les membranes liquides et un gaz à 100 % de CO<sub>2</sub> côté captage**

Deux types de résultats ont été obtenus par suivi du gaz coté relargage du CO<sub>2</sub>, d'abord par mesure de la teneur en CO<sub>2</sub> (sonde à infrarouge) et de la pression, donc en stoppant le balayage d'azote durant le transfert de CO<sub>2</sub>, ensuite et plus largement par suivi de la concentration en CO<sub>2</sub> avec la sonde à infrarouge et par précipitation de CaCO<sub>3</sub>, sous balayage d'azote.

### **4.2.1. Etude du transfert de CO<sub>2</sub>(g) par suivi de concentration et de pression différentielle, sans balayage d'azote côté relargage**

#### **4.2.1.1 Mode opératoire**

Pour cette expérimentation, le coté relargage est d'abord balayé en azote pour évacuer le CO<sub>2</sub> résiduel provenant des tests précédents, puis ce balayage est arrêté: la vanne S1 est fermée, mais les vannes S2 et S3 de sorties sont laissées ouvertes. Le coté captage est alors balayé pendant 20 min par du CO<sub>2</sub> pur sous 1 atm (débit  $\approx 1.08 \text{ L h}^{-1}$ ). Ce balayage en CO<sub>2</sub> est ensuite arrêté. Les mesures de la teneur en CO<sub>2</sub> et de la pression sont mesurées dès l'arrêt de ce balayage. Néanmoins le coté captage de la membrane liquide est laissé en communication avec le réservoir tampon intermédiaire.

Dans cette configuration, initialement, le coté captage contient donc uniquement du CO<sub>2</sub> et le coté relargage uniquement du N<sub>2</sub>, tous deux sous une pression  $\approx 1 \text{ atm}$ . Au début du transfert, le CO<sub>2</sub> diffuse du coté captage vers le coté relargage et N<sub>2</sub> diffuse en sens inverse. Si ces deux gaz diffusaient à la même vitesse, aucune surpression ni dépression ne se créerait, ni du coté captage ni du coté relargage. Par contre, si par exemple CO<sub>2</sub> diffusait plus rapidement que N<sub>2</sub>, une surpression se créerait du coté relargage et une dépression coté

captage. Un des rôles du réservoir tampon coté captage est d'atténuer entre autres une telle dépression qui se traduirait au bout d'un certain temps par des fuites. Toujours dans le cas où  $\text{CO}_2$  diffuserait plus rapidement que  $\text{N}_2$ , une surpression se créerait coté relargage. Toutefois cette dernière ne pourrait dépasser une valeur équivalente à  $\approx 1$  cm d'eau (environ 98 Pa) qui est la hauteur de plongée du tube de transfert de gaz dans le ballon de précipitation du  $\text{CaCO}_3$  (voir Fig.3.13). On observerait alors coté relargage une succession de montées en surpression, suivie d'une baisse due au départ d'une bulle de l'excès de  $\text{CO}_2$  transféré.

Expérimentalement, il était en fait possible d'enregistrer simultanément en fonction du temps, coté relargage, la concentration en  $\text{CO}_2(\text{g})$  au niveau de la sonde à infrarouge et la surpression par rapport à la pression atmosphérique du laboratoire. De plus, la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipité au bout d'une durée prédéterminée de 1 h dans le ballon terminal, pouvait fournir une indication supplémentaire à comparer aux enregistrements de concentration et surpression.

#### **4.2.1.2 Résultats obtenus avec un film aqueux d'épaisseur variable disposé au-dessus d'une membrane polymérique**

Dans cette série d'expériences, le système membranaire sandwich (membrane hydrophile imprégnée d'eau prise en sandwich entre deux membranes hydrophobes) a été remplacé par une simple membrane hydrophile de type RC Spectra-Por (MWCO = 3.5), destinée à retenir le film aqueux sur épaisseur uniforme, placé au-dessus.

Il s'est par ailleurs avéré impossible de réaliser un film aqueux d'épaisseur uniforme au-dessus d'une simple membrane hydrophobe de type PVDF (GVHP), l'eau étant repoussée sur les cotés de la cellule.

##### **a. Evolution de la concentration en $\text{CO}_2$ en fonction de la hauteur du film d'eau, sans enzyme**

Des films d'eau d'épaisseur croissante correspondant à des volumes aqueux de 0 (création volontaire d'une fuite) ; 1 ; 1.5 ; 2 et 3 mL, sans tampon (épaisseur correspondante 0 ; 1.17 ; 1.75 ; 2.34 et 3.51 mm) ont été étudiés. L'objectif était d'observer comment les mesures se

comportaient, et s'il y avait des fuites à travers la membrane liquide elle-même. Les enregistrements montrent en premier lieu l'existence d'un temps de latence avant que le CO<sub>2</sub> n'atteigne le niveau de la sonde à infrarouge. Ce temps correspond à la vitesse de diffusion du CO<sub>2</sub> dans le tube de transfert reliant la chambre de relargage au capteur (Fig.4.3). Ce temps est néanmoins court (20 à 30 s selon le seuil de concentration considéré) lorsqu'il y a une fuite (ex: absence d'eau Fig.4.3), mais beaucoup plus long (1500 à 2000 s) dès que le CO<sub>2</sub> doit diffuser au travers du film d'eau. Le temps nécessaire pour atteindre un seuil donné (ex: 1000 ppm) croît avec l'épaisseur du film d'eau. Puis la concentration en CO<sub>2</sub> au niveau du capteur croît, d'autant plus rapidement que l'épaisseur du film d'eau est mince. Le Tableau.4.1 montre ainsi les pentes entre 2600 et 3600 s de transfert de CO<sub>2</sub>. Ce tableau, ainsi que la Fig.4.3 confirment que la vitesse de transfert de CO<sub>2</sub> croît lorsque l'épaisseur du film d'eau croît.

**b. Influence de la concentration en enzyme pour un film aqueux de 1 mL (épaisseur équivalent 1.17 mm) sans tampon**

Avec la même membrane que précédemment et une épaisseur de film aqueux sans tampon de 1.17 mm, des concentrations en enzyme de 1.3 ; 2 ; 4 et 8 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme ont été testés. Les résultats, par exemple le Tableau.4.2 pour les pentes moyennes entre 2600 et 3600 s, ont montré que la vitesse de transfert du CO<sub>2</sub> était légèrement plus faible sans enzyme qu'avec enzyme. Par ailleurs aucune tendance nette d'augmentation de la vitesse de transfert avec la concentration d'enzyme n'a été observée.

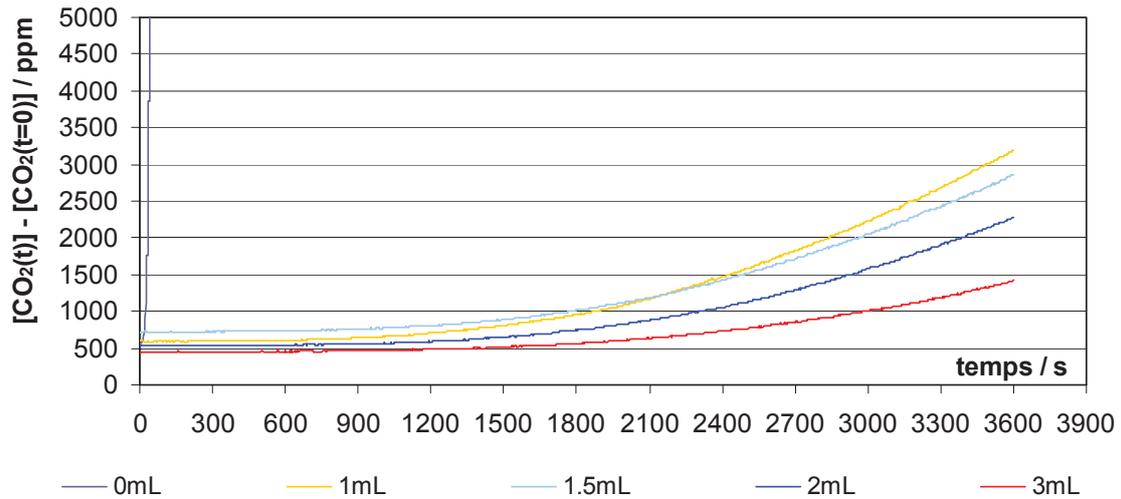


Figure.4.3: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) en fonction du temps, pour des volumes d'eau de 0 (fuite: aucun liquide) ; 1 ; 1.5 ; 2 et 3 mL au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile

Tableau.4.1: Evolution de la vitesse de croissance de concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) entre 2600 et 3600 s, pour des volumes d'eau de 0 (fuite : aucun liquide) ; 1 ; 1.5 ; 2 et 3 mL au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile.

Epaisseur d'eau (mm)	0	1.17	1.75	2.34	3.51
Pente (ppm/s)	465.0	1.49	1.24	1.07	0.60
Pente (%CO <sub>2</sub> /s)	$4.65 \cdot 10^{-02}$	$1.49 \cdot 10^{-04}$	$1.24 \cdot 10^{-04}$	$1.07 \cdot 10^{-04}$	$6.00 \cdot 10^{-05}$

Tableau.4.2: Evolution de la vitesse de croissance de concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) entre 2600 et 3600 s, pour une hauteur d'eau équivalente à 1.17 mm au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile, pour des concentrations en enzyme croissantes

Concentration en enzyme (mg/mL)	0	1.3	2	4	8
Pente (ppm/s)	1.49	1.30	1.27	1.01	1.28
Pente (%CO <sub>2</sub> /s)	$1.49 \cdot 10^{-04}$	$1.30 \cdot 10^{-04}$	$1.27 \cdot 10^{-04}$	$1.01 \cdot 10^{-04}$	$1.28 \cdot 10^{-04}$

De ces résultats, il ressort clairement que sans tampon, l'enzyme n'améliore pas la vitesse de captage du CO<sub>2</sub>. De plus, le fait que cette vitesse de captage soit légèrement plus faible avec enzyme que sans enzyme peut avoir deux causes. D'une part, l'enzyme peut colmater partiellement les pores de la membrane hydrophile. Celle-ci adsorbe très bien les protéines selon le fournisseur. D'autre part, elle devrait permettre d'atteindre plus rapidement le pKa<sub>1</sub> de 1<sup>ère</sup> ionisation du CO<sub>2</sub>(aq) dans la membrane liquide. La vitesse de transfert de CO<sub>2</sub> entre 2600 et 3600 s rapportées au Tableau.4.2, qui concerne un régime transitoire, pourrait donc montrer des valeurs légèrement plus faibles lorsque l'enzyme est présente.

Dans cette même configuration, une analyse plus détaillée de l'évolution du transfert de CO<sub>2</sub> a été effectuée en comparant une solution aqueuse à 2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme et une solution sans enzyme. Pour cela, la pente moyenne d'augmentation de concentration en CO<sub>2</sub> en fonction du temps a été calculée dans les créneaux 2600 à 3600 s ; 4500 à 5500 s ; 5200 à 7200 s et 6200 à 7200 s. Les résultats regroupés Fig.4.4 confirment une capacité de transfert légèrement plus lente avec l'enzyme entre 2600 et 3600 s, rapportés au Tableau.4.2. Mais pour des durées plus longues, les vitesses de transfert avec ou sans enzyme et sans tampon, s'égalisent. Ce résultat confirme donc bien que l'enzyme n'améliore pas le transfert du CO<sub>2</sub> sans tampon dans l'eau.

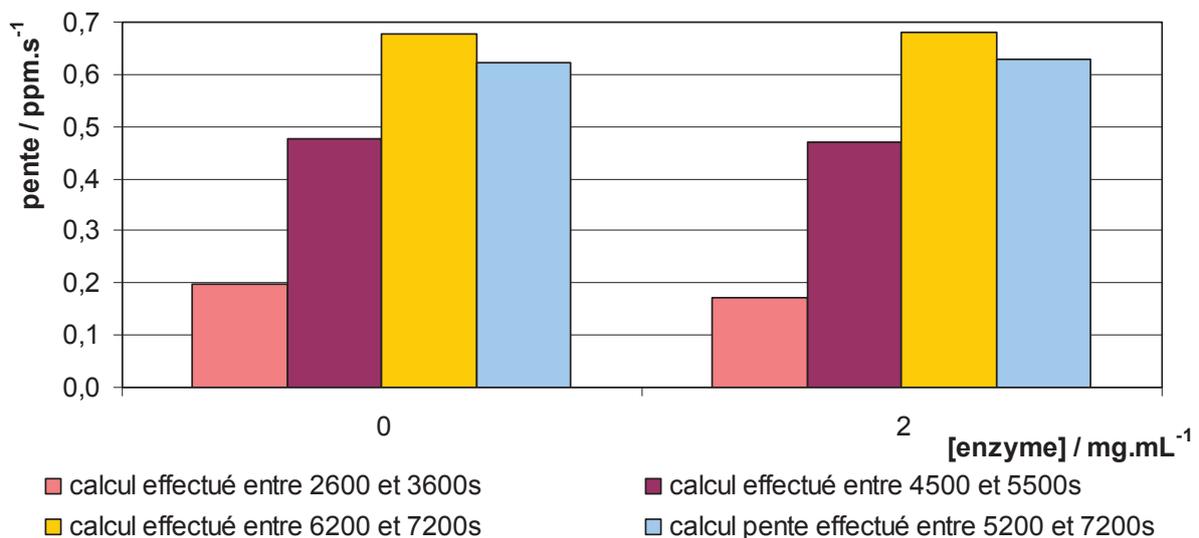


Figure.4.4: Analyse de l'évolution de la vitesse d'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) en fonction du temps, pour une hauteur (calculée) d'eau de 1.17 mm au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile, sans enzyme ou avec 2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme

### **c. Influence de la nature et de la molarité du tampon**

Toujours avec la même membrane hydrophile (MWCO = 3.5 kDa), un volume de 1 mL de liquide aqueux contenant, soit une concentration de 2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, soit aucune enzyme, a été testé. Mais, suite à l'étude précédente, le milieu aqueux était cette fois constitué de différents tampons de nature et molarité différentes: Tris-HCl ou phosphate de molarité ≈ 0.1 M et pH initial ≈ 8 ; Tris-HCl ≈ 1 M et pH initial ≈ 9 et 8. Les résultats essentiels concernant la vitesse de croissance de concentration en CO<sub>2</sub> entre 2600 et 3600 s sont regroupés Fig.4.5. Ils montrent:

- (1) Sauf avec le tampon phosphate 0.1 M pH = 8, que la présence d'un tampon Tris-HCl améliore modérément la vitesse de transfert du CO<sub>2</sub> avec l'enzyme, par comparaison à sans enzyme.
- (2) Avec du Tris-HCl, qu'un tampon de molarité 1 M améliore significativement la vitesse de transfert de CO<sub>2</sub> par rapport un tampon de molarité 0.1 M. Ce résultat est à corroborer au fait que, pour une molarité de 0.1 M, le pH final mesuré dans l'eau du film après 1 h 45 de transfert est proche de pKa1 (6.35), alors qu'il est plus élevé avec le Tris-HCl 1 M (Fig.4.5b)
- (3) Avec du Tris-HCl 1 M, lorsque l'enzyme est présente, que la valeur initiale du pH (≈ 8 ou ≈ 9) n'a pas d'influence significative.

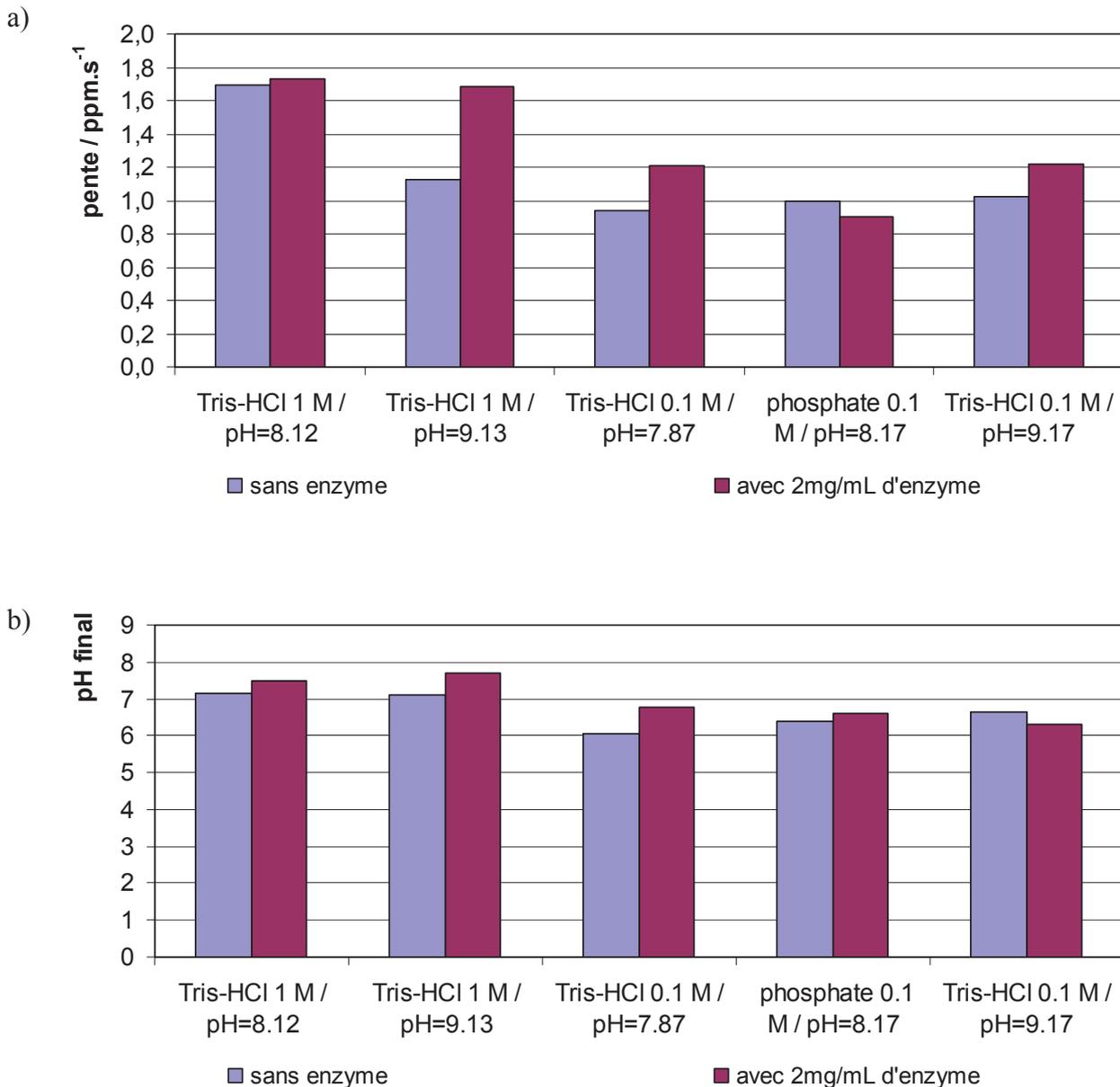


Figure.4.5: Effet d'un tampon sur la vitesse de croissance de concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) entre 2600 et 3600 s, pour une hauteur d'eau calculée de 1.17 mm au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile: (a) effet de la molarité du pH initial et de la nature du tampon ; (b) pH atteint après 1 h 45 de transfert dans le film liquide

Comme précédemment avec de l'eau sans tampon, une analyse plus détaillée de la vitesse d'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> en fonction du temps a été effectuée en calculant la pente dans les créneaux 2600 à 3600 s ; 4500 à 5500 s ; 5200 à 7200 s et 6200 à 7200 s, pour un tampon Tris-HCl (1 M ; pH = 9.13). Les résultats sans ou avec 2 mg mL<sup>-1</sup>

d'enzyme sont explicités à la Fig.4.6. Cette analyse confirme un effet bénéfique modéré du tampon tout au long de l'opération de transfert de CO<sub>2</sub>.

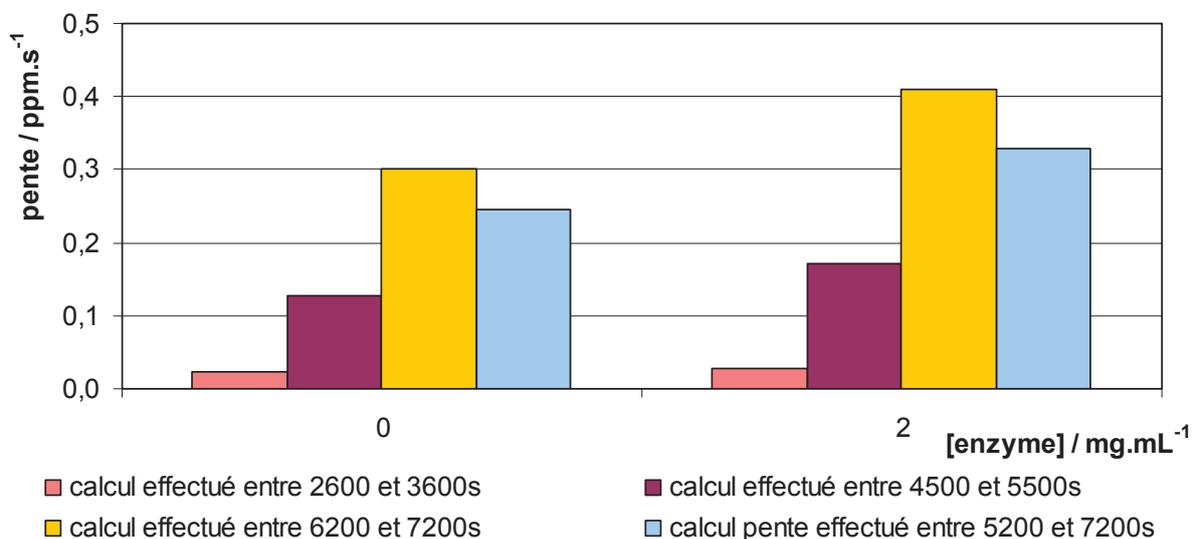


Figure.4.6: Analyse de l'évolution de la vitesse d'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> au niveau de la sonde (en ppm) en fonction du temps, pour une hauteur d'eau calculée de 1.17 mm au-dessus d'une membrane polymérique hydrophile, dans un tampon Tris-HCl (1 M ; pH = 9.13), sans enzyme ou avec 2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme

#### d. Influence de la nature et de la taille des pores de la membrane polymérique

Toujours dans la même configuration, où 1 mL d'eau avec ou sans enzyme était placé au-dessus d'une membrane unique, plusieurs membranes de nature ou de taille de pores différentes ont été étudiées. Il s'agit de membranes Durapore® de type PVDF hydrophiles ou hydrophobes ; de membranes de type « Cellulose régénérée » de chez Spectra-Por mais de taille de pore différente (MWCO = 6-8 et 10-12 kDa) de celle ayant fait l'objet des résultats présentés dans les sections précédentes (MWCO = 3.5 kDa) ; également de membranes en fibre de quartz liées par de l'alcool polyvinylique de chez Fisher Bioblock.

La Fig.4.7 regroupe les analyses des vitesses moyennes d'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub>, pour passer de 4000 à 8000 ppm avec ou sans enzyme, mais sans tampon. Ces résultats confirment que l'enzyme permet d'atteindre plus rapidement un seuil de 4000 ppm de CO<sub>2</sub> coté relargage, mais qu'ensuite les vitesses de transfert sont similaires avec ou sans enzyme. Par contre, cette vitesse de transfert augmente significativement avec la taille

des pores de la membrane polymérique. Il est à noter que les membranes en PVDF de type hydrophobe ou en feutre de quartz se sont avérées inefficaces. Les premières repoussent l'eau sur les cotés de la cellule, les secondes laissent l'eau transpercer, ce qui s'est traduit rapidement par une fuite de CO<sub>2</sub> importante.

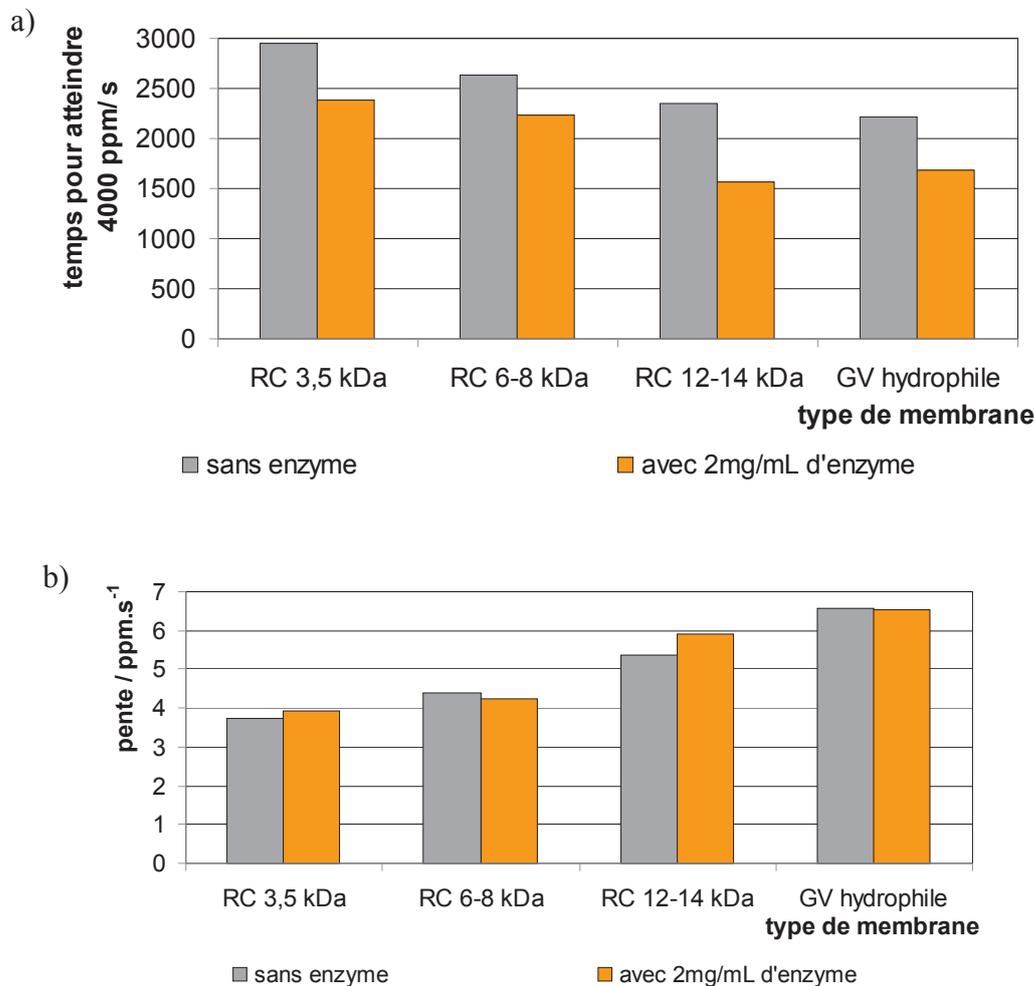


Figure.4.7: Comparaison du comportement de différentes membranes hydrophiles dans le transfert du CO<sub>2</sub> sans balayage d'azote coté relargage. Film d'eau de 1 mL (équivalent à 1.17 mm d'épaisseur) sans tampon: (a) temps pour atteindre 4000 ppm ; (b) pente entre 4000 et 8000 ppm

Les deux membranes polymériques hydrophiles à base de PVDF (membrane GV) et de cellulose régénérée (membrane RC 12-14), ont de plus été testées avec un volume d'eau de 0.25 mL (épaisseur calculée = 0.29 mm) pour des concentrations de 0 ou 8 mg mL<sup>-1</sup>, sans

tampon. Les résultats sur les vitesses de croissance en concentration de CO<sub>2</sub> entre 4000 et 8000 ppm et les temps pour atteindre 4000 ppm, sont regroupés au Tableau.4.3. Alors que la différence entre les deux membranes est significative, aucune amélioration due à l'enzyme n'a été observée pour un type de membrane donné, ce qui confirme encore les résultats précédents.

Tableau.4.3: Comparaison du comportement de différentes membranes hydrophiles dans le transfert du CO<sub>2</sub> sans balayage d'azote coté relargage. Film d'eau de 0.25 mL (épaisseur équivalente 0.29 mm) sans tampon

Type de membrane	PVDF (GV hydrophile)		Cellulose régénérée MWCO = 12-14 kDa	
Concentration en enzyme (mg/mL)	0	8	0	8
Temps pour atteindre 4000 ppm (s)	4226	4268	3082	3268
Pente (ppm/s)	2.21	2.34	3.73	3.78

#### 4.2.1.3 Résultats obtenus sur une membrane hydrophile de type PVDF imprégnée de solution aqueuse, prise en sandwich entre 2 membranes hydrophobes

Les membranes étaient du type PVDF de chez Durapore®, hydrophiles (GV) ou hydrophobes (GVHP). Le milieu aqueux dans lequel l'enzyme était dissoute ne contenait pas de tampon. L'imprégnation de la membrane hydrophile était effectuée par trempage pendant 45 min dans 4 mL d'eau distillée avec diverses masses d'enzyme. Puis cette membrane était coincée entre deux membranes hydrophobes (GVHP) sèches et le sandwich placé dans la cellule.

### a. Influence de la concentration enzymatique présente dans l'eau, sans tampon

Le transfert du  $\text{CO}_2$  a été suivi avec la sonde infrarouge et avec le capteur à pression différentielle. Un exemple de courbe de surpression en fonction du temps pour une solution de l'eau sans enzyme, est illustré à la Fig.4.8. Cette figure montre une succession de dents de scie, dont chaque montée correspond au transfert de  $\text{CO}_2$  coté relargage, diminué du transfert de  $\text{N}_2$  vers le coté captage et chaque descente à l'échappement d'une bulle dans le ballon de précipitation du  $\text{CaCO}_3$ .

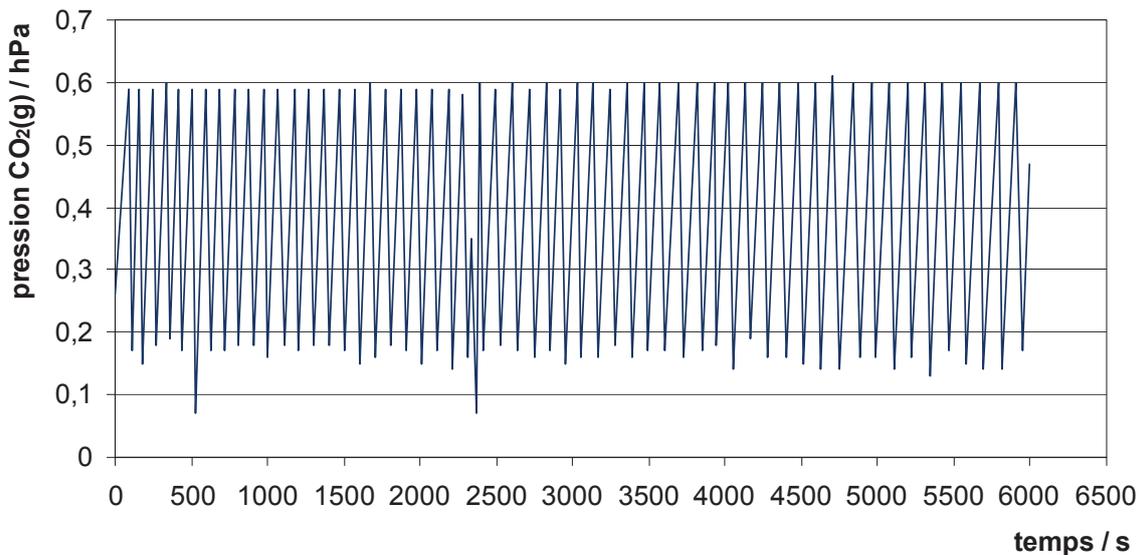


Figure.4.8: Exemple de donnée brute d'évolution de la surpression différentielle coté relargage, en fonction du temps, pour une membrane humide fine sandwich sans enzyme et sans tampon

Les dents de scie du graphique ci-dessus sont de moins en moins serrées au cours du temps, car progressivement la différence de pression partielle en  $\text{CO}_2$  entre les chambres de captage et de relargage s'atténue, et il en est de même pour  $\text{N}_2$ . Des approximations simples: gaz parfaits et bilan des vitesses de transfert ( $\text{CO}_2 - \text{N}_2$ ) dans une branche descendante de dent de scie obtenue en faisant la moyenne dans les 2 branches ascendantes encadrant cette descente, permettent de calculer un nombre cumulé de moles de gaz transférées (moles de  $\text{CO}_2 - \text{moles de N}_2$ ) du coté captage vers le coté relargage, en fonction du temps. La Fig.4.9a montre les résultats obtenus par mesure de pression avec des concentrations d'enzyme croissantes, alors que la Fig.4.9b montre ceux obtenus pour la concentration en  $\text{CO}_2$ . Alors

que les mesures de pression ne montrent pas de tendance nette, les mesures de concentration de  $\text{CO}_2$  avec le capteur à infrarouge montrent une légère amélioration avec une concentration croissante en enzyme, contrairement à ce que l'on avait observé pour un film d'eau plus épais (section 4.2.1.2). Ce dernier point suggère que le pH moyen se stabiliserait à une valeur moyenne légèrement plus élevée dans la membrane hydrophile mince, que dans un film d'eau plus épais. Quant aux résultats des mesures de pression, elles semblent entachées par de légères fuites incontrôlables, alors que ces dernières sont sans conséquence sur les mesures par le capteur, puisqu'elles ont la même composition que le réservoir de gaz coté relargage. En conséquence, pour la suite, seule la méthode de mesure de composition du gaz relargué avec le capteur à infrarouge, complétée par pesée du  $\text{CaCO}_3$  précipité, ont été conservées.

### **b. Influence d'un tampon phosphate 0.1 M**

Le tampon utilisé ici est un tampon à base de phosphate de molarité 0.1 M et  $\text{pH} = 8.17$ . Les résultats obtenus avec la sonde à pression différentielle et la sonde à  $\text{CO}_2(\text{g})$  en fonction du temps, sont regroupés Fig.4.10. Ils font ressortir la rapidité d'ajustement de la pression, par rapport à la lenteur de mélange des gaz.

Ici aussi, l'ajout d'un tampon phosphate améliore modérément le transfert de  $\text{CO}_2$ . Il accélère le transfert du  $\text{CO}_2(\text{g})$  en présence d'enzyme, contrairement à ce que l'on avait observé dans un film d'eau plus épais (section 4.2.1.2.c). L'effet de l'enzyme dans un tampon devient suffisamment bénéfique pour être observé même par la méthode des pressions.

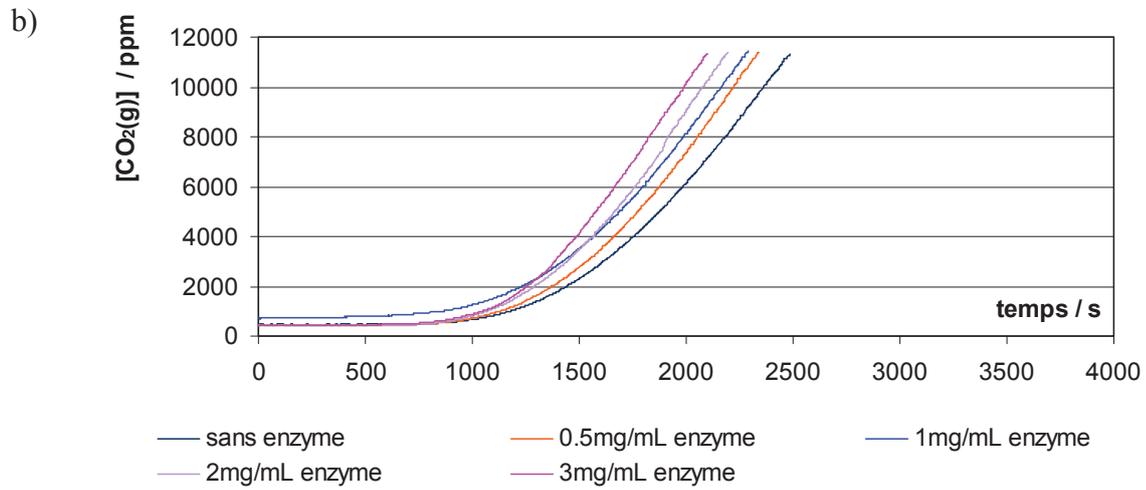
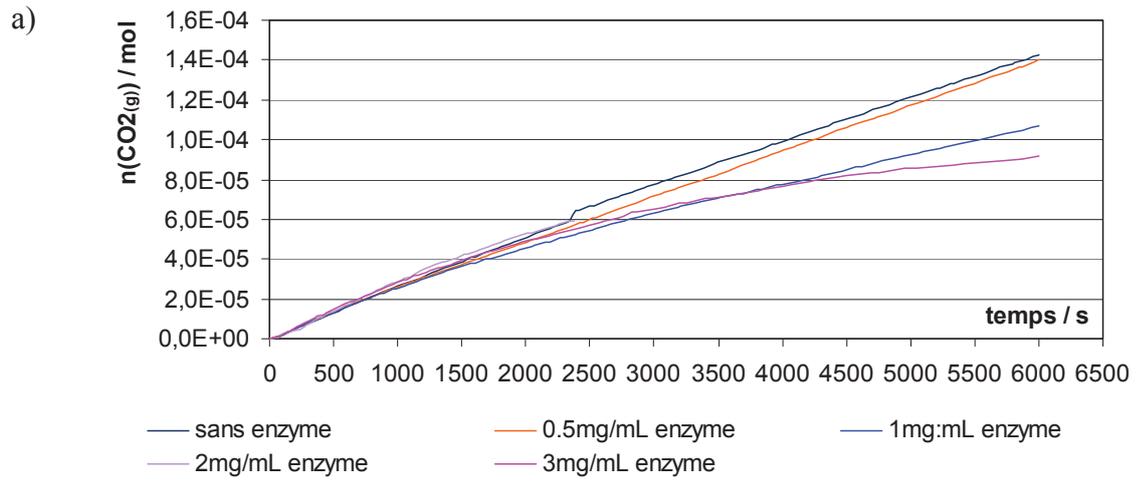


Figure.4.9: Evolution en fonction du temps: (a) du nombre de moles cumulées de  $\text{CO}_2$  transférées du côté captage vers le côté relargage, selon les mesures de pression ; (b) de la concentration en  $\text{CO}_2$  côté relargage

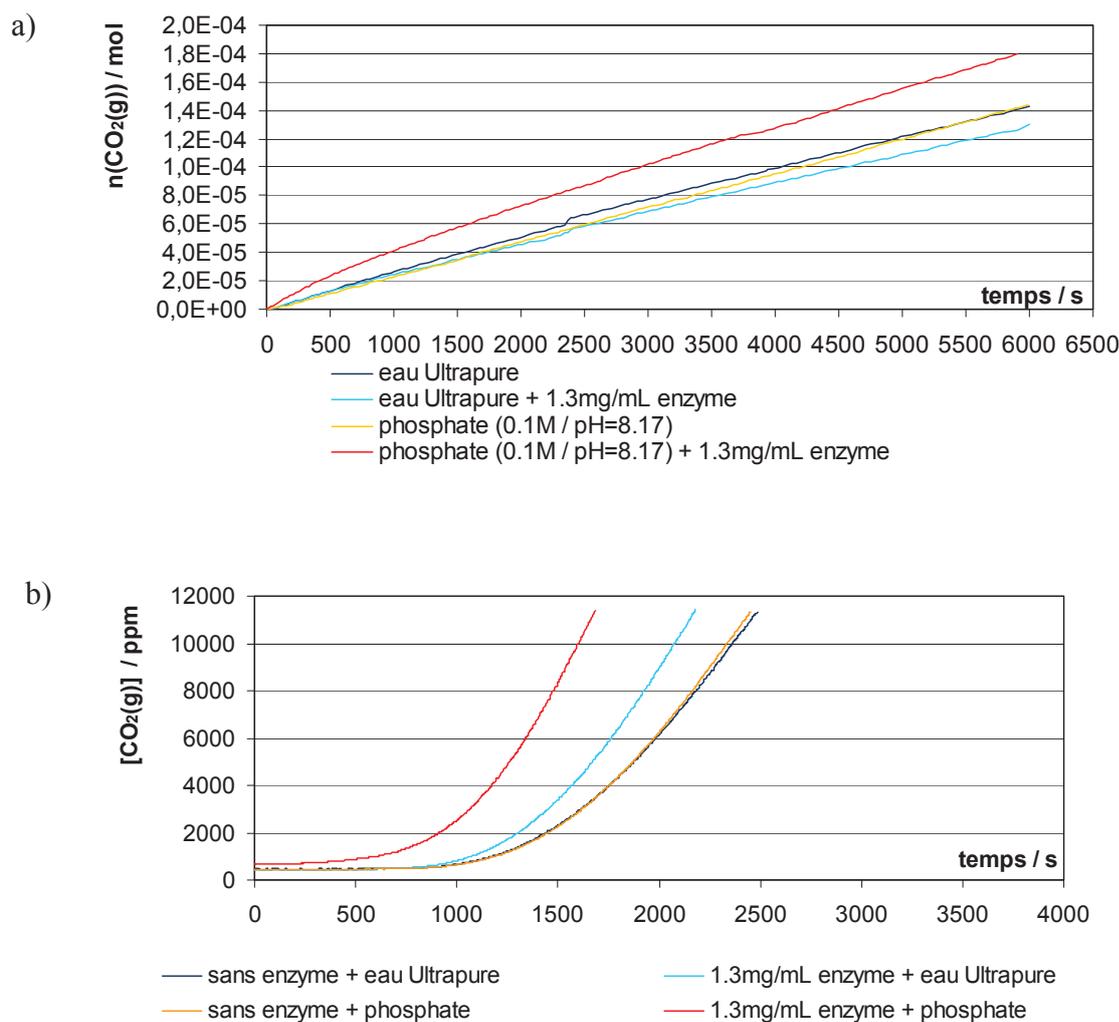


Figure.4.10: Evolution en fonction du temps avec ou sans enzyme dans un tampon phosphate 0.1 M: (a) du nombre de moles cumulées de  $\text{CO}_2$  transférées du côté captage vers le côté relargage, selon les mesures de pression ; (b) de la concentration en  $\text{CO}_2$  côté relargage

### c. Influence de la concentration enzymatique dans un tampon phosphate 1 M

Il a été montré à la section 4.2.1.2.c (Fig.4.5), qu'un tampon Tris-HCl 1 M était plus efficace qu'un tampon 0.1 M. Dans la présente section, un tampon phosphate 1 M de pH initial  $\approx 8$  (7.93) a été testé, avec des concentrations d'enzymes croissantes. Les résultats obtenus par mesure de la concentration de  $\text{CO}_2$  avec la sonde à infrarouge (pente d'augmentation de concentration en  $\text{CO}_2$  en fonction du temps entre 4000 et 8000 ppm) sont présentés Fig.4.11a. Ils sont corroborés par les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipité en 1 h (Fig.4.11b).

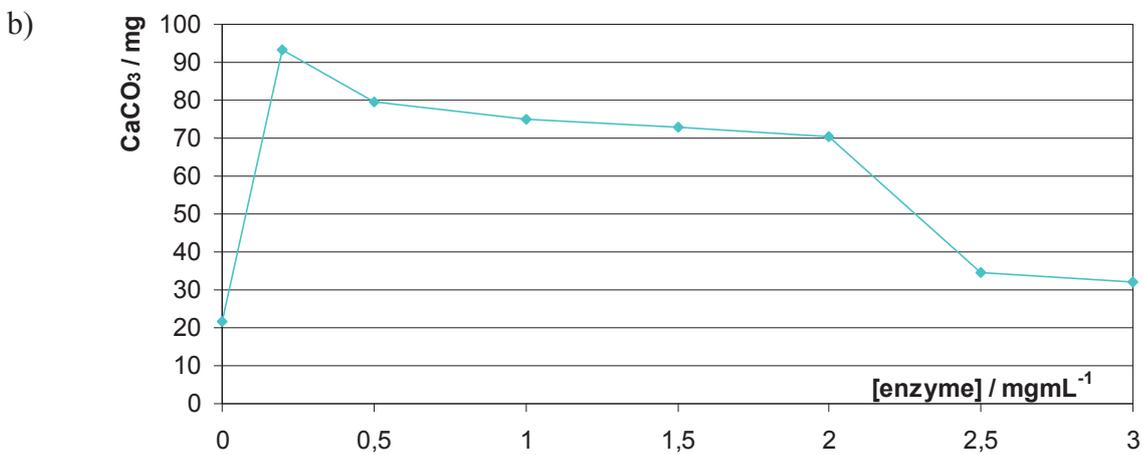
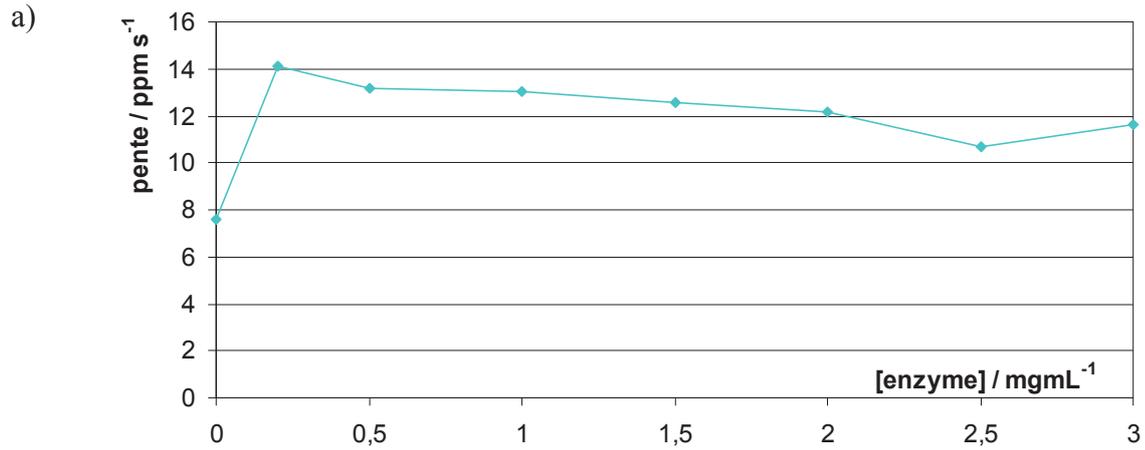


Figure.4.11: Evolution en fonction du temps: (a) de la pente d'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> entre 4000 et 8000 ppm ; (b) du CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h, pour des concentrations croissantes en enzyme dans un tampon phosphate 1 M de pH initial  $\approx 8$

La figure 4.11 montre l'existence d'une concentration optimale de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> en enzyme. Mais il se pourrait que la concentration optimale en enzyme soit encore plus faible, ce qui nécessiterait des tests avec de telles concentrations pour préciser ce résultat.

## 4.2.2. Etude du transfert de CO<sub>2</sub>(g) par suivi de concentration, sous balayage d'azote coté relargage

### 4.2.2.1 Mode opératoire

Le gaz alimentant la membrane liquide coté captage était fourni à partir d'une bouteille à 100 % de CO<sub>2</sub>(g). Le coté relargage était balayé en continu par de l'azote et le coté captage par le CO<sub>2</sub>. La concentration en CO<sub>2</sub>(g) du gaz relargué fournie par la sonde a été enregistrée en continu (1 mesure automatique toutes les 2 s). Cette mesure est insensible à de légères fuites éventuelles entre la chambre de relargage et la sonde, la fuite et le gaz relargué principal ayant la même composition. Pour atteindre un régime permanent mesurable, il était nécessaire de sélectionner un débit d'azote pour lequel la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz transféré était constante et dans la gamme de valeurs mesurables avec la sonde à infrarouge (< 10 000 ppm). Un tel plateau permet de calculer ensuite la perméance de la membrane (voir annexe C).

Mais il était d'abord nécessaire de vérifier si, pour une membrane et des conditions de captage données, la perméance obtenue dépendait du débit d'azote sélectionné. Ce travail préliminaire a été effectué avec une membrane en PVDF hydrophile (membrane GV), trempée pendant 45 min dans 4 mL d'eau sans enzyme ni tampon, pour des débits d'azote de 0.65 ; 1.13 ; 1.29 et 1.81 L h<sup>-1</sup> coté relargage. Ces débits d'azote ont été comparés alors que le débit de CO<sub>2</sub>(g) coté captage était maintenu à 1.08 L h<sup>-1</sup>.

La Fig.4.12 montre les courbes de concentration en CO<sub>2</sub> enregistrées en fonction du temps. Lorsque le débit d'azote est trop faible (0.65 L h<sup>-1</sup> et même 1.13 L h<sup>-1</sup>), le régime stationnaire correspond à une concentration en CO<sub>2</sub> excédant la gamme de mesure de la sonde. Le plateau n'est pas atteint et aucune perméance ne peut donc être calculée.

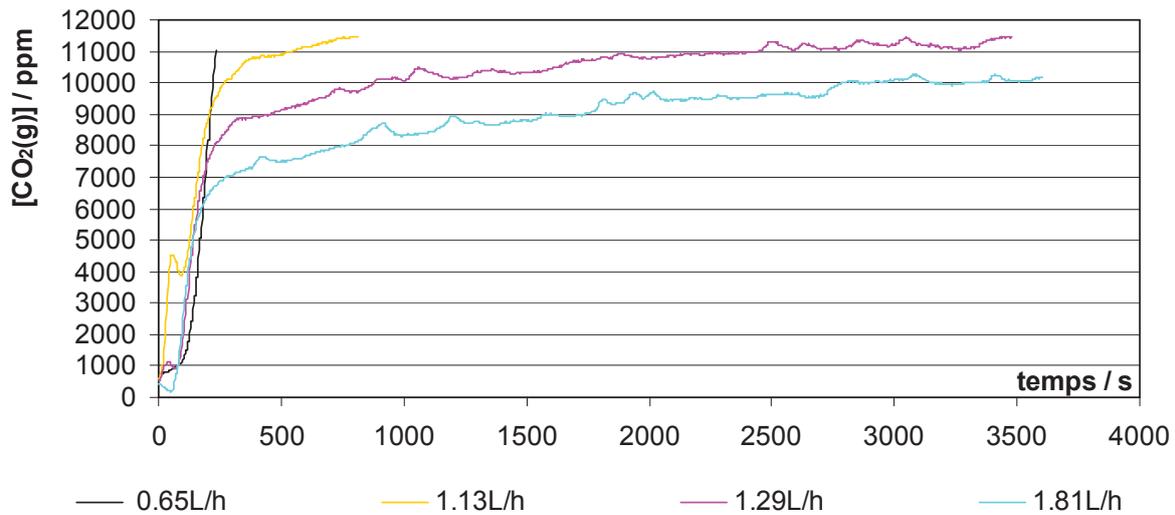


Figure.4.12: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, pour des débits d'azote différents coté relargage, et une membrane PVDF hydrophile (membrane GV), sans enzyme ni tampon

Le Tableau.4.4 regroupe les perméances calculées à partir des plateaux de la Fig.4.12, lorsqu'un plateau (régime stationnaire) a été atteint, ainsi que la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h. Il apparaît que la quantité de CaCO<sub>3</sub> précipitée est d'autant plus grande que le débit du gaz porteur est plus faible: une explication logique est que le temps de contact entre les molécules de CO<sub>2</sub> et l'eau est plus long dans ce cas. Il en ressort que la perméance augmente légèrement avec le débit d'azote, sans doute à cause d'un meilleur balayage de la couche limite de CO<sub>2</sub> transférée, en contact direct avec la membrane sandwich. De plus, la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée a diminué pour un débit d'azote plus élevé, en dépit d'une perméance plus élevée. Ceci est certainement dû à un temps de contact plus court entre le gaz relargué et la solution de CaCl<sub>2</sub>, quand le débit d'azote augmente. Il ressort de ces résultats qu'un débit d'azote unique devra être pris pour balayer un paramètre donné (ex: concentration d'enzyme).

Tableau.4.4: Perméance et masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h en fonction du débit d'azote coté relargage, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV), sans enzyme ni tampon

Débit d'azote (L h <sup>-1</sup> )	0.65	1.13	1.29	1.81
Plateau (ppm)	Non atteint	Non atteint	≈ 11500	≈ 10100
Perméance (mol/(m <sub>membrane</sub> <sup>2</sup> sPa))	-	-	4.08 10 <sup>-09</sup>	5.02 10 <sup>-09</sup>
Masse de CaCO <sub>3</sub> précipitée en 1 h (mg)	80.7	65.2	33.2	12.8

#### 4.2.2.2 Résultats des campagnes de balayage de paramètres

##### a. Influence de l'enzyme, en l'absence de tampon

Les résultats de transfert de CO<sub>2</sub> en régime permanent sous un débit de CO<sub>2</sub>(g) de 1.08 L h<sup>-1</sup> coté captage et débit d'azote de 1.81 L h<sup>-1</sup> coté relargage sont pratiquement les mêmes sans enzyme et avec 3 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, mais sans tampon (Fig.4.13).

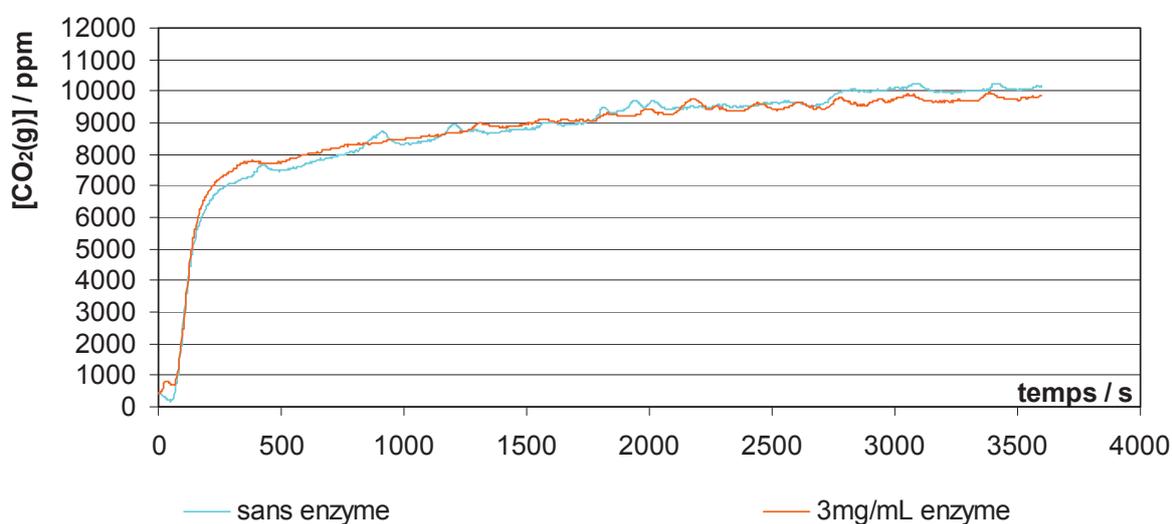


Figure.4.13: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, sous un balayage de 1.81 L h<sup>-1</sup> d'azote coté relargage et une membrane PVDF hydrophile (membrane GV), sans enzyme ou avec 3 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, sans tampon

Les perméances déduites des régimes quasi stationnaires (plateaux) sont très proches, respectivement de  $5.0 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  sans enzyme (plateau d'environ 10100 ppm) et de  $4.9 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  avec  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme (plateau d'environ 9850 ppm). Par contre les masses de  $\text{CaCO}_3$  déposées en 1 h était assez différentes, respectivement 12.8 mg et 34.3 mg sans et avec enzyme. Bien que cette masse ait souvent donné une variation cohérente avec les perméances, dans ce qui suit, l'incertitude sur cette mesure semble néanmoins importante, surtout quand la masse est relativement faible, comme c'est présentement le cas.

### b. Influence des enzymes en présence d'un tampon

Pour un tampon phosphate à  $0.1 \text{ M}$  et  $\text{pH} = 8.17$  et des concentrations croissantes en enzyme, les résultats de transfert de  $\text{CO}_2$  en régime permanent sous un débit de  $\text{CO}_2(\text{g})$  de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$ , sont présentés à la Fig.4.14.

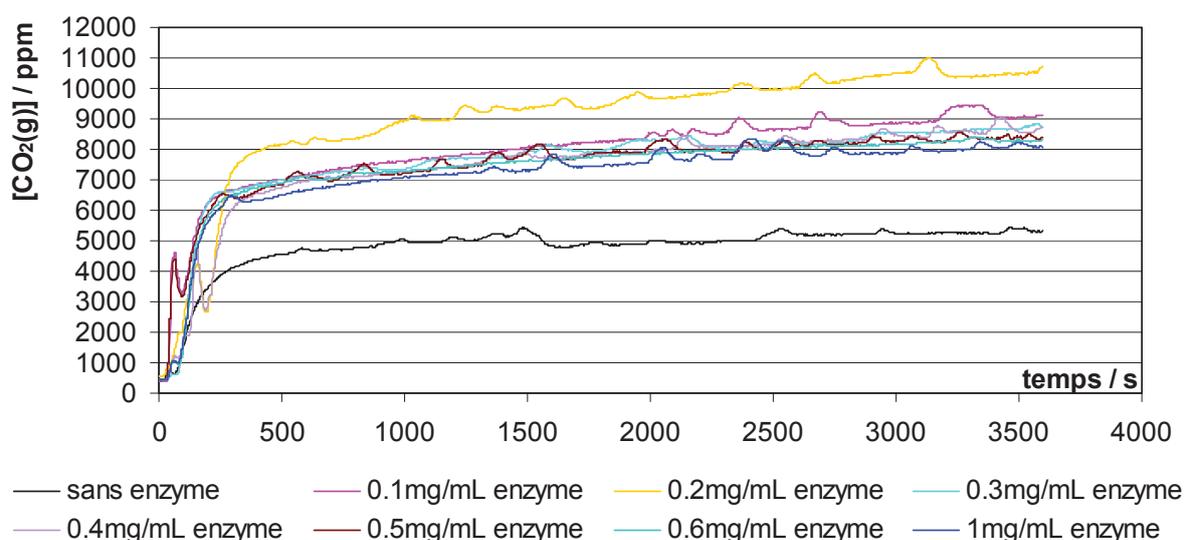


Figure.4.14: Evolution de la concentration en  $\text{CO}_2$  dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon phosphate à  $0.1 \text{ M}$  et  $\text{pH} = 8.17$ , sous un balayage d'azote coté relargage de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$

Les résultats équivalents obtenus avec un tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87 sont présentés Fig.4.15. Un plateau où la concentration en CO<sub>2</sub> était constante, a bien été atteint pour toutes les concentrations en enzymes. Les concentrations en CO<sub>2</sub> permettant de calculer les perméances ont été déterminées en faisant la moyenne des valeurs enregistrées durant les 100 dernières secondes.

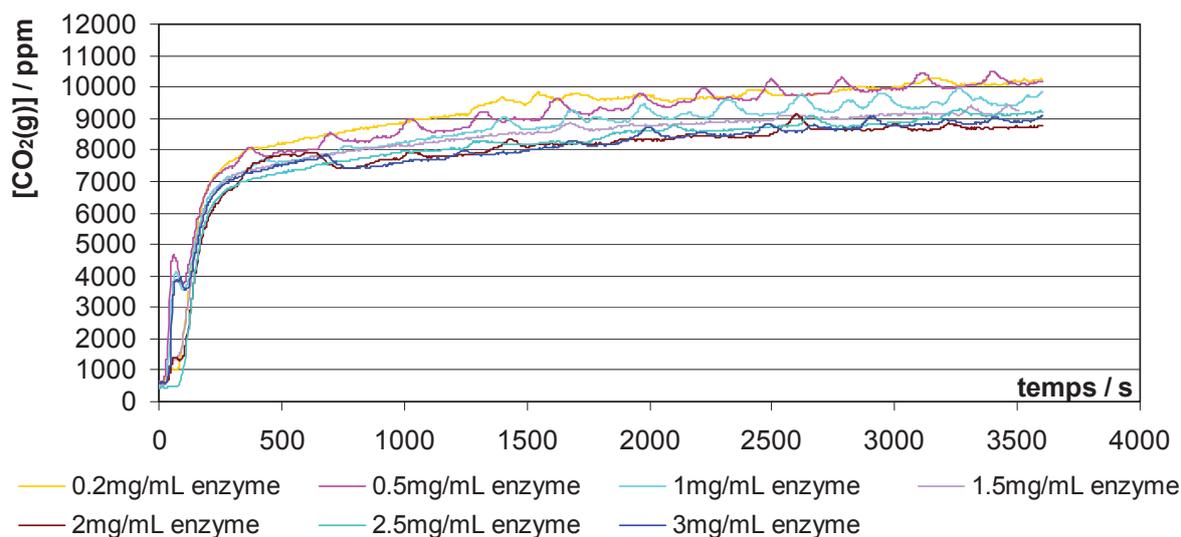


Figure.4.15: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, sous un balayage de 1.81 L h<sup>-1</sup> d'azote pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV), pour des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87

La Fig.4.16 regroupe les perméances déduites des Fig.4.14 et 4.15 pour les deux tampons 0.1 M de nature différente, ainsi que les masses de CaCO<sub>3</sub> précipitées en 1 h. Les deux séries de résultats sont concordantes et indiquent l'existence d'une concentration optimale d'enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>.

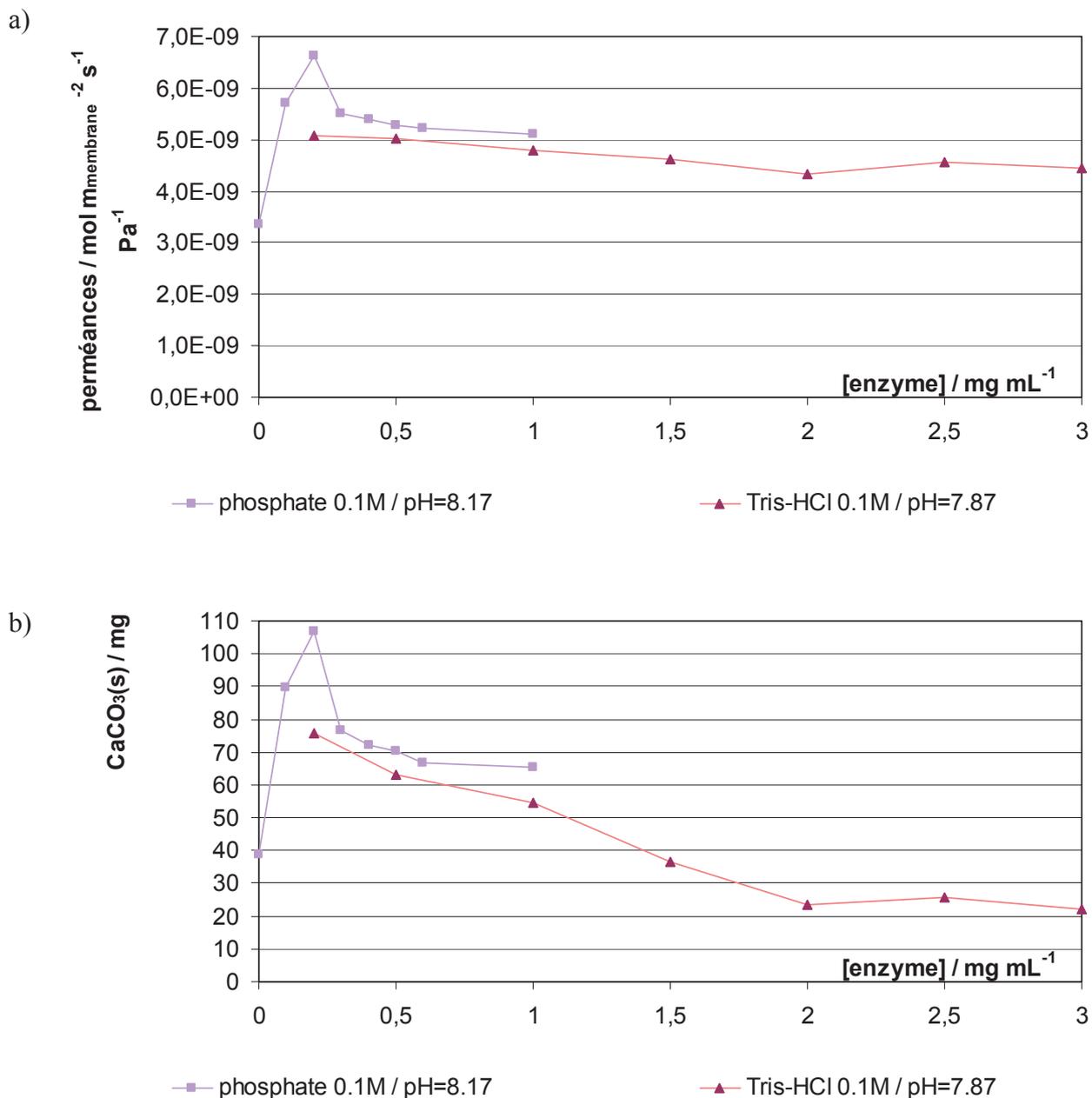


Figure.4.16: (a) Perméances déduites des Fig.4.14 (tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17) et 4.15 (tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87) et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h, pour des concentrations croissantes en enzyme

Les résultats montrent comme pour les deux tampons une décroissance de l'activité lorsque la concentration en enzyme croît à partir de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> avec un bon accord qualitatif entre les perméances et les masses de CaCO<sub>3</sub> précipitées. Les perméances sont par ailleurs légèrement inférieures avec le tampon Tris-HCl 0.1 M qu'avec le tampon phosphate 0.1 M.

Dans un tampon phosphate à 1 M et  $pH = 7.93$ , sous un débit d'azote de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$  coté relargage, les résultats sont présentés Fig.4.17.

La Fig.4.18 montre que les perméances déduites de la Fig.4.17 et les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipitées en 1 h fournissent des résultats tout à fait concordants. Dans ce cas, une concentration optimale d'enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  a également été observée. Les perméances ont des valeurs similaires à celles obtenues avec le tampon phosphate 0.1 M, pour une concentration en enzyme donnée.

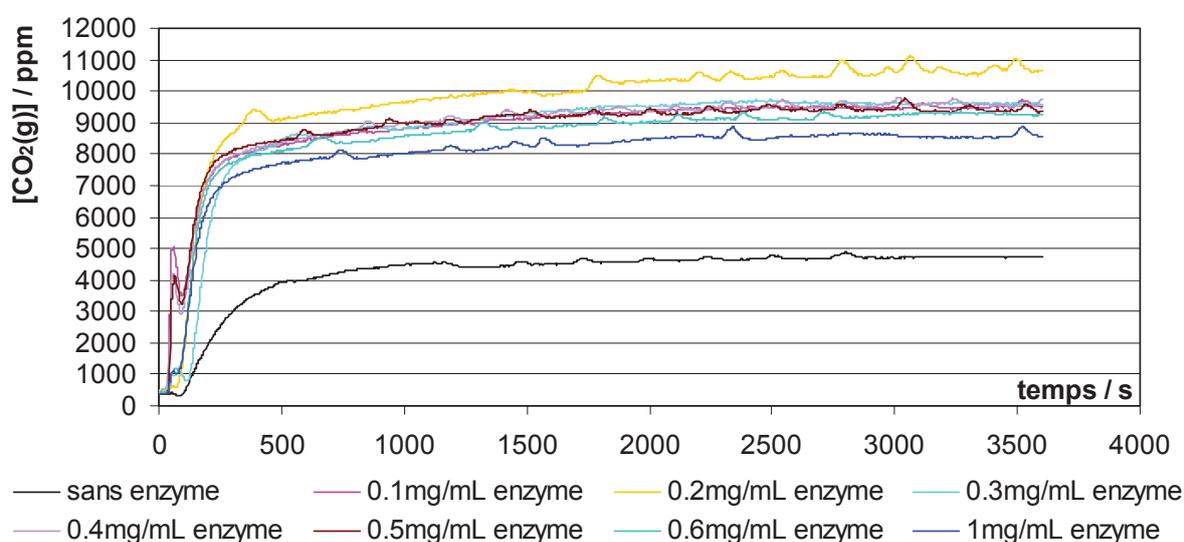


Fig.4.17: Evolution de la concentration en  $\text{CO}_2$  dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon phosphate à 1 M et  $pH = 7.93$ , sous un balayage d'azote coté relargage de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$

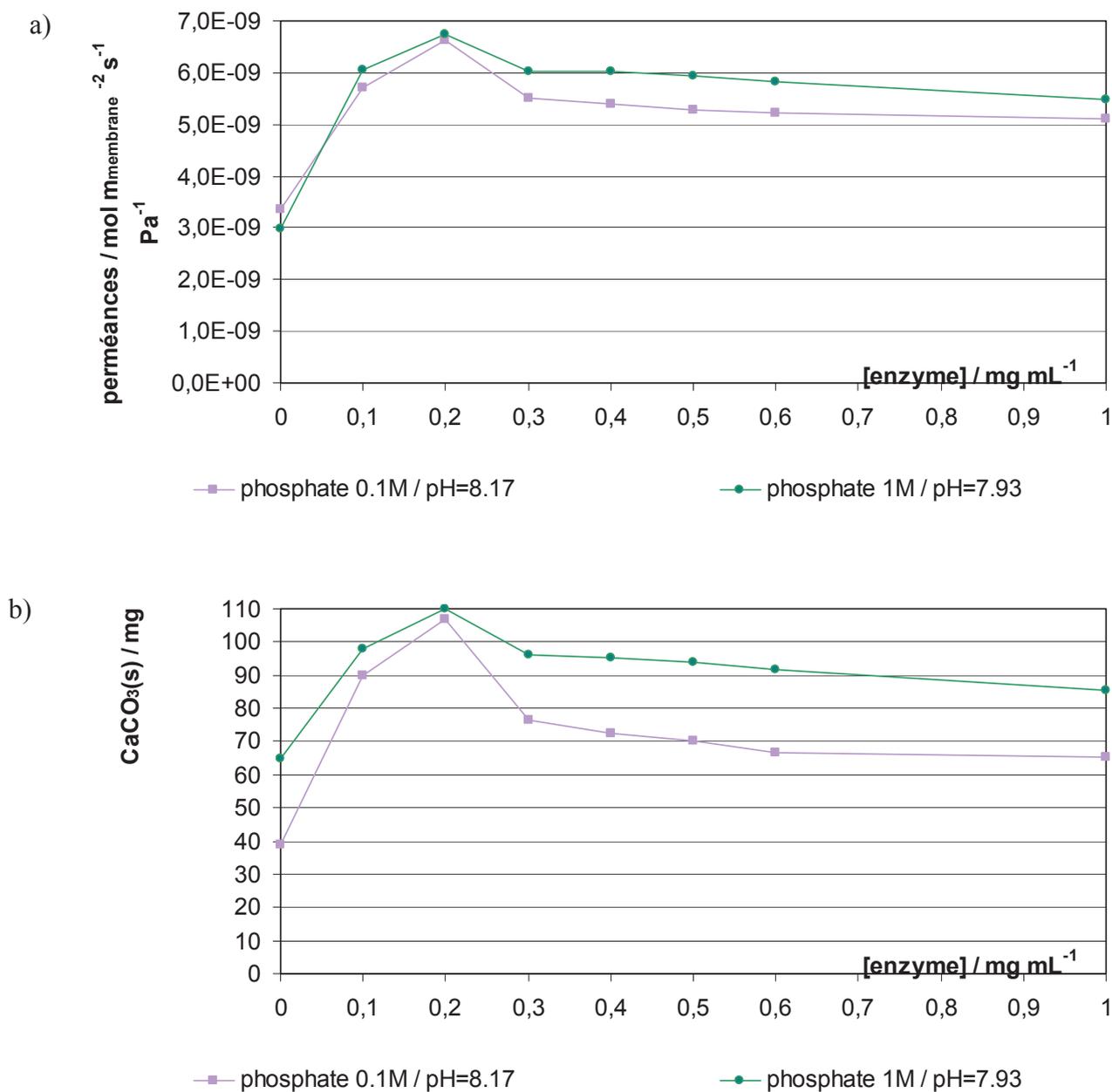


Fig.4.18: (a) Perméances déduites de la Fig.4.17 (tampon phosphate 1 M et pH = 7.93) et de la Fig.4.14 (tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17), et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h pour des concentrations croissantes en enzyme

### c. Essai d'un type de membrane fine à base de nylon tissé

Il s'agit d'une membrane en filet de Nylon « NY20 » de chez Millipore. Comme les membranes hydrophiles précédentes, celle-ci a été trempée pendant 45 min dans 4 mL de tampon phosphate (0.1 M / pH initial = 8.17), sans enzyme ou avec une concentration de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, puis placée en sandwich entre deux membranes hydrophobes à base de PVDF sèches (membranes GVHP). Comme précédemment, la membrane sandwich a été testée sous un débit de captage de CO<sub>2</sub>(g) de 1.08 L h<sup>-1</sup> et un balayage d'azote de 2.29 L h<sup>-1</sup> coté relargage. La Fig.4.19 montre que même sous ce débit d'azote, la concentration de CO<sub>2</sub> relargué avec enzyme a atteint la limite supérieure de détection de la sonde à infrarouge et qu'avec enzyme, elle l'excède très rapidement. Toutefois les expériences n'ont pas été reprises avec ce tampon dans ces conditions, en raison des résultats meilleurs obtenus dans ce qui suit avec d'autres conditions.

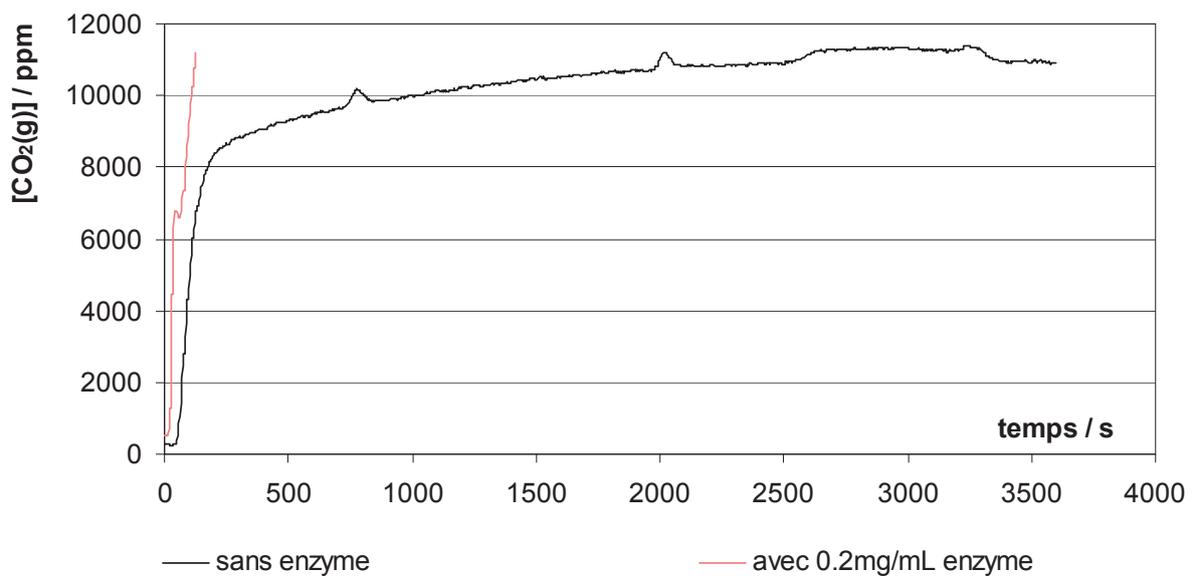


Figure.4.19: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane en nylon hydrophile (membrane NY20), avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme ou sans enzyme, dans un tampon phosphate à 0.1 M ; pH 8.17, sous un balayage d'azote coté relargage de 2.29 L h<sup>-1</sup>

La Fig.4.19 permet de calculer une perméance d'environ  $6.9 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  sans enzyme, aucun calcul n'étant faisable avec l'enzyme. Les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipitées en 1 h dans ce cas étaient respectivement de 62.4 et 90 mg.

### **4.3. Résultats obtenus sur les membranes liquides et un gaz à 10 % $\text{CO}_2$ - 90 % $\text{N}_2$ côté captage**

Un gaz à 10 % de  $\text{CO}_2$  est plus représentatif d'une fumée industrielle. Les études précédentes ont donc été reprises en remplaçant la bouteille de  $\text{CO}_2$  pur par une bouteille à 10 % de  $\text{CO}_2$  et 90 % de  $\text{N}_2$  de chez Linde, côté captage. Par ailleurs elles ont été limitées aux systèmes sandwich, constitués d'une membrane hydrophile à base de PVDF (membrane GV) ou de membranes en nylon tissé (NY20 ou NY60) (voir sections 4.3.2 et 4.3.3) imprégnée d'un milieu aqueux avec ou sans enzyme, placée entre deux membranes PVDF hydrophobes sèches (GVHP). Les mesures expérimentales ont concerné la concentration en  $\text{CO}_2$  mesurée avec la sonde à infrarouge ainsi que la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée en 1 h, côté relargage. Dans ces expériences, la précipitation était effectuée dans le ballon contenant une solution de  $\text{CaCl}_2$  selon la méthode décrite section 3.5.3.

#### **4.3.1. Influence d'un tampon et de la concentration en enzyme**

*Dans un tampon phosphate à 0.1 M et  $\text{pH} = 8.17$ , pour un débit de gaz de captage à 10 % de  $\text{CO}_2$  de 1.08 L/h et un débit de balayage d'azote de 2.29 L/h, les résultats sur l'évolution de la concentration en  $\text{CO}_2$  sont regroupés à la Fig.4.20, les perméances déduites de la concentration en régime stationnaire et la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée en 1 h sont respectivement sur la Fig.4.21a et Fig.4.21.b.*

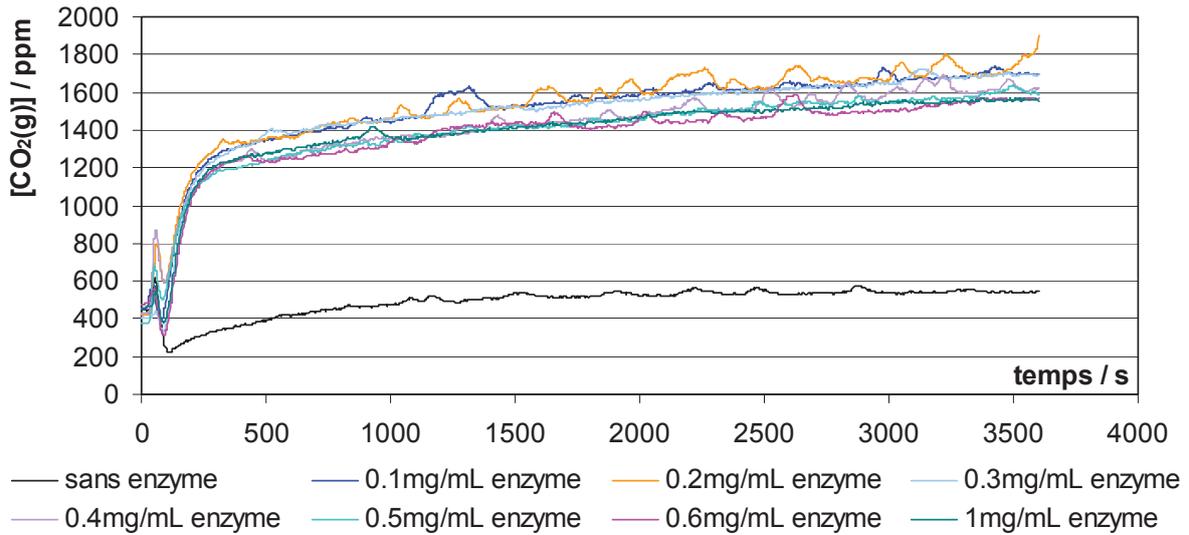


Figure.4.20: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17, sous un débit de 1.08 L h<sup>-1</sup> de gaz à 10 % de CO<sub>2</sub> coté captage et un débit d'azote de 2.29 L h<sup>-1</sup> coté relargage

Il apparaît que les perméances sont plus élevées par un facteur de l'ordre de 10, par rapport à du CO<sub>2</sub> pur, ce qui est dû à un pH moyen se stabilisant à une valeur plus élevée à l'intérieur de la membrane hydrophile, conformément aux prévisions (voir section 4.1.3). Les mesures de perméances et masses de CaCO<sub>3</sub> précipité sont concordantes en ce qui concerne l'effet de la concentration en enzyme: elles indiquent encore une concentration optimale d'enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>, identique pour un gaz à capter à 100 % ou à 10 % de CO<sub>2</sub>. Toutefois, même si la perméance est plus élevée pour le gaz à 10 % de CO<sub>2</sub>, le débit absolu de CO<sub>2</sub> traversant la membrane est plus élevé pour un gaz à capter constitué de CO<sub>2</sub> pur, comme le montre la masse de CaCO<sub>3</sub> précipité.

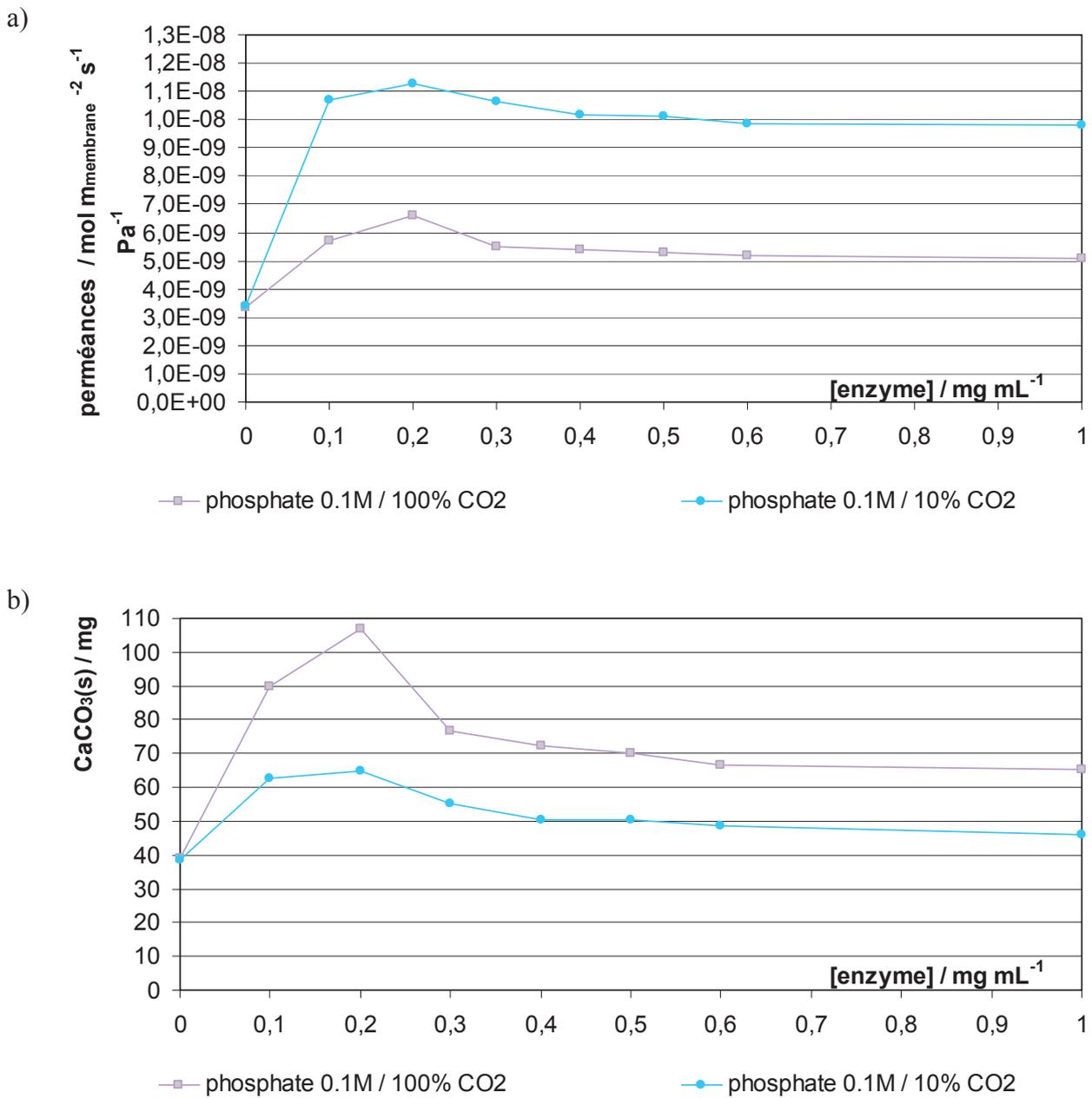


Figure.4.21: (a) Perméances déduites de la Fig.4.20 (gaz de captage à 10 % de CO<sub>2</sub>) et de la Fig.4.14 (gaz de captage 100 % CO<sub>2</sub>) pour tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17 et débit d'azote de 2.29 L h<sup>-1</sup>, et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h pour des concentrations croissantes en enzyme

Dans un tampon phosphate à 1 M et pH ≈ 8 (7.93), les résultats équivalents sont présentés Fig.4.22 et Fig.4.23. Les résultats de masse de CaCO<sub>3</sub> précipité et de perméance sont toujours cohérents entre eux et confirment l'existence de cette concentration optimale

d'enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . La perméance est sensiblement supérieure à celle déterminée dans le tampon  $0.1 \text{ M}$  précédent.

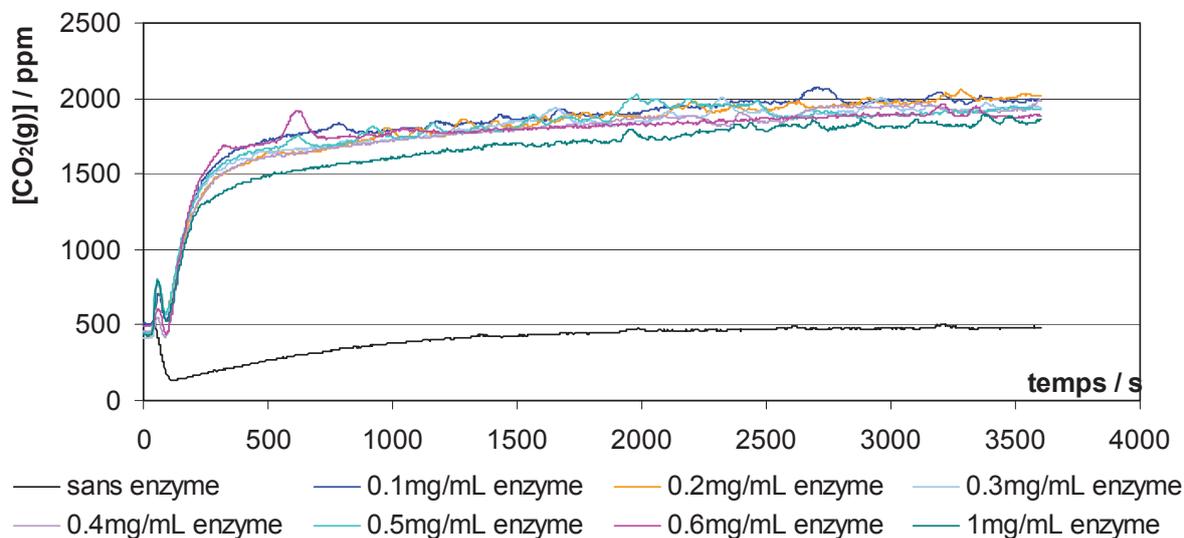


Figure.4.22: Evolution de la concentration en  $\text{CO}_2$  dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon phosphate à  $1 \text{ M}$  et  $\text{pH} = 7.93$ , sous un débit de  $1.08 \text{ L h}^{-1}$  de gaz à  $10 \%$  de  $\text{CO}_2$  coté captage et un débit d'azote de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$  coté relargage

Comme précédemment, pour des tampons phosphates de molarité  $0.1 \text{ M}$ , la concentration optimale d'enzyme se situe à environ  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ , quelque soit le pourcentage en  $\text{CO}_2$  du gaz à capter. La perméance est plus élevée pour le gaz à  $10 \%$  de  $\text{CO}_2$  que pour celui à  $100 \%$  mais, d'après les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipité, c'est l'inverse en ce qui concerne le débit absolu de  $\text{CO}_2$  ayant traversé la membrane. La perméance est ici légèrement supérieure dans le tampon  $1 \text{ M}$  que dans le tampon  $0.1 \text{ M}$ .

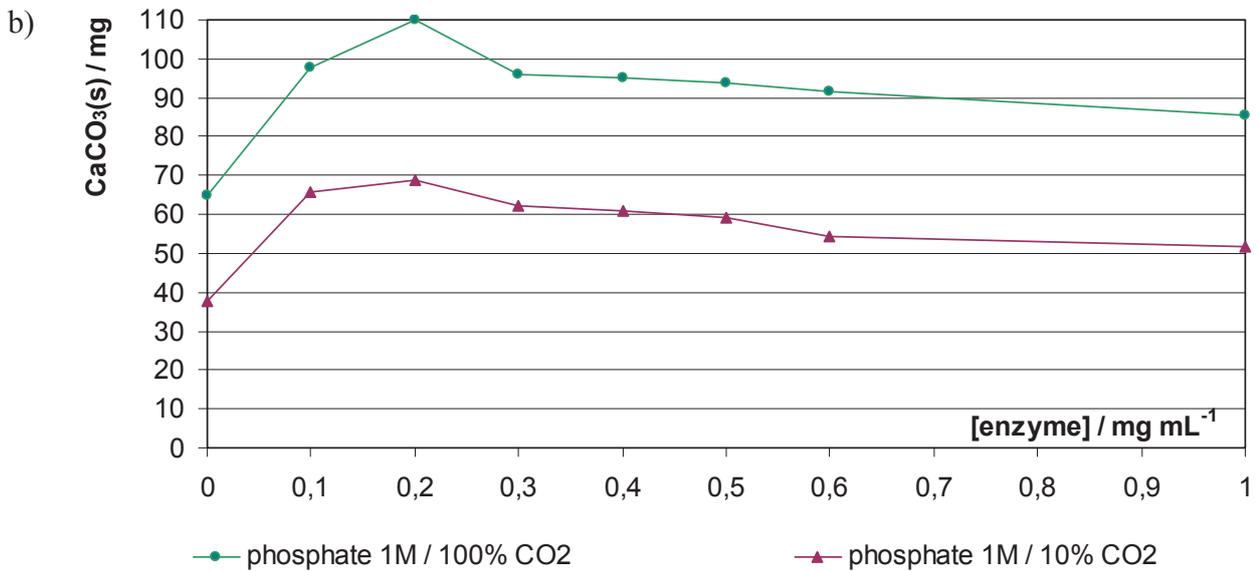
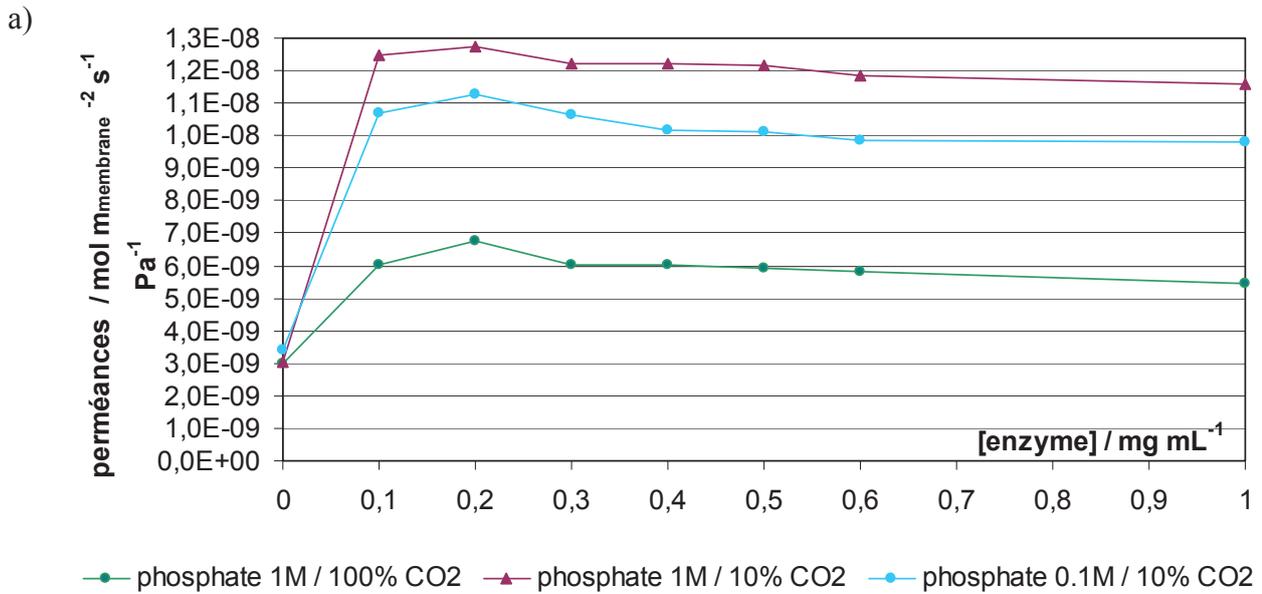


Figure.4.23: (a) Perméances déduites de la Fig.4.22 (gaz de captage à 10 % de CO<sub>2</sub>), de la Fig.4.17 (gaz de captage 100 % CO<sub>2</sub>) pour tampon phosphate à 1 M et pH = 7.93 et un débit d'azote de 2.29 L h<sup>-1</sup> et de la Fig.4.20 (gaz de captage 10 % CO<sub>2</sub>) pour tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17, et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h pour des concentrations croissantes en enzyme, et une membrane PVDF hydrophile (membrane GV)

Dans un tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87, les résultats de captage (Fig.4.24) conduisent à une perméance nettement plus faible que dans le tampon 0.1 M phosphate équivalent, bien que présentant toujours un maximum pour 0.2 mg mL<sup>-1</sup> (Fig.4.25).

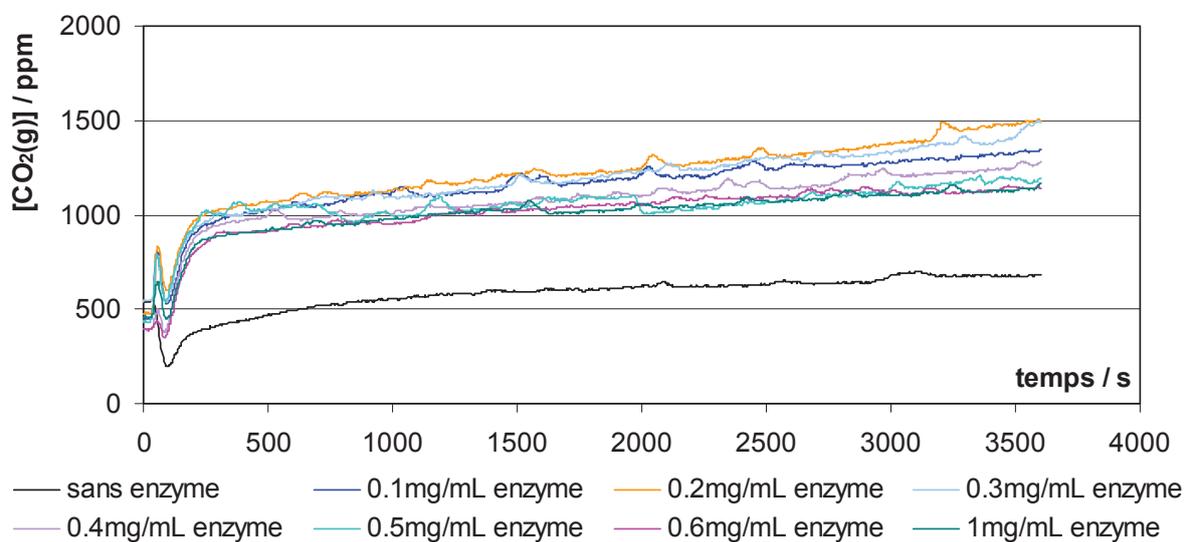


Figure.4.24: Evolution de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans un tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87, sous un débit de 1.08 L h<sup>-1</sup> de gaz à 10 % de CO<sub>2</sub> coté captage et un débit d'azote de 2.29 L h<sup>-1</sup> coté relargage

Avec des tampons de molarité 0.1 M et le présent gaz à capter à 10 % de CO<sub>2</sub>, la perméance est également sensiblement plus élevée pour le tampon phosphate, que pour le tampon Tris-HCl (Fig.4.25a), comme nous l'avions déjà observé pour un gaz à capter à 100 % de CO<sub>2</sub> (Fig.4.16).

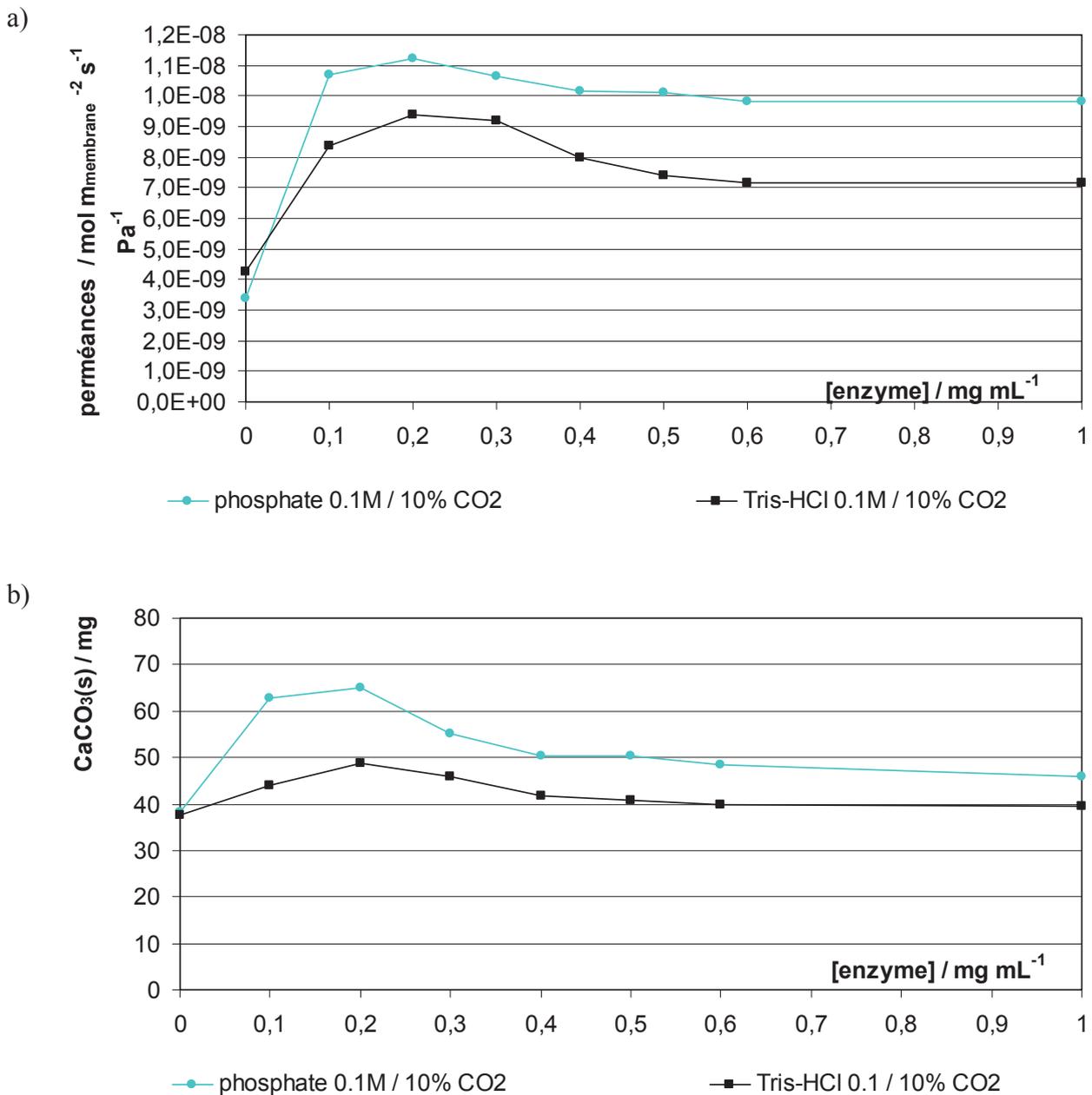


Figure.4.25: (a) Perméances déduites de la Fig.4.24 (tampon Tris-HCl à 0.1 M et pH = 7.87) et de la Fig.4.18 (tampon phosphate à 0.1 M et pH = 8.17) pour un gaz à 10 % de CO<sub>2</sub>, et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h pour des concentrations croissantes en enzyme

Lorsqu'une solution NaHCO<sub>3</sub> à 1 M et pH = 8.05 est utilisée, on observe dans un 1<sup>er</sup> temps un équilibrage de la membrane liquide qui se traduit par un pic de reconversion des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en molécules CO<sub>2</sub>(g) (Fig.4.26). Puis, dans un 2<sup>ème</sup> temps, la membrane se comporte comme précédemment en tendant vers un régime permanent de transfert de CO<sub>2</sub>.

Dans cette solution  $\text{NaHCO}_3$ , l'existence d'une concentration optimale d'enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  est également toujours observée (Fig.4.27). La perméance est surtout plus élevée que dans les tampons précédents, puisqu'elle passe par un maximum de  $2.8 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  Fig.4.29, au lieu de  $9.4 \cdot 10^{-9}$  à  $1.3 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  pour un tampon phosphate 1 M précédent.

Ce dernier résultat confirme celui de BaO et Trachtenberg <sup>1</sup>, et sera le principal tampon retenu pour les membranes en silice sol-gel (Chapitre 5).

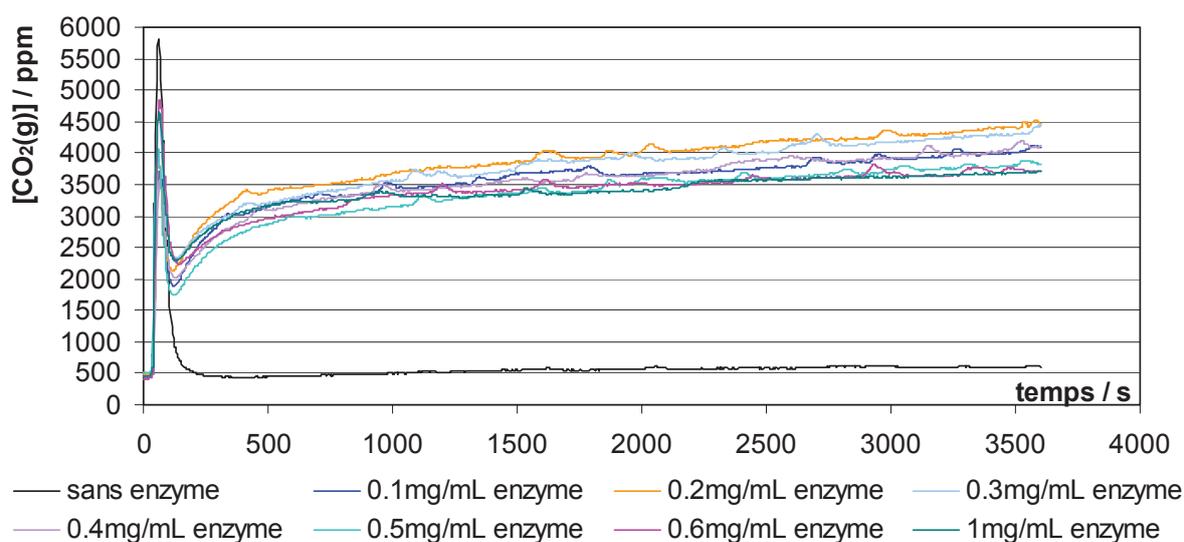


Figure.4.26: Evolution de la concentration en  $\text{CO}_2$  dans le gaz relargué en fonction du temps, pour une membrane PVDF hydrophile (membrane GV) et des concentrations croissantes en enzyme, dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  à 1 M et  $\text{pH} = 8.05$ , sous un débit de  $1.08 \text{ L h}^{-1}$  de gaz à 10 % de  $\text{CO}_2$  coté captage et un débit d'azote de  $2.29 \text{ L h}^{-1}$  coté relargage

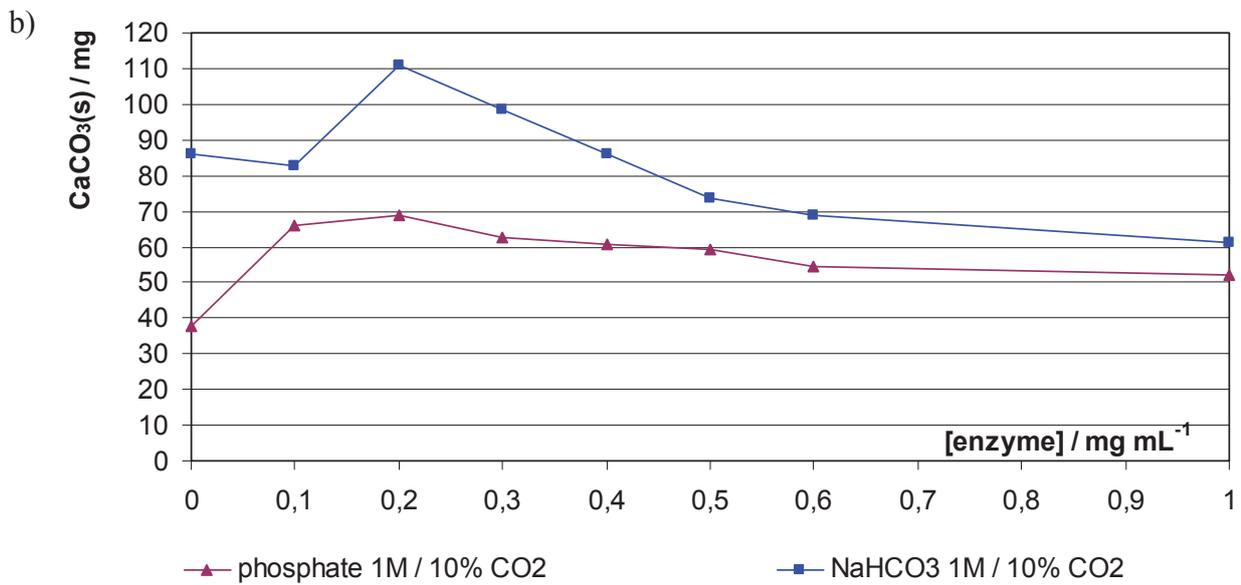
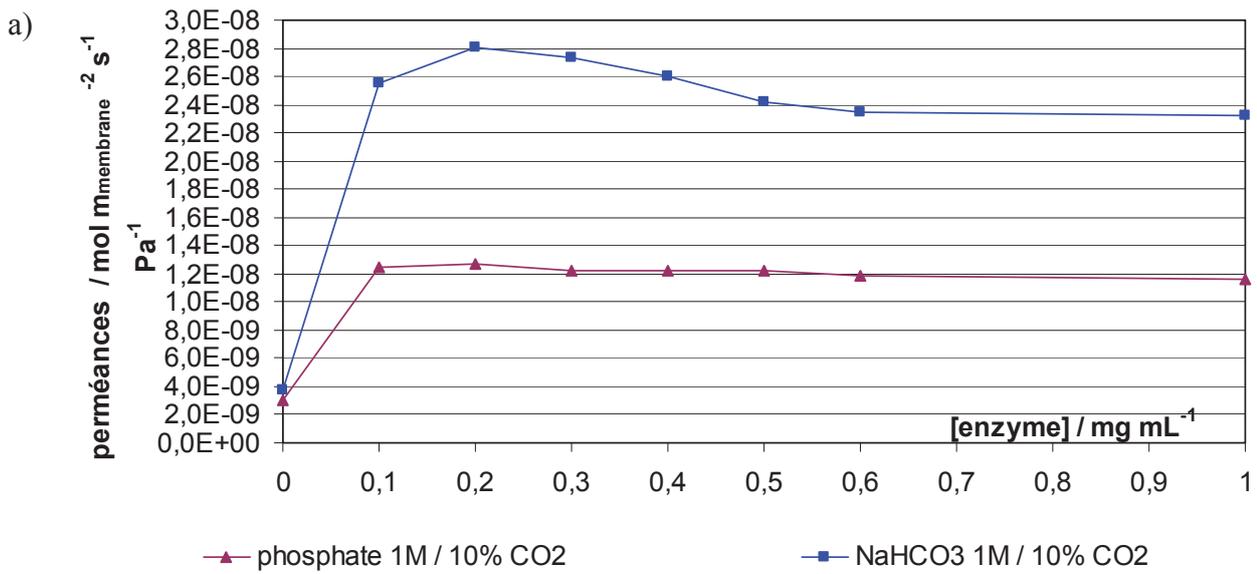


Figure.4.27: (a) Perméances déduites de la Fig.4.25 (solution NaHCO<sub>3</sub> à 1 M et pH = 8.05), Fig.4.20 (tampon phosphate à 1 M et pH = 7.93) et (b) masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h pour des concentrations croissantes en enzyme et une membrane PVDF hydrophile (membrane GV)

### 4.3.2. Comportement d'une membrane fine à base de nylon tissé NY20

Cette membrane a été testée en sandwich entre deux membranes hydrophobes en PVDF, pour une concentration en enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate 0.1 M à pH = 8.17 mais également dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M à pH = 8.05. Dans ce cas, le débit de CO<sub>2</sub>(g) coté captage était toujours de 1.08 L h<sup>-1</sup> mais celui d'azote a été élevé à 3.14 L h<sup>-1</sup>, de façon à rester dans les gammes de concentration mesurables avec la sonde à infrarouge. La perméance est en effet nettement plus élevée en raison de la finesse de la membrane, les résultats de perméance et de masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h étant là aussi cohérents entre eux (Tableau.4.5). Sa perméance dans un tampon phosphate 0.1 M à pH = 8.17, est de 1.92 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>, supérieure à celle de la membrane hydrophile GV précédente, soit 1.13 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> d'après Fig.4.21. Ce résultat peut être attribué à une épaisseur plus mince, de l'ordre de 55 µm pour la membrane NY20, à comparer à 125 µm pour la membrane GV.

Tableau.4.5: Perméance et masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h, avec une membrane en nylon NY20 contenant un tampon phosphate 0.1 M pH = 8.17 ou une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M pH = 8.05

Concentration en enzyme (mg mL <sup>-1</sup> )	0		0.2	
	phosphate	NaHCO <sub>3</sub>	phosphate	NaHCO <sub>3</sub>
Perméance (mol/(m <sub>membrane</sub> <sup>2</sup> sPa))	7.89 10 <sup>-08</sup>	4.64 10 <sup>-09</sup>	1.92 10 <sup>-08</sup>	2.52 10 <sup>-08</sup>
Masse de CaCO <sub>3</sub> (s) précipitée en 1 h (mg)	48.2	21.2	86.1	93

### 4.3.3. Comportement d'une membrane fine à base de nylon tissé NY60

Cette membrane a été testée en sandwich entre deux membranes hydrophobes en PVDF, pour une concentration en enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup> dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M à

pH = 8.05. Dans ce cas, le débit de CO<sub>2</sub>(g) coté captage était toujours de 1.08 L h<sup>-1</sup> mais celui d'azote a été élevé à 3.14 L h<sup>-1</sup>, de façon à rester dans les gammes de concentration mesurables avec la sonde à infrarouge. La perméance est en effet nettement plus élevée en raison de la finesse de la membrane, les résultats de perméance et de masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h étant là aussi cohérents entre eux (Tableau.4.6). Sa perméance dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M à pH = 8.05, 3.39 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> est supérieure à celle de la membrane hydrophile GV précédente, soit 2.8 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> d'après Fig.4.27, ce qui peut être attribué à une épaisseur plus mince, de l'ordre de 50 µm pour la membrane NY60 et 125 µm pour la membrane GV. Elle est également nettement plus élevée que celle de la membrane NY20 (2.53 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> ; Tableau 4.5), ce qui peut être attribué à une porosité nettement plus élevée (porosité de 14 % pour la membrane NY20 et de 41 % pour la membrane NY60).

Tableau.4.6: Perméance et masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h, avec une membrane en nylon NY60 contenant une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M pH = 8.05

Concentration en enzyme (mg mL <sup>-1</sup> )	0	0.2
T (°C)	21	22
Perméance (mol/(m <sub>membrane</sub> <sup>2</sup> sPa))	6.09 10 <sup>-09</sup>	3.39 10 <sup>-08</sup>
Masse de CaCO <sub>3</sub> (s) précipitée en 1 h (mg)	26.4	95.4

#### 4.4. Conclusions du chapitre sur le captage du CO<sub>2</sub> par membrane fine liquide

Des études de captage de CO<sub>2</sub> sur membrane liquide fine, réalisée par imprégnation d'une membrane polymérique hydrophile par le milieu aqueux contenant l'enzyme, ont été menées avec succès.

La sonde infrarouge à CO<sub>2</sub> s'est avérée fournir des résultats reproductibles et, dans l'ensemble, la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h a donné une indication « qualitative »

concordante sur la performance relative de captage en fonction des paramètres étudiés. L'avantage de la masse de  $\text{CaCO}_3$ , par rapport à la perméance, est qu'elle donne une estimation du volume total de  $\text{CO}_2$  ayant traversé la membrane. Par contre le suivi des surpressions dues au passage du  $\text{CO}_2$  s'est avéré être délicat en raison de légères fuites difficiles à contrôler et ont été abandonnées.

Les études sans balayage d'azote, comme celles avec balayage d'azote coté relargage, ont toutes deux montré la nécessité d'ajouter un tampon au milieu aqueux, afin de maintenir son pH à une valeur supérieure au  $\text{pKa}_1$  (= 6.35) de 1<sup>ère</sup> déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ . Néanmoins, si aucun balayage par un gaz vecteur, ici l'azote, n'est effectué coté relargage, la vitesse de transfert du  $\text{CO}_2$  passe par un maximum en fonction du temps et finit par ralentir (Fig.4.6), car on tend vers un équilibre stable où la pression partielle de  $\text{CO}_2$  est identique des deux cotés de la membrane. Par contre, un régime permanent est rapidement atteint lorsqu'un gaz de balayage est utilisé. Ce dernier pourrait d'ailleurs être potentiellement remplacé par un vide partiel, contenant une pression résiduelle de vapeur d'eau pour éviter à la membrane liquide de sécher. De telles études constitueraient une étape suivante de développement d'un procédé enzymatique à membrane liquide fine. Mais la technique utilisée ici s'est avérée suffisante pour étudier des paramètres importants d'une membrane enzymatique.

Un de ces paramètres est la porosité de la membrane hydrophile contenant la solution enzymatique. Plus la porosité est grande, pour une épaisseur de membrane donnée, plus le transfert de  $\text{CO}_2$  est rapide (Fig.4.7 et Tableau.4.6 versus Tableau.4.5). Plus cette membrane est fine, plus le transfert est également rapide, ainsi la membrane en Nylon tissé NY60 d'environ  $50 \mu\text{m}$  d'épaisseur permet de réaliser un transfert de  $\text{CO}_2$  nettement plus rapide qu'une membrane en PVDF hydrophile d'épaisseur  $\approx 125 \mu\text{m}$  (section 4.3.3).

Un 2<sup>ème</sup> ensemble de paramètres concerne le tampon ; sa nature et sa molarité. Concernant le gaz de captage à base de  $\text{CO}_2$  pur, le tampon phosphate 0.1 M à  $\text{pH} \approx 8$  a montré un résultat légèrement supérieur au tampon Tris-HCl de même pH initial similaire et même molarité (Fig.4.16). Mais le tampon à base de  $\text{NaHCO}_3$  a été le plus efficace (Fig.4.27). Une explication probable est qu'il a déplacé l'équilibre de 1<sup>ère</sup> déprotonation de  $\text{CO}_2(\text{aq})$  vers un pH plus élevé, en raison d'une concentration en ions  $[\text{HCO}_3^-]$  maintenue à une valeur élevée par la nature tampon et équilibrée par des ions  $\text{Na}^+$ . La molarité du tampon est apparue très importante, ainsi dans notre cas une molarité de 1 M est plus efficace qu'une molarité de 0.1 M, avec les tampons phosphate, Tris-HCl et  $\text{NaHCO}_3$ , sans doute parce que la

concentration plus élevée en base [B] du tampon, permet de maintenir le pH à une valeur plus élevée.

Une grande différence a également été observée dans le transfert de CO<sub>2</sub> par la membrane liquide, entre un gaz de captage à base de CO<sub>2</sub> pur et un gaz de captage à base de mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 % de CO<sub>2</sub>. Dans le 1<sup>er</sup> cas (avec 100 % de CO<sub>2</sub>), la meilleure perméance observée pour une membrane hydrophile GV à base de PVDF, avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, était de 6.74 10<sup>-9</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> avec un tampon phosphate 1 M et à pH = 7.93 (Fig.4.23), pour un coefficient multiplicateur par rapport au même milieu liquide sans enzyme d'environ 2.3. Dans le 2<sup>ème</sup> cas (avec 10 % de CO<sub>2</sub>), la meilleure perméance, toujours avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme pour une membrane hydrophile GV à base de PVDF, était de 2.58 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> pour une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M et à pH = 8.05 (Fig.4.27), et un coefficient multiplicateur par rapport au même milieu liquide sans enzyme supérieur à 6.7.

Une pression partielle P(CO<sub>2</sub>) plus faible dans le gaz à capter, se traduit en effet certainement par un pH plus élevé en régime permanent dans la membrane liquide, en raison d'un déplacement de l'équilibre de 1<sup>ère</sup> déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq), comme cela a été présenté dans la section 4.1.

Pour un gaz de captage à 10 % de CO<sub>2</sub>, les meilleures perméances ont été observées pour les membranes en nylon tissé NY20 et NY60. Sa valeur est de 1.92 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> pour 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme et un tampon phosphate 0.1 M à pH = 8.17. Elle est de 3.39 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> pour une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M et à pH = 8.05. Ces valeurs sont tout à fait comparables en magnitude avec les meilleures perméances publiées auparavant pour des membranes de ce type <sup>4, 5</sup>. En effet, comme indiqué dans la section 4.1, Bao et Trachtenberg, ont obtenu une perméance d'environ 3 10<sup>-8</sup> mol m<sub>membrane</sub><sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> en utilisant 3 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, une solution NaHCO<sub>3</sub> (1 M) et 10 % de CO<sub>2</sub> et une zone d'alimentation membranaire d'environ 0.1885 m<sup>2</sup>, dans un système à base de fibres microporeuses <sup>1</sup>.

Enfin dans tous les cas, aussi bien avec des gaz de captage à 100 % qu'à 10 % de CO<sub>2</sub>, et quel que soit le tampon et la membrane, une perméance maximum a été observée pour une concentration en enzyme de 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. Ce résultat est donc imputable uniquement au comportement de l'enzyme. Il pourrait être dû à une agrégation de l'enzyme au delà d'une certaine concentration, peut-être favorisée par la présence des ions du tampon. Il pourrait également y avoir un effet cinétique d'inhibition compétitive, par exemple par le CO<sub>2</sub>(aq), les

ions  $\text{HCO}_3^-$ , ou les ions du tampon. Il sera intéressant de voir si un extremum existe pour la même concentration enzymatique dans le cas d'une membrane  $\text{SiO}_2$  synthétisée par procédé sol-gel.

#### 4.5. Références bibliographiques

[1] Bao L., Trachtenberg M.C., (2006). "Facilitated transport of  $\text{CO}_2$  across a liquid membrane: comparing enzyme, amine, and alkaline", Journal of Membrane Science **280**: 330-334

[2] Ward W.J., Robb W.L., (1976). "Carbon dioxide–oxygen separation: facilitated transport of carbon dioxide across a liquid film", Science **156**: 1481–1484.

[3] Suchdeo S.R., Schultz J.S., (1974). "Mass transfer of  $\text{CO}_2$  across membranes: facilitation in the presence of bicarbonate ion and the enzyme carbonic anhydrase", Biochimica et Biophysica Acta **352**: 412–440.

[4] Ge J. Cowan R.M., Tu C., McGregor M.L., Trachtenberg M.C., (2002). "Enzyme-based  $\text{CO}_2$  capture for advanced life support", Life support and biosphere Science **8**: 181-189

[5] Trachtenberg M.C., Flue gas  $\text{CO}_2$  capture by means of a biomimetic facilitated transport membrane [en ligne]. In: Site de Carbozyme. [http://www.carbozyme.us/pub\\_abstracts.shtml](http://www.carbozyme.us/pub_abstracts.shtml) (Page consultée le 06-10-2008)



## **CHAPITRE 5**

# CHAPITRE 5: CAPTAGE DU CO<sub>2</sub> PAR MEMBRANES HYBRIDES POLYMERE - SILICE SOL-GEL

## 5.1. Description des études effectuées

Les membranes sol-gel étudiées dans cette partie ont été adaptées des membranes liquides précédentes. Afin de réaliser de fines épaisseurs sol-gel constantes, les membranes polymériques hydrophiles précédentes ont, en effet, été imprégnées d'un sol ou un gel de silice, avec ou sans enzyme, et placées en sandwich entre deux membranes hydrophobes du type GVHP et positionnées dans la cellule de captage.

Dans une 1<sup>ère</sup> série d'expériences, le sol de silice imprégnant la membrane hydrophile a d'abord été gélifié, puis séché. Puis la membrane a été imprégnée d'une solution aqueuse avec ou sans enzyme, avant d'être placée dans la cellule de captage. Ce cadre a nécessité une étude de l'adsorption de l'enzyme sur la membrane sol-gel.

Dans une 2<sup>ème</sup> série d'expériences, le sandwich a directement été réalisé avec une membrane hydrophile imprégnée d'un sol de silice liquide, avec ou sans enzyme. La gélification s'est donc produite durant le captage. Ce point nous a amené à étudier l'influence de l'enzyme sur la gélification de la silice.

La silice a par ailleurs un point isoélectrique à  $\text{pH} \approx 2.5$  à 3. Nous avons donc également cherché à examiner une modification du solide qui modifie cet environnement solide. Des ions calcium étant à priori susceptible d'apporter un environnement fortement basique, en faveur du déplacement de l'équilibre d'hydratation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$  vers des ions  $\text{HCO}_3^-$ , voire  $\text{CO}_3^{2-}$ , nous avons dans une 3<sup>ème</sup> partie étudié l'influence d'un dépôt de  $\text{CaCO}_3$  solide, soit directement dans la membrane polymérique hydrophile, soit dans une membrane silice sol-gel, le dépôt de  $\text{CaCO}_3$  étant réalisé par dissolution de  $\text{CaCl}_2$  dans le milieu aqueux de la membrane et carbonatation par le  $\text{CO}_2$  capté.

Après une revue bibliographique des travaux d'immobilisation sol-gel de l'anhydrase carbonique, les sections suivantes développent les résultats obtenus dans ces 3 volets.

## 5.2. Les Procédés sol-gel et l'immobilisation d'anhydrase carbonique

### 5.2.1. Les procédés sol-gel

#### a. Bref historique <sup>1 à 12</sup>

Les procédés « sol-gel » désignent une méthode de synthèse de céramiques à une température ambiante ou proche de la température ambiante, à partir de composés chimiques appelés précurseurs chimiques, pouvant produire des solides inorganiques cristallins ou vitreux de pureté en général plus grande et d'homogénéité meilleure que les mêmes composés solides obtenus par des procédés conventionnels à haute température. Les précurseurs chimiques les plus utilisés, sont les alcoxydes de formule générale  $M(OR)_n$ , où M désigne un cation de valence n et R une chaîne alkyle. Les alcoxydes du silicium, ou alcoxysilanes sont des tétra-alcoxydes dont les plus utilisés sont le tétraméthoxysilane (TMOS) – précurseur utilisé dans cette thèse – ou le tétraéthoxysilane (TEOS).

Le premier gel de silice a été synthétisé par le chimiste Ebelmen en 1846, à partir d'un alcoxyde de silicium, lui même obtenu par réaction de  $SiCl_4$  avec l'éthanol <sup>2</sup>. Pendant près d'un siècle, ces nouveaux matériaux ne présentèrent toutefois qu'un intérêt purement scientifique. Il fallut attendre 1939, lors du dépôt du premier brevet sur la fabrication de rétroviseurs par la société Schott-Glaswerke, pour que les alcoxydes soient utilisés dans la préparation de films d'oxydes <sup>3</sup>.

Une percée scientifique importante s'est produite en ce qui concerne la nature très poreuse et ouverte du réseau solide constituant les matériaux appelés « gels », lorsque Flory s'est penché sur la cinétique de gélification. Cette étude concernait les gels organiques mais fut ensuite étendue aux gels inorganiques <sup>4</sup>. Le formalisme décrivant le phénomène de gélification a ensuite été développé dans le cadre des théories mathématiques de percolation, initiées par Hammersley <sup>5</sup> et applicables essentiellement aux gels polymériques de chimie organique, puis dans le cadre des théories d'agrégation limitée par la diffusion (DLA pour « Diffusion Limited Agregation ») initiées par Stanley <sup>7</sup>, applicables aux gels colloïdaux de chimie inorganique.

Depuis, de nombreuses nouvelles variétés de gels, en particulier des gels hybrides « organiques – inorganiques », sont obtenus par exemple par greffage de groupements fonctionnels organiques sur des précurseurs de silice, ou à partir de mélanges de précurseurs de diverses natures dont certains ligands du silicium sont purement organiques <sup>8 à 12</sup>.

b. **Définitions** <sup>3, 6, 13, 14</sup>

Dans les procédés sol-gel, une **solution** liquide de petits polymères (oligomères) plutôt linéaires, ou une **suspension colloïdale** de nanoparticules solides ou d'oligomères plutôt globulaires appelée **sol**, sont transformés en un réseau solide tridimensionnel continu mais très poreux appelé **gel**. Le réseau du gel est construit par liaison, via des réactions de condensation, entre les oligomères de la solution ou les particules colloïdales du sol, tels que décrit respectivement par les théories de percolation et DLA précédentes. C'est le phénomène de **gélification**, très différent du phénomène de **précipitation**. Alors que dans ce dernier phénomène, les particules solides se séparent du liquide par gravitation pour former un dépôt, dans la gélification la solution polymérique ou le sol prennent en masse, en conservant une apparence homogène en général transparente ou translucide, sans séparation en masse du liquide (Fig.5.1). Après gélification, le liquide de départ est entièrement contenu dans les pores du gel. On désigne par **gels polymériques** les gels issus de solutions polymériques et par **gels colloïdaux** ceux issus de sols. Mais dans la pratique, les gels de chimie inorganique sont toujours intermédiaires entre purement polymériques et colloïdaux, on désigne alors par gels polymériques ceux dont les particules formant le réseau solide ne sont pas réellement distinguables en microscopie électronique, en particulier pour la silice. Bien qu'il n'y ait pas de limite de taille précise, les nanoparticules d'une suspension colloïdale ont typiquement un diamètre compris entre 2 et 200 nm. Leur masse est alors suffisamment faible pour qu'elles puissent se disperser naturellement de manière homogène dans un liquide, par mouvement Brownien.

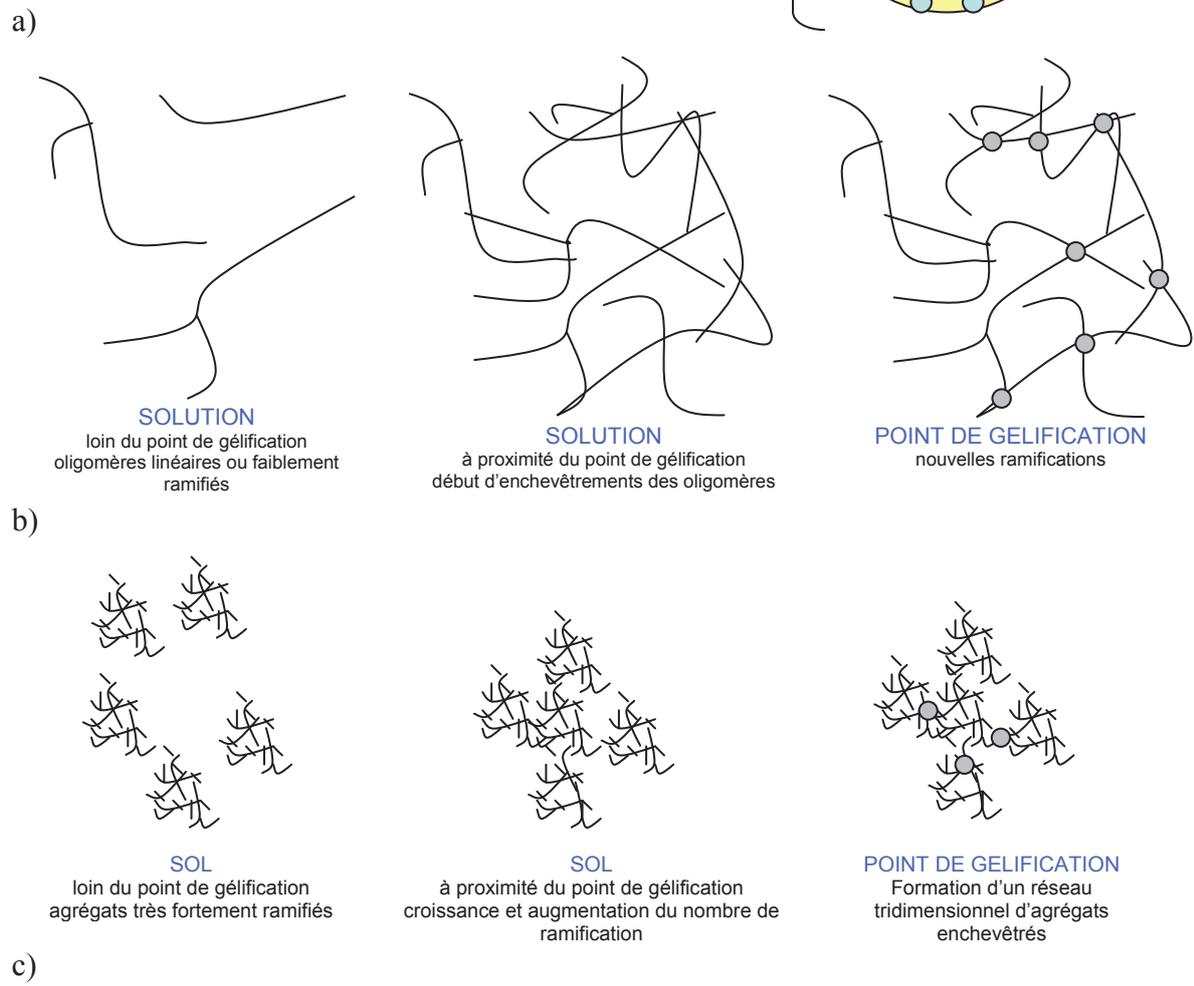
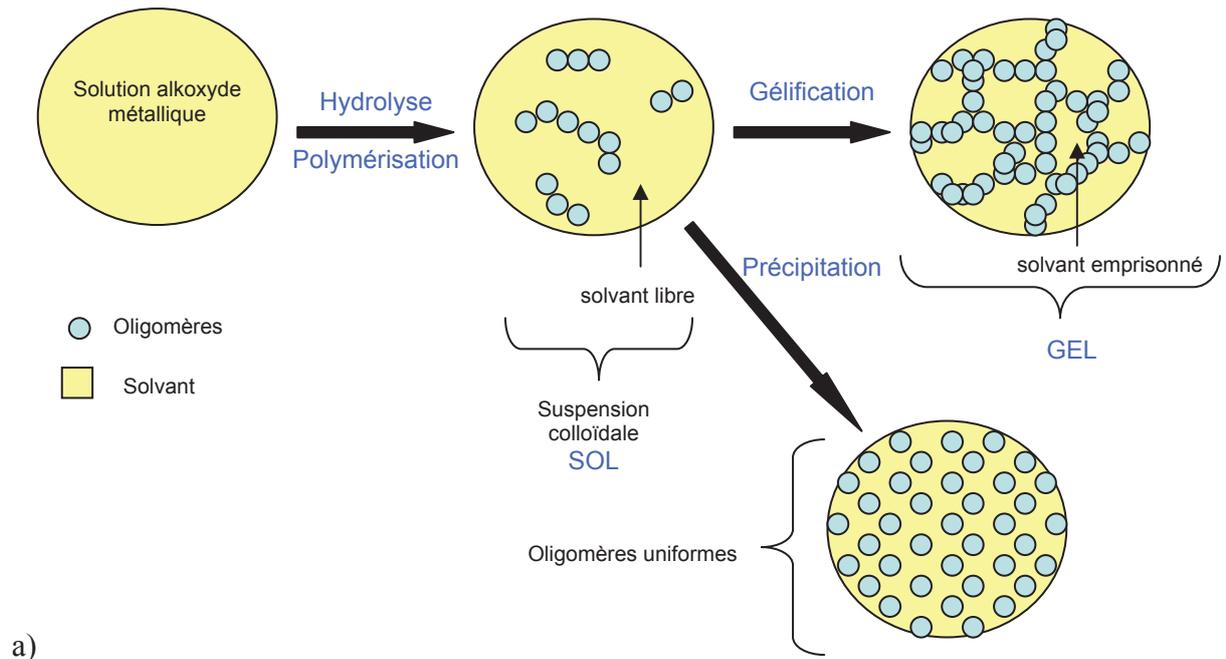


Figure 5.1: Schéma de la formation: (a) d'un gel colloïdal ; (b) d'un gel polymérique ; (c) d'un gel intermédiaire entre colloïdal et polymérique<sup>3,6</sup>

Les liaisons chimiques responsables de la cohésion du réseau du gel doivent permettre une cohésion mécanique du gel, lui conférant des propriétés élastiques, même si la résistance à rupture est faible. Mais elles peuvent être de nature très diverse: liaisons covalentes dans de nombreux gels de chimie organique, ou covalentes polaires dans de nombreux gels d'oxydes en particulier ceux de silice. Il existe donc plusieurs types de gels en fonction de la nature des liaisons mais aussi de la nature des unités constituant le réseau 3D et Flory en avait donné une 1<sup>ère</sup> classification en 4 catégories <sup>4, 15 à 17</sup>.

Lorsqu'il est conservé imprégné de son liquide de départ, un gel dit « humide » subit en général spontanément une évolution d'origine chimique lente, de type **synérèse**, ou de type **vieillissement**. Dans le premier cas, le gel rétrécit lentement en expulsant un peu de son liquide mais en conservant sa forme monolithique de départ, par exemple cylindrique s'il a été synthétisé dans un Becher, soit vieillissement. Dans le second cas, il ne rétrécit pas, mais les nanoparticules formant le réseau deviennent plus grossières ; les plus petites sont dissoutes et recondensées sur les plus grosses. Les surfaces des branches du réseau solide sont lissées. Pour de nombreuses applications, il est nécessaire de sécher le gel pour ne conserver que le réseau solide. Selon la manière dont le séchage est effectué, on distingue communément 2 types de gels secs: les **xérogels** et les **aérogels** (Fig.5.2).

Les xérogels sont obtenus par séchage du gel humide par évaporation, sous air ou sous vide. Les forces capillaires importantes qui prévalent lorsque le liquide est évacué par évaporation, induisent en général une contraction très importante du gel (ex: 70 % en volume ou plus), pour donner un solide très poreux mais dont la porosité est essentiellement de type « microporeuse » (taille des pores < 2 nm) <sup>87</sup>. Si l'évaporation est effectuée très lentement, le monolithe conserve sa forme de départ (ex: cylindrique), mais il se fracture souvent lorsque l'évaporation est trop rapide.

Le terme « aérogel » a été inventé par Kistler en 1932 <sup>18</sup>, pour désigner les gels secs où le liquide a pu être éliminé sans contraction (ou en pratique avec peu de contraction) du monolithe humide. Le liquide y est simplement remplacé par de l'air (ou du vide ou un autre gaz). Les pores d'un aérogel sont essentiellement dans le domaine mésoporeux (taille de 2 à 50 nm) ou macroporeux (tailles supérieures). Le record est constitué d'aérogels de silice où une proportion > 99 % du volume du monolithe est constituée d'un réseau poreux ouvert <sup>18</sup>. Kistler a pu atteindre de tels résultats en amenant le liquide contenu dans les pores du gel humide au delà de son point critique, ce qui en théorie permet d'éliminer les contraintes de capillarité puisqu'il n'y a plus de ménisques séparant le liquide du gaz à la sortie des pores du gel. Il existe maintenant d'autres techniques de « séchage à pression ambiante », permettant

d'obtenir des aérogels, en jouant sur la tension interfaciale entre le liquide et le solide constituant le gel humide.

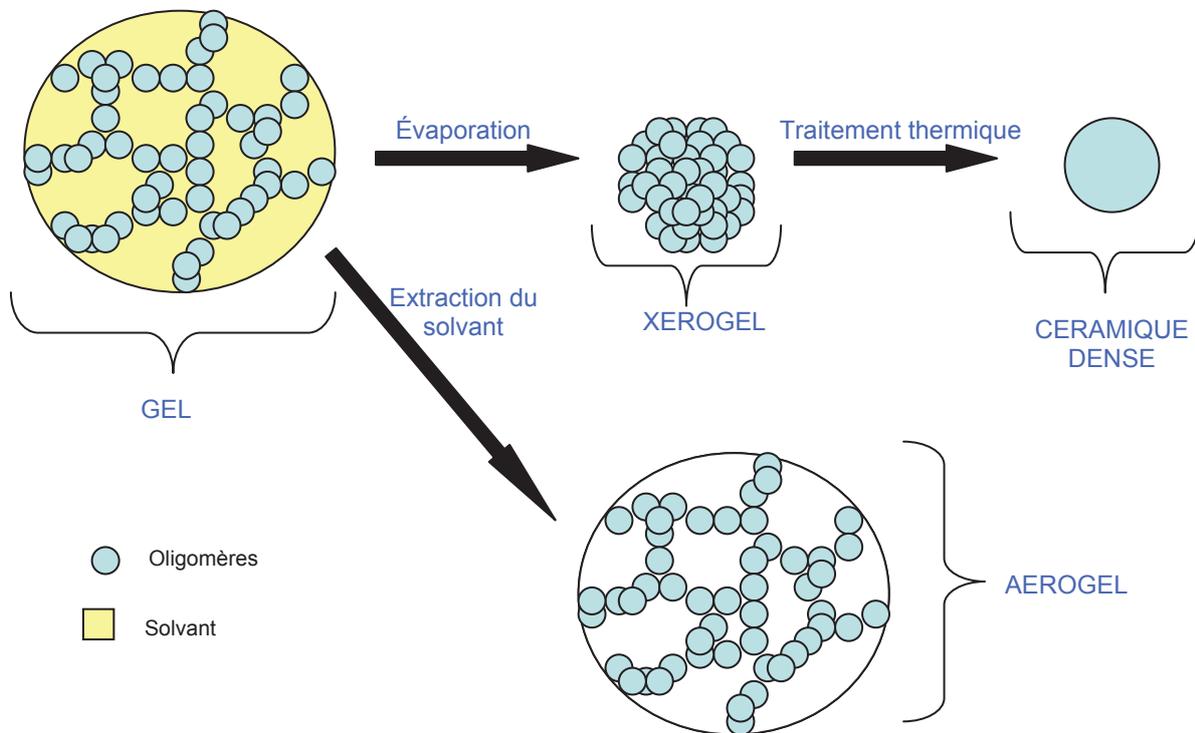


Figure 5.2: Schéma d'obtention des xérogels et des aérogels par séchage<sup>3,6</sup>

### c. Chimie du procédé sol-gel<sup>3, 13, 19 à 25</sup>

Le principe de base des procédés sol-gel consiste à transformer progressivement une solution liquide de précurseurs en un solide, au moyen de réactions chimiques classées en réactions d'hydrolyse et réactions condensation le plus souvent à température ambiante, d'où l'expression de chimie « douce » pour qualifier ces procédés. L'hydrolyse peut être décrite comme étant une réaction d'activation, alors que la condensation, appelée également polymérisation, est l'étape de croissance des chaînes polymériques<sup>3</sup>. Les types de réactions chimiques responsables de la gélification sont explicités dans ce qui suit pour les alcoxydes de silicium.

- Hydrolyse:<sup>13, 19, 20</sup>

L'hydrolyse d'un précurseur de silicium se fait classiquement par ajout d'eau, en proportion stoechiométrique précise par rapport au précurseur, en général dans un solvant

organique. Globalement, la réaction d'hydrolyse catalytique d'un alcoxyde de silicium libère une molécule d'alcool et remplace un groupement alkoxy par un silanol Si-OH, selon l'Eq.5.1 ci-dessous.



Afin d'obtenir une vitesse de réaction suffisamment élevée, on ajoute souvent à la formulation un catalyseur acide et/ou basique, la charge partielle positive  $\delta^+$  portée par le silicium étant relativement faible pour une attaque nucléophile directe par l'eau efficace <sup>3, 13, 19</sup>.

Dans le cas de la catalyse acide sur un alcoxyde de silicium, par exemple, un groupement alkoxy OR est facilement protoné comme indiqué à la Fig.5.3, par attaque électrophile d'un atome H, appartenant à un cation  $\text{H}_3\text{O}^+$  et porteur une charge partielle  $\delta^+$  importante, sur l'atome O porteur d'une charge  $\delta^-$  du groupement alkoxy. La charge partielle  $\delta^+$  du silicium s'en trouve augmentée, ce qui le rend plus susceptible à une attaque nucléophile par l'atome O porteur d'une charge partielle  $\delta^-$ , d'une molécule d'eau. On considère qu'il se forme un état de transition où le Si est penta-coordonné <sup>19</sup>. Puis rapidement, le caractère nucléofuge du ligand ROH en fait un groupement partant sous forme de molécule d'alcool.

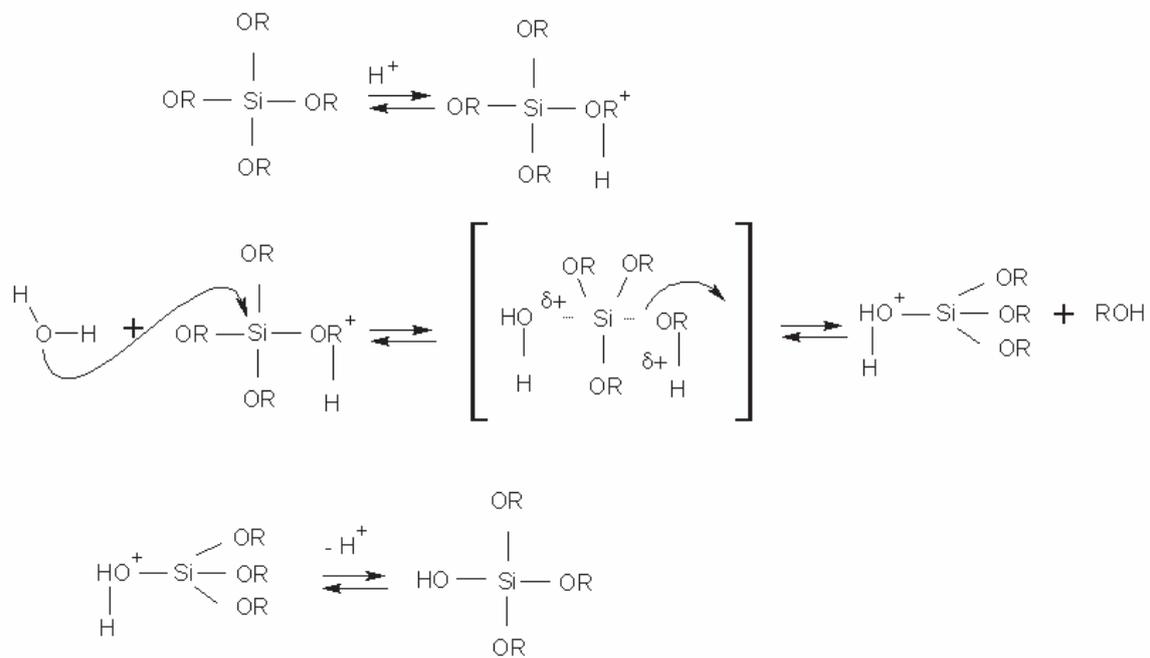


Figure.5.3: Mécanisme d'hydrolyse par catalyse acide des alcoxydes de silicium  $\text{Si}(\text{OR})_4$  <sup>3,6</sup>

La vitesse d'hydrolyse des alcoxydes de silicium passe par un minimum où elle devient très faible, pour un  $\text{pH} \sim 7$  <sup>3, 19, 20</sup> (Fig.5.4). En pratique, leur hydrolyse est donc effectuée avec un catalyseur acide, la vitesse d'hydrolyse étant alors proportionnelle à la concentration en ions  $[\text{H}_3\text{O}^+]$ .

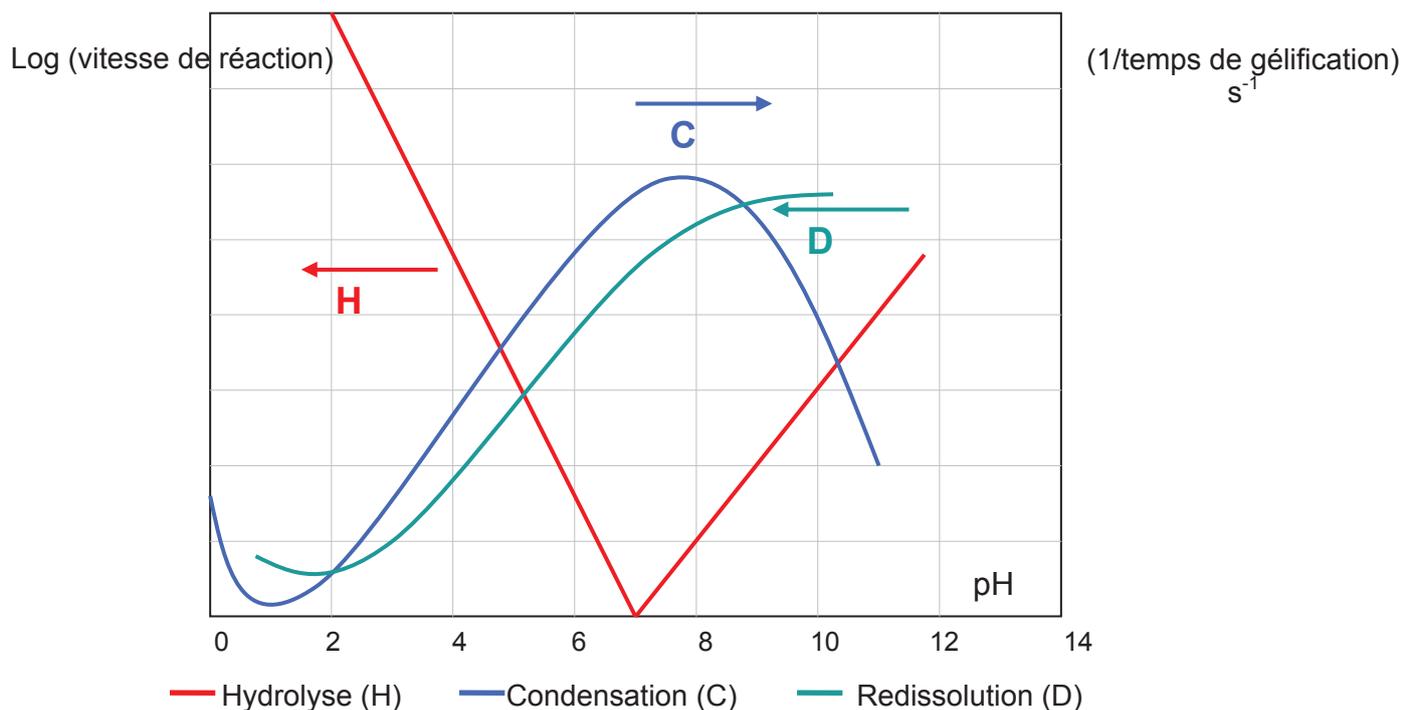


Figure.5.4: Variation des vitesses d'hydrolyse H, de condensation C, et de redissolution D des espèces condensées, pour les alcoxydes de silicium, en fonction du pH <sup>3, 19, 20</sup>

Les mécanismes de catalyse basique de l'hydrolyse pour les alcoxydes de silicium sont plus controversés <sup>3</sup>. Dans le modèle le plus simple, l'anion hydroxyle  $OH^-$  porte une charge partielle négative plus importante que l'atome O d'une molécule d'eau neutre. Il peut réaliser une attaque nucléophile directe sur Si, comme schématisé Fig.5.5.

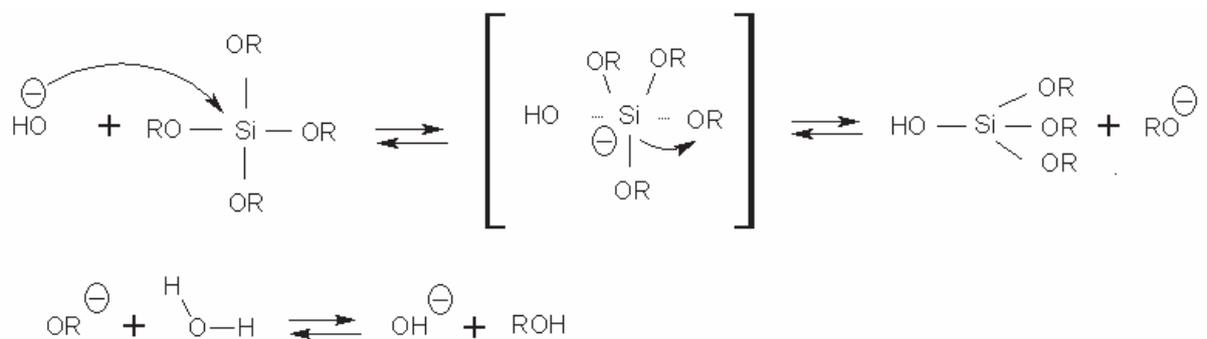
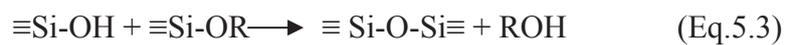
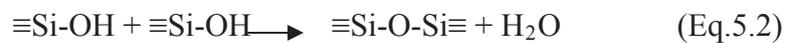


Figure.5.5: Mécanisme possible d'hydrolyse par catalyse basique des alcoxydes de silicium <sup>3,</sup>

Toutefois, dans le cas de la silice dont les charges de surface sont largement négatives à  $\text{pH} > 7$  (point de charge nulle vers  $\text{pH} \sim 2.5$  à  $3$ ) il est aussi possible de déprotoner directement un silanol  $\equiv\text{Si-OH}$  pour donner un siloxo  $\equiv\text{Si-O}^-$  et libérer directement une molécule ROH.

- Condensation: **13, 19, 20**

Les fonctions silanol ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) permettent l'initiation des réactions de condensation qui conduisent à la formation de ponts siloxane ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ) tout en libérant une molécule d'eau (Eq.5.2) ou d'alcool (Eq.5.3).



Tout comme l'hydrolyse, la condensation des alcoxydes de silicium nécessite d'être accélérée par des catalyseurs et cette fois ci, à  $\text{pH} > 3$ , ce sont les catalyseurs basiques au sens de Lewis, qui sont les plus efficaces. Ces catalyseurs peuvent être par exemple des réactifs apportant des ions  $\text{OH}^-$  ou  $\text{F}^-$ . Un des mécanismes possible est que ces bases de Lewis déprotonent les silanols  $\equiv\text{Si-OH}$  pour donner des siloxo  $\equiv\text{Si-O}^-$ . Ces derniers sont capables d'effectuer une attaque nucléophile directe sur le Si d'un autre silanol pour donner un état de transition dimérique dont l'un des Si est penta-coordonné, selon un mécanisme de substitution nucléophile d'ordre 2 ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) (Fig.5.6). Le 5<sup>ème</sup> ligand de ce dernier Si est un  $\text{OH}^-$  qui quitte rapidement le dimère sous forme de groupement partant ionique  $\text{OH}^-$ , lequel peut réagir avec HF pour recréer des ions  $\text{F}^-$ , si de tels ions ont été utilisés comme catalyseur basique de Lewis.

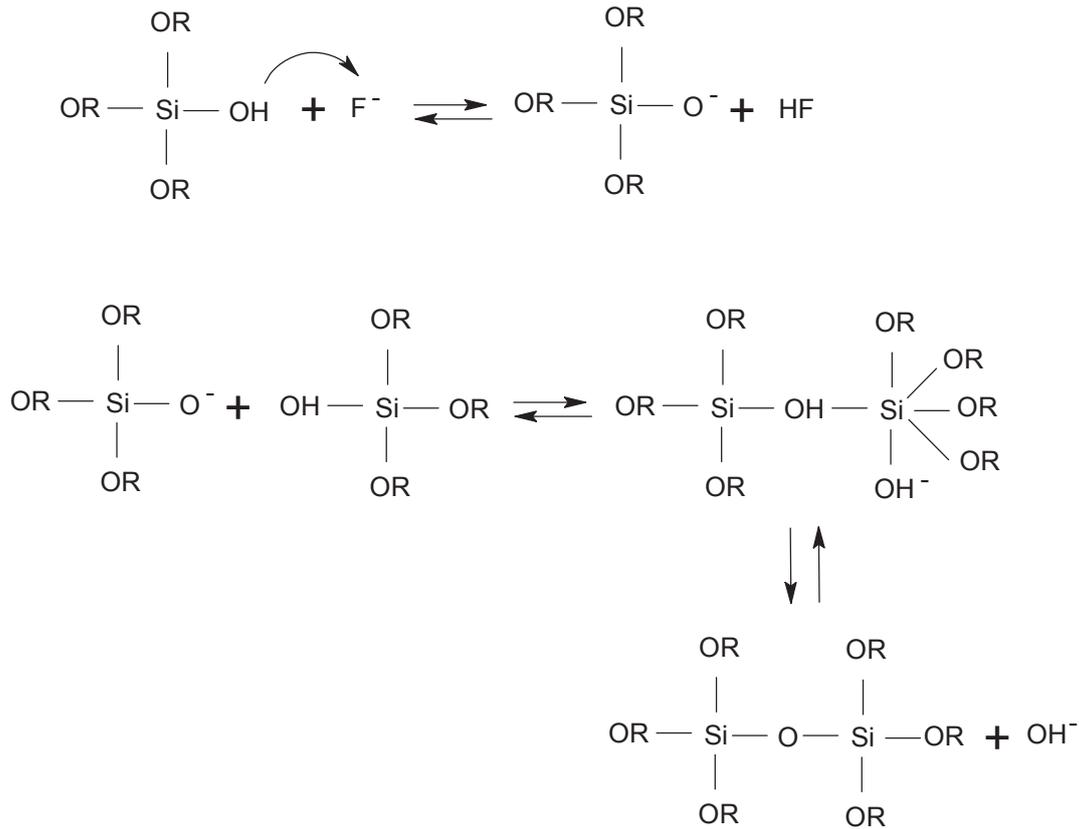


Figure.5.6: Mécanisme possible de condensation des silanols par une base de Lewis <sup>3</sup>

La propagation de ces réactions de condensation conduit plus ou moins rapidement à l'obtention d'un réseau siloxane tridimensionnel, constituant le squelette d'un gel de silice. Les groupements terminaux peuvent être une proportion variable, selon le pH du milieu, de silanols neutres  $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ , de siloxo  $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$  chargés négativement ( $\text{pH} > 3$ ), de silanols protonés  $\equiv\text{Si}-(\text{OH}_2)^+$  chargés positivement ( $\text{pH} < 2.5$ ), d'alkoxy non hydrolysés  $\equiv\text{Si}-\text{OR}$  ou de fonctions  $\equiv\text{Si}-\text{X}$  où X est un groupement non hydrolysable comme  $\text{CH}_3$ , selon le précurseur de silicium utilisé.

#### d. Avantages et inconvénients des procédés sol-gel <sup>3, 26</sup>

Les avantages, inconvénients et applications des procédés sol-gel ont fait l'objet de revues extensives <sup>3, 24, 25, 27 à 29</sup> qui ne seront pas abordées ici, étant hors de propos dans leur ensemble

avec ce mémoire de thèse, sauf en ce qui concerne l'immobilisation des enzymes, résumée dans une section suivante.

En ce qui concerne les recherches rapportées dans ce mémoire, les procédés sol-gel permettent de travailler dans des conditions douces de température et de solvant. Des applications d'encapsulation de molécules fragiles organiques ou biologiques peuvent donc être envisagées. Il est cependant souvent nécessaire d'adapter les conditions de pH et de solvant, afin de ne pas endommager les espèces encapsulées fragiles et par exemple préserver la bioactivité d'enzymes immobilisées. Mais, les propriétés des matériaux sol-gel comme leur texture poreuse et la nature de leur groupement de surface, par exemple hydrophobes ou hydrophiles, peuvent être largement modifiées en adaptant les conditions de synthèse, en particulier en ce qui concerne la silice. Les paramètres de synthèse ajustables comprennent la nature des précurseurs, leur concentration, le solvant, le pH, les additifs (catalyseurs) et le mode de séchage.

Les procédés sol-gel présentent bien évidemment des inconvénients. Parmi ceux-ci, la fracturation des gels n'est pas aisée à contrôler, en particulier s'ils viennent à sécher par évaporation, ce qui peut présenter des inconvénients pour réaliser des membranes sol-gel humides (non séchées) contenant des enzymes, destinées au captage du CO<sub>2</sub>.

### **5.2.2. L'immobilisation sol-gel d'enzymes**

Depuis la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés à l'immobilisation des enzymes. Ainsi de nombreuses revues ont traité l'encapsulation des protéines ou des biomolécules en général<sup>30</sup>.

On distingue quatre méthodes principales d'immobilisation des enzymes sur un support solide (Fig.5.7). Ces techniques confèrent des caractéristiques différentes à chaque type de catalyseur mais elles doivent toutes permettre aux substrats et aux produits de diffuser librement du solvant vers le site actif de l'enzyme et vice versa.

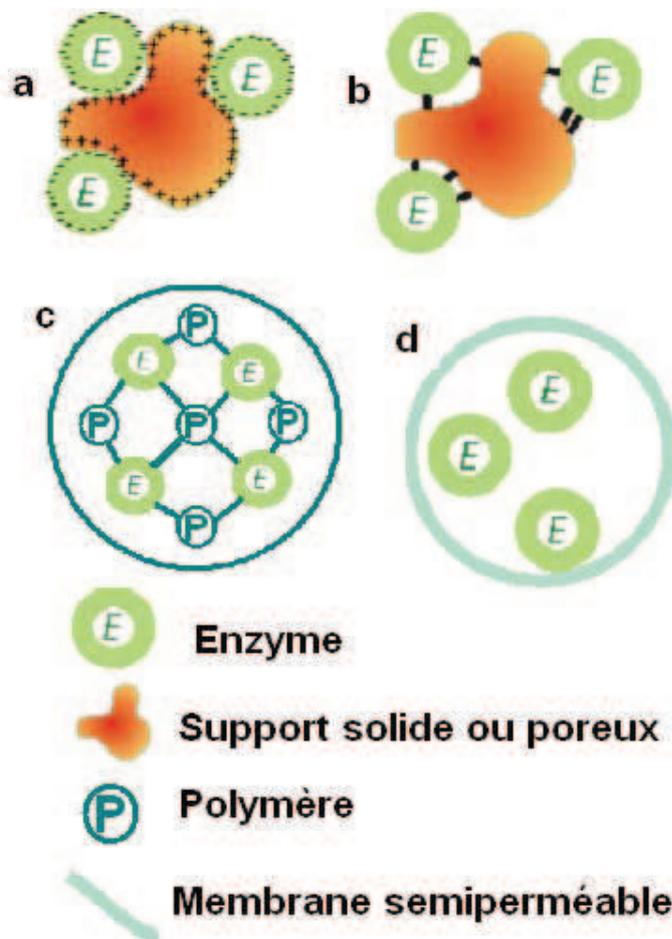


Figure.5.7: Schéma des 4 principales méthodes d'immobilisation par: (a) adsorption physique ; (b) liaison covalente ; (c) réticulation polymérique ; (d) encapsulation <sup>31</sup>

### a. Adsorption physique sur un support <sup>32, 33</sup>

Dans cette technique considérée comme la plus ancienne méthode d'immobilisation, l'enzyme est adsorbée par l'intermédiaire de liaisons faibles avec un support. Ces liaisons comprennent principalement des attractions électrostatiques, des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes ou de Van der Waals. Cette méthode présente les avantages d'être simple et peu coûteuse. Cependant, une partie des enzymes se désorbe souvent lors d'utilisation successives, l'activité du biocatalyseur diminuant progressivement.

### **b. Attachement covalent** <sup>32, 33</sup>

L'enzyme forme des liaisons chimiques très stables avec un support. Il est donc nécessaire d'utiliser une procédure de greffage chimique nécessitant des conditions douces n'altérant pas les propriétés de l'enzyme. Mais l'enzyme est stablement fixée par ce type de liaison et se décrocher au cours des cycles catalytiques.

### **c. Réticulation** <sup>33, 34</sup>

Ce type d'immobilisation consiste à réaliser des liaisons intermoléculaires, soit directement entre les enzymes, soit par l'intermédiaire d'agents bi ou multifonctionnels. Cependant, une baisse de l'activité catalytique de l'enzyme est souvent observée par rapport à l'enzyme libre. En effet, des liaisons trop courtes entre les macromolécules d'enzyme peuvent affecter leur conformation et ralentir la diffusion des substrats et produits, problème auquel il est possible de remédier au moins partiellement en ajoutant des macromolécules jouant le rôle d'espaceurs, comme l'Albumine de Sérum Bovin (BSA).

### **d. Encapsulation**

L'encapsulation est basée sur le maintien de l'enzyme au sein d'une nano-capsule, à laquelle elle n'est pas nécessairement fixée. Les parois de ces nano-capsules doivent posséder des pores suffisamment étroits pour que l'enzyme ne puisse pas en sortir, mais assez larges pour permettre la diffusion des substrats et produits. Leur nature peut être organique ou inorganique. Une méthode d'encapsulation très simple consiste par exemple à dissoudre l'enzyme à encapsuler dans un sol de silice avant gélification. Les nano-capsules se construisent alors directement tout autour des molécules d'enzymes qui servent de gabarit, par condensation de la silice pour former le réseau d'un gel de silice.

### **e. Immobilisation sol-gel d'enzymes** <sup>3, 35 à 50</sup>

Les procédés sol-gel s'ouvrent également à la biologie. Il est par exemple possible d'encapsuler au sein d'un gel de silice des structures biologiques assez volumineuses telles que des enzymes, des levures ou encore des peptides. Un type d'application important concerne actuellement le développement de biocapteurs et même des bioréacteurs <sup>3</sup>.

L'encapsulation des enzymes permet souvent de les stabiliser en préservant mieux leur structure des perturbations physico-chimiques environnantes. Elle permet ainsi de travailler

souvent à température relativement plus élevée en limitant les mouvements de dépliage et repliement de la chaîne polypeptidique, donc la destruction de la structure quaternaire <sup>40 à 43</sup>. A l'opposé, le réseau du gel peut induire un changement de conformation de l'enzyme, néfaste à son activité. L'activité catalytique des enzymes encapsulées peut par exemple être modifiée à cause des interactions électrostatiques entre la silice et certains résidus aminés de la protéine. En effet, au dessus du point isoélectrique de la silice ( $pI \approx 2.8$ ), la surface des pores du gel de silice est chargée négativement, de sorte que les interactions silice-enzyme vont dépendre de la valeur du  $pI$  de l'enzyme. Ainsi, Chen et ses collaborateurs ont étudié l'encapsulation du glucose oxydase, du lactate oxydase et du glycolate oxydase dont les  $pI$  sont respectivement 3.8 ; 4.6 et 9.6. Ils ont démontré que seul le glucose oxydase conservait son activité à pH neutre. Les interactions électrostatiques avaient tendance à affaiblir l'activité catalytique des deux autres oxydases. Ces effets dénaturants pouvaient cependant être atténués en complexant la silice par des polyélectrolytes tels que le poly(N-vinylimidazole) (PVI) et le poly-éthylèneimine (PEI) <sup>40, 47</sup>.

La diffusion des substrats et produits vers et depuis l'enzyme peut également être significativement ralentie, si les pores du gel sont trop petits et le chemin de diffusion trop long, ce qui se traduit par une activité plus faible que l'enzyme libre. Cependant, dans certains cas, notamment lorsqu'on travaille en milieu organique, l'enzyme encapsulée peut montrer une meilleure activité que l'enzyme libre, comme cela a été montré avec des lipases <sup>44, 45</sup>. Dans ce cas, le réseau du gel maintient en effet les molécules d'enzyme dispersées au sein du solvant organique, alors que leur agglomération se produit lorsqu'elles sont introduites non immobilisées, directement dans le solvant organique

L'encapsulation sol-gel ne change pas la nature des mécanismes catalytiques mais modifie en général, les valeurs des constantes cinétiques. Ainsi un gel peut altérer la constante de Michaelis, la vitesse maximale de transformation et la constante catalytique  $k_{cat}$  d'une réaction enzymatique. Ces modifications dépendent de la nature du milieu et de l'enzyme. Généralement, dans un xérogel, la constante de Michaelis augmente ce qui signifie une liaison plus faible entre l'enzyme et le substrat et la cinétique globale de la réaction mesurée par la constante catalytique est plus élevée <sup>48, 49</sup>.

Lorsque le catalyseur doit être appliqué en milieu aqueux, ce qui est le cas dans le présent mémoire, il n'est pas nécessaire de sécher le gel contenant l'enzyme. L'enzyme encapsulée peut être préservée en conservant le gel dans un milieu aqueux de pH approprié, une technique que l'équipe a déjà appliquée à la lipoxigénase <sup>46</sup>. Enfin, si les gels de silice sont fragiles, il est possible de les renforcer en imprégnant un tissage ou un feutre de fibres

(organiques ou silice) par un sol de silice contenant l'enzyme, avant gélification, comme cela a été fait avec succès pour des lipases et la lipoxigénase <sup>46, 50</sup>. Dans les présentes recherches expérimentales, cette technique sera utilisée en imprégnant une membrane polymérique fine et poreuse, par le gel contenant l'enzyme anhydrase carbonique.

### **5.2.3. Etudes précédentes d'immobilisation de l'anhydrase carbonique**

L'anhydrase carbonique est une enzyme commercialement coûteuse. Afin d'obtenir une séquestration enzymatique du CO<sub>2</sub> économiquement viable, diverses recherches ont donc eu pour objectif l'immobilisation de cette enzyme, qui permettrait de réutiliser le biocatalyseur pendant une plus grande durée, ou un plus grand nombre de cycles. Il s'agit souvent, dans ce qui suit, de travaux en cours, menés en concurrence avec le présent travail.

#### **a. Immobilisation au sein de perles de chitosane-alginate <sup>51 à 53</sup>**

Dès 2001, Bond et ses collaborateurs se sont attachés à développer un système d'épuration de CO<sub>2</sub>, dans lequel l'anhydrase carbonique catalysait l'hydratation du CO<sub>2</sub> pour le transformer en carbonates minéraux stables <sup>51</sup>. Dans ce but, ils ont immobilisé l'anhydrase carbonique bovine dans des perles constituées d'un mélange de chitosane et d'alginate.

La synthèse de ces perles comprend plusieurs étapes. Tout d'abord, l'anhydrase carbonique bovine est dissoute dans une solution d'alginate de sodium à 2 % (en masse). En parallèle, une solution de chitosane à 2 % (en masse) est réalisée par dissolution de chitosane dans une solution d'acide acétique à 3 %. Les perles de chitosane-alginate sont obtenues en laissant tomber goutte à goutte la solution d'alginate contenant l'enzyme dans une solution consistant en un mélange d'une solution à 0.2 M de CaCl<sub>2</sub>, de la solution de chitosane et d'eau déionisée, dans un rapport en volume 1: 1: 1. Pendant cette opération, le pH de la solution est maintenu à ~ 5 en utilisant des solutions à 0.1 M de NaOH ou de HCl. Les perles obtenues sont ensuite lavées pendant 2 h avec de l'eau déionisée et sont conservées à 4°C.

### b. Greffage de l'enzyme sur un support polymérique thermoplastique <sup>54</sup>

Parent et Belzil <sup>54</sup> se sont intéressées à l'anhydrase carbonique humaine en l'immobilisant sur un support polymérique thermoplastique constitué d'anneaux de Raschig en nylon 6.6. Cette immobilisation a été obtenue par greffage chimique sur le support polyamide, auquel l'enzyme était donc lié par liaison covalente (Fig.5.8). Une telle technique d'immobilisation par des liaisons permanentes est adaptée à une application dans un système rotatif où le support est soumis à un mouvement permanent.

Dans leur technique de greffage, le support en nylon est d'abord traité par une solution d'acide chlorhydrique permettant de générer des groupements aminés à sa surface. Une seconde incubation du support dans une solution de glutaraldéhyde permet ensuite de greffer directement l'anhydrase carbonique. Après lavage dans de l'eau déionisée puis dans une solution de NaCl, les anneaux Raschig sont finalement conservés dans une solution de Tris à  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  à  $\text{pH} \approx 8.3$ , avant utilisation.

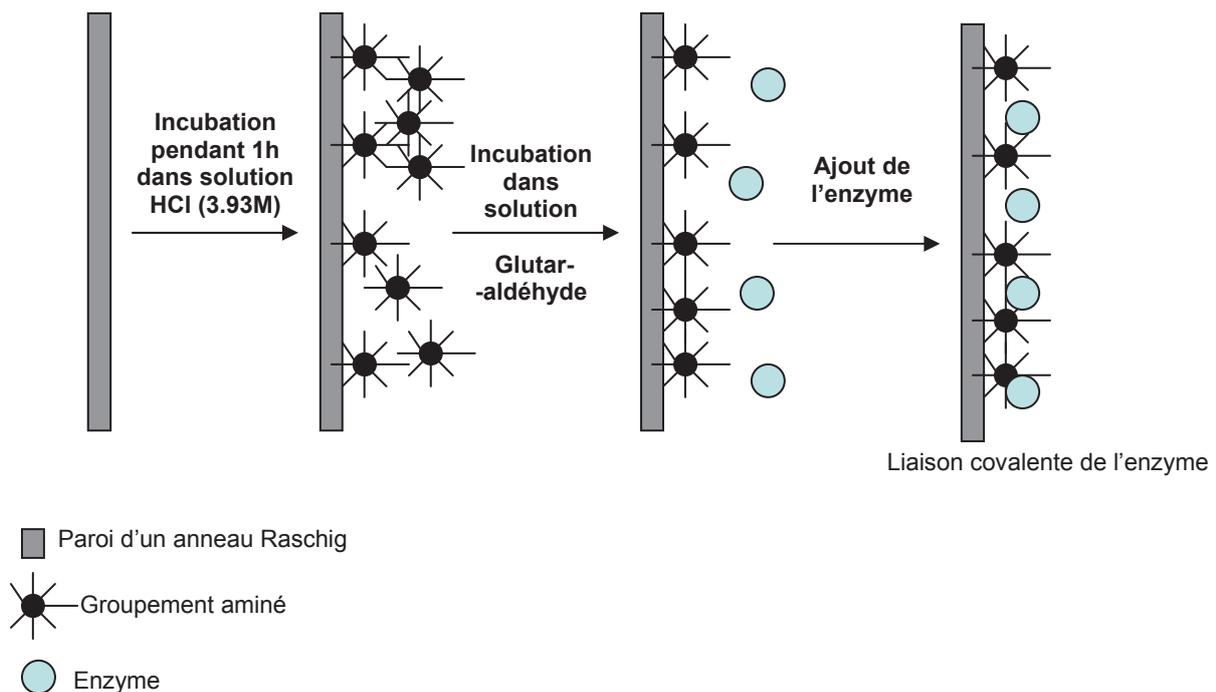


Figure.5.8: Schéma de l'immobilisation de l'enzyme sur un support polymérique thermoplastique <sup>54</sup>

La quantité de protéines greffées a été déterminée en mesurant la concentration en protéine dans la solution avant et après greffage, d'une par la méthode de Bradford, d'autre

part par des tests « Elisa ». L'activité de l'enzyme immobilisée a été directement estimée dans la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub> par la méthode de Wilbur et Anderson <sup>55</sup>.

La détermination de l'activité d'hydratation du CO<sub>2</sub> a été effectuée avec un gaz contenant 200 000 ppm (20 %) de CO<sub>2</sub> à une température de 1°C. Les résultats ont montré que la meilleure activité en hydratation du CO<sub>2</sub> était obtenue pour une concentration en enzyme dans la solution de greffage de 0.5mg mL<sup>-1</sup>. 73 % de l'enzyme est greffée au support et 45 % de cette enzyme est active. Au-delà de 1mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme en solution, le pourcentage d'enzymes fixées au support décroît, la concentration d'enzyme en solution croît et il en est de même en ce qui concerne la quantité d'enzymes actives. Dans ces conditions, la vitesse de formation de protons était d'environ 10 000 ions H<sup>+</sup> par min. Le rendement, déterminé par la méthode de Wilbur et Anderson selon la relation (Eq.5.4) était de 85 % pour l'enzyme libre et seulement de 20 % pour l'enzyme immobilisée.

$$\text{Rendement} = \frac{t_0 - t_{enz}}{t_{enz}} = v m_{enz} \quad (\text{Eq.5.4})$$

où  $v$  et l'activité définie par la méthode de Wilbur et Anderson, et  $t_{enz}$  et  $t_0$  les temps définis dans cette méthode (cf. Eq. 2.23, section 2.1.2b)

Ce faible résultat était expliqué d'une part par la faible dimension du réacteur qui ne permettait d'utiliser qu'un nombre total limité d'anneaux de Raschig, d'autre part par le faible transfert de matière entre le CO<sub>2</sub> aqueux et la surface du support solide, de faible surface spécifique.

### **c. Immobilisation par greffage sur des hybrides organique-inorganiques** <sup>56 à 58</sup>

En 2009, Zhang et ses collègues <sup>56, 57</sup> ont étudié l'immobilisation de l'anhydrase carbonique sur un matériau nanocomposite hybride en « Poly(acrylic acid-co-acrylamide)/hydrotalcite (PAA-AAm/HT) », par liaison covalente. Le processus comprend les étapes suivantes:

- préparation de l'hydrotalcite et de l'hydrotalcite modifié (Fig.5.9)
- préparation d'un nanocomposite hydrogel/Hydrotalcite (Fig.5.10)
- activation du nanocomposite précédent (Fig.5.11)

- immobilisation de l'enzyme (Fig.5.11).

L'hydrotalcite, un solide de composition théorique  $Mg_6Al_2(CO_3)(OH)_{16} \cdot 4(H_2O)$ , est préparée à partir d'un mélange de  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  et d'urée dans de l'eau (Fig.5.9). La dissolution de ces composants sous agitation étant exothermique, la température dépasse  $90^\circ C$  tandis que le pH augmente (il passe de  $pH = 3.6$  à  $pH > 10$ ) et  $NH_3$  est libéré<sup>58</sup>. Un précipité gélatineux apparaît lorsque le pH atteint 7 après environ 1 h. Ce précipité chauffé à  $95^\circ C$  pendant 10 h sous agitation et maintenu ensuite au repos à cette température pendant 20 h supplémentaires donne, après lavage à l'eau déminéralisée et séchage à  $90^\circ C$ , l'hydrotalcite notée HT.

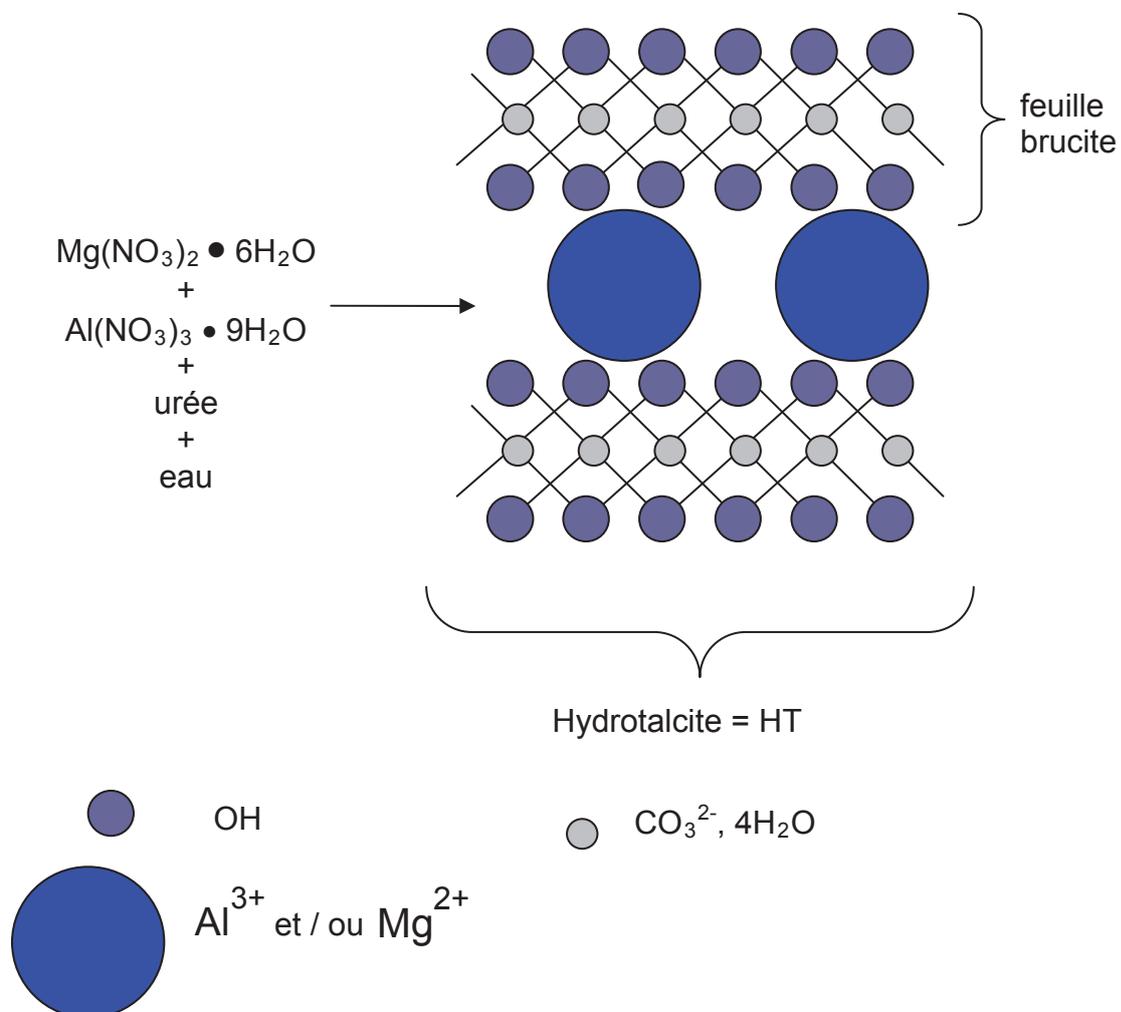


Figure.5.9: Schéma de l'hydrotalcite utilisée pour immobiliser l'anhydrase carbonique<sup>56</sup>

L'hydrotalcite est ensuite mélangée à un sel de sodium de l'acide 2-méthyl-2-propène-1-sulfonique (SMAS) et une solution de N,N'-diméthylacétamide, pour obtenir après filtration et séchage sous vide, une hydrotalcite modifiée notée SMAS-HT (Fig.5.10a). Le nanocomposite hydrogel / HT noté PAA-AAm / HT est préparé à partir d'un mélange d'acide acrylique (AA) neutralisé par de la soude, d'acrylamide (AAm), de N,N'-méthylènebisacrylamide (NMBA) et de peroxydisulfate de potassium (KPS) dans du cyclohexane auquel un tensioactif (Span 60) et une quantité appropriée de SMAS-HT sont ajoutés sous azote (Fig.5.10b). Le nanocomposite obtenu est filtré, lavé et séché sous vide.

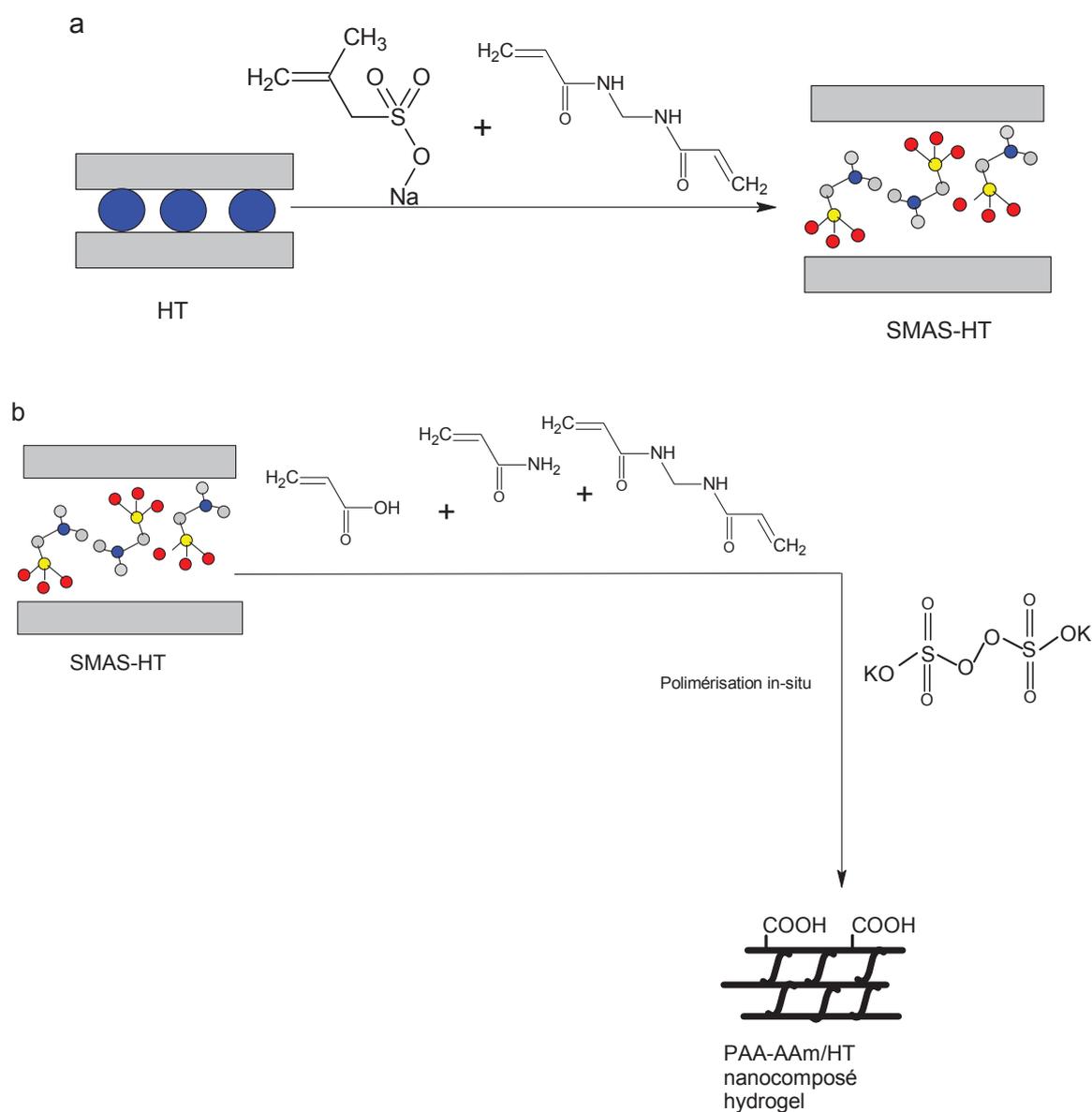


Figure.5.10: Schéma de synthèse du nanocomposite hydrogel / Hydrotalcite utilisé pour immobiliser l'anhydrase carbonique<sup>56</sup>

L'activation du nanocomposite précédent est effectuée avec un mélange de N-hydroxysuccinimide (NHS) et de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans de l'éthanol, à 50°C pendant 24 h (Fig.5.11a). Les produits sont filtrés, lavés et séchés sous vide. L'immobilisation finale de l'anhydrase carbonique dans le nanocomposite hydrogel/HT (Fig.5.11b) est effectuée dans une solution tampon Tris-HCl à pH = 8, à 4°C pendant 4 h, et les biocatalyseurs finals lavés dans du Tris-HCl.

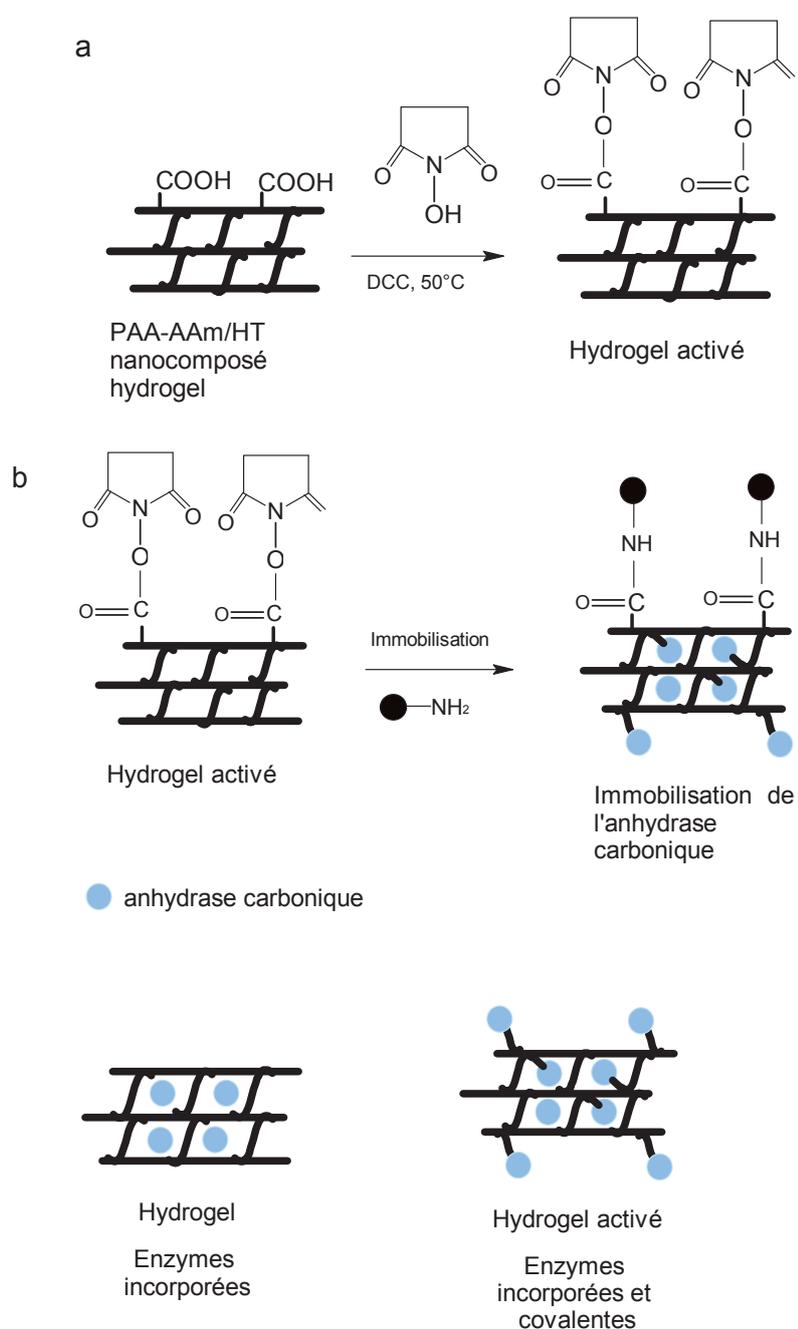


Figure.5.11: Schéma de l'immobilisation de l'enzyme par l'hydrogel activé: (a) activation du composite ; (b) immobilisation de l'enzyme<sup>56</sup>

Selon les auteurs, cette méthode offrirait une forte capacité d'immobilisation d'enzymes, jusqu'à 4.6 mg par gramme de support pour l'hydrogel activé, dans un solide poreux (bien que la taille des pores ne soit pas indiquée), par des liaisons covalentes qui renforcent la stabilité de l'enzyme.

Cette technique d'immobilisation conserverait également une proportion d'activité enzymatique importante: 76.8 % après immobilisation dans un hydrogel activé préparé avec 3 % de SMAS/HT, et 90.9 % dans un hydrogel non activé. Cette activité immobilisée augmenterait avec la proportion de SMAS / HT lors de la préparation de l'hydrogel, peut-être en raison d'une augmentation de la quantité d'eau libérée à l'intérieur de l'hydrogel, ce qui pourrait fournir à l'enzyme un environnement de survie meilleur.

#### **d. Immobilisation dans des mousses de polyuréthane** <sup>59, 60 à 70</sup>

Les mousses de polyuréthane, polymère respectueux de l'environnement et noté PU, sont largement utilisées pour immobiliser des enzymes et des cellules <sup>63</sup>. Une première méthode d'immobilisation irréversible des enzymes dans les PU fut brevetée en 1982 par Wood et son équipe <sup>61</sup>, le degré d'immobilisation de l'enzyme contenu dans le polyuréthane pourrait atteindre approximativement 100 %. Au fil des années, de nombreuses enzymes ont été immobilisées dans les mousses de PU <sup>60, 63 à 70</sup>, mais ce n'est qu'en 2008 que Kanbar utilisa ce support pour étudier l'immobilisation de l'anhydrase carbonique <sup>60</sup> dans un but de séquestration du CO<sub>2</sub>, suivi en 2010 par Ozdemir <sup>59</sup>.

La méthode d'immobilisation de Wood s'effectue à partir d'un mélange d'un prépolymère de PU appelé Hypol et d'une solution aqueuse d'enzyme, comme indiqué dans la Fig.5.12 ci-dessous. L'enzyme est dissoute dans une solution de tampon Tris et vigoureusement mélangée à de l'Hypol pour homogénéiser la répartition d'enzyme dans le prépolymère. La polymérisation s'effectue à température ambiante pour produire une écume lavée à l'eau Ultrapure et conservée dans du tampon Tris.

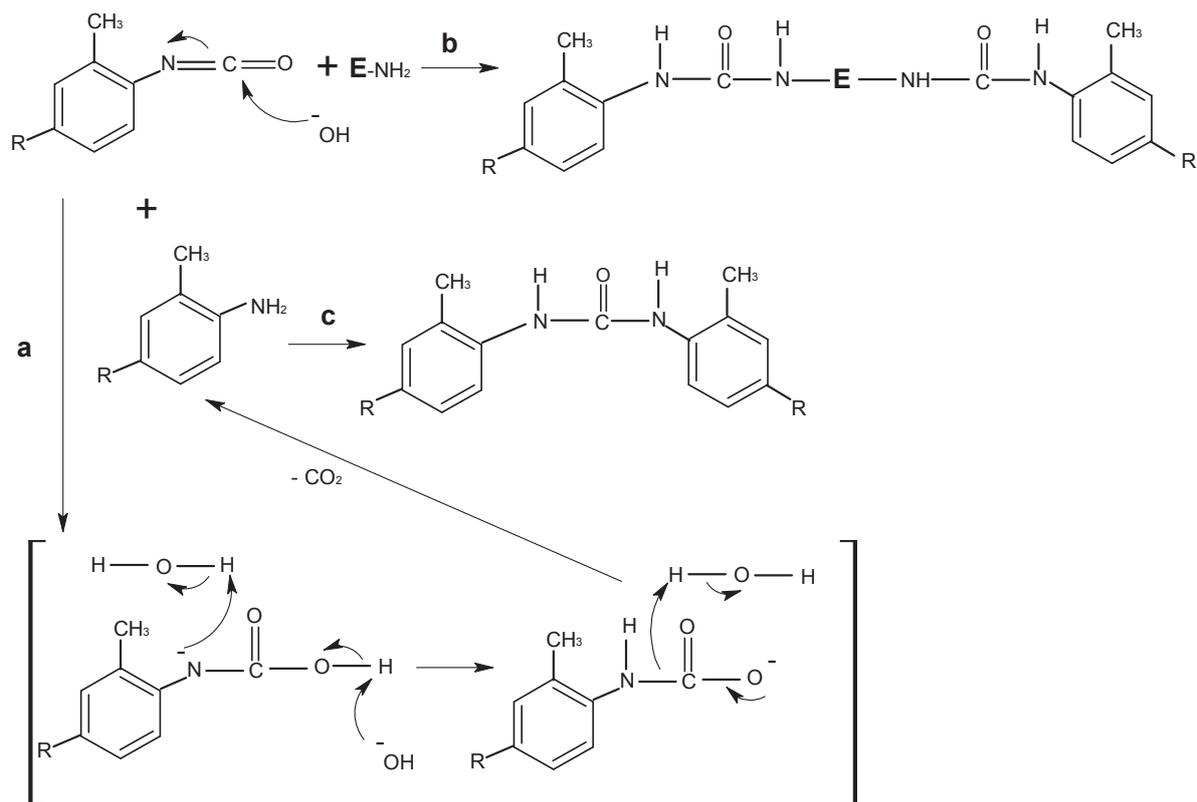


Figure.5.12: Schéma d'immobilisation d'une enzyme dans la mousse de polyuréthane: (a) réaction de polymérisation du polyuréthane ; (b) immobilisation de l'enzyme et (c) formation du polyuréthane en présence de l'enzyme <sup>59</sup>

Pendant la polymérisation, l'eau réagit avec les groupements isocyanate du PU pour produire un groupement amine (NH<sub>2</sub>) et entraîner un dégagement de CO<sub>2</sub>. Cette production de CO<sub>2</sub> est responsable de la formation d'une mousse de PU. Simultanément, les groupements isocyanate réagissent avec l'amine ou les groupements hydroxyle de l'enzyme pour l'immobiliser <sup>62, 63</sup>.

L'immobilisation de l'anhydrase carbonique bovine (BCA) dans la mousse de PU fut un succès. Elle présente une excellente stabilité permettant sa réutilisation en milieu aqueux, sans perte d'activité après 7 utilisations, contrairement à l'enzyme libre. Cette dernière perd totalement son activité après 45 jours de conservation à 4°C. La température idéale de fonctionnement de l'enzyme immobilisée se situe entre 35°C et 45°C. Au delà, l'activité diminue pour s'annuler dès 60°C.

### **5.3. Membranes hybrides préparées par adsorption d'enzyme sur membranes en gel de silice préalablement séchées**

#### **5.3.1. Préparation des membranes sol-gel en silice**

##### **a. Membranes polymériques utilisées**

Les membranes à imprégner par le sol de silice étaient des filets nylon NY20 ou NY60 de chez Millipore dont la taille des pores est respectivement de 20 ou 60  $\mu\text{m}$ .

##### **b. Imprégnation par un gel de silice**

Un sol de silice était préparé par hydrolyse de 2186  $\mu\text{L}$  de TMOS (14.77 mmol), par 5472  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ( $\approx 304$  mmol) et 688  $\mu\text{L}$  ( $\approx 38.22$  mmol) d'eau acidifiée par une solution aqueuse de HCl 0.1 M à pH = 2.8. Le rapport d'hydrolyse était donc  $r_{\text{hyd}} = n_{\text{eau}} / n_{\text{TMOS}} = 23.17$ . Après agitation magnétique pendant 15 min à 1280 tours  $\text{min}^{-1}$ , le méthanol libéré lors de l'hydrolyse était suffisant pour homogénéiser le sol de silice obtenu. Une membrane polymérique à imprégner était alors immergée pendant 45 min dans 4 mL de ce sol de silice. Toutes les membranes imprégnées étaient d'abord laissées à l'air pour gélifier puis sécher. Le temps de gélification du sol de silice a été déterminé sur le sol en excès restant de l'opération d'imprégnation de la membrane hydrophile, il était  $t_g \approx 5$  h 16. La durée du séchage était de 2 jours à l'air. Puis elles étaient trempées dans des solutions d'enzyme, afin d'y adsorber l'enzyme, avant d'être testées dans la cellule de captage du  $\text{CO}_2$ .

##### **c. Adsorption d'enzymes**

Deux protocoles d'adsorption ont été étudiés: un 1<sup>er</sup> protocole par trempage en une seule étape dans une solution aqueuse avec ou sans enzyme ; un 2<sup>ème</sup> protocole en 2 étapes, d'abord dans une solution aqueuse sans enzyme, suivi d'un trempage dans une solution aqueuse d'enzyme. Dans le 2<sup>ème</sup> protocole, on pouvait en effet penser que l'enzyme serait

principalement adsorbée en surface de la membrane sol-gel, alors que dans le 1<sup>er</sup> protocole, elle devrait être répartie plus uniformément dans l'épaisseur de la membrane. Une comparaison des deux protocoles devait donc permettre d'aborder peut-être l'importance possible de la localisation de l'enzyme: proche des faces en contact avec les gaz, ou dans l'épaisseur de la membrane.

Les paramètres étudiés ont alors été: la nature du milieu aqueux d'adsorption (présence d'un tampon), la durée de trempage dans la 2<sup>ème</sup> étape (solution d'enzyme dans un tampon), la concentration d'enzyme et la taille des pores de la membrane polymérique imprégnée (NY20 ou NY60).

#### **d. Aspect des membranes**

Les micrographies (Fig.5.13) ont été prises au moyen d'un microscope électronique à balayage (MEB) de type JEOL JSM 5800 LV, sous une tension électrique de 20 kV. Chacun des échantillons des deux types de membranes a été alors fixé sur un support au moyen d'un film de carbone puis métallisé avec de l'or pendant 4 fois 20 s dans un pulvérisateur atomique cathodique.

La Fig.5.13 montre une différence nette entre les membranes, en effet, le tissage du nylon n'est pas le même. Concernant la membrane NY20, le nylon est tissé de manière plus serrée d'où une taille de pores plus faible que la membrane NY60.

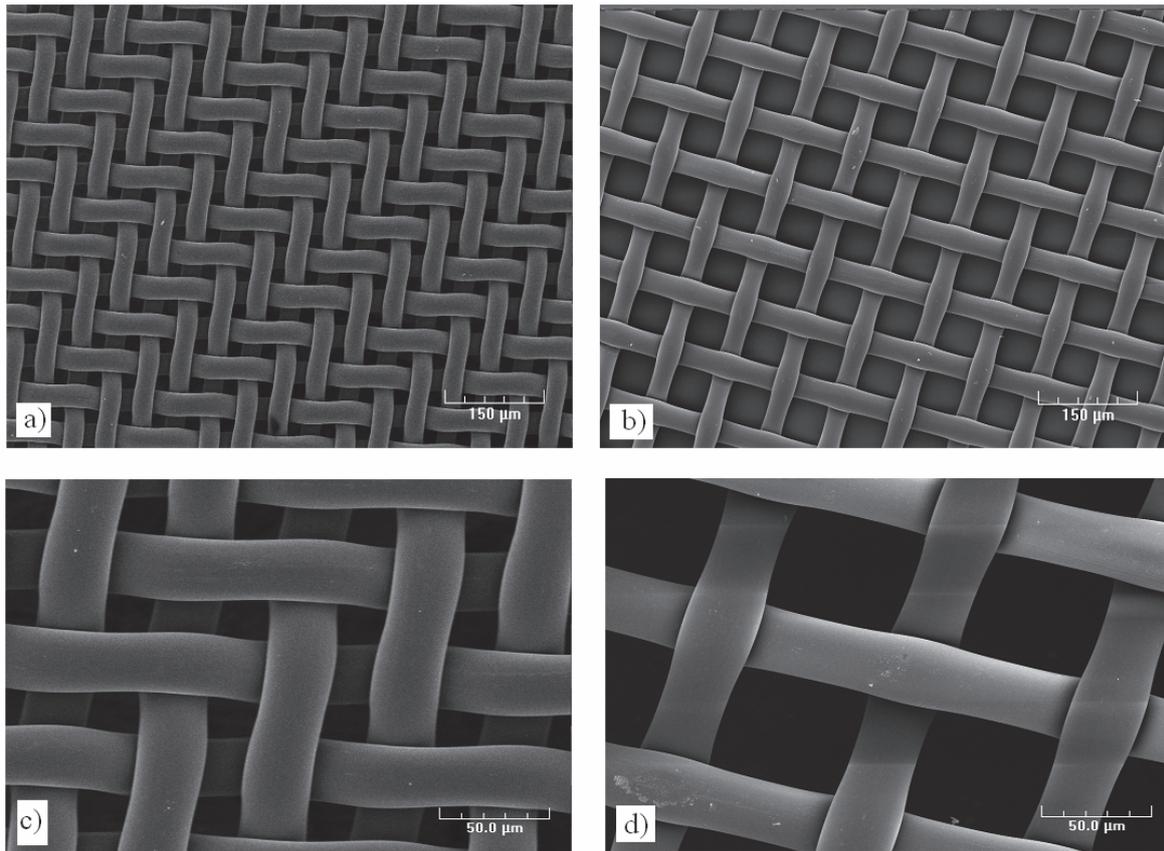


Figure.5.13: Micrographies réalisées au MEB des deux types de membranes en nylon tissé intactes: a) et c) NY20 ; b) et d) NY60

### 5.3.2. Conditions de test des membranes hybrides préparées par adsorption d'enzyme, dans le captage du CO<sub>2</sub>

Les membranes hybrides, imprégnées d'une solution d'enzyme dans un tampon, ont été placées en sandwich entre deux membranes hydrophobes de même type que celles utilisées pour les études de membranes liquides (voir Chapitre 3), c'est-à-dire des membranes en PVDF. Elles ont été testées en transfert en continu du CO<sub>2</sub>, pour un gaz de captage à 10 % de CO<sub>2</sub>. A chaque fois, la perméance et la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h ont été déterminées, selon la même procédure que pour les membranes liquides.

### 5.3.3. Effet d'un tampon lors de l'adsorption d'enzyme

#### a. Procédé d'adsorption en 1 étape

Une membrane nylon NY20 imprégnée de gel séché sans enzyme a été trempée pendant 45 min dans 4 mL de tampon sans enzyme, ou contenant  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Un tampon phosphate  $0.1 \text{ M}$  à  $\text{pH} = 8.17$  et une solution  $\text{NaHCO}_3$   $1 \text{ M}$  à  $\text{pH} = 8.05$  ont été comparés. Les perméances calculées à partir des plateaux des concentrations en ppm coté relargage, sont présentés à la Fig.5.14.

#### b. Procédé d'adsorption en 2 étapes

Dans ces expériences, la membrane NY20 imprégnée de gel de silice séché a été, dans une 1<sup>ère</sup> étape, trempée pendant 40 min dans 4 mL de tampon sans enzyme. A l'issue de cette étape, elle a été immergée pendant 45 min dans 4 mL du même tampon contenant  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Les mêmes tampons que ceux utilisés dans le procédé d'adsorption en 1 étape ont été comparés. Les perméances obtenues sont regroupées avec celles du procédé en 1 étape Fig.5.14.

Ces tests ont montré que l'imprégnation par un gel de silice et ensuite d'un tampon diminuait très légèrement la perméance de la membrane polymérique simplement imprégnée de liquide. La silice, vraisemblablement, ne diminue pas énormément la taille des pores. En effet, les diverses microscopies (notamment à la Fig.5.23 ; page 189) des membranes contenant un gel de silice ont montré que le gel enrobe principalement les fibres en nylon de la membrane alors que les espaces entre les fibres de nylon restent relativement vides et donc accessibles, même si la silice bouche quelques pores de la membrane polymérique. Par contre, l'adsorption d'enzyme dans un tampon à  $\text{pH} = 8$ , même dans une membrane polymérique imprégnée de silice, améliore cette perméance.

A la suite de cette série de tests, une solution  $\text{NaHCO}_3$   $1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} \approx 8$  a été retenue car il donne des résultats supérieurs. Comme pour les membranes liquides, les ions  $\text{HCO}_3^-$  maintenus en concentration élevée par équilibrage initial avec des ions  $\text{Na}^+$ , permettent de travailler en régime permanent dans un domaine de  $\text{pH}$  plus favorable à ces ions, donc à l'enzyme.

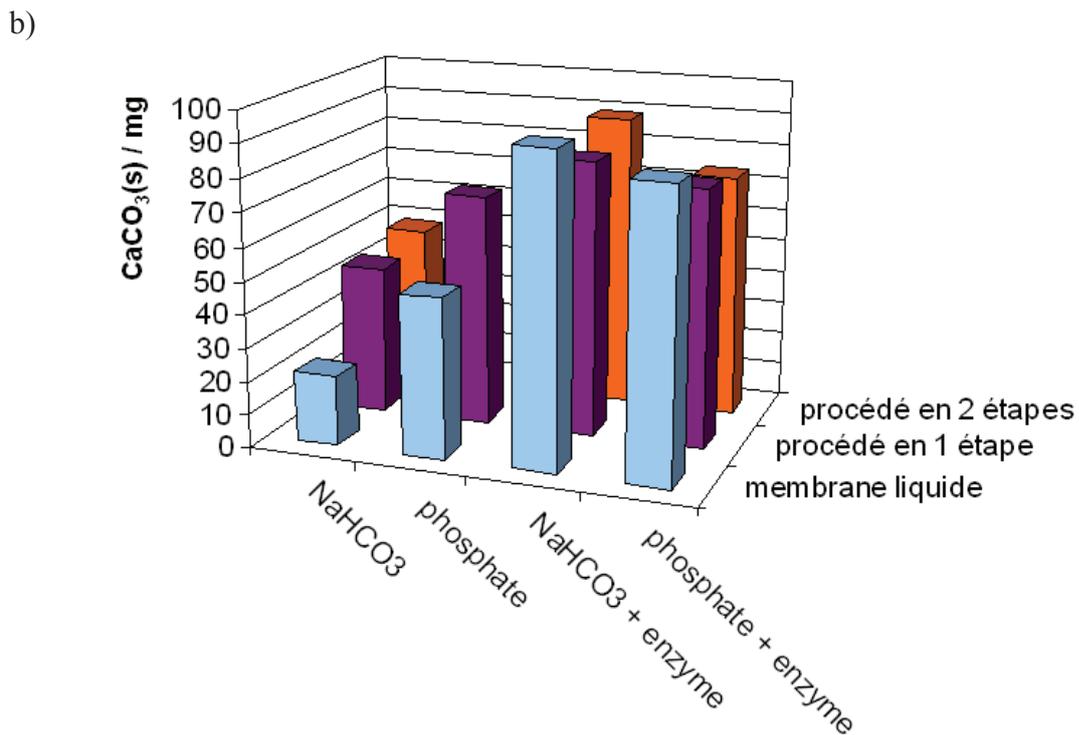
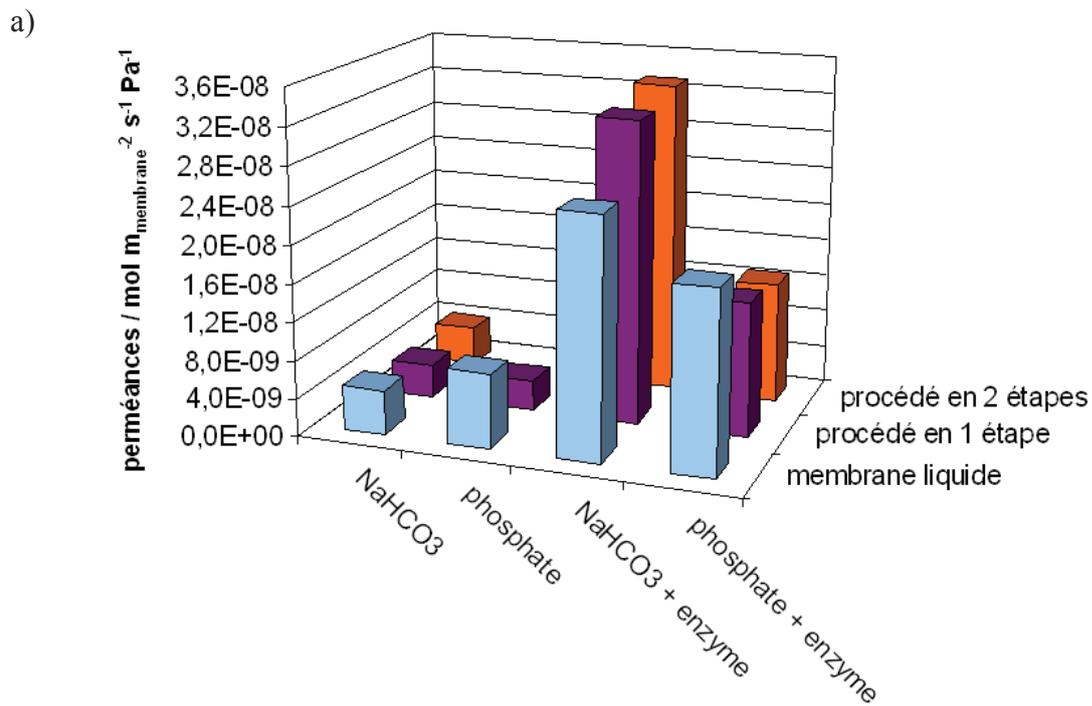


Figure.5.14: Effet d'un tampon sur le transfert de CO<sub>2</sub> dans des membranes hybrides: (a) Perméances déduites des plateaux concentration en CO<sub>2</sub> coté relargage ; (b) masses de CaCO<sub>3</sub> déposée en 1 h. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) à un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

### 5.3.4. Effet du procédé et des durées de trempage de la membrane polymérique

#### a. Effet du temps du temps de trempage durant le procédé en 1 étape

La durée du temps de trempage dans un tampon lors du procédé en 1 étape, ne modifie pas la perméance de la membrane imprégnée de gel de silice. Ainsi pour une membrane NY20, et un temps de trempage allant de 22 à 60 min dans un tampon phosphate 0.1 M à pH = 8.17 sans enzyme, cette perméance est de  $3.31 \cdot 10^{-9} \pm 3.46 \cdot 10^{-10} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ . Dans une solution de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme dans le tampon, cette perméance est de  $1.09 \cdot 10^{-8} \pm 1.35 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ . Concernant les masses moyennes de  $\text{CaCO}_3$  précipitées en 1 h, les valeurs moyennes sont de  $41.2 \pm 1.3 \text{ mg}$  et de  $57 \pm 2.7 \text{ mg}$  respectivement sans enzyme et avec enzyme.

L'influence du temps de trempage lors du procédé en 1 étape, a également été étudié sur une membrane NY60 dont la taille des pores est de  $60 \mu\text{m}$ , mais cette fois dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  1 M à pH = 8.05. Les courbes de concentration en  $\text{CO}_2$  relargué en fonction du temps, pour des durées de trempage dans une solution d'enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  dans le tampon, sont rapportées Fig.5.15. Cette figure montre un pic initial de concentration de  $\text{CO}_2$  relargué, dû à un ré-équilibre initial de la solution  $\text{NaHCO}_3$  1 M, qui contient une grande proportion d'ions  $\text{HCO}_3^-$ , avec l'azote du gaz de balayage coté relargage. Là aussi la perméance déduite des plateaux ne dépend pas du temps de trempage. Sa valeur est de  $2.69 \cdot 10^{-8} \pm 2.24 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , alors que la masse de  $\text{CaCO}_3$  précipitée en 1 h était de  $86.8 \pm 8.2 \text{ mg}$ .

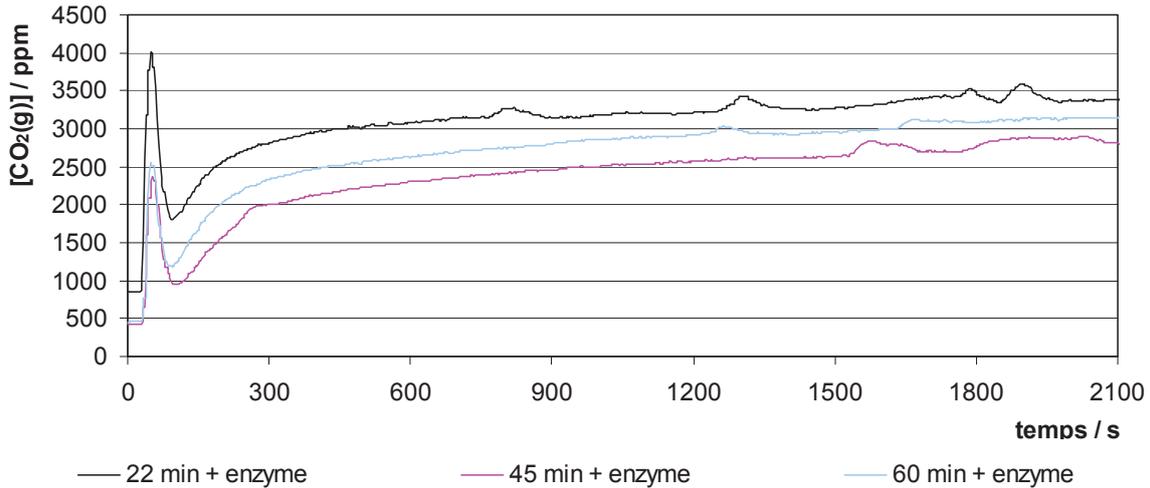


Figure.5.15: Evolution en fonction du temps de la concentration de CO<sub>2</sub> relargué pour une membrane hydrophile NY60 imprégnée d'un gel de silice séché, puis imprégnée d'une solution tampon contenant 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme selon le protocole en 1 seule étape, en fonction de la durée d'imprégnation. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

A la suite de cette étude, le temps de trempage au cours de la 1<sup>ère</sup> étape du procédé en 2 étapes dans un tampon NaHCO<sub>3</sub> (1M / pH = 8.05) sans enzyme, a été maintenu fixe à 40 min.

### **b. Influence du temps d'adsorption d'enzyme durant la 2<sup>ème</sup> étape du procédé en 2 étapes**

L'influence du temps de trempage de la 2<sup>ème</sup> étape dans 4 mL du même tampon soit sans enzyme, soit contenant 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, a été étudié dans une gamme allant de < 1 à 120 min. A la précision des mesures près, la valeur des perméances ne dépend pas du temps de trempage lors du cas sans enzyme. La moyenne sur les temps de trempage de < 1 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 et 120 min, est de  $3.61 \cdot 10^{-9} \pm 4.49 \cdot 10^{-10} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  sans enzyme dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M.

Pour une membrane NY20, les résultats des calculs de perméance à partir des plateaux de concentration du CO<sub>2</sub> relargué, sont comparées Fig.5.16a, et le CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h

Fig.5.16b. Suite à ces résultats, une durée de 30 min a été sélectionnée pour le temps de trempage de la 2<sup>ème</sup> étape, puisque la perméance présente un léger maximum pour cette durée.

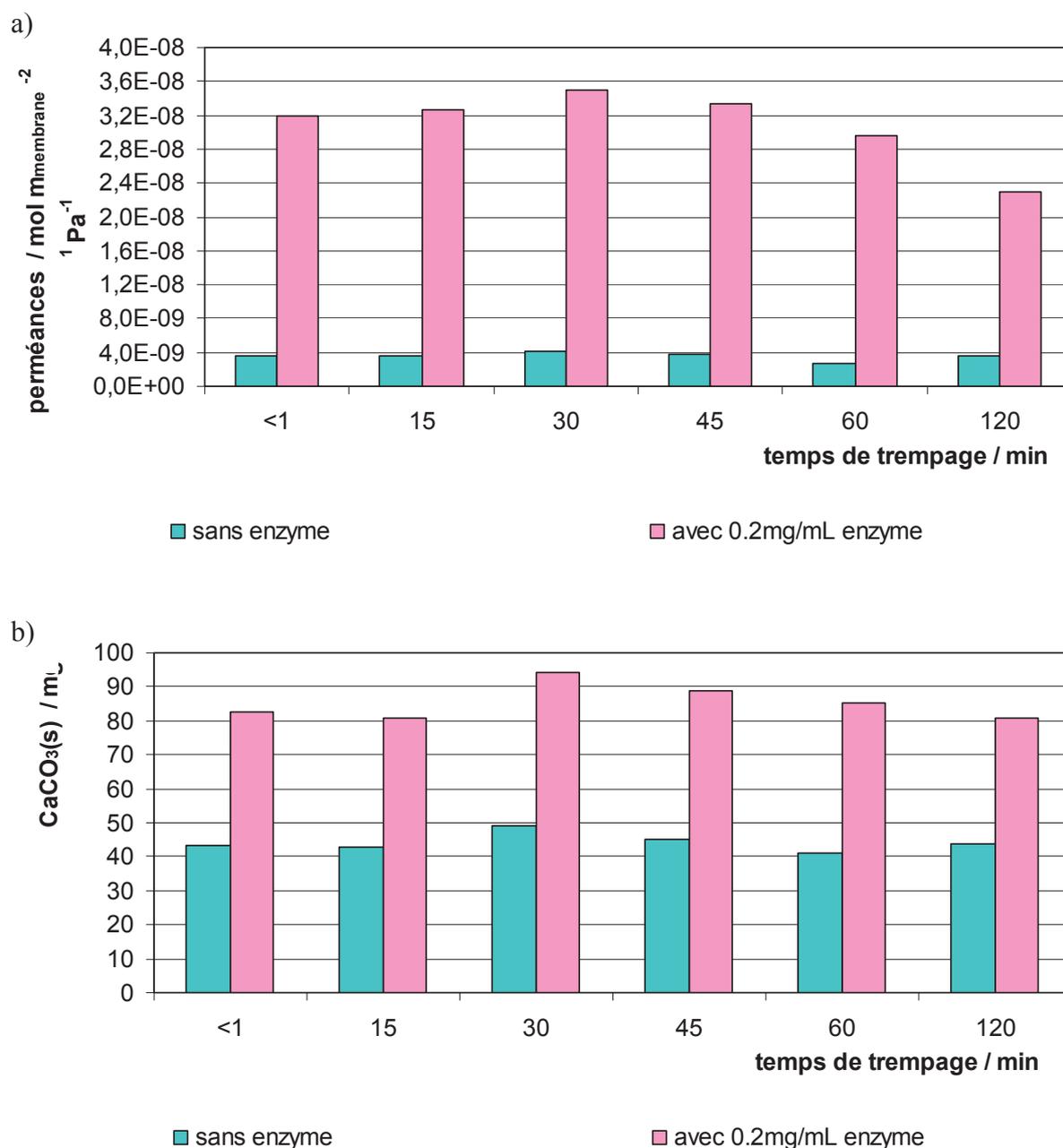


Figure.5.16: Influence de la durée de la 2<sup>ème</sup> étape du procédé d'adsorption dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M avec une membrane NY20 sur: (a) les perméances, déduites des plateaux de concentration en CO<sub>2</sub> coté relargage ; (b) la masse de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h. Gaz à capter sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) à un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

Les meilleures perméances ainsi que les masses de carbonate solide obtenues sont comparées dans le Tableau.5.1 à celles de la membrane liquide imprégnée pendant 45 min dans 4 mL de tampon phosphate (0.1M / pH = 8.17) (voir Chapitre 4 au Tableau.4.5).

Tableau.5.1: Perméances et masses de CaCO<sub>3</sub> précipitées en 1 h, avec une membrane en nylon NY 20 contenant un tampon phosphate 0.1 M pH = 8.17, et avec une membrane en nylon contenant un gel de silice séché sans méthanol et sans enzyme imprégnée par trempage en deux étapes

	Membrane liquide		Membrane imprégnée de gel de silice séché	
Temps de trempage dans tampon (min)	45		Etape 1 : 40 Etape 2 : 30	
Concentration en enzyme (mg mL <sup>-1</sup> )	0	0.2	0	0.2
T (°C)	19	22	21	21
Perméance (mol/(m <sub>membrane</sub> <sup>2</sup> sPa))	7.89 10 <sup>-9</sup>	1.92 10 <sup>-8</sup>	4.13 10 <sup>-9</sup>	3.50 10 <sup>-8</sup>
Masse de CaCO <sub>3</sub> (s) précipitée en 1 h (mg)	48.2	86.1	45.1	94.3

Le Tableau 5.1 montre que la membrane hybride se comporte mieux qu'une simple membrane liquide réalisée à partir de la même membrane en nylon, toutes 2 imprégnées de la même solution d'enzyme dans du tampon.

Les résultats équivalents pour une membrane nylon NY60 dont la taille des pores est de 60 µm, sont présentés Fig.5.17. Les perméances ne sont que marginalement supérieures à celles obtenues avec la membrane NY20.

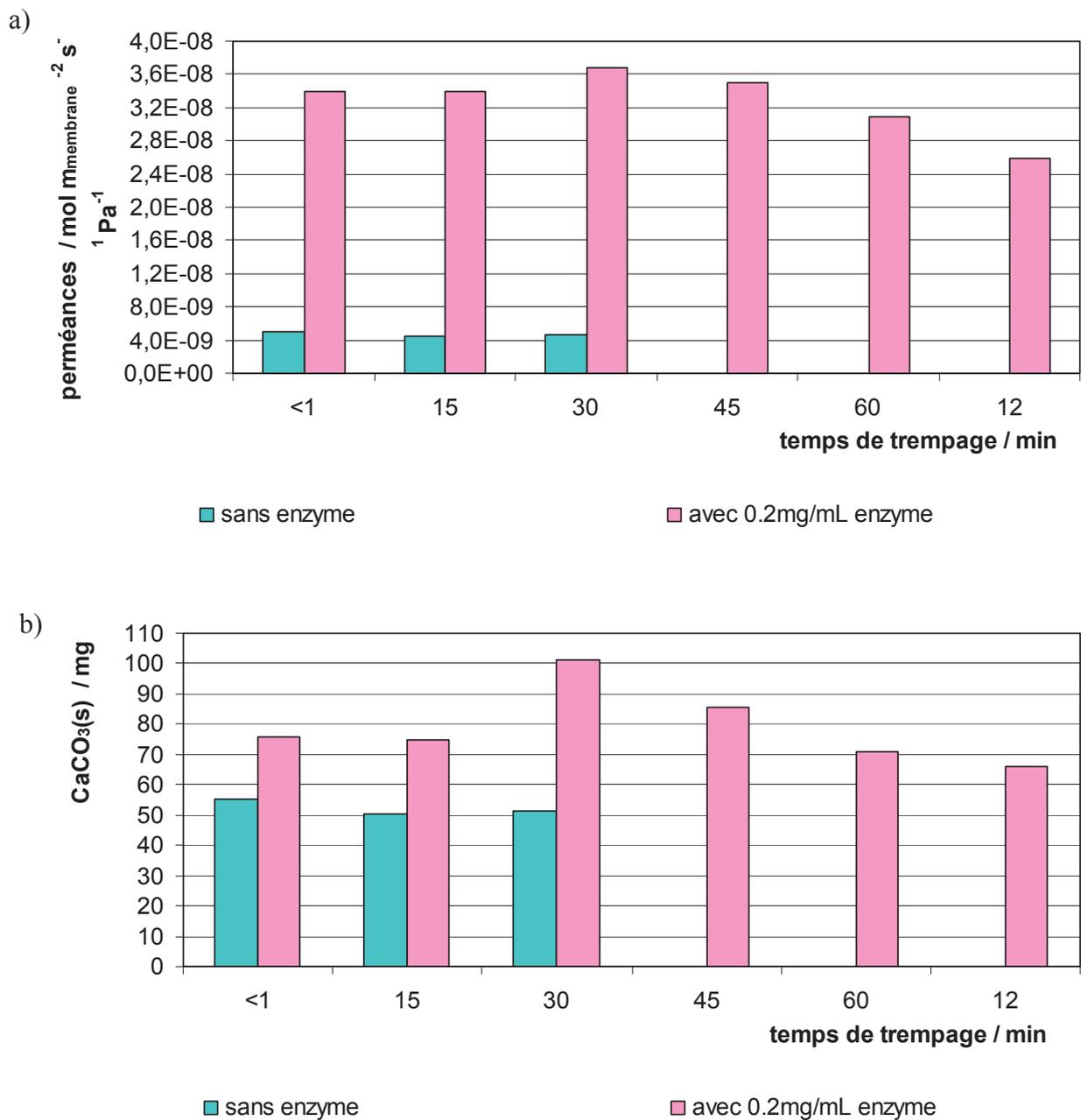


Figure.5.17: Influence de la durée de la 2<sup>ème</sup> étape du procédé d'adsorption dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M avec une membrane NY60 sur: (a) les perméances, déduites des plateaux de concentration en CO<sub>2</sub> coté relargage ; (b) la masse de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h. Gaz à capter sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) à un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

### c. Comparaison des protocoles d'adsorption en 1 ou 2 étapes

Cas de la membrane NY 20:

Les résultats sur l'étude de deux procédés de trempage sont récapitulés Fig.5.18 sans ou avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme.

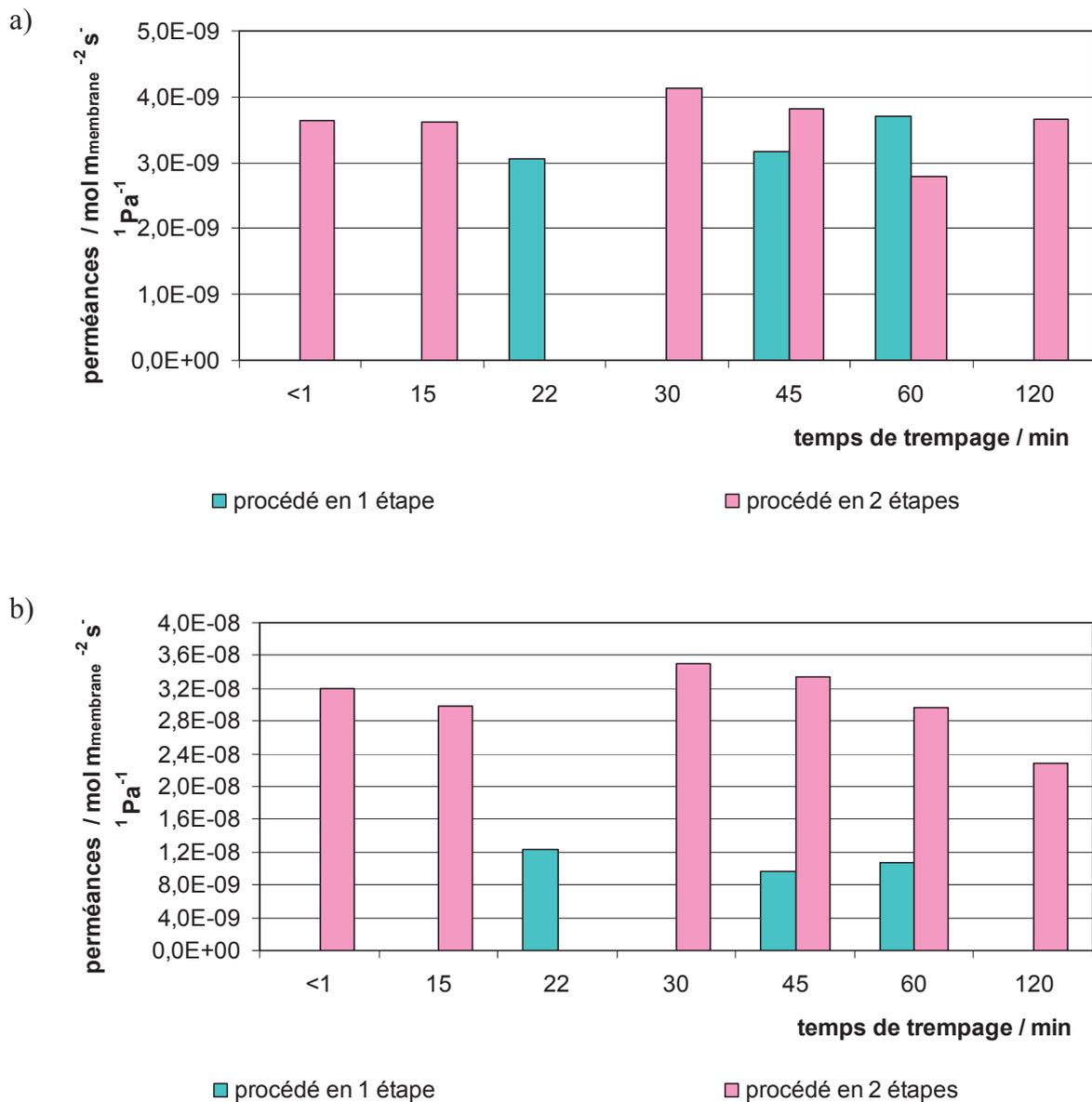


Figure.5.18: Récapitulatif des perméances obtenues pour les deux procédés de trempage: (a) sans enzyme ; (b) avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Gaz à 1 atm contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à un débit de  $1.08 \text{ L/h}$  coté captage, et azote à un débit de  $3.14 \text{ L/h}$  coté relargage. Le procédé en 1

étape dans un tampon phosphate 0.1 M et le procédé en 2 étapes dans une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M

M

Cas de la membrane NY 60:

Les résultats équivalents obtenus avec la membrane NY60 sont récapitulés Fig.5.19.

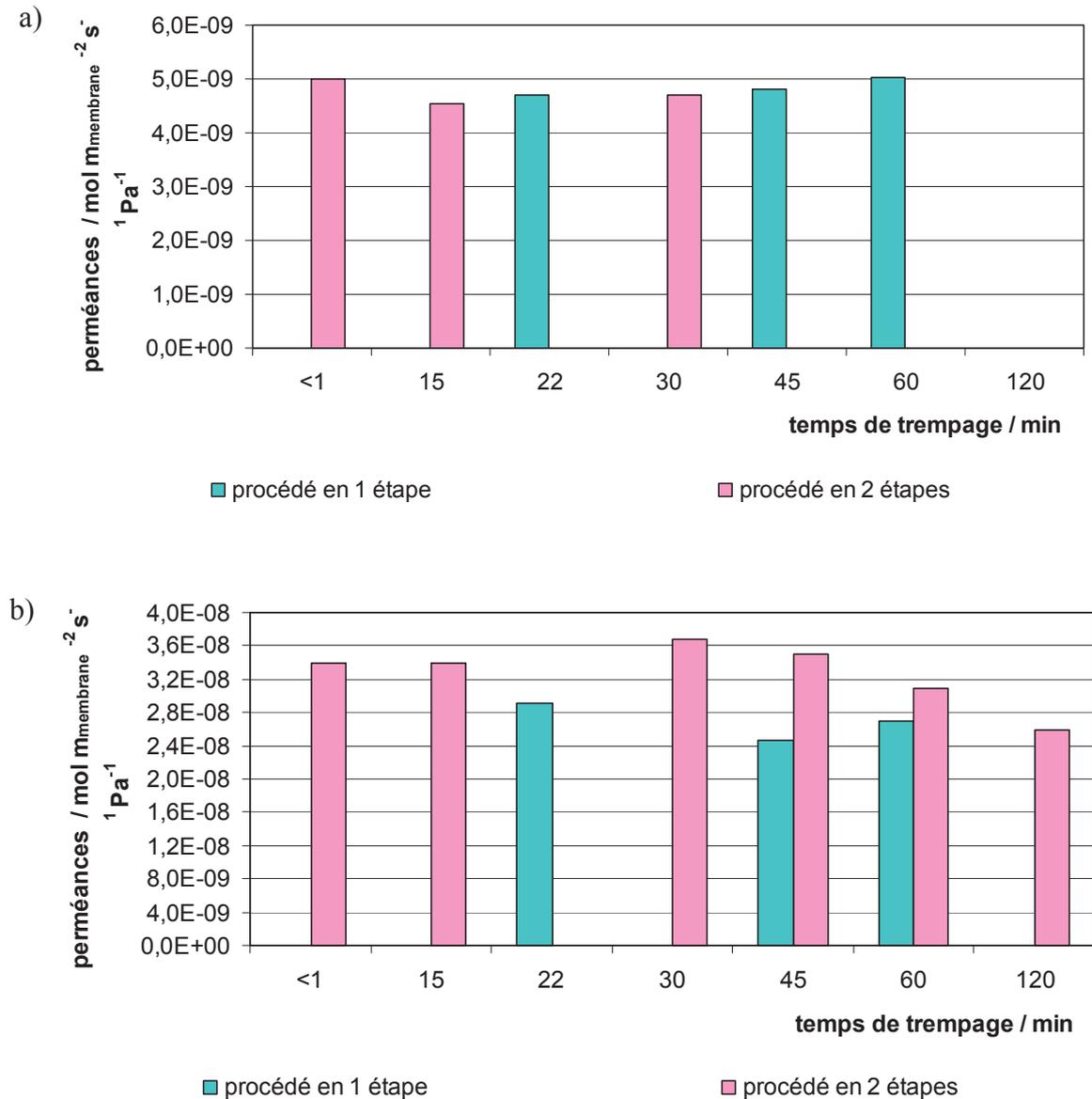


Figure.5.19: Récapitulatif des perméances obtenues pour les deux procédés de trempage avec une solution NaHCO<sub>3</sub> 1 M: (a) sans enzyme ; (b) avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme. Gaz à 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) à un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

Ces résultats montrent qu'avec les deux membranes, lorsque l'enzyme doit être adsorbée, le procédé de trempage en 2 étapes fournit une perméance plus élevée. Une explication possible est que le procédé en 2 étapes adsorbe préférentiellement les enzymes sur les faces externes de la membrane polymérique, dans une position où elles peuvent plus efficacement accélérer la déprotonation des espèces  $\text{CO}_2(\text{aq})$ , la distance de diffusion de ces espèces vers l'enzyme étant plus courte.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une durée de 30 min dans la 2<sup>ème</sup> étape, cette durée a donc été sélectionnée pour le temps de trempage de la 2<sup>ème</sup> étape, lors des études suivantes.

#### **d. Comparaison des deux membranes nylon pour le procédé de trempage à 2 étapes**

La comparaison des deux procédés de trempage de la section précédente, nous a permis de déterminer le meilleur trempage quelle que soit la membrane en nylon utilisée. Le procédé sélectionné est donc d'effectuer un 1<sup>er</sup> trempage de 40 min dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  1 M,  $\text{pH} \approx 8$ , sans enzyme, suivi d'un 2<sup>ème</sup> trempage ayant plusieurs temps dans la même solution contenant de l'enzyme.

Par ailleurs, une comparaison des deux membranes en nylon montre que la membrane NY60 est légèrement supérieure à la membrane NY20 (Fig.5.20). La membrane NY60 a donc été retenue pour l'étude des paramètres suivants. La différence est quand même faible, pour une porosité très différente (41 % pour NY60 et 14 % pour NY20). L'épaisseur serait donc primordiale, par rapport à la porosité.

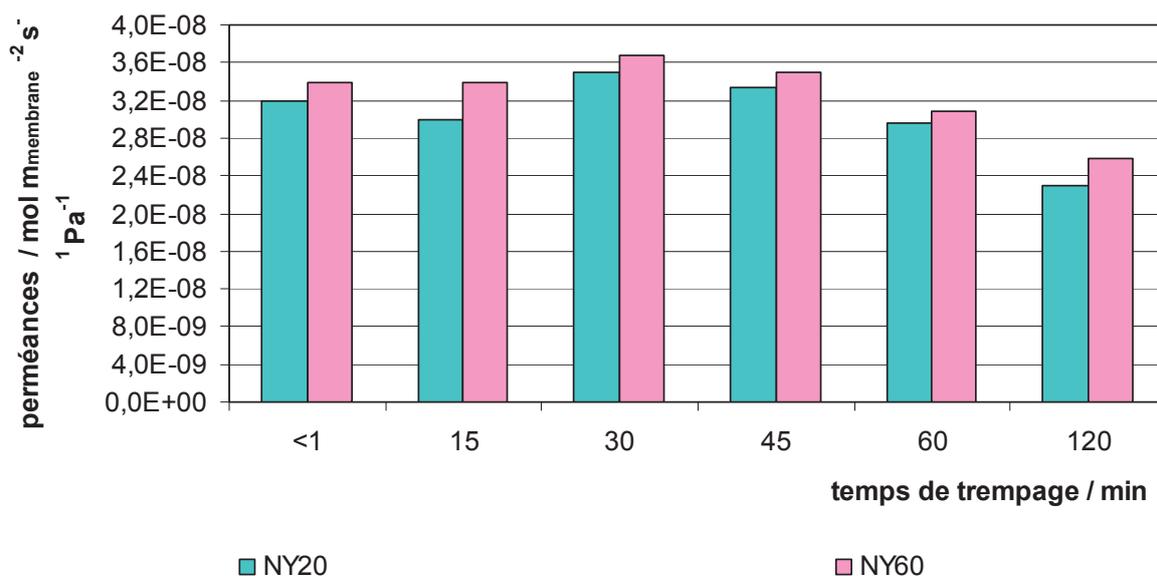


Figure.5.20: Récapitulatifs des perméances obtenues lors du procédé de trempage en 2 étapes avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme dans la solution  $\text{NaHCO}_3$  1 M,  $\text{pH} \approx 8$ , pour des membranes NY20 et NY60 contenant un gel de silice séché avant adsorption d'enzyme. Gaz à 1 atm contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

### 5.3.5. Effet de la concentration en enzyme dans la solution utilisée lors de la 2<sup>ème</sup> étape du procédé d'adsorption en 2 étapes

Des membranes nylon NY20 (nylon 20  $\mu\text{m}$ ) et NY60 (nylon 60  $\mu\text{m}$ ) imprégnées de gel et séchées, ont été soumises à l'adsorption d'enzyme pendant 30 min dans 4 mL d'une solution d'enzyme dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  (1 M /  $\text{pH} = 8.05$ ), lors de la 2<sup>ème</sup> étape selon le protocole d'adsorption en 2 étapes. Les perméances et les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipité en 1 h ont été déterminées pour des concentrations croissantes en enzyme dans cette solution, et sont présentées Fig.5.21a et 5.21b. Ces 2 graphiques concordent pour montrer qu'une concentration en enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  dans le tampon apparaît optimale. Ils confirment également une différence faible entre les membranes NY20 et NY60, en dépit d'une porosité assez différente.

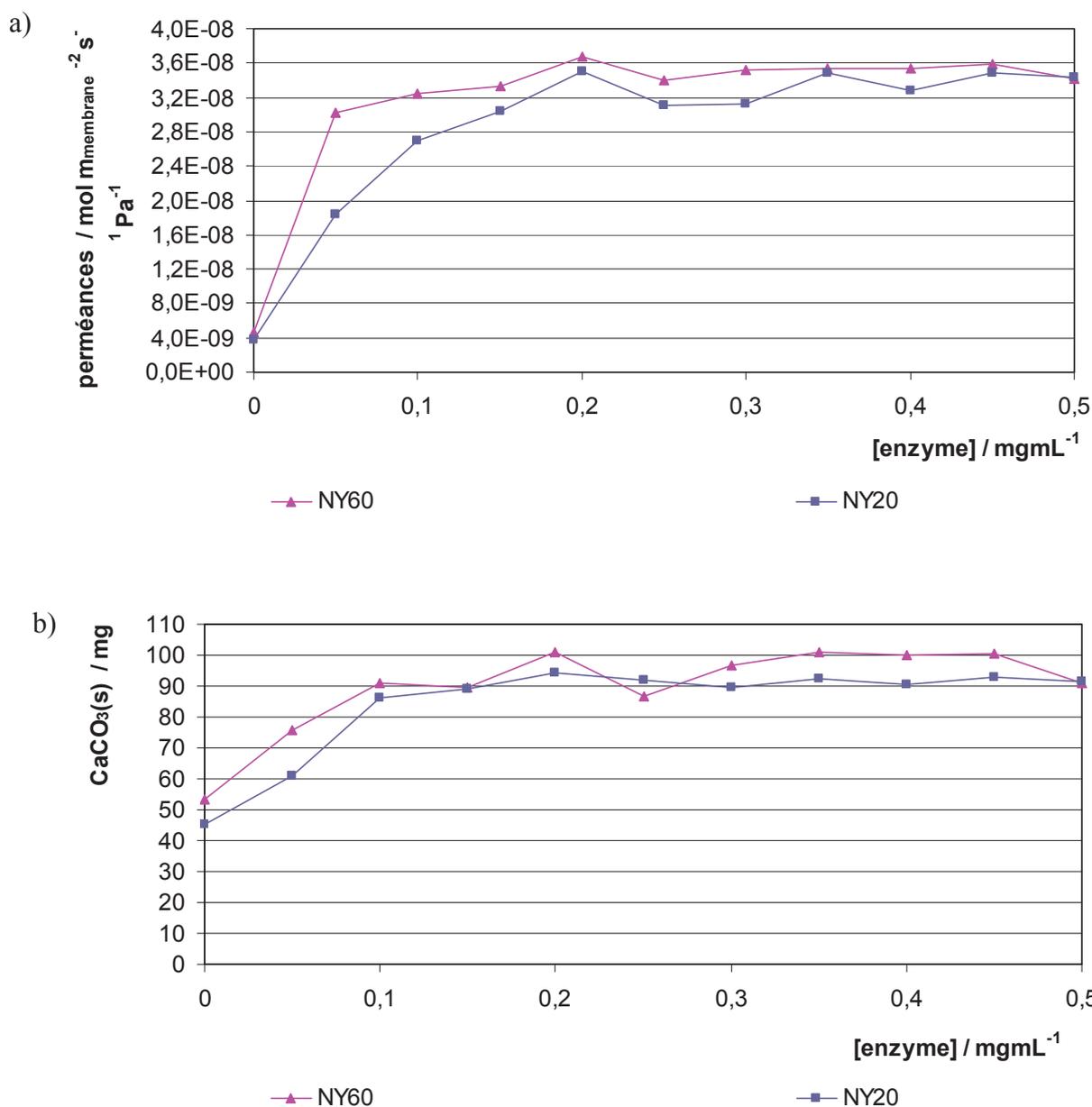
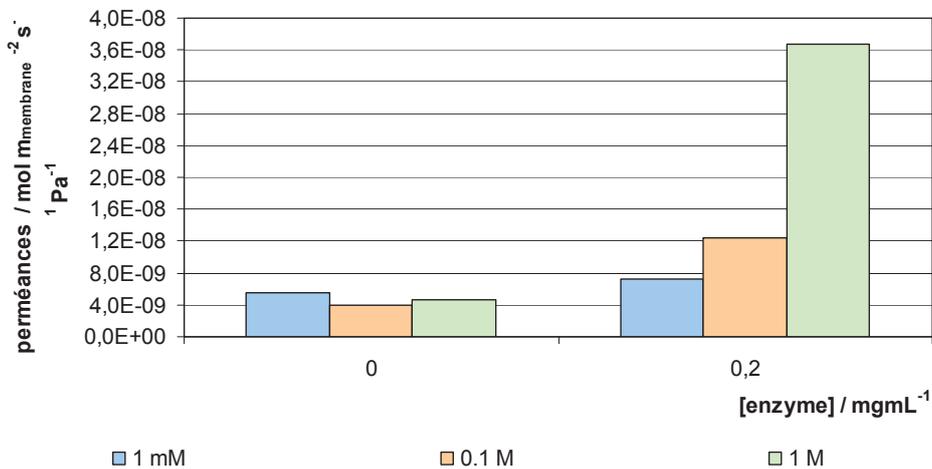


Figure.5.21: Influence de la concentration en enzyme dans la solution NaHCO<sub>3</sub> (1 M / pH = 8.05) d'adsorption selon le protocole d'imprégnation en 2 étapes sur: (a) la perméance ; (b) la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée en 1 h. Gaz soumis sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

### 5.3.6. Influence de la molarité de la solution $\text{NaHCO}_3$

Les membranes à imprégner par le sol de silice étaient des filets nylon NY60 de chez Millipore dont la taille des pores est de  $60 \mu\text{m}$ . Le 1<sup>er</sup> trempage s'effectue pendant 40 min dans 4 mL de solution  $\text{NaHCO}_3$  à  $\text{pH} \approx 8$  et le 2<sup>ème</sup> trempage pendant 30 min dans la même solution contenant  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Trois molarités de solution  $\text{NaHCO}_3$  ont été comparées: 1 mM ( $\text{pH} = 8.36$ ) ; 0.1M ( $\text{pH} = 8.15$ ) et 1M ( $\text{pH} = 8.05$ ). Les Figs.5.54a et b récapitulent les perméances et les masses de carbonate solide précipitées au bout d'1 h, obtenues avec les 3 molarités de solution  $\text{NaHCO}_3$ . Il apparaît clairement qu'une molarité 1 M est nettement plus efficace. C'est donc cette solution sélectionnée pour la suite des études.

a)



b)

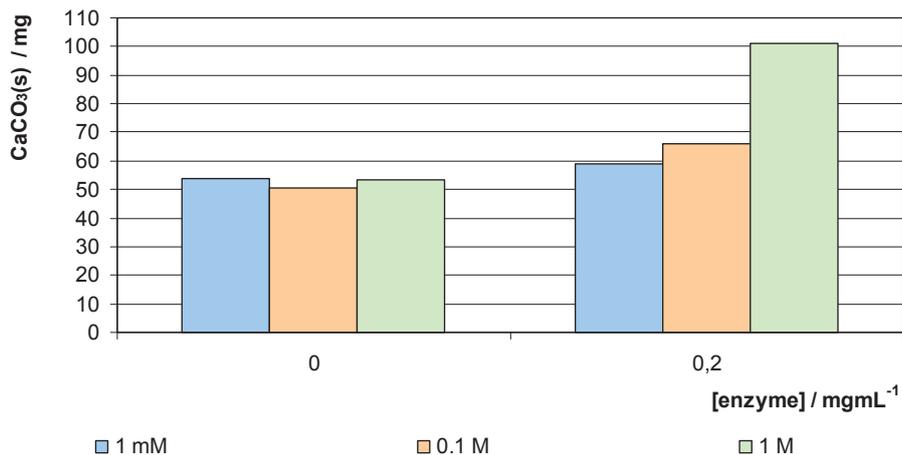


Figure.5.22: Récapitulatif: (a) des perméances ; (b) des masses de  $\text{CaCO}_3$  précipitées en 1 h, pour 3 molarités différentes d'une solution  $\text{NaHCO}_3$   $\text{pH} \approx 8$ . Gaz à 1 atm contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à un débit de  $1.08 \text{ L/h}$  coté captage, et azote à un débit de  $3.14 \text{ L/h}$  coté relargage

### 5.3.7. Influence de la concentration en silice lors de l'imprégnation sol-gel des membranes en nylon

Différents sols de silice ont été préparés en modifiant la concentration en silice lors de leur préparation, par rapport au sol de silice de référence utilisé jusqu'ici, et testés par imprégnation dans les membranes en nylon NY60. Le tampon utilisé était du  $\text{NaHCO}_3$  1 M à  $\text{pH} \approx 8.05$  et la concentration en enzyme lors de la 2<sup>ème</sup> étape d'adsorption de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### a. Synthèse des sols de silice

Les paramètres de synthèse de sols de silice utilisés sont regroupés au Tableau.5.2. Dans cette série, le méthanol avait été évaporé à l'évaporateur rotatif à  $50^\circ\text{C}$ , sous un vide de 75 mbar pendant 4 min. La perte en masse, supérieure à la masse de méthanol potentiellement libérée par hydrolyse de tous les groupements méthoxy du TMOS a été compensée par l'ajout d'une masse d'eau distillée équivalente. Le temps de gélification a été déterminé sur l'excès de sol utilisé pour imprégner une membrane NY60.

Tableau.5.2: Paramètres de synthèse des sols de silice utilisés pour l'imprégnation d'une membrane nylon NY60

Sol de silice	TMOS (mmol)	Eau distillée ( $\mu\text{L}$ )	HCl aqueux $\text{pH} = 2.8$ ( $\mu\text{L}$ )	Rapport d'hydrolyse $n_{\text{eau}} / n_{\text{TMOS}}$	Perte en masse (g)	Temps de gélification: tg
Référence	14.77	5472	688	23.17	2.69	2 h 35
Dilué	7.385	5472	688	46.34	1.6	7 h 02
Concentré	29.54	5472	688	11.58	3.048	3 h 05

Chaque membrane imprégnée de sol de silice a été gélifiée à l'air et conservée dans une boîte hermétique pendant 2 jours avant son utilisation. Lors de son utilisation, la membrane imprégnée de sol de silice séché était imprégnée d'une solution d'enzyme dans du tampon,

placée en sandwich entre deux membranes hydrophobes du type GVHP utilisées précédemment avec la membrane liquide, et positionnées dans la cellule de captage de CO<sub>2</sub>.

### b. Aspect des membranes

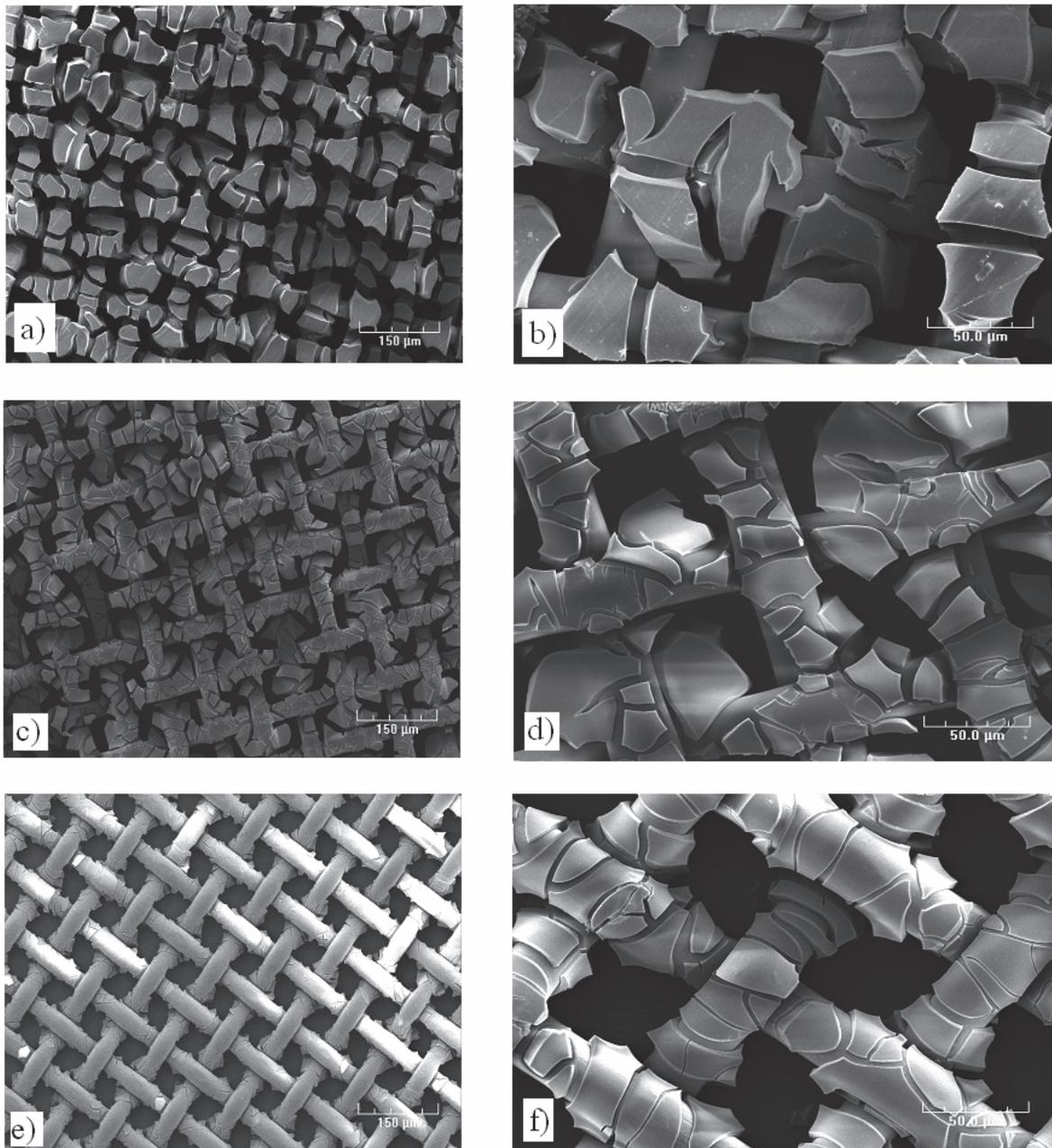


Figure.5.23: Micrographies au microscope à balayage à deux grossissements, des membranes NY 60 contenant du gel de silice séché, réalisées à partir de sol de concentrations différentes en silice: a) et b) sol de silice de référence ; c) et d) sol de silice concentré ; et e) et f) sol de silice dilué

Ces micrographies nous indiquent, d'une part, que sur toute la surface de chacune des membranes, le gel est imprégné de manière homogène, d'autre part, que la dilution du sol de silice permet d'obtenir une épaisseur de gel beaucoup plus fine comportant beaucoup moins de « craquelures ».

### **c. Comportement des membranes hybrides lors du captage de CO<sub>2</sub>**

Chaque membrane hybride sèche a été trempée, dans un 1<sup>er</sup> temps pendant 40 min dans 4 mL de solution NaHCO<sub>3</sub> (1 M / pH = 8.05), puis pendant 30 min dans la même solution contenant ou non 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme. Les perméances ont été calculées à partir des plateaux de concentration en CO<sub>2</sub> relargué en fonction du temps et sont regroupées sur la Fig.5.24 ainsi que toutes les masses de CaCO<sub>3</sub> formées au bout d'1 h.

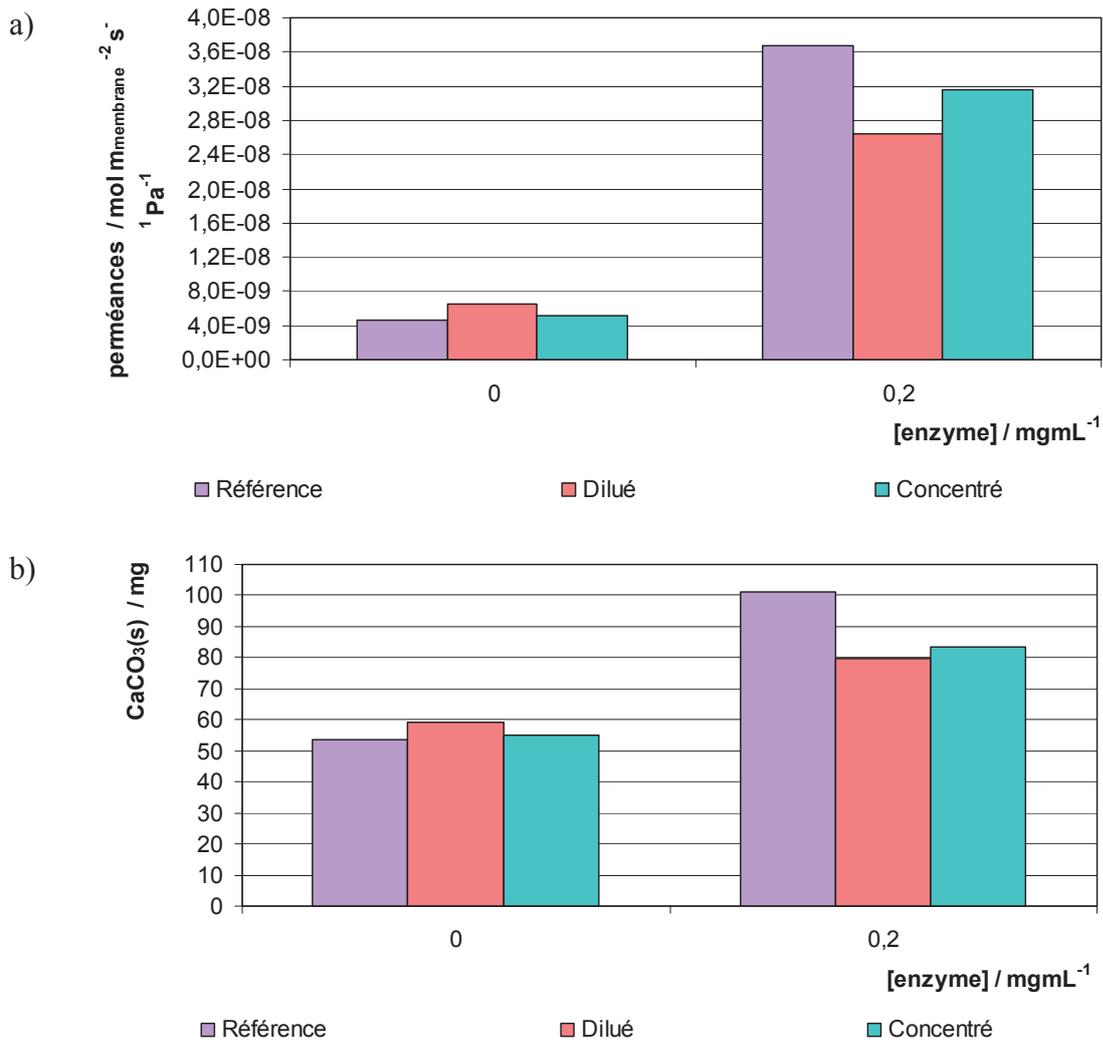


Figure.5.24: Récapitulatif: (a) des perméances ; (b) des masses de  $\text{CaCO}_3$  précipitées en 1 h, pour 3 concentrations différentes en silice du sol de silice. Solution  $\text{NaHCO}_3$  1 M,  $\text{pH} \approx 8$ . Gaz à 1 atm contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$  à un débit de 1.08 L/h coté captage, et azote à un débit de 3.14 L/h coté relargage

## **5.4. Influence d'un dépôt de $\text{CaCO}_3$ solide dans la membrane**

### **5.4.1. Objectif**

L'objectif était de modifier la nature du solide déposé dans la membrane hybride, pour le remplacer, au moins en partie, par un solide d'acidité différente de la silice. Dans ce but, des procédés sol-gel mettant en oeuvre d'autres oxydes que la silice peuvent bien sur être envisagés. Mais le  $\text{CO}_2$  capté pouvait aussi être utilisé pour déposer « in-situ » du  $\text{CaCO}_3$ , à l'intérieur de la membrane. Les 1<sup>ers</sup> efforts dans cette direction sont présentés dans cette partie.

### **5.4.2. Essais préliminaires de dépôt de $\text{CaCO}_3$ avec l'enzyme**

Chronologiquement, ces essais sont venus en complément des études de précipitation de  $\text{CaCO}_3$ , en tant qu'indice de transfert de  $\text{CO}_2$  étudié au Chapitre 3 (section 3.3). Rappelons que les mesures ont porté sur la précipitation du  $\text{CaCO}_3$  dans un mélange composé d'un volume X d'eau qualité HPLC (ici X = 20 mL), saturée en  $\text{CO}_2(\text{g})$  par bullage sous une pression d'environ 0.1 MPa, pendant 60 min contenant une quantité variable d'enzyme (quelques mg), d'un volume T de tampon Tris-HCl (ici T = 5 mL), de pH initial 8.4 ; 9.4 ou 10.5, et d'un volume Y (ici Y = 2mL) d'eau HPLC dans lequel 0.3 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.054 mmol) était préalablement dissous. Le tout est soumis à une agitation magnétique à 1200 tours  $\text{min}^{-1}$ . Dans tous les tests, le volume aqueux total (X+T+Y) était d'environ 27 mL. La concentration initiale de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  était de 76 mM. La réaction était arrêtée au bout d'un temps variable par filtration de la solution et pesée du  $\text{CaCO}_3$  précipité.

Globalement, la Fig.5.25 montre que l'enzyme a remarquablement augmenté la vitesse apparente initiale de précipitation de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$ , mesurée durant la 1<sup>ère</sup> minute. Cette vitesse apparente s'est accrue d'un facteur > 10 lorsque 4 mg d'enzyme était ajouté à 5°C. Toutefois,

la Fig.5.25 montre également l'existence d'une quantité optimale d'enzyme pour laquelle cette vitesse initiale de précipitation est maximale. Dans la présente étude, cette masse d'enzyme optimale était  $\leq 1$  mg (1.3 U). Ce résultat en apparence surprenant peut s'expliquer par le fait qu'une plus grande masse d'enzyme accroît, dans un 1<sup>er</sup> temps, la vitesse de formation des ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{H}^+$ . Le pH décroît donc plus rapidement vers des valeurs basses défavorables à la formation des ions carbonates  $\text{CO}_3^{2-}$ , ce qui finit par ralentir la précipitation initiale de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$ . Finalement, la masse totale de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipitée ne dépend toutefois pas de la présence d'enzyme. L'enzyme modifie en effet uniquement la vitesse pour atteindre un équilibre où le pH est trop bas pour continuer à précipiter du  $\text{CaCO}_3$  mais ne modifie pas cet équilibre lui-même après 15 min de précipitation. Cette masse finale ne dépend que du tampon utilisé initialement, de son pH et de sa molarité.

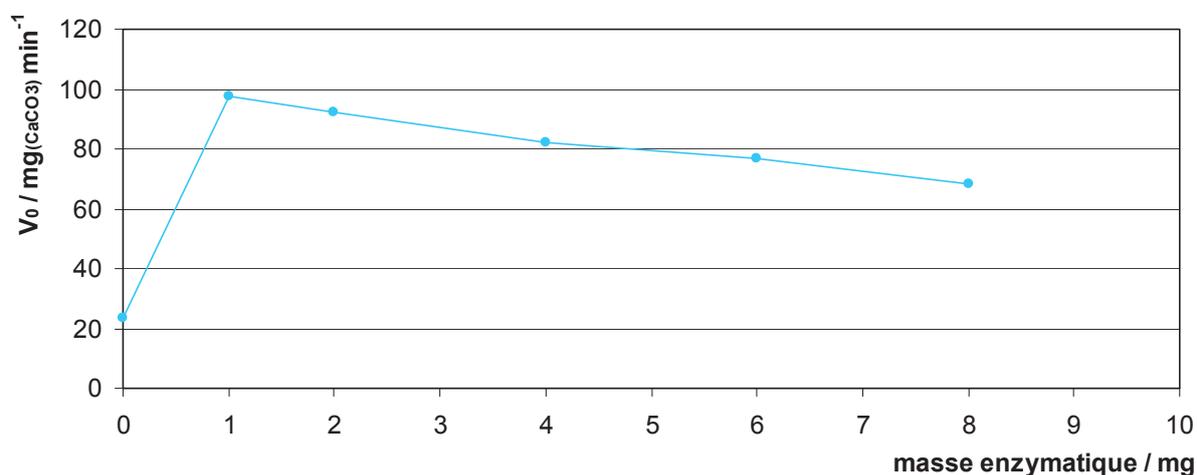


Fig.5.25: Vitesse initiale  $V_{0E}$  de formation de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  en fonction de la quantité d'enzyme, pour un volume  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , un volume  $T = 5$  mL de tampon à pH 10.5, un volume total aqueux 27 mL et 0.3 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , à  $20^\circ\text{C}$

Les solides précipités ont été analysés par diffraction des rayons X, sous la radiation  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0,154$  nm), au moyen d'un diffractomètre Theta-theta vertical Bruker D5005, équipé d'un monochromateur en graphite. Sans enzyme, la phase cristallographique du  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  formé après 15 min de réaction dépend du pH du tampon utilisé (Fig.5.26). En particulier, à  $20^\circ\text{C}$  avec un volume  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et un volume  $T = 5$  mL de tampon à pH 8.4 ou 9.4, les spectres de diffraction X montrent uniquement la présence de

la phase « Calcite », alors que la phase « Vatérite » dominait lorsqu'un tampon à pH 10.5 était utilisé (Fig.5.26). Par contre, toujours dans le même tampon à pH = 10.5, l'ajout d'enzyme a favorisé la conversion de Vatérite en Calcite, à 5°C comme à 20°C (Fig.5.27). La température présente une influence, puisqu'à 20°C cette conversion est complète alors qu'à 5°C elle n'est que partielle.

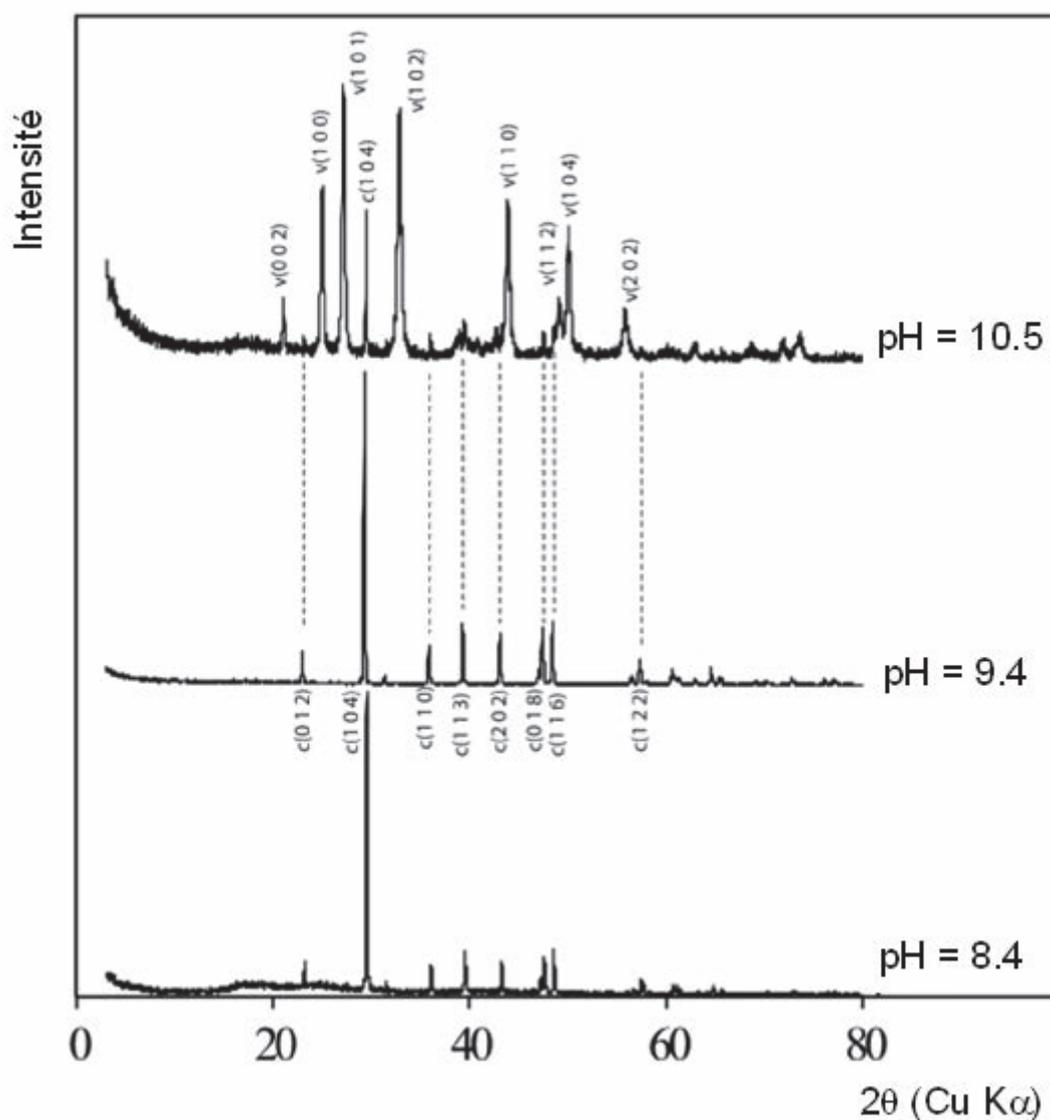


Figure.5.26: Spectres de diffraction rayons X du solide CaCO<sub>3</sub>(s) précipité avec un volume X = 20 mL d'eau saturée en CO<sub>2</sub>, un volume T = 5 mL de tampon à différents pH, sans enzyme, après 15 min de précipitation à 20°C (radiation Cu Kα)

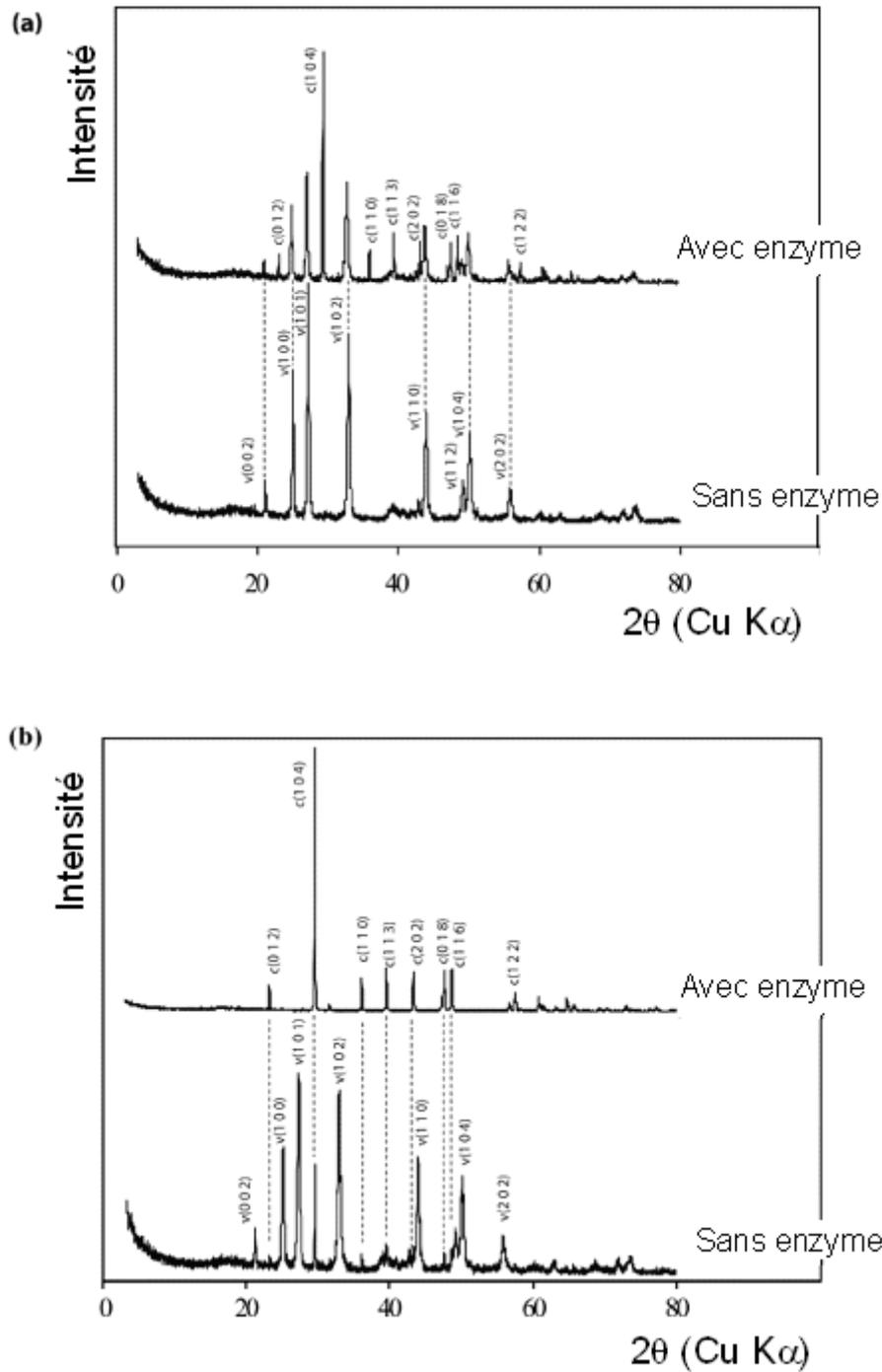


Figure.5.27: Spectres de diffraction X -Ray du solide  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  précipité avec un volume  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , un volume  $T = 5$  mL de tampon à pH 10.5, avec ou sans enzyme, après 15 min de précipitation à: (a)  $\approx 5^\circ\text{C}$  et (b)  $\approx 20^\circ\text{C}$  (radiation Cu  $K\alpha$ )

Des micrographies ont également été prises sur des échantillons sélectionnés, au moyen d'un microscope électronique à balayage (MEB) de type JEOL JSM 5800 LV, sous une tension électrique de 20 kV. Pour de telles observations, un prélèvement de chaque échantillon solide à examiner a été fixé sur un support au moyen d'un film de carbone et métallisé avec de l'or pendant 2.5 min dans un pulvérisateur atomique cathodique. Des micrographies montrant les cristaux de Vaterite et de Calcite obtenus sont présentées Fig.5.28. Les deux variétés de  $\text{CaCO}_3$  adoptent une structure de type hexagonal<sup>71, 72</sup>, mais la Vaterite est plus complexe et montre un empilement de cristallites conduisant à la croissance de particules sphériques et poreuses. Par opposition, les cristaux de Calcite montrent une forme rhomboédrique à facettes bien marquées.

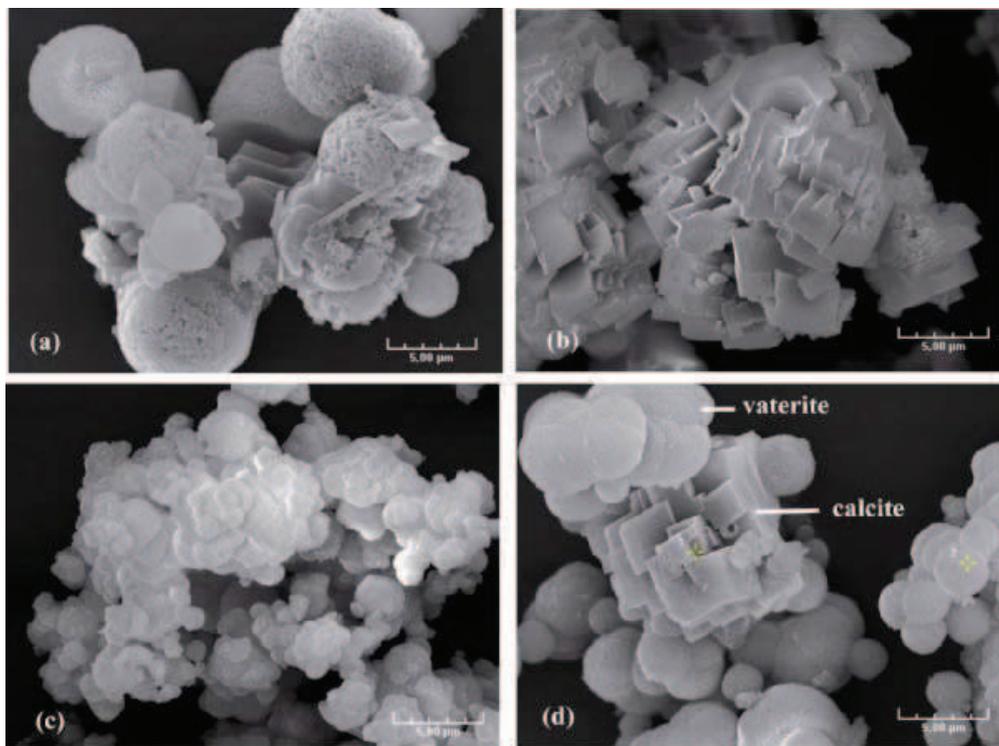


Figure.5.28: Micrographies, prises au Microscope électronique à Balayage, de  $\text{CaCO}_3$  solide synthétisé avec  $X = 20$  mL d'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et  $T = 5$  mL de solution tampon à pH 10.5, après 15 min de précipitation: (a) à  $\approx 5^\circ\text{C}$  avec enzyme; (b) à  $20^\circ\text{C}$  avec enzyme; (c) à  $5^\circ\text{C}$  sans enzyme; et (d) à  $20^\circ\text{C}$  sans enzyme

Une influence catalytique directe de l'enzyme sur la forme cristallographique n'est pas vraisemblable. Toutefois des changements de structure cristallographique et / ou de formes

des particules ont souvent été observés lorsque des particules solides germent et croissent en milieu liquide <sup>73</sup>.

Des transitions de forme peuvent être dues à la concentration des oligomères en solution issus du précurseur, ici  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Elles n'impliquent alors pas de modification cristallographique du solide. De plus, les 1<sup>ères</sup> particules qui germent ne sont pas obligatoirement de la phase thermodynamiquement la plus stable: cette phase dépend de la nature des oligomères qui atteignent en premier une sursaturation critique. Par contre la phase stable peut se former dans un 2<sup>ème</sup> temps par dissolution re-précipitation des particules initiales. Les présentes observations cristallographiques et microscopiques suggèrent qu'un tel phénomène s'est produit dans la présente étude. D'une part la Vatérite peut se former à un pH de l'ordre de 10.5 et elle est plus soluble que la Calcite <sup>74</sup>. D'autre part une phase métastable transitoire a plus de chance d'être observée lorsque la cinétique de formation globale est relativement lente, c'est-à-dire ici à 5°C plutôt qu'à 20°C et également quand l'enzyme est présente puisqu'elle diminue plus rapidement le pH, conformément aux présentes observations. Par ailleurs nous avons vu au Chapitre 3 dans la section 3.2 que les protéines pouvaient, dans certains cas, catalyser la formation d'un solide. Il n'est donc pas exclu que dans le cas présent l'anhydrase carbonique ait eu une action catalytique de ce type.

### **5.4.3. Dépôt $\text{CaCO}_3$ dans des membranes liquides et comportement des membranes dans le captage du $\text{CO}_2$**

Les membranes imprégnées pendant 45 min par une solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,292 M / pH initial = 10.5 dans un tampon Tris sans ou avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, étaient des filets nylon NY20 ou NY60 de chez Millipore.

La Fig.5.29 montre l'évolution du  $\text{CO}_2$  relargué avec ou sans enzyme, en fonction du temps pour une membrane NY20. Cette concentration augmente d'abord rapidement, puis elle diminue progressivement et tend finalement vers un plateau. Deux raisons peuvent expliquer cette diminution progressive et ce plateau. La 1<sup>ère</sup> est un bouchage partiel progressif des pores de la membrane par du  $\text{CaCO}_3$  solide, la 2<sup>ème</sup> une baisse progressive du pH. Les perméances finales étaient respectivement de  $7.39 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  et de  $1.86 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$

$m_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  sans et avec enzyme. Les masses de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  obtenues au bout d'1 h étaient de 41.1 mg sans enzyme et de 67.7 mg avec enzyme.

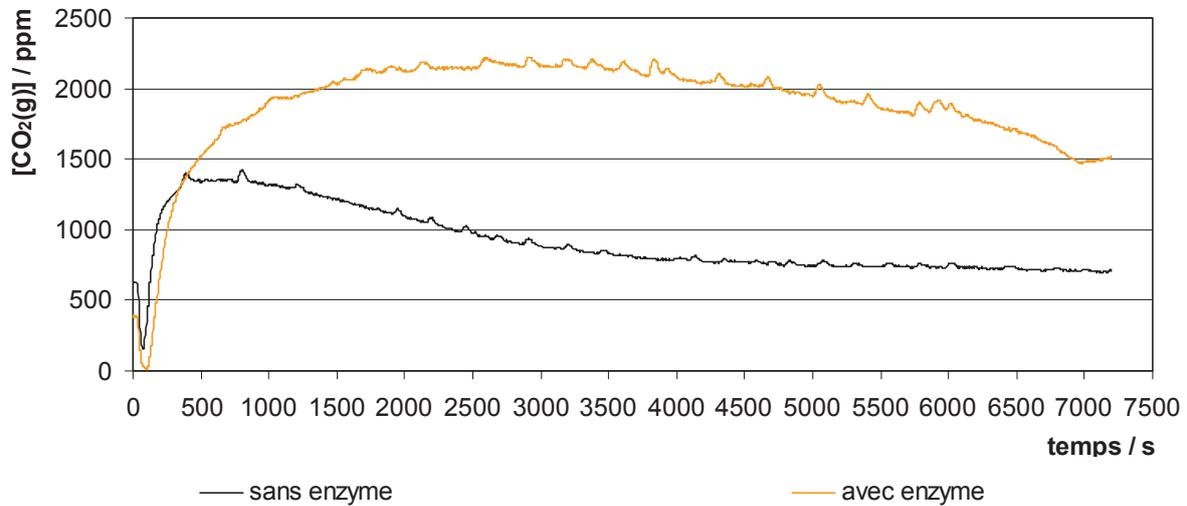


Figure.5.29: Evolution en fonction du temps de la concentration de  $\text{CO}_2$  relargué pour une membrane hydrophile NY 20 imprégnée d'une solution de chlorure de calcium dihydraté pendant 45 min sans ou avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$  et un débit de  $1.08 \text{ L/h}$  coté captage, et un débit d'azote de  $3.14 \text{ L/h}$  coté relargage

Des essais ont été effectués avec une membrane (NY60) trempée pendant 45 min dans  $4 \text{ mL}$  de solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sans ou avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme, pour plusieurs concentrations en  $\text{CaCl}_2$ :  $0.146$  ;  $0.292$  et  $0.584 \text{ mol L}^{-1}$ , à un pH initial de 10.5 dans un tampon Tris. Les évolutions de la concentration de  $\text{CO}_2$  relargué en fonction du temps sont présentées Fig.5.30. Ces évolutions sont semblables à celles obtenues avec la membrane NY20, mais la décroissance après le maximum est plus lente. Les perméances déterminées lors de ces essais et les masses de  $\text{CaCO}_3$  précipité en 1 h sont regroupées Fig.5.31. Les résultats obtenus avec une membrane liquide sans dépôt de  $\text{CaCO}_3$  y ont été ajoutés.

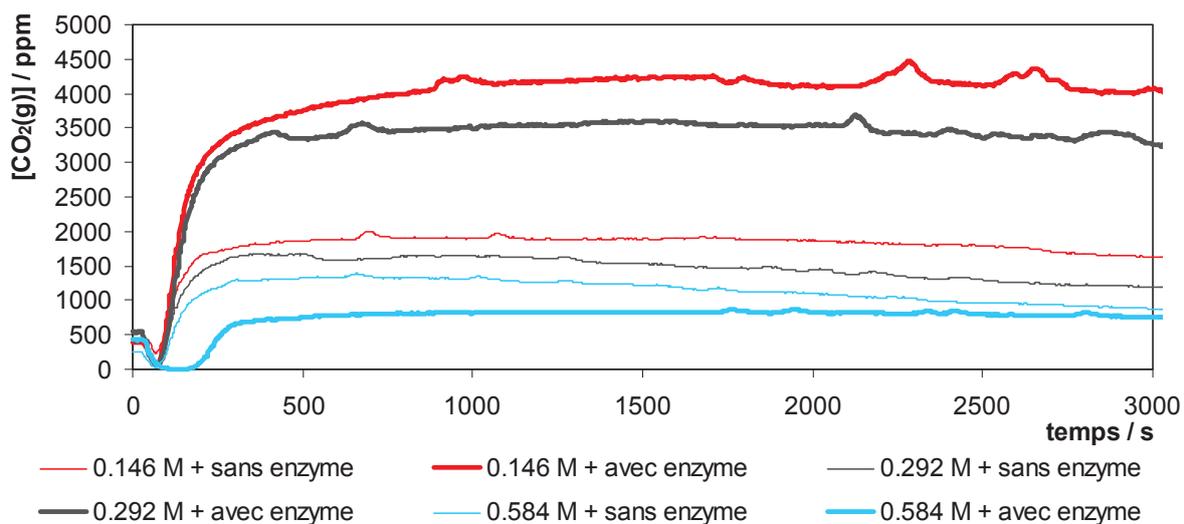


Figure.5.30: Evolution en fonction du temps de la concentration de CO<sub>2</sub> relargué pour une membrane hydrophile NY60 imprégnée pendant 45 min d'une solution de chlorure de calcium dihydraté à plusieurs concentrations, sans ou avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

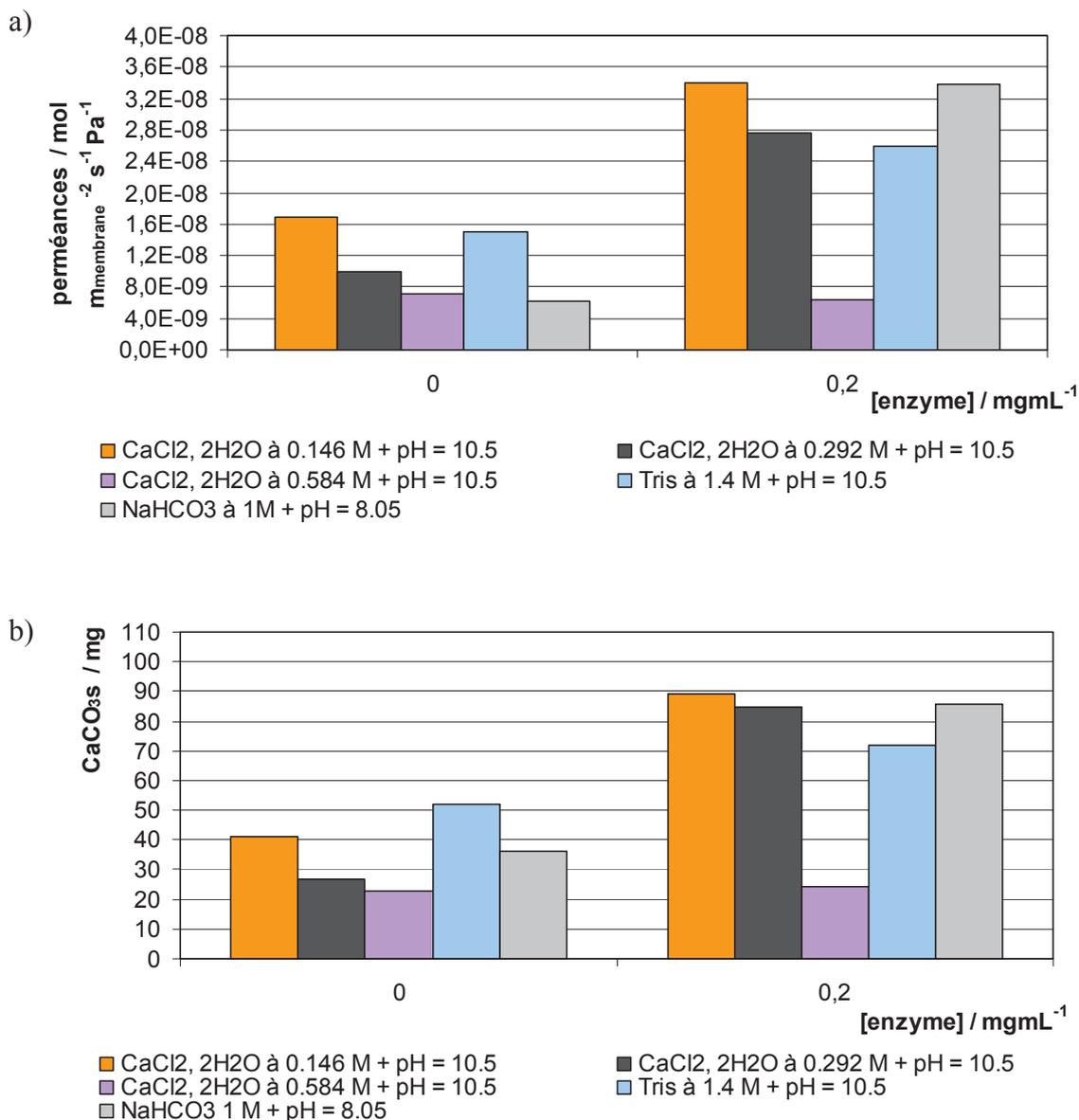


Figure.5.31: (a) Perméances déduites de la Fig.5.62 ; (b) Masse de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h. Membrane hydrophile NY60 imprégnée pendant 45 min d'une solution de chlorure de calcium dihydraté à plusieurs concentrations sans ou avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme mais également avec un tampon Tris à 1.4 M et à pH = 10.5 et une solution NaHCO<sub>3</sub> à 1 M et à pH = 8.05. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

Ainsi, la présence de chlorure de calcium dihydraté de molarité de 0.146 contenant 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme permet d'obtenir une performance de transfert de CO<sub>2</sub>

approximativement égale à celle d'une solution de  $\text{NaHCO}_3$  à 1 M et  $\text{pH} = 8.05$ . Mais la perméance diminue pour des concentrations initiales plus élevées en  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

#### 5.4.4. Aspect des membranes polymériques séchées

La Fig.5.32 montre des micrographies de la membrane nylon NY60 séchées obtenues au MEB, pour chacune des trois molarités différentes de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à un même grossissement. On y voit une couche mince entre les fibres de nylon, ainsi que des dépôts sur les fibres elles-mêmes. Une micro analyse X nous a permis de montrer qu'il s'agissait respectivement de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  solidifié et de petits cristaux de  $\text{CaCO}_3$ . La forme rhomboédrique à facette bien marquées de ces derniers, observée à plus fort grossissement Fig.5.33, correspond à de l'Apatite.

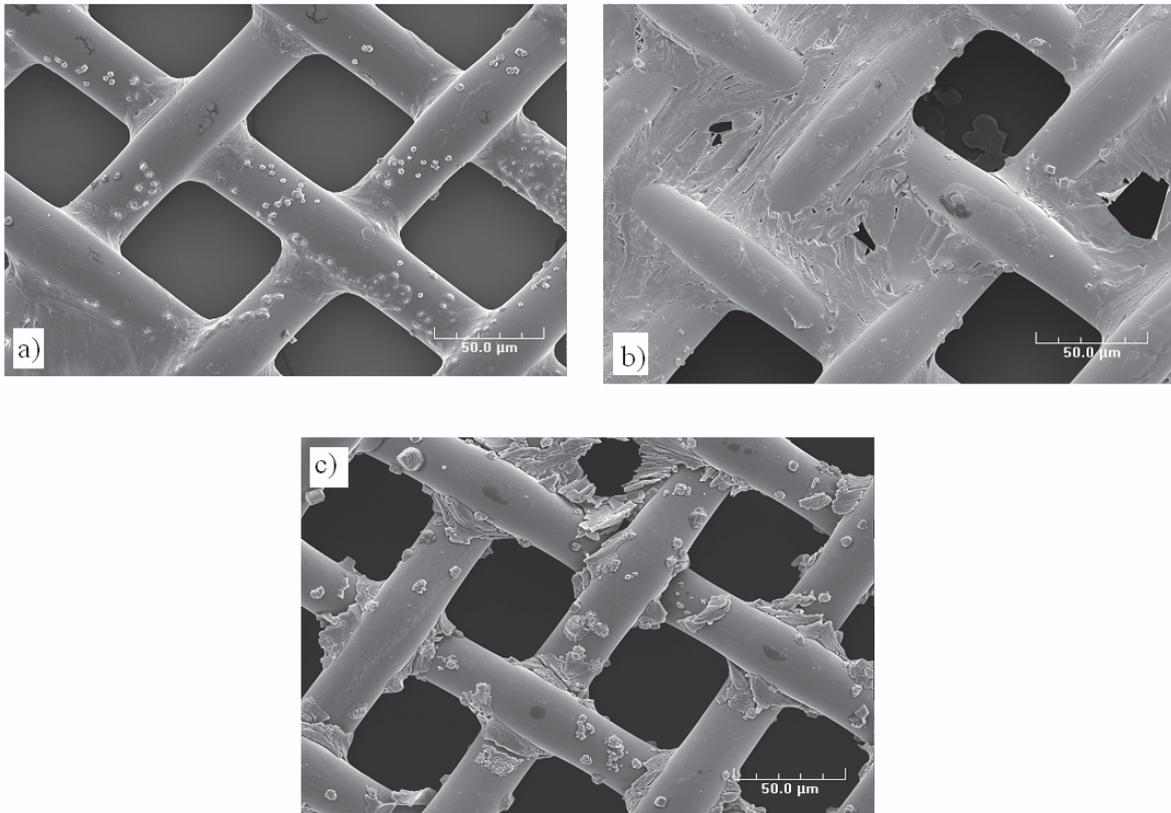


Figure.5.32: Micrographies réalisées au MEB après chaque test de captage du  $\text{CO}_2(\text{g})$  et séchage, de membranes NY60 ayant trempée dans des solutions de chlorure de calcium

contenant également  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme. Les concentrations de  $\text{CaCl}_2$  étaient: a)  $0.146 \text{ M}$  ; b)  $0.292 \text{ M}$  ; et c)  $0.584 \text{ M}$

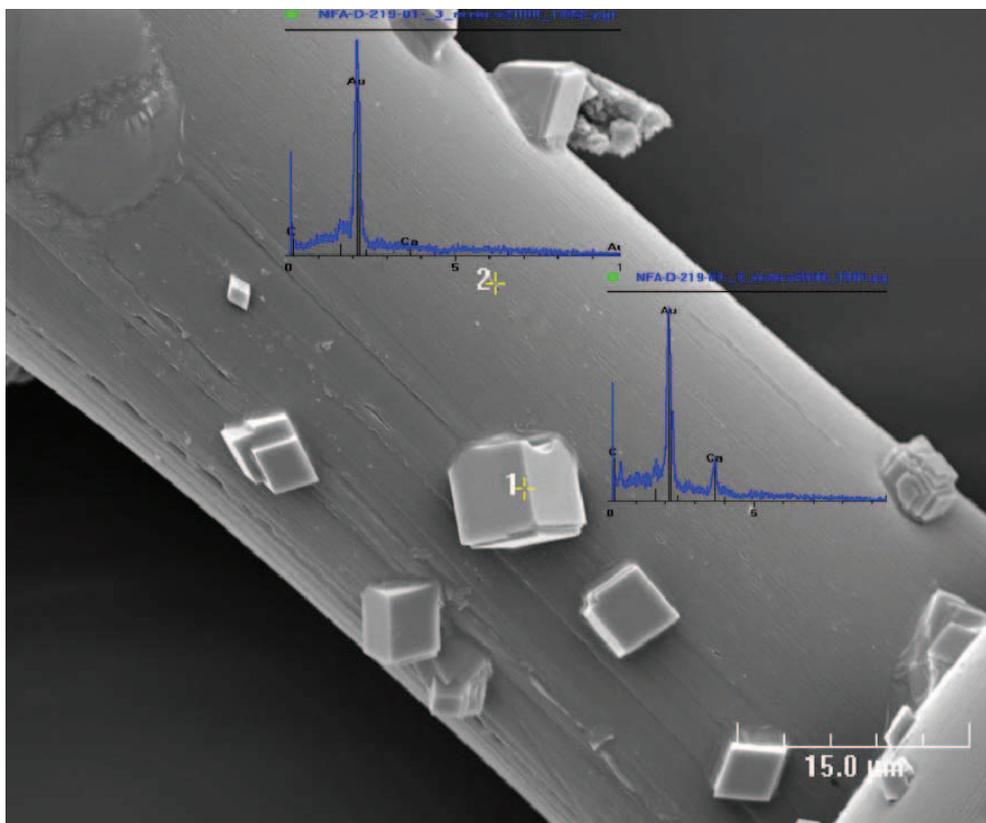


Figure.5.33: Micrographie MEB et spectres de microanalyse X (EDX) de la membrane NY60 trempée dans une solution à  $0.292 \text{ M}$  de chlorure de calcium et de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme, après test de captage du  $\text{CO}_2(\text{g})$  et séchage

#### 5.4.5. Dépôt $\text{CaCO}_3$ dans des membranes hybrides et comportement dans le captage du $\text{CO}_2$

Il s'agit de membranes en nylon NY60, imprégnées dans un 1<sup>er</sup> temps d'un sol de silice comme indiqué en 5.3.1b, puis séchées et imprégnées selon le procédé en 2 étapes par une solution à pH 10.5 dans un tampon Tris de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de molarité  $0.146 \text{ M}$ , contenant également  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme dans la 2<sup>ème</sup> étape d'adsorption.

L'évolution de la concentration de CO<sub>2</sub> relargué en fonction du temps, dans un test de captage de CO<sub>2</sub>, est illustrée Fig.5.34. Les perméances déterminées à partir de ces courbes, ainsi que les masses de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h, et leurs comparaison aux résultats obtenus pour une membrane hybride imprégnée d'une solution d'enzyme dans du NaHCO<sub>3</sub> 1 M à pH 8.05, sont regroupées Fig.5.34.

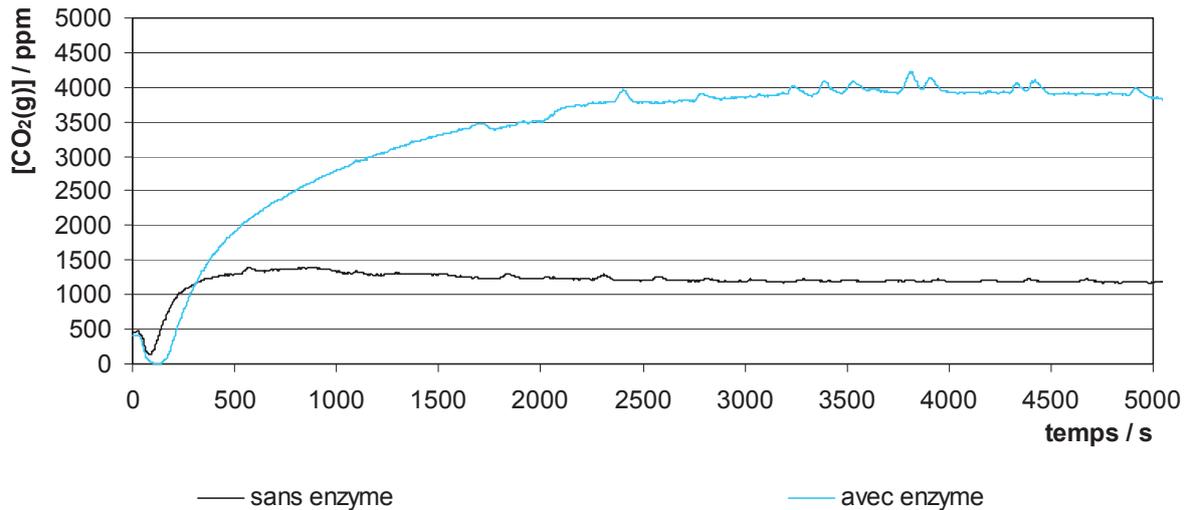


Figure.5.34: Evolution en fonction du temps de la concentration de CO<sub>2</sub> relargué pour une membrane hybride imprégnée suivant le protocole en 2 étapes par une solution à 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme dans du CaCl<sub>2</sub> de molarité 0.146 M à pH 10.5. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

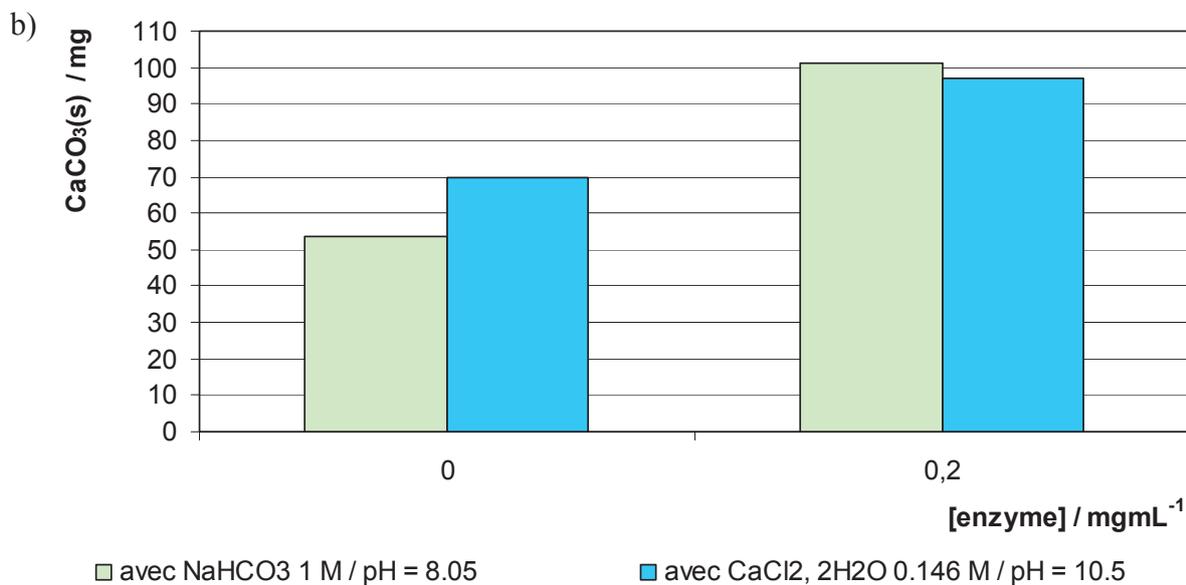
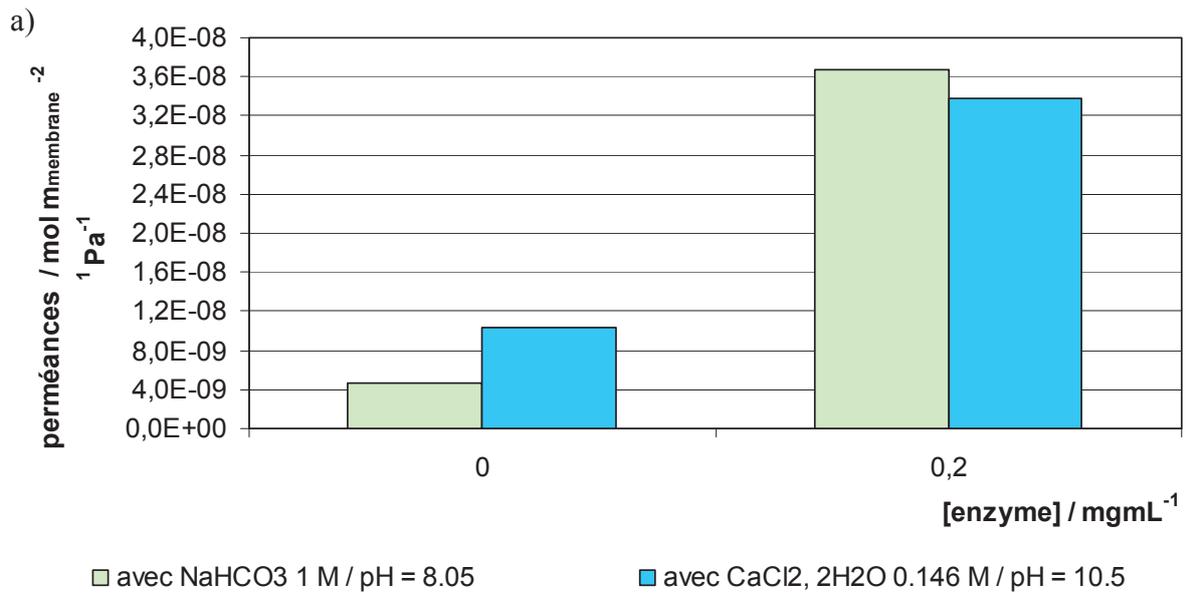


Figure.5.35: (a) Perméances ; (b) Masse de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h, pour des membranes hybrides imprégnée suivant le protocole en 2 étapes dans une solution contenant 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme et du CaCl<sub>2</sub> (déduites de la Fig.5.34) ou du NaHCO<sub>3</sub> 1 M à pH = 8.05. Gaz sous 1 atm contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) et un débit de 1.08 L/h coté captage, et un débit d'azote de 3.14 L/h coté relargage

#### 5.4.6. Aspect des membranes hybrides séchées

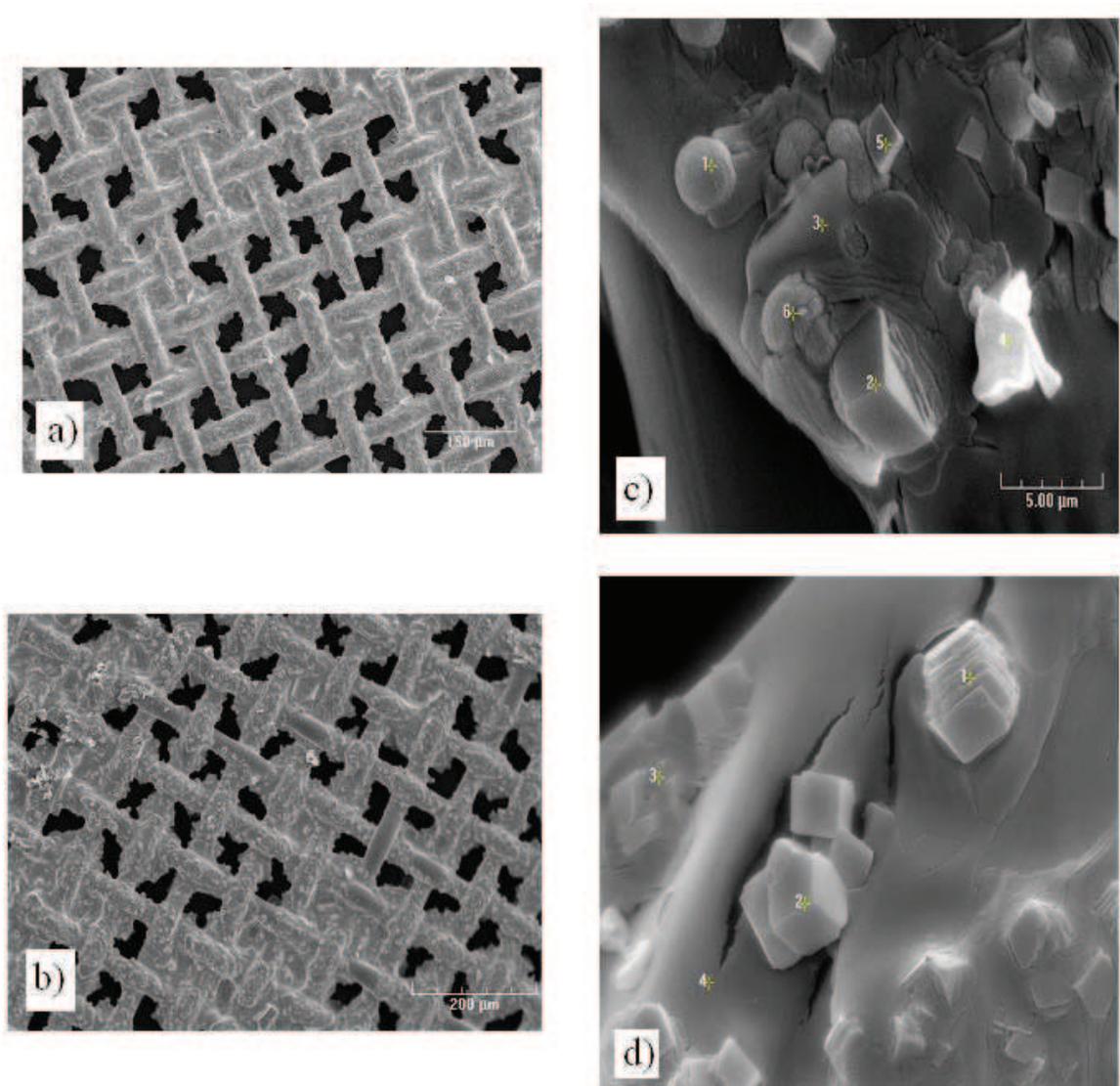


Fig.5.36: Micrographies réalisées au MEB après test de captage du  $\text{CO}_2(\text{g})$  et séchage, de membranes NY60 contenant un gel de silice et ayant trempées dans une solution de chlorure de calcium de molarité 0.146 M: a) et c) sans enzyme ; et b) et d) avec  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme

La Fig.5.36 montre des micrographies obtenues au MEB, après test de captage du  $\text{CO}_2(\text{g})$ , de la membrane nylon NY60 séchée contenant un gel de silice puis trempée dans une solution de chlorure de calcium avec ou enzyme. On y voit une couche mince entre les fibres de nylon, un film (d4) sur ces fibres ainsi que des dépôts de cristaux sur les fibres elles-mêmes (c1, c2, d1, d2). Des micro analyses X (voir Annexes D et E) nous a permis de montrer qu'il s'agissait

respectivement de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  solidifié, d'un mélange contenant les atomes Si, O, Ca et Cl et de petits cristaux de  $\text{CaCO}_3$ . La forme rhomboédrique à facette bien marquées de ces derniers, observée sur la Fig.5.36 c2, d1, d2 correspond à de la Calcite. La Fig.5.36 c1) montre également une autre variété de carbonate de calcium en forme de particules sphériques et poreuses (chou-fleur) similaires à celles observées à la Fig.5.28 lorsque l'enzyme est absente, et qui correspond à la Vatérite. D'après la micro analyse (voir Annexe E), le film sur les fibres pourrait consister en une couche de  $\text{SiO}_2$  recouverte d'un mélange de silicate de calcium (du type  $\text{CaSiO}_3$ ), et de  $\text{CaCl}_2$ . La silice à pH basique est en effet légèrement soluble et pourrait avoir réagi avec le  $\text{CaCl}_2$  pour se re-condenser sous forme de ce silicate de calcium.

## **5.5. Membranes hybrides préparées par gélification in situ de la silice**

### **5.5.1. Préparation des membranes sol-gel en silice**

#### **a. Membranes polymériques utilisées**

Les membranes à imprégner par le sol de silice étaient des filets nylon NY20 ou NY60 comme précédemment.

#### **b. Imprégnation par un sol de silice**

Le sol de silice était préparé par hydrolyse acide par le même protocole que dans la section 5.3.1. Toutefois, des expériences précédentes de l'équipe sur d'autres enzymes du type lipase ayant montré que le méthanol pouvait désactiver les enzymes<sup>46, 50</sup>, une variante du protocole de préparation du sol de silice a donc consisté à évaporer le méthanol généré lors de l'hydrolyse. Cette évaporation a été effectuée après l'étape d'hydrolyse sous agitation magnétique, dans un évaporateur rotatif à  $50^\circ\text{C}$ , sous un vide de 75 mbar pendant 4 min. Dans un exemple typique, 2.8 g ont été évaporés, ce qui constitue une masse en excès de tout le méthanol potentiellement libéré par hydrolyse du TMOS. Cette masse évaporée a été

compensée par l'ajout d'une masse équivalente d'eau distillée, de façon à redonner une fluidité suffisante au sol de silice. L'imprégnation de la membrane polymérique a ensuite été effectuée comme précédemment, en l'immergeant pendant 45 min dans 4 mL de ce sol de silice.

Des sols de silice pour imprégnation de membranes hydrophiles ont été préparés sans enzyme, ou en dissolvant 0.8 mg d'enzyme dans l'eau ajoutée pour compenser le méthanol évaporé, de façon à obtenir une concentration de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  dans le sol.

### **c. Tests de captage**

Chaque membrane imprégnée du sol de silice, avec ou sans enzyme, a ensuite été directement placée en sandwich entre deux membranes hydrophobes du type GVHP utilisées précédemment avec les membranes liquides, et positionnée dans la cellule de captage de  $\text{CO}_2$ . Le captage était donc effectué dans une étape initiale au travers d'un sol liquide de silice. Mais ce sol finit par gélifier, de sorte que dans une seconde étape le captage du  $\text{CO}_2$  s'effectuait au travers d'une membrane polymérique imprégnée d'un gel de silice humide (non séché). Les temps de gélification du sol de silice, avec ou sans enzyme, ont été déterminés dans une étude spéciale de gélification, présentée plus loin, section 5.5.3.

### **d. Aspect des membranes**

Des micrographies au MEB de membranes NY60 avec ou sans enzyme ont été réalisées selon la même technique que celle utilisée pour les membranes hydrides obtenues par adsorption sur gel séché (section 5.3). Ces micrographies ont été obtenues après un test de captage du  $\text{CO}_2(\text{g})$  et séchage à l'air des membranes. Elles ne représentent donc certainement pas le gel humide après gélification du sol de silice, qui remplissait les pores des membranes. Pour observer ce dernier, il aurait fallu pouvoir faire un séchage supercritique au  $\text{CO}_2$  qui aurait minimisé la contraction de ce gel. Plutôt, dans le cas présent, le gel s'est fracturé et contracté autour des fibres de la membrane en nylon tissé lors du séchage pour obtenir les micrographies. Ces micrographies montrent néanmoins une excellente adhésion entre le gel séché et les fibres de nylon, et aucune différence significative n'est observable entre le gel avec enzyme et celui sans enzyme.

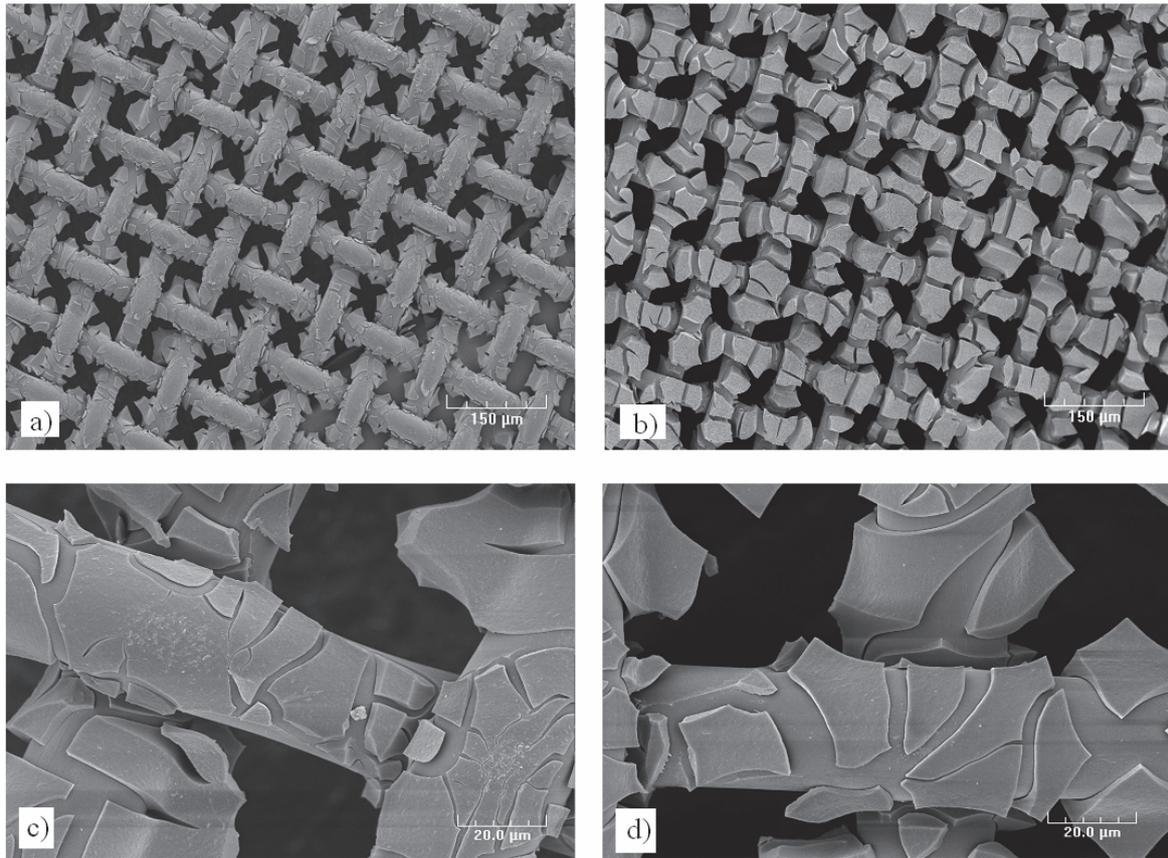


Figure.5.37: Micrographies au microscope à balayage des membranes NY60 contenant un gel de silice, après test de captage du CO<sub>2</sub> et séchage par évaporation: avec (a) et (c) avec enzyme ; (b) et (d) sans enzyme

### 5.5.2. Comportement lors du captage de CO<sub>2</sub>

Le mode opératoire était le même que pour les membranes hybrides précédentes. Le gaz de captage contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) a été alimenté sous une pression de 1 atm et un débit de 1.08 L/h. Le débit d'azote de balayage était de 3.14 L/h coté relargage.

Les résultats obtenus aussi bien avec la membrane NY20 qu'avec la membrane NY60 n'ont pas permis d'atteindre un plateau, donc de déterminer une perméance. Dans ces circonstances, la détermination de CaCO<sub>3</sub> précipité en 1 h était sans intérêt. Une montée précoce de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué, correspondant à une fuite au travers de la membrane hybride, a toujours été observée. Avec les deux membranes, cette fuite était

de plus toujours beaucoup plus brutale lorsque l'enzyme était présente, que lorsqu'elle était absente. Le moment où s'est produite la fuite correspond aux temps de gélification du sol de silice, comme l'a montré ensuite une l'étude sur l'interaction de l'enzyme et du CO<sub>2</sub> sur les gels de silice (section 5.5.3 suivante). En fait les micrographies de la Fig.5.37 précédente ont montré que le gel se rétractait autour des fibres de nylon, ouvrant ainsi de larges chenaux sans milieu aqueux.

Une étude complémentaire a donc été effectuée, avec la membrane nylon NY60 imprégnée d'un sol, non gélifié initialement, mais en remplaçant la membrane hydrophobe supérieure par un petit volume de 0.6 mL de solution NaHCO<sub>3</sub> à 1 M et à pH ≈ 8. Cette fois-ci, aucune fuite ne s'est plus produite, les résultats concernant la concentration de CO<sub>2</sub> transféré en fonction du temps sont présentés sur la Fig.5.38.

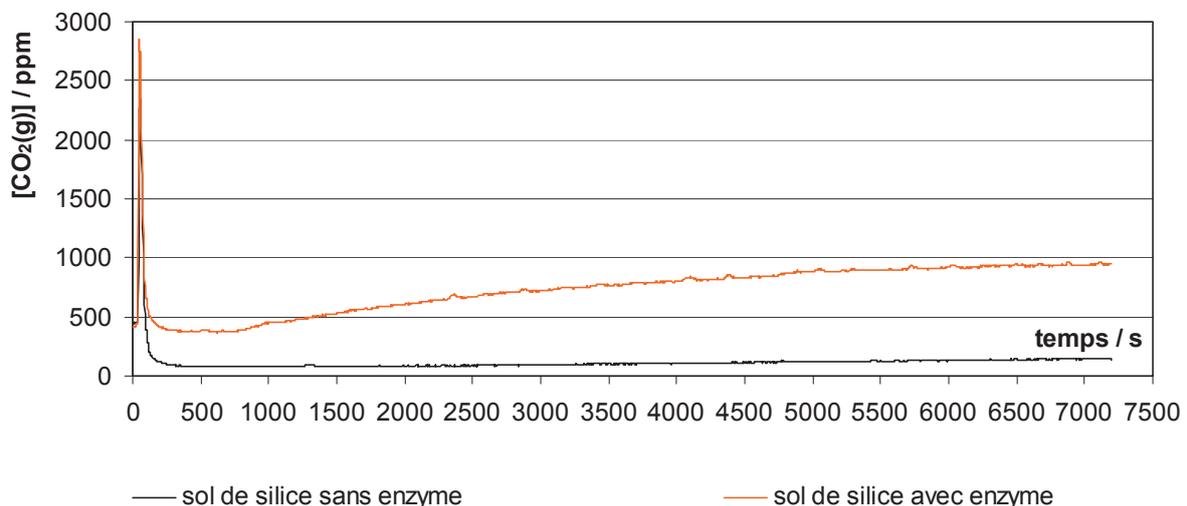


Figure.5.38: Evolution en fonction du temps de la concentration de CO<sub>2</sub> relargué pour une membrane hydrophile imprégnée d'un sol de silice sans enzyme ou avec 0.2 mg mL<sup>-1</sup> d'enzyme, puis ajout de 0.6 mL d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 1 M et pH ≈ 8 sur le gel de silice non séché, à l'intérieur de la cellule. Débit d'azote côté relargage de 3.14 L/h. Gaz de captage contenant 10 % de CO<sub>2</sub>(g) alimenté sous 1 atm et un débit de 1.08 L/h

Les perméances étaient respectivement de  $8.15 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  et de  $1.23 \cdot 10^{-9} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  pour un sol de silice avec enzyme et un sol de silice sans enzyme.

Les masses de  $\text{CaCO}_3(\text{s})$  obtenues au bout d'1 h étaient de 64.7 mg avec enzyme et de 29.8 mg sans enzyme.

### 5.5.3. Intéraction gel de silice - enzyme

Pour comprendre les effets de l'enzyme et également du  $\text{CO}_2$  sur la gélification de la silice, des gels ont été synthétisés avec ces additifs et leurs caractéristiques étudiés.

#### a. Préparation des gels de silice

Les sols de silice ont été préparés comme indiqués dans la section 5.3.1b. Toutefois, l'eau rajoutée après évaporation du méthanol était, soit: (a) de l'eau distillée; (b) de l'eau distillée saturée en  $\text{CO}_2$ ; (c) de l'eau distillée dans laquelle 8 mg d'anhydrase carbonique avait été dissous; ou (d) de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  dans laquelle 8 mg d'enzyme avait été dissous. Le sol de silice obtenu avait immédiatement été réparti dans 4 petits piluliers cylindriques en polyéthylène à fermeture hermétique (diamètre 1.5 cm, hauteur 4.5 cm), pour produire simultanément 4 gels humides identiques. Chacun de ces 4 échantillons contenait  $\approx 2$  mL de sol de silice et même masse d'enzyme, soit 0 ou 2 mg d'enzyme selon la série de gels faite. Chaque pilulier était alors maintenu fermé hermétiquement, jusqu'à séchage du gel pour le caractériser.

Afin de les caractériser, 2 échantillons de gels d'une série donnée furent séchés par évaporation pour produire des xérogels « X ». Les 2 autres échantillons de la même série furent séchés par la méthode au  $\text{CO}_2$  supercritique, selon une méthode classique de l'équipe<sup>75</sup>, pour produire des aérogels « A ». Lorsque l'eau utilisée pour l'hydrolyse était saturée en  $\text{CO}_2$ , les échantillons séchés furent désignés XCO<sub>2</sub> ou ACO<sub>2</sub>. Lorsque cette eau contenait de l'anhydrase carbonique, ils furent désignés XCA et ACA et lorsque l'eau était à la fois saturée en  $\text{CO}_2$  et contenait de l'anhydrase carbonique XCO<sub>2</sub>CA ou ACO<sub>2</sub>CA.

La liste des échantillons réalisés et leur temps de gélification sont rassemblés au Tableau.5.3. Celui-ci montre que le  $\text{CO}_2$  aqueux et l'enzyme ont tous deux accéléré la gélification de la silice, bien que l'enzyme se soit révélée plus efficace que le  $\text{CO}_2$  aqueux. L'aspect visuel de ces échantillons est illustré Fig.5.39. Comme prévu, les aérogels obtenus

étaient toujours de taille supérieure aux xérogels correspondants, pour une même masse de gel non séché. Mais la présence simultanée d'eau saturée en CO<sub>2</sub> et de 2 mg d'enzyme a produit des aérogels plus contractés, moins transparents, d'aspect granuleux.

### b. Caractérisation des gels séchés

*Effet du CO<sub>2</sub> aqueux et de l'anhydrase carbonique sur la texture du gel:*

Pour déterminer les caractéristiques texturales des gels séchés, leur isotherme d'adsorption d'azote a été enregistrée à 77 K sur un appareil Micromeritic ASAP 2020, après les avoir désorbés pendant 6 h à 200°C.

Tableau.5.3: Temps de gélification ( $t_g$ ) et principales caractéristiques texturales (Surface spécifique  $S_{BET}$ , Volume poreux spécifique  $V_{sp}$  et taille de pore moyenne ( $d_{p,ave}$ ) des gels séchés. (\*)  $t_g$  moyen sur 4 échantillons

Hydrolyse	Avec de l'eau déionisée				Avec de l'eau saturée en CO <sub>2</sub>			
$t_g$ (min) (*)	46 ± 2.94		12 ± 0.82		24 ± 0.96		8 ± 3.30	
Echantillon	X	A	XCA	ACA	XCO2	ACO2	XCO2CA	ACO2CA
$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	968 ± 97	980 ± 98	578 ± 58	983 ± 98	1037 ± 104	765 ± 77	826 ± 83	663 ± 67
$V_{sp}$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	0.64 ± 0.06	2.18 ± 0.22	1.33 ± 0.13	3.52 ± 0.35	0.63 ± 0.06	1.36 ± 0.14	0.45 ± 0.05	1.75 ± 0.18
$d_{p,ave}$ (nm)	2.9 ± 0.3	17.5 ± 1.8	8.10 ± 0.8	36.1 ± 3.6	2.9 ± 0.3	13.5 ± 1.4	2.6 ± 0.3	20.8 ± 2.1



Figure.5.39: Photographies des xérogels X et aérogels A, synthétisés: X et A sans  $\text{CO}_2$  ni CA, XCO<sub>2</sub> avec de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , XCA et ACA avec de l'enzyme, et XCO<sub>2</sub>CA et ACO<sub>2</sub>CA avec de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et de l'enzyme

L'influence du  $\text{CO}_2$  aqueux et de l'anhydrase carbonique sur les isothermes d'adsorption d'azote des xérogels et des aérogels est présentée dans les Fig.5.40 et Fig.5.41 respectivement. La plupart des xérogels, à l'exception de XCA, ont des isothermes proches du type I dans la classification de l'IUPAC<sup>76</sup>, typiques des matériaux microporeux.

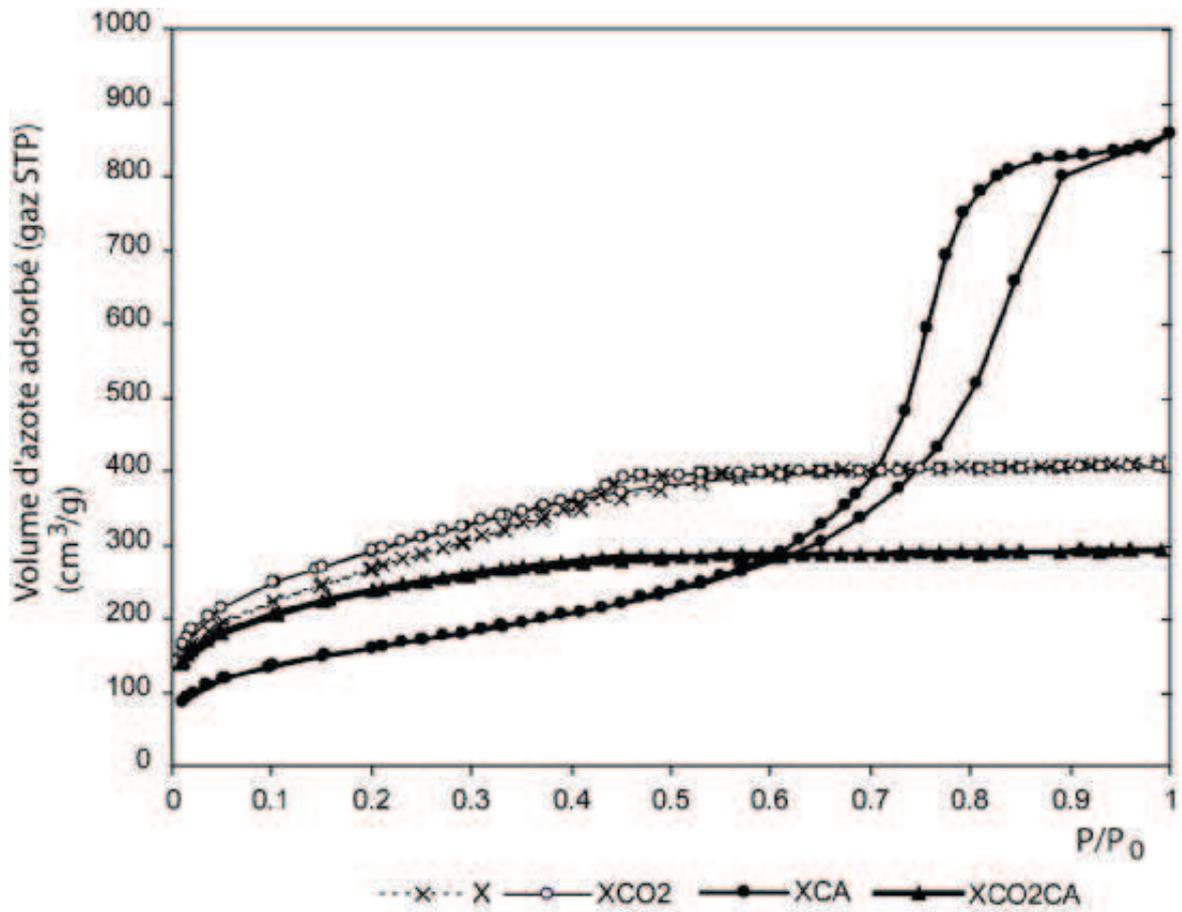


Figure.5.40: Influence du CO<sub>2</sub> aqueux et l'anhydrase carbonique sur les isothermes d'adsorption d'azote des xérogels synthétisés: X sans CO<sub>2</sub> ni AC, XCO2 avec de l'eau saturée en CO<sub>2</sub>, XCA avec de l'enzyme, et XCO2CA avec de l'eau saturée en CO<sub>2</sub> et de l'enzyme

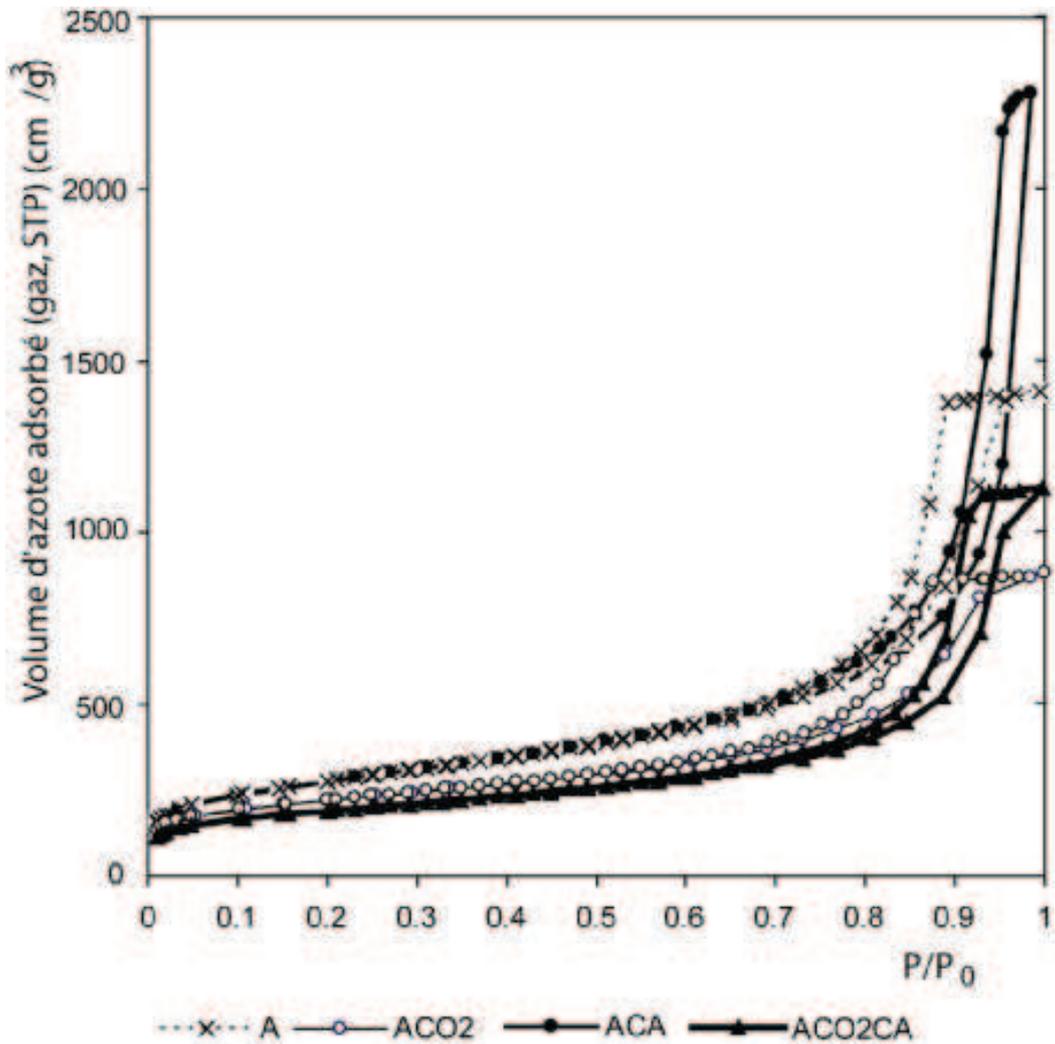


Figure.5.41: Influence du CO<sub>2</sub> aqueux et l'anhydrase carbonique sur les isothermes d'adsorption d'azote des aérogels synthétisés: A sans CO<sub>2</sub> ni AC, ACO2 avec de l'eau saturée en CO<sub>2</sub>, ACA avec de l'enzyme, et ACO2CA avec de l'eau saturée en CO<sub>2</sub> et de l'enzyme

Le volume d'azote adsorbé pour la pression d'azote P la plus élevée (point expérimental pour P / P<sub>0</sub> le plus proche de 1, où P<sub>0</sub> désigne la pression de vapeur d'azote en équilibre avec une surface liquide plane à 77 K) est relativement bas. Concernant ces xérogels, il doit être mentionné que la perte de masse lors de la désorption sous vide avant acquisition de l'isotherme, était supérieure à 50 %. C'est-à-dire que les xérogels tels que photographiés Fig.5.41 après simple évaporation avant de déterminer leur isotherme, étaient loin d'être complètement séchés. Par ailleurs, le xérogel XCA pour lequel l'eau d'hydrolyse

contenait de l'enzyme mais n'était pas saturée CO<sub>2</sub>, a montré une isotherme différente. Sa résistance à la contraction durant l'évaporation a été notablement améliorée, au point que XCA pourrait être considéré comme un aérogel obtenu par séchage sous pression ambiante (« ambient pressure drying »). Néanmoins, lorsque l'enzyme était dissoute dans de l'eau saturée en CO<sub>2</sub>, comme pour XCO<sub>2</sub>CA, le CO<sub>2</sub> a pratiquement annulé l'effet dû à l'enzyme sur l'isotherme d'adsorption d'azote. La Fig.5.39 montre d'ailleurs que XCO<sub>2</sub>CA était moins transparent et d'aspect plus granuleux que les autres xérogels.

En ce qui concerne les aérogels, leurs isothermes d'adsorption d'azote ont toutes montré une boucle d'hystérésis typique des matériaux mésoporeux, se terminant sur un volume d'azote adsorbé élevé pour  $P / P_0$  proche de 1 (Fig.5.43). Ces derniers volumes d'azote adsorbé ont été transformés en volumes poreux spécifiques  $V_{sp}$  dans le Tableau 5.3 où les principales caractéristiques texturales sont rassemblées.

Il est connu que ces  $V_{sp}$  ne représentent pas le véritable volume spécifique dans le cas des aérogels de silice. Une 1<sup>ère</sup> raison est que les échanges de fluide nécessaires pour appliquer la technique de séchage supercritique au CO<sub>2</sub> induisent une contraction du gel. La grandeur de cette contraction dépend de la nature polymérique ou colloïdale du réseau du gel de silice. Une 2<sup>ème</sup> raison est que les gels de silice polymériques peuvent se contracter réversiblement, dans des proportions qui peuvent être élevées (exemple: > 40 vol %) lors de l'adsorption d'azote <sup>77</sup>. De plus, les isothermes d'adsorption d'azote ne permettent pas d'estimer la contribution des macropores (taille >100 nm) au volume poreux spécifique total, car il faudrait s'approcher beaucoup plus proche de  $P / P_0 = 1$ . Lorsque ces macropores sont le principal contributeur au volume poreux, comme dans des aérogels transparents, une différence importante peut exister entre le volume total d'azote adsorbé et le volume déduit des dimensions de l'échantillon. Cependant, une nette tendance est apparue dans les xérogels, en ce qui concerne le milieu aqueux utilisé pour la gélification, tendance qui s'est confirmée pour les aérogels. En particulier, ACA (XCA pour les xérogels) a montré un volume spécifique plus élevé que les autres aérogels (ou xérogels). Egaleme nt, ACO<sub>2</sub>CA avait un aspect opaque et granulaire, de même que XCO<sub>2</sub>CA (Fig.5.39).

Les distributions en taille des pores, déduites de la branche de désorption des isothermes par la méthode de Barrett, Joyner et Halenda (BJH) <sup>78</sup> sont rapportées Figs.5.42 et 5.43 pour les xérogels et les aérogels respectivement, et elles apportent des renseignements complémentaires. Dans tous les échantillons, ces courbes montrent l'existence d'un maximum pour une taille  $d_{max}$ . Le volume relatif des micropores déterminé par la méthode du « graphe t », par comparaison avec le volume spécifique poreux  $V_{sp}$  précédent, était  $\approx 41$  % dans

XCO<sub>2</sub> et XCO<sub>2</sub>CA,  $\approx 6.3\%$  dans X et  $\approx 0.23\%$  dans XCA. Ainsi, la contribution des micropores à  $V_{sp}$  était importante dans XCO<sub>2</sub>, alors que XCA était mésoporeux. Par ailleurs, la Fig.5.43 confirme que les aérogels étaient mésoporeux.

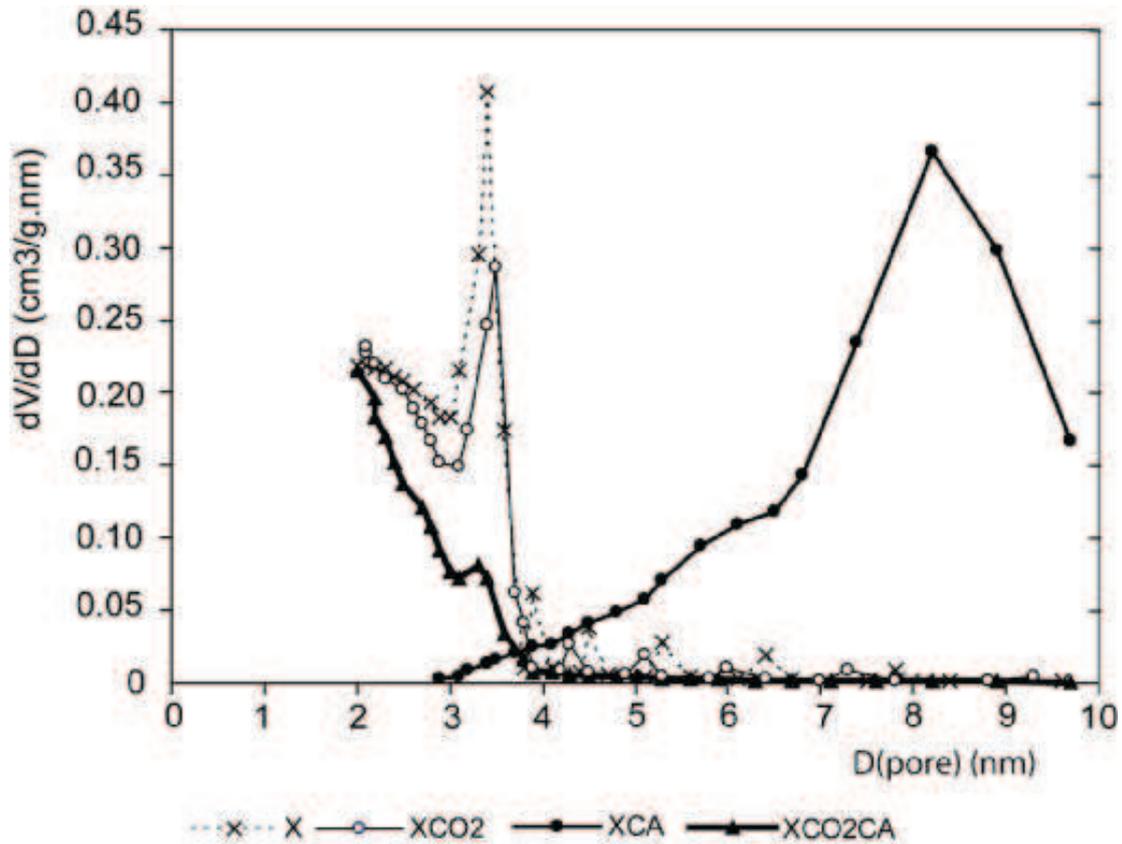


Figure.5.42: Distribution du volume poreux en fonction de la taille des pores des xérogels, déduites par la méthode BJH de la branche de désorption de leur isotherme d'adsorption d'azote à la Fig.5.40

Globalement (Tableau.5.3), il existe une différence notable entre XCA et X, ainsi qu'entre A et ACA, en ce qui concerne  $V_{sp}$  et la taille des pores  $d_{max}$  au maximum de la distribution en tailles. L'anhydrase carbonique a accru  $d_{max}$  de 17.5 nm à 36.1 nm dans les aérogels, et de 2.9 nm à 8.10 nm dans les xérogels équivalents. Par contre l'eau saturée en CO<sub>2</sub> a atténué cet effet de l'enzyme (Tableau.5.3).

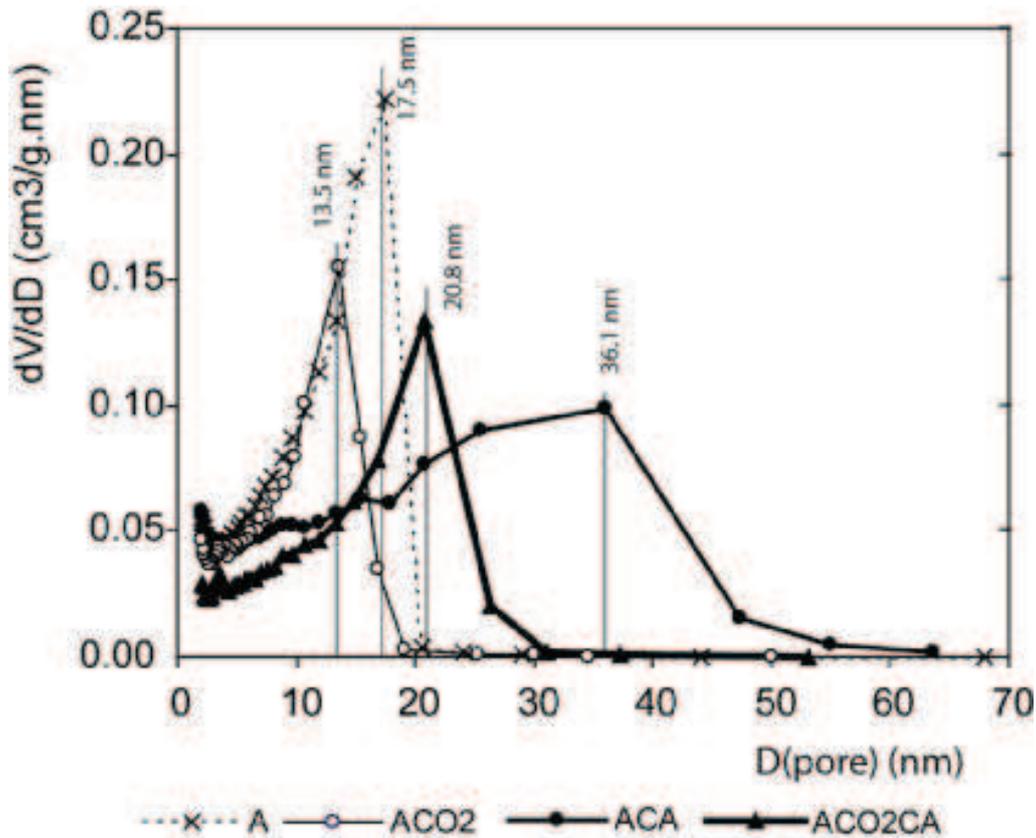


Figure.5.43: Distribution du volume poreux en fonction de la taille des pores des aérogels, déduites par la méthode BJH de la branche de désorption de leur isotherme d'adsorption d'azote à la Fig.5.41

Les surfaces spécifiques, déterminées par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) <sup>79</sup> sont également présentées au Tableau.5.3. Elles étaient élevées dans tous les échantillons. Toutefois, dans ceux hydrolysés avec de l'eau saturée en CO<sub>2</sub>, le séchage supercritique au CO<sub>2</sub> (aérogels ACO2 et ACO2CA) a diminué cette surface spécifique, sans doute à cause d'une moindre résistance du réseau des gels aux contractions, lors des échanges de fluides.

*Spectres d'absorption d'infra-rouge par transformée de Fourier:*

Des spectres d'absorption infrarouge par transformée de Fourier (IRTF) des aérogels ont été enregistrés dans une gamme de nombre d'onde allant de 400 à 4000 cm<sup>-1</sup> à température ambiante sous courant d'azote, sur un appareil Bruker IFS-48 Vector 22 équipé

d'un logiciel d'acquisition de données « Opus22 ». Pour cela, des échantillons ont été préparés en mélangeant 1 mg de fine poudre de l'aérogel avec 300 mg de poudre de KBr anhydre, et mise en forme de pastilles circulaires de diamètre  $\approx 1.7$  cm et épaisseur  $\approx 1$  mm, sous 58 KPa de pression.

Le but de ces spectres était de déterminer si du  $\text{CO}_2$  restait adsorbé sur les gels, provenant soit de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$ , soit du  $\text{CO}_2$  utilisé lors du séchage supercritique. Les spectres enregistrés pour X, A, et XCO2CA sont présentés Fig.5.44. Les bandes d'absorption de la silice ont été indexés en se rapportant à plusieurs références <sup>80 à 83</sup>. L'adsorption du  $\text{CO}_2$  sur la silice a été étudiée par Ueno et Bennett <sup>84</sup>. Leurs spectres ont montré l'existence d'une bande d'absorption attribuable aux molécules de  $\text{CO}_2$  dans le domaine  $2312 - 2381 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi qu'une modification du profil de la large bande d'absorption dans le domaine  $3550 - 3715 \text{ cm}^{-1}$  due à une adsorption modérée de  $\text{CO}_2$  sur des silanols SiOH. Dans la présente étude, aucune modification significative de cette dernière bande n'a été observée, et la 1<sup>ère</sup> bande d'absorption due aux molécules de  $\text{CO}_2$  était extrêmement faible, voire inobservable. On peut donc en conclure que très peu de  $\text{CO}_2$ , en provenance ni de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  ni du séchage supercritique  $\text{CO}_2$ , n'est resté adsorbé dans les xérogels ou les aérogels.

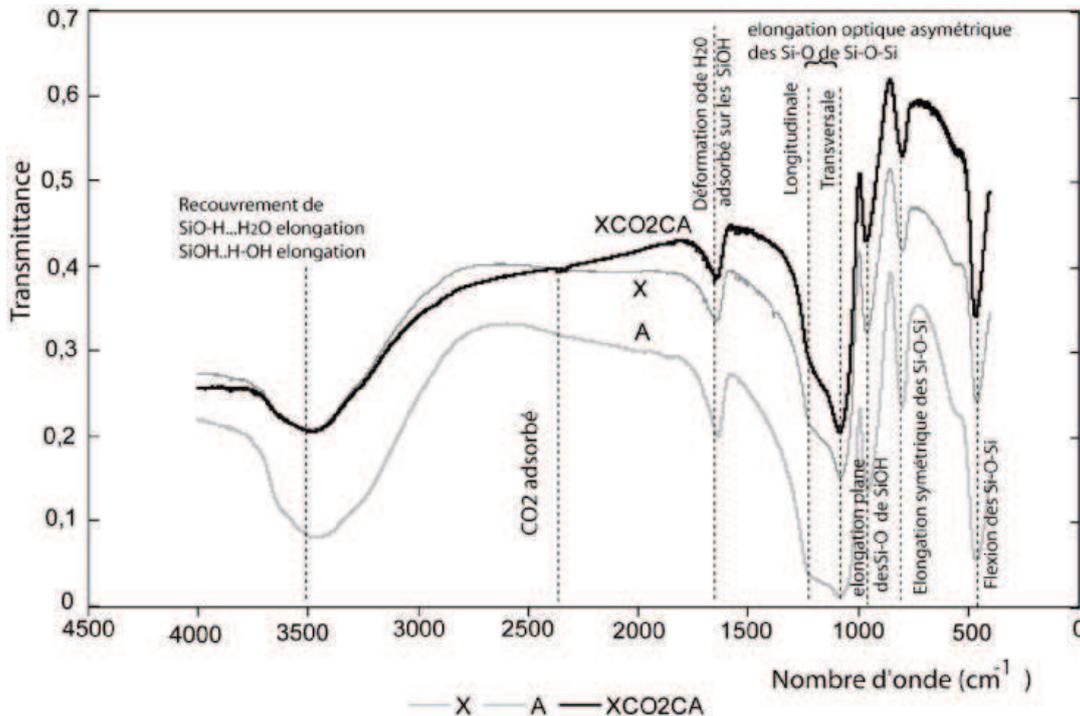


Figure.5.44: Spectre d'absorption infra rouge par transformée de Fourier (IRTF) d'un xérogel X et un aérogel A, tous deux synthétisés sans  $\text{CO}_2$  ni enzyme, et un xérogel XCO2CA synthétisé avec de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et 2 mg d'enzyme

### *Résultats de RMN:*

Des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire par Spinning à l'Angle magique (RMN-MAS) sous 10 kHz ont été enregistrés pour les noyaux  $^{13}\text{C}$  (avec couplage protons dans ce cas : CP-MAS),  $^{29}\text{Si}$  et  $^1\text{H}$ , sur un spectromètre Bruker DSX400, en utilisant des sondes de 4 mm. Les fréquences d'acquisition des spectres étaient respectivement de 100.6219 MHz, 79.50 MHz et 400.16 MHz, les durées de pulse de 3.05  $\mu\text{s}$ , 4  $\mu\text{s}$  et 3.26  $\mu\text{s}$ , les intervalles entre pulses de 4 s, 50 s et 4 s et le nombre de balayages d'acquisition 10240, 1500 et 16. Pour la RMN CP MAS du  $^{13}\text{C}$ , le temps de contact était de 3 ms. Tous les déplacements chimiques ont été mesurés par référence au tétraméthylsilane.

Les spectres RMN-MAS du noyau  $^{29}\text{Si}$  des échantillons A, ACO<sub>2</sub> et ACA sont présentés Fig.5.45. Les signaux labellisés Q<sup>4</sup>, Q<sup>3</sup> et Q<sup>2</sup> désignent respectivement les sites de silicium Si(OSi≡)<sub>4</sub>, Si(OX)(OSi≡)<sub>3</sub> et Si(OX)<sub>2</sub>(OSi≡)<sub>2</sub>, où X peut être tout groupement comme OH, de l'eau, des méthoxy ou de l'acétone<sup>81</sup>. Si on compare l'amplitude relative de ces signaux, les signaux Q<sup>4</sup> ont été légèrement plus abondants par rapport aux signaux Q<sup>3</sup>, uniquement dans ACA (Fig.5.45). L'enzyme aurait donc modérément amélioré la condensation du gel SiO<sub>2</sub>, mais uniquement lorsque de l'eau saturée en CO<sub>2</sub> n'était pas utilisée. Les spectres  $^1\text{H}$  MAS, mais surtout  $^{13}\text{C}$  CP MAS ont également montré la présence d'acétone résiduelle dans les aérogels uniquement, caractérisée par un faible pic pour un déplacement chimique  $\delta \sim -30$  ppm. Aucune trace de molécule CO<sub>2</sub> adsorbée n'a jamais été observée.

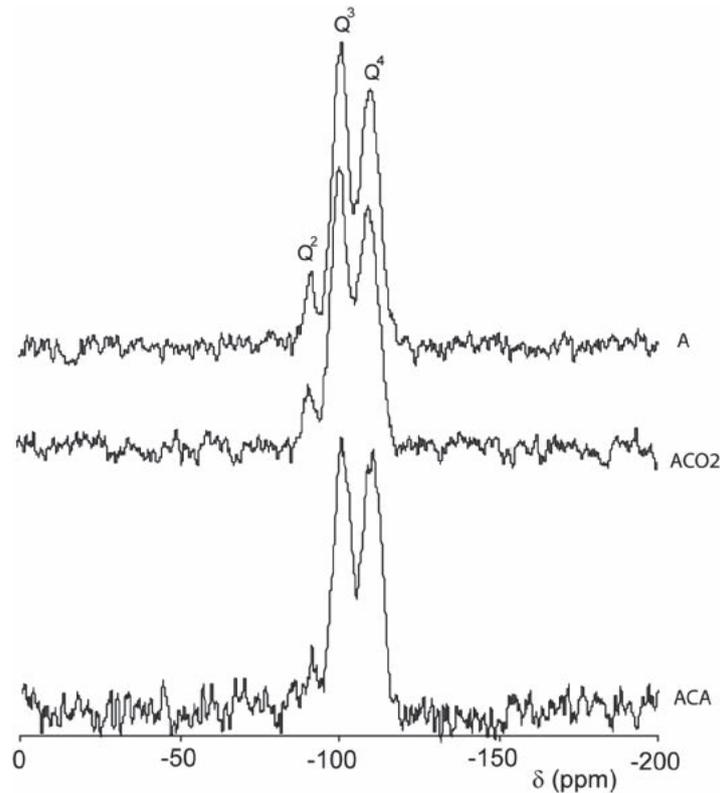


Fig.5.45: Spectre RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  MAS pour des aérogels: A, synthétisé sans  $\text{CO}_2$  ni enzyme; ACO2 synthétisé avec de l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  et ACA synthétisé avec 2 mg d'enzyme

#### *Microscopie à balayage:*

Des micrographies au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont été prises sur un microscope électronique JEOL, JSM 5800LV sous une tension de 30 kV. Tout échantillon examiné a d'abord été fracturé pour observer une surface de fracture, fixé sur un support d'échantillon à l'aide d'une couche de carbone et métallisé avec de l'or pendant 4 min 20 s dans un appareil de pulvérisation cathodique JEOL 5800LV.

Les micrographies ont montré des surfaces lisses pour les xérogels (Fig.5.46b, d, f). Par contre, les ouvertures de petits pores (points noirs très fins uniformément répartis) sont observables sur la surface de l'aérogel ACA (Fig.5.46a), qui est l'aérogel caractérisé par les mésopores les plus gros selon les isothermes d'adsorption d'azote. L'aérogel ACO2CA, dont l'aspect visuel était granuleux, était inhomogène. Dans certaines zones les surfaces de fracture ont montré des boursouffures (Fig.5.46c), alors que d'autres zones ont montré une agglomération de particules submicroniques de silice (Fig.5.46e).

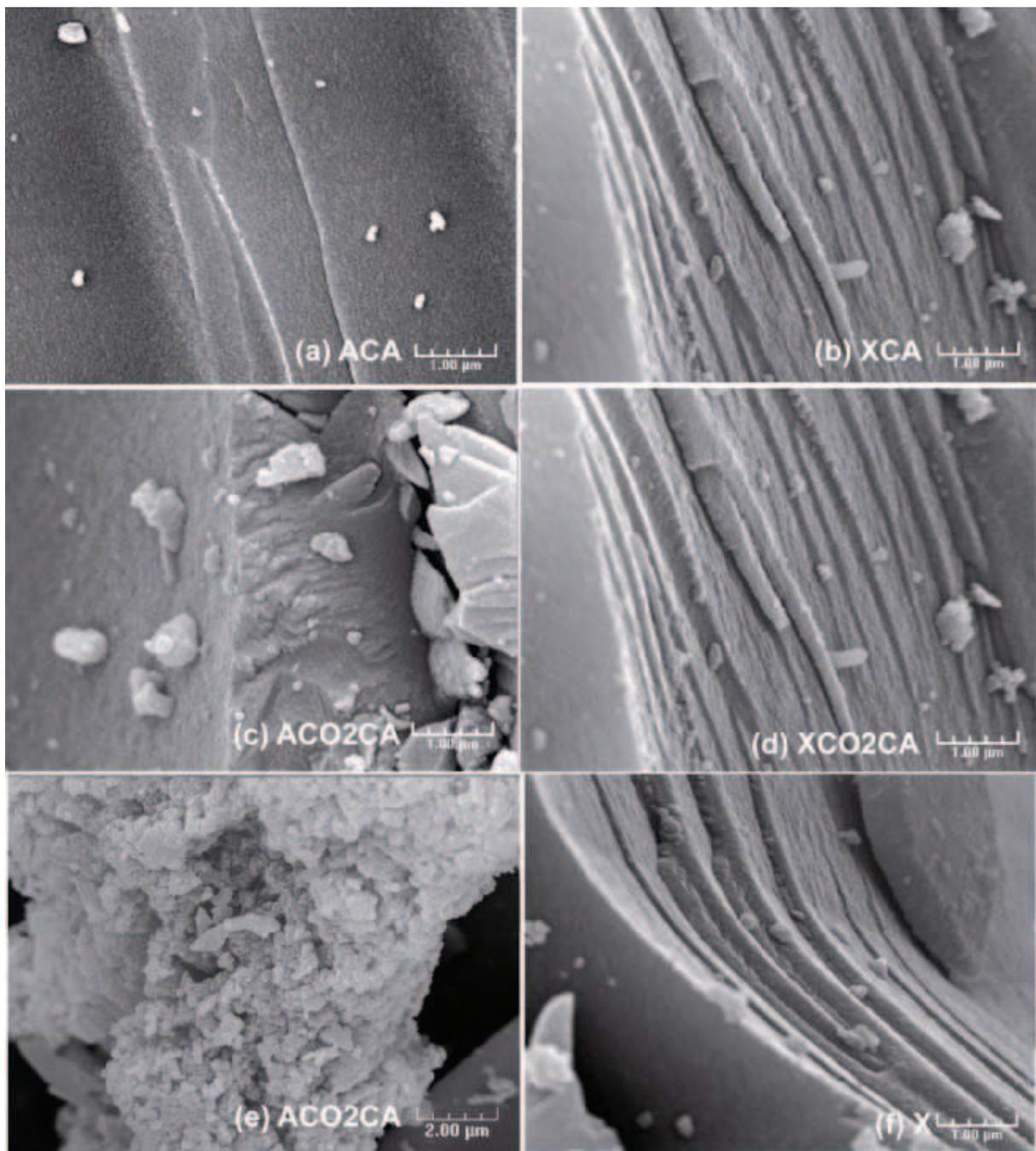


Figure.5.46: Micrographies au microscope à balayage d'aérogels et de xérogels

### c. Analyse des résultats

Globalement, il apparaît que l'enzyme comme l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  ont exercé un effet catalytique sur la gélification de la silice synthétisée à partir de TMOS, comme montré par

une diminution des temps de gélification. De plus, ces deux effets catalytiques étaient additifs (Tableau.5.3).

Cependant, les effets de ces deux catalyseurs sur le réseau du gel de silice apparaissent différents. Lorsque l'enzyme est le seul catalyseur, les spectres RMN du  $^{29}\text{Si}$  montrent une condensation légèrement meilleure des silanols  $\equiv\text{Si-OH}$  en siloxanes  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ , un effet généralement obtenu avec un catalyseur de type basique <sup>81</sup>. Cette vue est également cohérente avec l'existence de mésopores plus gros dans XCA et ACA, par comparaison respectivement avec X et A (Figs.5.42 et 5.43). Ces pores étaient suffisamment gros dans ACA pour être observés sous le MEB (Fig.5.46a).

Il faut mentionner que plusieurs auteurs ont rapporté la capacité d'enzymes ou de protéines à catalyser la formation de silice. De tels effets ont été observés avec des polypeptides <sup>85, 86</sup>, la silicatéine <sup>87</sup>, la lysozyme <sup>88, 89</sup>, la papaïne et la trypsine <sup>90</sup> et une lipase de *Burkholderia cepacia* <sup>91</sup>. Des gels de silice monolithiques ont été obtenus par Zelisko et ses collègues <sup>90</sup> par hydrolyse de tétraéthoxysilane (TEOS), catalysée par de l' $\alpha$ -chymotrypsin ou de la trypsine et par hydrolyse de phényltriméthoxysilane (PhTMOS) catalysée par de la pepsine, dans des conditions et des échelles de temps où des gels n'étaient pas obtenus sans enzyme. Dans ce dernier cas, les chercheurs ont également prouvé par RMN du  $^{29}\text{Si}$  que l'enzyme catalysait bien l'hydrolyse de la silice et que son inhibition, par un produit chimique stoppait cette catalyse, ce qui serait en faveur d'un mécanisme catalytique véritablement enzymatique. Cependant, sans catalyseur, la gélification de TEOS est extrêmement lente, beaucoup plus lente que celle de TMOS. Par exemple un temps de gélification de l'ordre de 1000 h a été rapporté pour une hydrolyse avec un rapport molaire  $[\text{H}_2\text{O}] / [\text{TEOS}] = 4$  et il est connu que le temps de gélification augmente avec ce rapport d'hydrolyse <sup>81</sup>. Dans la présente étude avec TMOS, un catalyseur acide (HCl) a été utilisé pour obtenir un sol de silice, de sorte que la gélification s'est produite même sans enzyme. Pourtant, l'anhydrase carbonique a également accéléré la gélification de la silice.

Par comparaison avec l'enzyme, l'eau saturée en  $\text{CO}_2$  a favorisé l'obtention d'une microporosité dans les xérogels (Fig.5.42) et diminué d'une manière importante la taille des pores dans les aérogels (Fig.5.43). C'est un phénomène généralement observé avec les catalyseurs acides <sup>81</sup>, auquel on pouvait s'attendre compte tenu du fait que l'hydratation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$  produit des ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$ . Dans la présente étude, cet effet catalytique acide a été plus fort que l'effet catalytique de l'enzyme, comme montré dans les gels XCO2CA et ACO2CA.

En ce qui concerne l'aspect granuleux de XCO<sub>2</sub>CA et ACO<sub>2</sub>CA, l'équilibre entre les espèces CO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> était réalisé dans l'eau saturée utilisée pour hydrolyser TMOS. Par contre la gélification a été effectuée alors que l'on ne faisait plus buller du CO<sub>2</sub>. Afin d'atteindre spontanément un nouvel équilibre avec l'atmosphère au dessus du mélange en cours de gélification, la répartition entre les espèces en solution s'est donc déplacé en faveur de la libération de CO<sub>2</sub> gazeux. Ce phénomène a certainement été beaucoup plus rapide avec enzyme (XCO<sub>2</sub>CA et ACO<sub>2</sub>CA) que sans enzyme (XCO<sub>2</sub> et ACO<sub>2</sub>). Ceci a pu induire la formation de bulles de CO<sub>2</sub> gazeux à l'intérieur de XCO<sub>2</sub>CA et ACO<sub>2</sub>CA, expliquant leur aspect granuleux final (Fig.5.39).

Il est possible qu'un phénomène de ce type explique les fuites précoces se produisant brutalement lorsqu'un sol de silice contenant de l'enzyme et gélifiant in situ a été testé avec dans la section 5.4.2, le phénomène étant beaucoup plus progressif lorsque l'enzyme est absente du sol de silice.

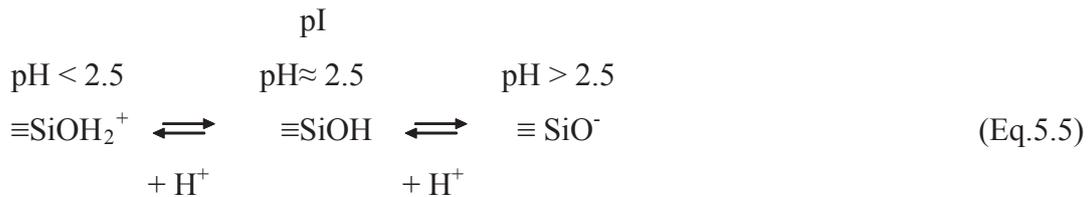
#### **5.5.4. Test d'activité d'une membrane hydrophile hybride**

Une membrane hydrophile GV imprégnée de gel de silice séché et dont le méthanol avait été évaporé par la méthode ci-dessus (5.4.1b) a été testé par la technique dérivée de Wilbur et utilisée au Chapitre 2 pour tester l'activité de l'enzyme non immobilisée (voir section 2.2.2b). Pour cela, la membrane hybride séchée a été découpée en petits carrés d'environ 5 mm de coté, avant d'être immergée dans le ballon de tampon à pH = 8 et soumise au bullage de CO<sub>2</sub>. Le sol de silice avant gélification puis séchage était soit sans enzyme, soit avec enzyme. La Fig.5.47 montre que le pH a décré plus vite avec la membrane hybride sans enzyme que dans le tampon sans membrane et sans enzyme. Par contre ce pH a décré moins vite que dans le tampon contenant de l'enzyme libre seule. Par ailleurs, si le tampon n'est pas soumis au bullage, la membrane hybride ne décroît que très modérément le pH du tampon, qui se stabilise à une valeur très supérieure à 7.5.

Selon ce test, le gel de silice serait donc lui-même actif dans la déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq), bien que cette activité soit bien moindre que celle de l'enzyme. Cette activité modérée, compensée par une diminution de la porosité de la membrane polymérique après imprégnation de gel, pourrait expliquer qu'une membrane liquide sans enzyme ait montré une

perméance légèrement supérieure à celle de la membrane hybride séchée, imprégnée ensuite dans le même tampon sans enzyme.

Un mécanisme catalytique de la silice pourrait d'ailleurs être proposé. Il se baserait sur le fait que le point isoélectrique (pI) de la silice est bas :  $pI \approx 2.5$  à  $3$ <sup>92</sup>. Pour un  $pH < pI$ ,  $SiO_2$  porte globalement un excès de charges électriques positives et pour  $pH > pI$  un excès de charges négatives, conformément à l'Eq.5.5 ci-dessous.



Dans les conditions de captage du  $CO_2$ , le gel de silice porte donc un excès de fonctions  $\equiv SiO^-$  en surface. Ces sites basiques de Lewis permettent de proposer un mécanisme décrit Fig.5.48, par mimétisme du mécanisme de l'enzyme elle-même (Fig.2.7, Chapitre 2).

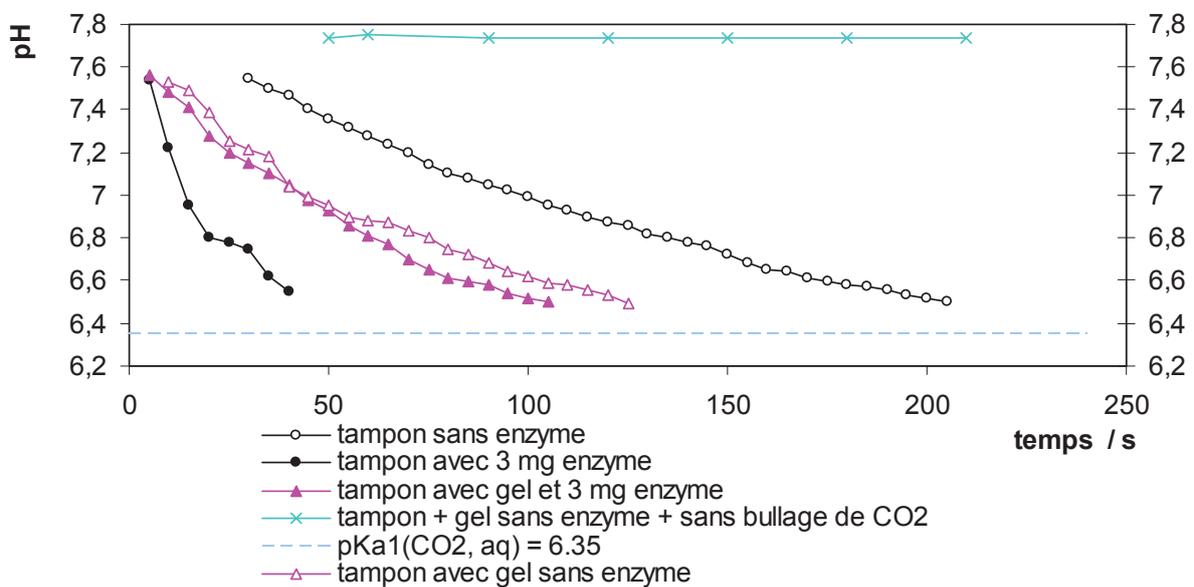


Figure.5.47: Vitesse de décroissance du pH à  $22 \pm 1$  °C dans 10 mL de tampon phosphate à  $pH \approx 8$ : (1) par bullage  $CO_2$  (bouteille contenant 100 % de  $CO_2$ ) dans le tampon contenant respectivement: aucune enzyme; 2 mg d'enzyme ; une membrane polymérique imprégnée de gel sans enzyme ; (2) sans bullage du  $CO_2$  pour une membrane polymérique imprégnée de gel sans enzyme

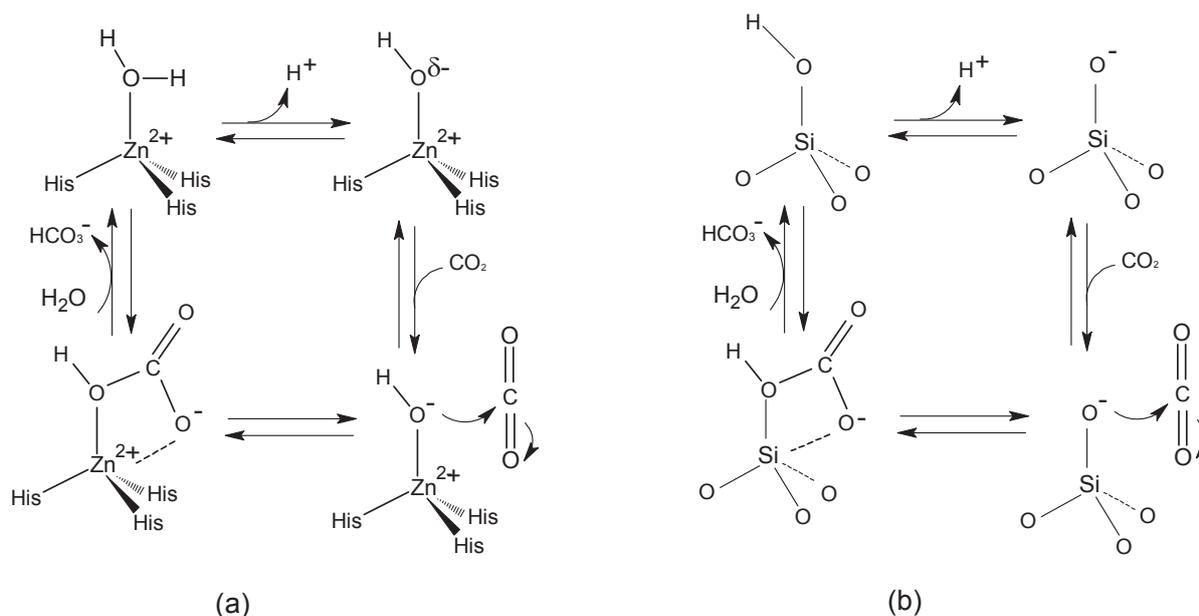


Figure.5.48: Mécanisme catalytique de déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ : (a) Mécanisme simplifié connu pour l'enzyme anhydrase carbonique (Fig.2.7, Chapitre 2); (b) Mécanisme proposé pour  $\text{SiO}_2$  un pH supérieur à son pI par mimétisme avec le mécanisme enzymatique

## 5.6. Conclusions du chapitre sur le captage du $\text{CO}_2$ par membrane hybride

Le dépôt de silice par procédé sol-gel sur une membrane polymérique en nylon tissé, a pu être mené avec succès. Un test de mesure d'activité dérivé de la technique de Wilbur développé au Chapitre 2 pour tester l'activité de l'enzyme, a montré que la silice était très modérément active dans la déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ . Toutefois cette propriété est largement compensée par la diminution de la porosité de la membrane hybride nylon- $\text{SiO}_2$ , la silice bouchant en partie les pores de la membrane polymérique. L'enzyme est en comparaison beaucoup plus active de sorte que l'adsorption de l'enzyme en solution dans un tampon à pH 8, sur la membrane hybride préalablement séchée, s'est traduite par une augmentation importante de la perméance de cette membrane. La valeur la plus élevée est obtenue avec la membrane NY60 hybride et est de  $3.67 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  pour une adsorption d'enzyme dans une solution  $\text{NaHCO}_3$  de molarité 1 M et  $\text{pH} \approx 8$  contenant  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$

d'enzyme. Cette valeur est tout à fait consistante avec celle publiée, par exemple par Bao et Trachtenberg ( $\approx 3 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  Fig.4.1, section 4.1.2a) pour un gaz contenant 10 % de  $\text{CO}_2(\text{g})$ <sup>93</sup>. Par rapport à sans enzyme, le coefficient multiplicateur est d'environ 7.

Quelques paramètres influents dans le cas des membranes liquides (Chapitre 4) ont pu être étudiés et leur importance confirmée dans le cas des membranes hybrides. Ainsi, une comparaison des résultats obtenus avec les membranes en nylon tissé NY20 et N60 a montré que la perméance augmentait avec la taille des pores de la membrane polymérique. La nature du tampon est également importante. Un tampon à base de bicarbonate, qui apporte des ions  $\text{HCO}_3^-$  équilibrés par des cations comme  $\text{Na}^+$ , permet de déplacer plus efficacement l'équilibre de déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$  vers un pH plus élevé, favorisant ainsi une contribution plus importante à la diffusion du  $\text{CO}_2$  à travers la membrane par l'intermédiaire des ions  $\text{HCO}_3^-$ . Comme pour les membranes liquides, une concentration de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  d'enzyme dans le tampon utilisé pour adsorber l'enzyme dans la membrane, s'est avéré être optimale. Cette valeur ne dépendant ni du tampon (phosphate, Tris-HCl,  $\text{NaHCO}_3$ ) ni de la membrane (polymère, ou hybride polymère-silice) est donc dû à l'enzyme elle-même. Une possibilité à vérifier est que l'enzyme pourrait s'agglomérer lorsque sa concentration devient supérieure à  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ , ce qui pourrait être un phénomène régi par la théorie électrostatique des suspensions colloïdales.

Ainsi, la voie des membranes hybrides minces polymère-silice, d'épaisseur contrôlée, réalisée par imprégnation sol-gel d'une membrane polymérique, puis imprégnée d'une solution d'enzyme dans du tampon, apparaît comme une voie intéressante à creuser pour capter le  $\text{CO}_2$  de fumées industrielles. La quantité de silice déposée est importante, puisque la perméance la plus élevée a été obtenue avec notre sol de silice de référence, par rapport aux sols dilués ou concentrés par un facteur 2.

Ce chapitre a aussi soulevé un aspect intéressant suggérant que le gel de silice lui-même pourrait participer au captage catalytique du  $\text{CO}_2$ . Cet aspect est à approfondir en obligeant le  $\text{CO}_2$  à diffuser au travers du réseau du gel lui-même, ce qui implique de pouvoir imprégner la membrane d'un sol de silice, qui reste humide à un pH de préférence proche de 8, sans produire des fissures importantes sources de fuites lors de sa gélification.

A ce titre, il serait d'ailleurs intéressant d'étudier d'autres solides que la silice pour réaliser la membrane, en particulier des solides dont le caractère basique serait marqué. Nous

avons initié cette voie en effectuant des dépôts de carbonate de calcium. La concentration de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  à partir de laquelle est réalisé le dépôt de  $\text{CaCO}_3$  est importante puisque la meilleure perméance ( $\approx 3.4 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) a été obtenue avec la concentration en  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  la plus faible (0.156 M). Cette perméance est légèrement inférieure à celle obtenue avec la meilleure membrane hybride polymère-silice ( $\approx 3.6 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), mais dans un tampon différent, et elle est par contre supérieure à celle dans le même tampon sans  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\approx 2.5 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Fig.5.31).

Bien évidemment, il faudrait étudier beaucoup d'améliorations du procédé, en particulier pour éviter le séchage de la membrane hybride imprégnée. Par exemple, il faudrait étudier l'alimentation en gaz saturés en vapeur d'eau. De plus, il faudrait éviter d'utiliser un gaz vecteur comme l'azote coté relargage, et étudier la faisabilité d'une récupération sous vide partiel, par exemple en présence de vapeur d'eau saturante. D'autres paramètres sont à préciser, comme la concentration en silice du sol d'imprégnation, ou la géométrie de la cellule de captage.

Des travaux plus importants restent aussi à mener, pour développer une technique de ce type fiable. Parmi ceux-ci, il faudrait étudier l'influence de la température de la membrane et des gaz, toutes les études présentées dans ce chapitre ayant été effectuées à  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ . Il faudrait aussi effectuer des tests de longévité afin de déterminer pendant quelle durée ces membranes hybrides polymère-silice pourraient rester efficaces, dans un procédé en continu.

## 5.7. Références bibliographiques

- [1] Ebelmen J. J., (1846). "Üntersuchungen über dir verbindung ber borsaüre and kieselsaüre mit aether", Annale de Chimie et de Physique **16**: 129
- [2] Ebelmen J.J., (1844). Journal of Pharmaceutical Chemistry **6**: 262
- [3] Collignon F., "Cahier technologique sol-gel". Edité par Certech. 2008. p. 0-140. ISBN

- [4] Flory P.J., (1941). "Molecular size distribution in three dimensional polymers. I. Gelation", Journal of the American Chemical Society **63**: 3083-3090
- [5] Hammersley, J. (1957). "Percolation processes. II. The connective constant", Proceedings of the Cambridge Philosophical **53**: 642-645
- [6] Sallard S., (2004). "Etudes électrochimiques des cinétiques de polycondensation et de la fractalité des xérogels." Th. Doct.: Chimie: Cachan: 175p
- [7] Stanley H.E., Birgeneau R.J., Reynolds P.J., Nicoll J.F., (1976) "Thermally driven phase transitions near the percolation threshold in two dimensions", Journal of Physics C: solid State Physics **9**:L553-L560
- [8] Toupance T., Jousseume B., Prabusankar G., Allouchi A., (2006). "Organic–Inorganic Sn<sub>12</sub> and Organic Sn<sub>6</sub> Oxide–Hydroxide Clusters", Angewandte Chemie **118**:1277 –1280
- [9] Shchipunov Y.A., Karpenko T.Y., Krekoten A.A., (2005). "Hybrid organic–inorganic nanocomposites fabricated with a novel biocompatible precursor using sol-gel processing", Composite Interfaces **11**:587-607
- [10] Mauritz K.A., (1998). "Organic-inorganic hybrid materials: perfluorinated ionomers as sol-gel polymerization templates for inorganic alkoxydes", Materials science and engineering **6**: 121-133
- [11] Sanchez C., In M., (1992). "Molecular design of alkoxyde precursors for the synthesis of hybrid organic-inorganic gels", Journal of Non-Crystalline Solids **147-148**: 1-12
- [12] Schmidt H., (1988). "Chemistry of material preparation by the sol-gel process", Journal of Non-Crystalline Solids **100**(1-3): 51-64
- [13] Audebert P., Miomandre F., (2005). "Procédé sol-gel de polymérisation", Technique de l'ingénieur. Plastiques et composites AM1(n°AM3048)

- [14] Pierre A.C., "Introduction to sol-gel processing." Edité par Klumer academic publishers. 1998. p 0 - 394
- [15] Flory P.J., (1941). "Molecular size distribution in three dimensional polymers. II. Trifunctional branching units", Journal of the American Chemical Society **63**: 3091-3096
- [16] Flory P.J., (1941). "Molecular size distribution in three dimensional polymers. III. Tetrafunctional branching units", Journal of the American Chemical Society **63**: 3097-3100
- [17] Flory P.J., "Principles of Polymer Chemistry", Edité par Cornell University Press. 1953. p. 0 – 672. ISBN 0-8014-0134-8
- [18] Kistler P.P., (1932). "Coherent expanded aerogels", Journal of Physical Chemistry **36**(1): 52-64
- [19] Brinker C., "Sol gel Science. The physics and chemistry of sol-gel processing." Edité par Academic Press Inc. 1990. p. 0 – 910. ISBN 0-12-134970-5
- [20] Hüsing N., Schubert U., (1998). "Aerogels - Airy Materials: Chemistry, Structure, and Properties", Angewandte Chemie International Edition **37**(1-2): 22-45
- [21] Hench L.L., West J.K., (1990). "The sol-gel process", Chemical Reviews **90**: 33-72
- [22] Livage J., Sanchez C., Henry M., Doeuff S., (1989). "The chemistry of the sol-gel progress", Solid state ionics **32-33**(Part 2): 633-638
- [23] Hatsuo I., Kumar G., "Molecular characterisation of composite interfaces." Edité par Plenum, New York. 1987. p. 0 – 265
- [24] Artemyer M.V., Woggon U., Wannemacher R., Jaschinski H., Langbein W, (2001). Nano letters **1**(6): 309
- [25] Banyai L., Koch S.W., "Semiconductors Quantum Dots", Edité par World Scientific Publishing, Singapore. 1993. p. 0 – 407. ISBN

- [26] Agoudjil N., Kermadi S., Larbot A., (2008). "Synthesis of inorganic membrane by sol-gel", Desalination **223**(1-3): 417-424
- [27] Platschek V., Schmidt T., Lerch M., Muller G., Spanhel L., Emmerling A., Fricke J., Foitzik A.H., Langer E., (1998). "Quantized aggregation phenomena in II-VI-semiconductor colloids", Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics **102**(1): 85-95
- [28] Piléni M.P., (2001). "Magnetic Fluids: Fabrication, Magnetic Properties, and Organization of Nanocrystals", Advanced Functional Materials **11**: 323-336
- [29] Tawara T., Suemune I., Kumano H., (2002). "Strong coupling of CdS quantum dots to confined photonic modes in ZnSe-based microcavities", Physica E **13**: 403-407
- [30] Gill I., Ballesteros A., (2000). "Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biological", Trends in Biotechnology **18**: 282-296
- [31] Methods of immobilisation. [En ligne]. <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/immmethod.html> (Page consultée le 2 Février 2009)
- [32] Weetall H.H., (1974). "Immobilized enzymes: Analytical applications", Analytical Chemistry **46**(7):602A-615A
- [33] Fabiano S. Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT. Th Doct: chimie-biochimie:Université Claude Bernard Lyon 1:2002. 172p
- [34] Cao L., Van Langen L., Sheldon R.A., (2003). "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free", Current opinion in Biotechnology **14**: 1-8
- [35] Ariga O., Suzuki T., Sano Y., Murakami Y., (1996). "Immobilization of a Thermostable Enzyme Using a Sol-Gel Preparation Method", Journal of fermentation and bioengineering **82**(4): 341-3145

- [36] Jürgen-Lohmann D.L., Legge R.L., (2006). "Immobilization of bovine catalase in sol-gels", Enzyme and Microbial Technology **39**: 621-633
- [37] Choi H., Stathatos E., Dionysiou D.D., (2006). "Sol-gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO<sub>2</sub> films and TiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite membranes for environmental applications", Applied Catalysis B: Environmental **63**: 60-67
- [38] Liu B., Cao Y., Chen D., Kong J., Deng J., (2003). "Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO<sub>2</sub> matrix", Analytica Chimica Acta **478**: 59-66
- [39] Chen J.P., Lin W.S, Chang M.F., (2002). "Synthesis of Geranyl Acetate by Esterification with Lipase Entrapped in Hybrid Sol-Gel Formed Within Nonwoven Fabric", Journal of the American Oil Chemists' Society **79**(3): 309-314
- [40] Livage J., Coradin T., Roux C., (2001). "Encapsulation of biomolecules in silica gels" Journal of Physics: Condensed Matter **13**(33)
- [41] Shtelzer S., Rappoport S., Avnir D., Ottolenghi M., Braun S., (1992). "Properties of trypsin and of acid phosphatase immobilized in sol-gel glass matrices", Biotechnology and applied biochemistry **15**(3): 227-235
- [42] Frenkel-Mullerad H., Avnir D., (2005). "Sol-Gel Materials as Efficient Enzyme Protectors: Preserving the Activity of Phosphatases under Extreme pH Conditions", Journal of the American Chemical Society **127**: 8077-8081
- [43] Avnir D., (1995). "Organic Chemistry within Ceramic Matrices: Doped Sol-Gel Materials", American Chemical Society **28**: 328-334
- [44] Reetz M.T., (1997). "Entrapment of Biocatalysts in Hydrophobic Sol-Gel Materials for Use in Organic Chemistry", Advanced Materials **9**(12): 943-954
- [45] Reetz M.T., Tielmann P., Wiesenhöfer W., Könen W., Zonta A., (2003). "Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts", Advanced Synthesis & Catalysis **345**: 717-728

- [46] Karout A., Chopard C., Pierre A.C., (2007). "Immobilization of a lipoxygenase in silica gels for application in aqueous media", Journal of molecular catalysis B: Enzymatic **44**: 117-127
- [47] Chen Q., Kenausis G.L., Heller A., (1998). "Stability of oxidases immobilized in silica gels", Journal of the American Chemical Society **120**(19): 4582-4585
- [48] Gupta A.K., Singh A.K., (2000). "Aqueous sol-gel process for protein encapsulation", Chemistry of Materials **12**(8): 2434-2441
- [49] Yamanaka, S.A., Nguyen N.P., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., (1996). "Enzymatic activity of oxalate oxidase and kinetic measurements by optical methods in transparent sol-gel monoliths", Journal of sol-gel science and technology **7**(1-2): 117-121
- [50] A. Karout, P. Buisson, A. Perrard, A.C. Pierre, (2005). "Shaping and mechanical reinforcement of silica aerogel biocatalysts with encapsulated lipase", Journal of Sol-Gel Science and Technology **36**: 163-171
- [51] Bond G.M., Stringer J., Brandvold D.K., Simsek F.A., Medina M.G., Egeland G., (2001). "Development of integrated system for biomimetic CO<sub>2</sub> sequestration using the enzyme carbonic anhydrase", Energy & Fuels **15**(2): 309-316
- [52] Liu, N., Bond G.M., Abel A., McPherson B.J., Stringer J., (2005). "Biomimetic sequestration of CO<sub>2</sub> in carbonate form: Role of produced waters and other brines", Fuel Processing Technology **86**(14-15): 1615-1625
- [53] Krajewska B., (2004). "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review", Enzyme and Microbial Technology **35**(2-3): 126-139
- [54] Parent C., Belzil A., (2005). "Méthodes de qualification des immobilisations chimiques d'une enzyme sur un support solide", Biochemistry and Cell Biology **83**: 70-77

- [55] Wilbur K.M., Anderson N.G., (1948). "Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase", Journal of Biological Chemistry **176**(1): 147-154
- [56] Zhang Y.T., Zhi T.T., Zhang L., Huang H., Chen H.L., (2009). "Immobilization of carbonic anhydrase by embedding and covalent coupling into nanocomposite hydrogel containing hydrotalcite", Polymer **50**(24): 5693-5700
- [57] Zhang Y.T., Zhang L., Chen H.L., Zhang H.M., (2010). "Selective separation of low concentration CO<sub>2</sub> using hydrogel immobilized CA enzyme based hollow fiber membrane reactors", Chemical Engineering Science **65**(10): 3199-3207
- [58] Ben Assaker I. Synthèse électrochimique de films d'hydroxydes doubles lamellaires-application aux biocapteurs. Th Doct: chimie:Université d'Evry Val d'Essonne: 2009. 189p
- [59] Ozdemir E., (2009). "Biomimetic CO<sub>2</sub> Sequestration: 1. Immobilization of Carbonic Anhydrase within Polyurethane Foam", Energy & Fuels **23**: 5725-5730
- [60] Kanbar B., (2008). "Enzymatic CO<sub>2</sub> sequestration by carbonic anhydrase" Th. Doct.: Biotechnology: Izmir: 55
- [61] "Enzymes bound to polyurethane." Wood L.L, Hartdegen F.J., Hahn P.A., US Patent US 4343834, 03-08-1982
- [62] Bakker M., Van de Velde F., Van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2000). "Highly Efficient Immobilization of Glycosylated Enzymes into Polyurethane Foams", Biotechnology and Bioengineering **70**(3): 342-348
- [63] Romaskevicius T., Pielichowski K., Budriene S., Pielichowski J.,(2006). "Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review", Chemija **17**(4): 74-89
- [64] Budriene S., Romaskevicius T., Pielichowski K., Pielichowski J., (2007). "Synthesis and characterization of polyurethane microspheres and their application for immobilization of maltogenase", Polymers for advanced technologies **18**: 67-71

- [65] Van de Velde F., Bakker M., Van Rantwijk F., Sheldon R. A. (2000). "Chloroperoxidase-Catalyzed Enantioselective Oxidations in Hydrophobic Organic Media", Biotechnology and Bioengineering **72**(5): 523-529
- [66] LeJeune K.E., Mesiano A.J., Bower S.B., Grimsley J.K., Wild J.R., Russell A.J., (1997). "Dramatically Stabilized Phosphotriesterase-Polymers for Nerve Agent Degradation", Biotechnology and Bioengineering **54**:105-114
- [67] Berberich J.A., Yang L.W., Madura J., Bahar I., Russell A.J., (2005). "A stable three-enzyme creatinine biosensor. 1. Impact of structure, function and environment on PEGylated and immobilized sarcosine oxidase", Acta Biomaterialia **1**:173-181
- [68] Berberich J.A., Yang L.W., Madura J., Bahar I., Russell A.J., (2005). "A stable three enzyme creatinine biosensor. 2. Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase", Acta Biomaterialia **1**:183-191
- [69] Berberich J.A., Yang L.W., Madura J., Bahar I., Russell A.J., (2005). "A stable three-enzyme creatinine biosensor. 3. Immobilization of creatinine amidohydrolase and sensor development", Acta Biomaterialia **1**:193-199
- [70] Veselova I.A., Shekhovtsova T.N., (1999). "Visual determination of mercury(II) using horseradish peroxidase immobilized on polyurethane foam", Analytica Chimica Acta **392**: 151-158
- [71] Kamhi S.R., (1963). "On the structure of vaterite  $\text{CaCO}_3$ ", Acta Crystallographica **16**: 770-772
- [72] Graf D.L., (1961). "Crystallographic tables for rhombohedral carbonates", The American Mineralogist **46**: 1283-1316
- [73] Pierre A.C., "Introduction to Sol-Gel Processing", Edité par Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. 1998. Chap. 3 Colloidal particles and Sols. p. 91 - 163

- [74] Gal J.Y., Bollinger J.C., Tolosa H., Gache N., (1996). "Calcium carbonate solubility: a reappraisal of scale formation and inhibition", Talanta **43**: 1497-1509
- [75] Favre N., Christ M.L., Pierre A.C., (2009). "Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **60**: 163-170
- [76] Sing K.S.W, Everett D.H., Haul R.A.W., Moscou L., Pierotti R.A., Rouquerol J., Siemieniewska T., (1985). "Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984)", Pure and Applied Chemistry **57**: 603-619
- [77] Reichenauer G., Scherer G.W., (2000). "Ammonia-catalyzed silylation reactions of Cab-O-Sil with methoxymethylsilanes", Journal of Non-Crystalline Solids **277**: 162-172
- [78] Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.H., (1951). "The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms", Journal of the American Chemical Society **73**: 373-380
- [79] Brunauer S., Emmett P.H., Teller E., (1938). "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers", Journal of Non-Crystalline Solids **60**: 309-319
- [80] Bertoluzza A., Fagnano C., Antonietta Morelli M., Gottardi V., Guglielmi M., (1982). "Raman and infrared spectra on silica gel evolving toward glass", Journal of Non-Crystalline Solids **48**:117-128
- [81] Scherer G.W., Brinker C.J., "Sol-gel Science: Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxides". Edité par Academic Press. 1990. p. 108-145. ISBN 0-12-134970-5
- [82] Williams A., Guenzler H., Gremlich U., "Handbook of Analytical Techniques: Infrared and raman Spectroscopy". Edité par Wiley-VCH Verlag GmbH 1. p. 465-507
- [83] Socrates G., "Infrared and Raman Characteristic Group frequencies: Tables and Charts, 3rd ed". Edité par John Wiley & Sons. 2004. p. 0 – 347. ISBN 0-470-09307-2

- [84] Ueno A., Bennett C.O., (1978). “Infrared Study of CO<sub>2</sub> Adsorption on SiO<sub>2</sub>”, Journal of Catalysis **54**:31-41
- [85] Kröger N., Deutzmann R., Sumper M., (1999). “Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation”, Science **286**:1129-1132
- [86] Zhang Y.F., Wu H., Li J., Li L., Jiang Y.J., Jiang Z.Y., (2008). “Protamine-Templated Biomimetic Hybrid Capsules: Efficient and Stable Carrier for Enzyme Encapsulation”, Chemistry of Materials **20**:1041-1048
- [87] Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S.C., Chmelka B.F., Stucky G.D., Morse D.E., (1999). “Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro”, Proceedings of the National Academy of Sciences USA **96**:361-365
- [88] Luckarift H.R., Dickerson M.B., Sandhage K.H., Spain J.C., (2006). “Rapid, room-temperature synthesis of antibacterial bio-nanocomposites of lysozyme with amorphous silica or titania”, Small **2**: 640-643
- [89] Abbate V., Bassindale A.R., Brandstadt K.F., Lawson R., Taylor P.G., (2010). “Enzyme mediated silicon-oxygen bond formation; the use of *Rhizopus oryzae* lipase, lysozyme and phytase under mild conditions”, Dalton Trans **39**: 9361-9368
- [90] Frampton M., Vawda A., Fletcher J., Zelisko P.M., (2008). “Enzyme-mediated sol–gel processing of alkoxysilanes”, Chemical Communications 5544-5546
- [91] Buisson P., El Rassy H., Maury S., Pierre A.C., (2003). “Biocatalytic gelation of silica in the presence of a lipase” Journal of Sol-Gel Science and Technology **278**: 373-379
- [92] Pierre A.C., Pajonk G.M., (2002). “Aerogels and their applications”, Chemical Reviews **102**: 4243-4265

[93] Bao L., Trachtenberg M.C., (2006). “Facilitated transport of CO<sub>2</sub> across a liquid membrane: comparing enzyme, amine, and alkaline”, Journal of Membrane Science **280**: 330-334



## **CHAPITRE 6**

## CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette thèse s'était fixée comme objectif d'initier l'étude du captage par voie enzymatique du CO<sub>2</sub> de fumées industrielles, d'abord dans une membrane liquide, puis dans une membrane de silice sol-gel elle-même imprégnée de solution enzymatique. Ce sujet est actuellement étudié par plusieurs concurrents, des résultats importants sur les membranes à base de fibres microporeuses ont par exemple été publiés alors que notre travail expérimental était largement engagé. Notre objectif a été largement atteint puisqu'une membrane liquide simple a pu être mise au point. Le liquide a pu être ensuite remplacé par un dépôt de silice, lui-même imprégné d'une solution aqueuse d'enzyme et la dissolution de l'enzyme dans une solution adéquate (NaHCO<sub>3</sub> 1 M et à pH = 8.05) a magnifié par un facteur de l'ordre de 5.5 la perméance de la membrane, pour un mélange N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> à 10 % de CO<sub>2</sub>. La meilleure valeur de cette perméance est de  $\approx 3.39 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  (Tableau 4.6), valeur tout à fait similaire aux meilleures publiées pour des membranes liquides (Fig.4.1). Dans le cas d'une membrane hybride polymère-silice la meilleure perméance est de  $\approx 3.6 \cdot 10^{-8} \text{ mol m}_{\text{membrane}}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  (Fig.5.22) pour un coefficient multiplicateur  $\approx 7.8$  par rapport à sans enzyme, dans la même solution. La perméance est donc légèrement supérieure avec silice que sans silice, ce qui suggérerait une cation catalytique de la silice, résultat à confirmer néanmoins.

Afin d'atteindre ce résultat, le présent travail expérimental a d'abord nécessité la construction d'une cellule contenant une membrane liquide. La conception de cette dernière a été précisée à la suite de tests expérimentaux préliminaires, montrant les conditions dans lesquelles l'enzyme pourrait améliorer le captage du CO<sub>2</sub> en milieu aqueux. Les résultats les plus marquants concernent l'épaisseur de la membrane liquide qui doit être mince, typiquement de l'ordre d'une centaine de  $\mu\text{m}$  et la nécessité d'un tampon pour maintenir le pH suffisamment au-dessus du pKa1 (= 6.35) de 1<sup>ère</sup> déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq) en solution aqueuse. La molarité de ce tampon pour un pH donné doit également être d'autant plus élevée que la pression partielle du CO<sub>2</sub> dans le gaz de captage est élevée.

Afin de pouvoir réaliser une membrane liquide fine d'épaisseur contrôlée par une méthode simple, la technique choisie a consisté à imprégner une membrane polymérique hydrophile poreuse et à la placer en sandwich entre deux membranes poreuses hydrophobes et

sèches, le tout reposant sur une grille métallique servant de support et séparant une chambre de captage et une chambre de relargage du CO<sub>2</sub>.

La technique de mesure du CO<sub>2</sub> transféré choisie est simple. Des essais comparatifs de mesure de pression, de masse de CaCO<sub>3</sub> précipité par le gaz relargué et de teneur en CO<sub>2</sub> dans le gaz relargué au moyen d'une sonde infrarouge de coût relativement modeste, nous a amené à retenir cette dernière. Cette sonde à infrarouge permet de mesurer la concentration en CO<sub>2</sub> dans une gamme de 0 à 10 000 ppm. Une 2<sup>ème</sup> mesure lui a néanmoins été souvent adjointe, qui consiste à déterminer la masse de CaCO<sub>3</sub> précipité dans une solution de CaCl<sub>2</sub> initialement à pH = 10.5. Une étude détaillée nous a montré que le pH diminuait lors d'une telle précipitation, de sorte que même en régime continu la précipitation finissait par s'arrêter lorsque le pH était trop bas. Par contre, si la durée de précipitation sélectionnée était telle qu'un pH < pKa1 n'était pas encore atteint, la masse du précipité pouvait servir d'indicateur qualitatif de la performance de transfert du CO<sub>2</sub>. De fait dans cette thèse, la masse de CaCO<sub>3</sub> précipitée, par exemple en 1 h, a toujours corroboré les mesures de perméances déterminées avec la sonde à CO<sub>2</sub>, en terme de grandeur relative: ainsi, une perméance plus élevée a toujours correspondu à une masse de CaCO<sub>3</sub> précipité plus élevée, bien que cette dernière ne soit pas proportionnelle à la perméance, pour les raisons que nous avons résumées plus haut.

La cellule contenant la membrane mince que nous avons construite présente des inconvénients, auxquels il serait possible de remédier en retravaillant sa conception. Parmi ses limitations, elle ne permettait pas d'étudier commodément l'effet de la température, en raison de la difficulté à réguler la température non seulement de la membrane compte tenu des nombreuses entrées et sorties de gaz qu'elle comportait, mais aussi des gaz balayant cette dernière. Aussi les résultats présentés ici ont été obtenus, sauf mention particulière, à la température de 21 ± 2°C. De plus, la technique de mesure par sonde à infrarouge retenue pour mesurer la concentration en CO<sub>2</sub> du gaz relargué, ne permettait pas de travailler sous vide partiel. Elle nous a conduit à utiliser un gaz vecteur: l'azote. Il est évident que dans la pratique, il serait inopportun d'utiliser un tel gaz vecteur à la pression atmosphérique, car il ne servirait à rien de séparer le CO<sub>2</sub> d'une fumée, pour le re-diluer dans de l'azote. Il faudrait certainement travailler sous vide, au moins partiel. Une 3<sup>ème</sup> limitation concerne le séchage de la membrane liquide. Cette limitation n'a pas posé de problèmes dans le cas de nos mesures, effectuées sur une durée limitée. Mais pour des durées de transfert plus longues, il serait possible de saturer le gaz à capter en vapeur d'eau, et de récupérer le gaz relargué sous un vide partiel saturé en vapeur d'eau. A ce titre, la membrane hybride développée ici présente un avantage par rapport aux autres procédés, dans la mesure où la silice hydrophile adsorbe

facilement la vapeur d'eau. Il serait également possible de mettre la membrane liquide en contact, au niveau latéral, avec un excès d'eau par un design approprié.

Malgré ces limitations, notre cellule s'est avérée suffisante pour étudier la faisabilité et le principe de fonctionnement d'un système membranaire de captage du CO<sub>2</sub> par voie enzymatique.

En ce qui concerne l'enzyme anhydrase carbonique utilisée dans cette thèse, l'analyse du produit commercial effectuée par électrophorèse à l'Université de Paris V - René Descartes, a montré qu'il s'agissait d'un produit relativement pur. Pour vérifier son activité, nous avons adapté la méthode classique de Wilbur et Anderson, de façon à la rendre applicable également à la membrane sol-gel elle-même. Ce test, par bullage de CO<sub>2</sub> dans un milieu aqueux contenant l'enzyme, simule un processus de captage du CO<sub>2</sub>, puisqu'il est dynamique, sous pression et débit constant, dans un milieu aqueux initialement non saturé en CO<sub>2</sub>. Il a en particulier montré que la silice elle-même était très modérément active dans la déprotonation du CO<sub>2</sub>(aq) neutre. Toutefois cette propriété est largement compensée par la diminution de la porosité de la membrane hybride nylon-SiO<sub>2</sub>, la silice bouchant en partie les pores de la membrane polymérique. L'enzyme est en comparaison beaucoup plus active de sorte que l'adsorption de l'enzyme en solution dans un tampon à pH = 8, dans la membrane hybride préalablement séchée, s'est traduite par une augmentation importante de la perméance de cette membrane. Notre test d'activité adapté de Wilbur et Anderson a également montré que notre enzyme commerciale était active à une température de 22°C, et restait active à 33°C.

Globalement, le comportement de la membrane est régi essentiellement par des équilibres relevant de la chimie-physique: équilibre de Henry pour la dissolution et le relargage du CO<sub>2</sub>; équilibre de déprotonation des espèces neutres CO<sub>2</sub>(aq) pour former des ions H<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; équilibres d'adsorption d'enzyme sur la silice, auxquels il faut ajouter les phénomènes de diffusion des espèces en solution d'une face vers l'autre face de la membrane liquide ou sol-gel. A ce titre, une caractéristique originale de la réaction catalysée par l'enzyme est que l'eau pure elle-même est active et que tout composant basique d'un tampon est lui-même un catalyseur de la même réaction. Ceci explique que la nature d'un tampon et sa molarité se soient révélées être importantes, comme on pouvait s'y attendre. Des ions H<sup>+</sup> étant formés en même temps que les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, un tampon à un pH ≥ 8 est nécessaire pour maintenir des conditions thermodynamiques où les espèces HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dominant sur les espèces neutres CO<sub>2</sub>(aq), conditions favorables au captage enzymatique puisque l'enzyme catalyse précisément cette réaction de déprotonation. Dans ces conditions, l'utilisation d'un tampon à

base de bicarbonate comme  $\text{NaHCO}_3$  est logiquement très bénéfique, puisqu'il aide à maintenir un excès d'ions  $\text{HCO}_3^-$ . Cet aspect de chimie physique explique également la grande différence observée dans le transfert de  $\text{CO}_2$  par la membrane liquide, entre un gaz de captage à base de  $\text{CO}_2$  pur et un gaz de captage à base de mélange  $\text{N}_2\text{-CO}_2$  à 10 % de  $\text{CO}_2$ . Dans le 1<sup>er</sup> cas, une pression partielle  $P(\text{CO}_2)$  plus élevée dans le gaz à capter, se traduit par un pH plus faible en régime permanent dans la membrane liquide, en raison d'un déplacement de l'équilibre de 1<sup>ère</sup> déprotonation du  $\text{CO}_2(\text{aq})$ . Le pH décroît en effet très vite vers le  $\text{pKa}_1$ , d'où une bien moins grande efficacité de l'enzyme pour un tampon donné, ainsi que cela a été présenté dans la section 4.1

D'autres paramètres importants sont la porosité de la membrane hydrophile imprégnée de liquide: la perméance croît avec la porosité. Elle croît également lorsque l'épaisseur de cette membrane décroît, comme l'a montré une comparaison des membranes GV de cellulose régénérée comprenant différentes tailles de pores et des membranes nylon, plus fines et à pores plus gros

Un résultat remarquable de la voie enzymatique étudiée dans ce mémoire est que, quel que soit le tampon et la membrane, y compris la membrane silice sol-gel, une perméance maximum a été observée pour une concentration en enzyme de  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ce résultat est donc imputable uniquement au comportement de l'enzyme: il pourrait par exemple être dû à une agrégation de l'enzyme au delà d'une certaine concentration, un résultat qui reste à approfondir et expliquer réellement.

En résumé, la voie des membranes hybrides minces polymère-silice d'épaisseur contrôlée, réalisées par imprégnation sol-gel d'une membrane polymérique puis imprégnées d'une solution d'enzyme dans du tampon, apparaît comme une voie intéressante à développer pour capter le  $\text{CO}_2$  de fumées industrielles. Nous n'avons fait ici que l'initier et d'autres aspects sont à approfondir, comme la géométrie de la cellule de captage, l'influence de la température de la membrane et des gaz, ainsi que des tests de longévité afin de déterminer pendant quelle durée ces membranes hybrides polymère-silice pourraient rester efficaces, dans un procédé en continu.

L'utilisation de solides autres que la silice permettant de maintenir un pH basique serait un sujet intéressant à approfondir: nous n'avons fait ici que l'aborder avec des dépôts in situ de  $\text{CaCO}_3$ . De même il serait également intéressant de mieux comprendre le rôle de ce solide dans le captage du  $\text{CO}_2$ . Le milieu aqueux contenant l'enzyme, y compris pour la gélification in-situ de la silice, pourrait enfin être modifiée, en particulier en y ajoutant une composante de type liquide ionique, beaucoup moins susceptible de sécher en s'évaporant que l'eau.

**PUBLICATIONS DE LA THESE**

## PUBLICATIONS DE LA THESE

### Publications dans des revues avec comité de lecture

- 1 – Nathalie Favre, M. Lorraine Christ and Alain C. Pierre, (2009). “Biocatalytic capture of CO<sub>2</sub> with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **60**: 163-170
- 2 – Nathalie Favre, Yasser Ahmad and Alain.C. Pierre, (2011). “Biomaterials obtained by gelation of silica precursor with CO<sub>2</sub> saturated water containing a carbonic anhydrase enzyme”, Journal of Sol-Gel Science and Technology **58**: 442-451

### Publications dans des proceedings de conférence (\* présentateur)

- 1 – N. Favre\* and A.C. Pierre “Biocatalytic aided CO<sub>2</sub> transfer through an aqueous membrane, at relatively high CO<sub>2</sub> partial pressure”. Proceedings of the “2010 Duke-UAM Conference on Biofiltration for air Pollution Control”. 107-116
- 2 – N. Favre and A.C. Pierre\*, “Interaction of a carbonic anydrase with SiO<sub>2</sub> aerogels for CO<sub>2</sub> capture”, Communication orale invitée dans le symposium (POLY) “Aerogels, Foams, and Nanoporous Materials”, Foams and Other Nanoporous Materials”, American Chemical Society, Spring 2011, 241<sup>st</sup> National Meeting, Annahein, CA, March 26-31, 2011. Polymer Preprint 52 (1): 27-28

### Publications en cours de rédaction

- 1 – Nathalie Favre and Alain.C. Pierre, “CO<sub>2</sub> transfer using hybrid polymer sol-gel SiO<sub>2</sub> membranes with immobilized carbonic anhydrase”

### Autres présentations orales et par affiches

- 1 – Participation au congrès international sur “CO<sub>2</sub> capture and storage”, qui a eu lieu à IFP (Solaize) du 25 au 26 Mai 2009
- 2 – Participation à la journée nationale de la Société Chimique de France avec la présentation d’un poster intitulé “Capture biocatalytique du dioxyde de carbone par l’anhydrase carbonique”, qui a eu lieu à Lyon en Juin 2009

- 3 – Participation au congrès international GeCat avec la présentation d'un poster intitulé "Capture biocatalytique du dioxyde de carbone par l'anhydrase carbonique", qui a eu lieu à Porquerolles, du 17 au 20 Mai 2010
- 4 – Participation à la journée nationale de la Société Chimique de France avec la présentation d'un poster intitulé "Capture biocatalytique du dioxyde de carbone par l'anhydrase carbonique", qui a eu lieu à Grenoble en Juin 2010
- 5 – Participation au congrès international "Large Volume CO<sub>2</sub> recycling to fuels and materials" avec la présentation d'un poster intitulé "Capture biocatalytique du dioxyde de carbone par l'anhydrase carbonique", qui a eu lieu à Lyon, du 27 au 28 Septembre 2010
- 6 – Participation à la journée national de l'Ecole Doctorale de Lyon avec la présentation d'un poster intitulé "Capture biocatalytique du CO<sub>2</sub> par l'anhydrase carbonique", qui a eu lieu à Solaize le 14 Septembre 2010
- 7 – Participation au congrès international "Conference on Biofiltration for Air Pollution Control" avec la présentation orale intitulée "Biocatalytic aided capture of CO<sub>2</sub> through an aqueous thin film containing a carbonic anhydrase enzyme", qui a eu lieu à Washington, du 28 au 29 Octobre 2010
- 8 – Participation au congrès international "Conference on Biofiltration for Air Pollution Control" avec la présentation orale intitulée "Interaction of a carbonic anydrase with SiO<sub>2</sub> aerogels for CO<sub>2</sub> capture", qui a eu lieu à Annahein, du 26 au 31 Mars 2011
- 9 – Participation à la journée nationale de la Société Chimique de France avec la présentation d'un poster intitulé "CO<sub>2</sub> transfer using sol-gel ceramic membrane with immobilized carbonic anhydrase", qui a eu lieu à Chambéry le 9 Juin 2011
- 10 – Participation au congrès international "11th International Conference on Carbon Dioxide Utilization" avec la présentation d'un poster intitulé "CO<sub>2</sub> transfer using sol-gel ceramic membrane with immobilized carbonic anhydrase", qui a eu lieu à Dijon, du 27 au 30 Juin 2011

# **ANNEXES**

## ANNEXE A

### Technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide utilisée <sup>1 à 3</sup>

L'électrophorèse est une technique de laboratoire utilisée depuis longtemps pour séparer des protéines ou des acides nucléiques en fonction de leur masse, par migration dans un gel de polyacrylamide sous l'action d'un champ électrique (Fig.A.1) <sup>1, 2</sup>. Ce gel est une matière inerte obtenu par polymérisation d'acrylamide, présentant un réseau poreux ouvert.



Figure.A.1: Equipement nécessaire pour l'électrophorèse

Comme tout colloïde, une protéine peut adsorber un excès d'ions  $H^+$  ou  $OH^-$ , selon le pH du milieu aqueux environnant. Elle présente donc un point isoélectrique (pI), qui est une valeur du pH pour lequel sa charge globale de surface est nulle, de sorte qu'elle ne se déplace pas sous l'effet d'un champ électrique. Par contre, lorsque le milieu aqueux est à un  $pH < pI$ , la protéine adsorbe un excès d'ions  $H^+$ , elle est alors chargée positivement et se déplace dans le sens du champ électrique, à une vitesse qui dépend de sa charge électrique et de sa masse. A l'inverse, pour un  $pH > pI$ , elle adsorbe un excès d'ions  $OH^-$  et est chargée négativement. Elle se déplace alors dans un sens opposé au champ électrique.

Afin d'effectuer l'électrophorèse de l'enzyme commerciale utilisée, 8 échantillons de solutions enzymatiques ont été préparés. Chaque solution était constituée d'un mélange de 10

$\mu\text{L}$  de solution aqueuse d'anhydrase carbonique (concentrations en enzyme utilisées : 2 ; 1 ; 0,5 et 0,2  $\text{mg mL}^{-1}$ ) et 7,5  $\mu\text{L}$  de réactif. Le réactif était constitué d'un mélange de 50 $\mu\text{L}$  de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et 10 $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol, un réducteur. Les solutions étaient introduites dans des tubes fermés percés par un trou percé dans leur extrémité supérieure, chauffées à 100°C pendant 5 min afin de dénaturer les protéines, puis centrifugées pendant 5 min à 1300  $\text{tours min}^{-1}$  pour perdre leur structure tridimensionnelle native.

Le SDS est le détergent anionique le plus utilisé en électrophorèse. Il possède trois actions. Il permet, tout d'abord, de dissocier les protéines agrégées peu solubles ou hydrophobes, puis il confère une charge négative à toutes les protéines qui migrent vers l'anode et enfin, il sépare les protéines en fonction de leur géométrie, leur masse molaire et leur forme par un effet de tamis moléculaire. Il se fixe ainsi sur les protéines et les transforme en polyanions.

La dénaturation complète des protéines se produit sous l'action du réducteur qui réduit les ponts disulfures. La protéine prend alors une forme allongée (on parle de "random coil"), dont la longueur est proportionnelle à sa masse moléculaire.

Le gel utilisé pour l'électrophorèse est en polyacrylamide à 12 %, tamponné par du 2,2-Bis(hydroxyméthyl)-2,2',2''-nitrilotriéthanol – HCl (ou Bis-Tris –HCl) à pH = 6,4. Il est mis en forme de couche mince dans une cassette entre 2 plaques transparentes en verre. La cassette est placée verticalement dans une cuve contenant une solution de 25 mL de 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) dans 500 mL d'eau. Chaque solution enzymatique préparée a été analysée en déposant 15  $\mu\text{L}$  de cette solution dans la raie supérieure de la cassette de gel schématisée sur la Fig.A.2. Après migration sous l'effet du champ électrique de 200 V, les protéines sont révélées par coloration après trempage pendant 1 h dans une solution à 0.025 % (poids ou volume) de bleu de Coomassie. Le gel peut ensuite être décoloré par une solution d'éthanol et d'acide acétique.

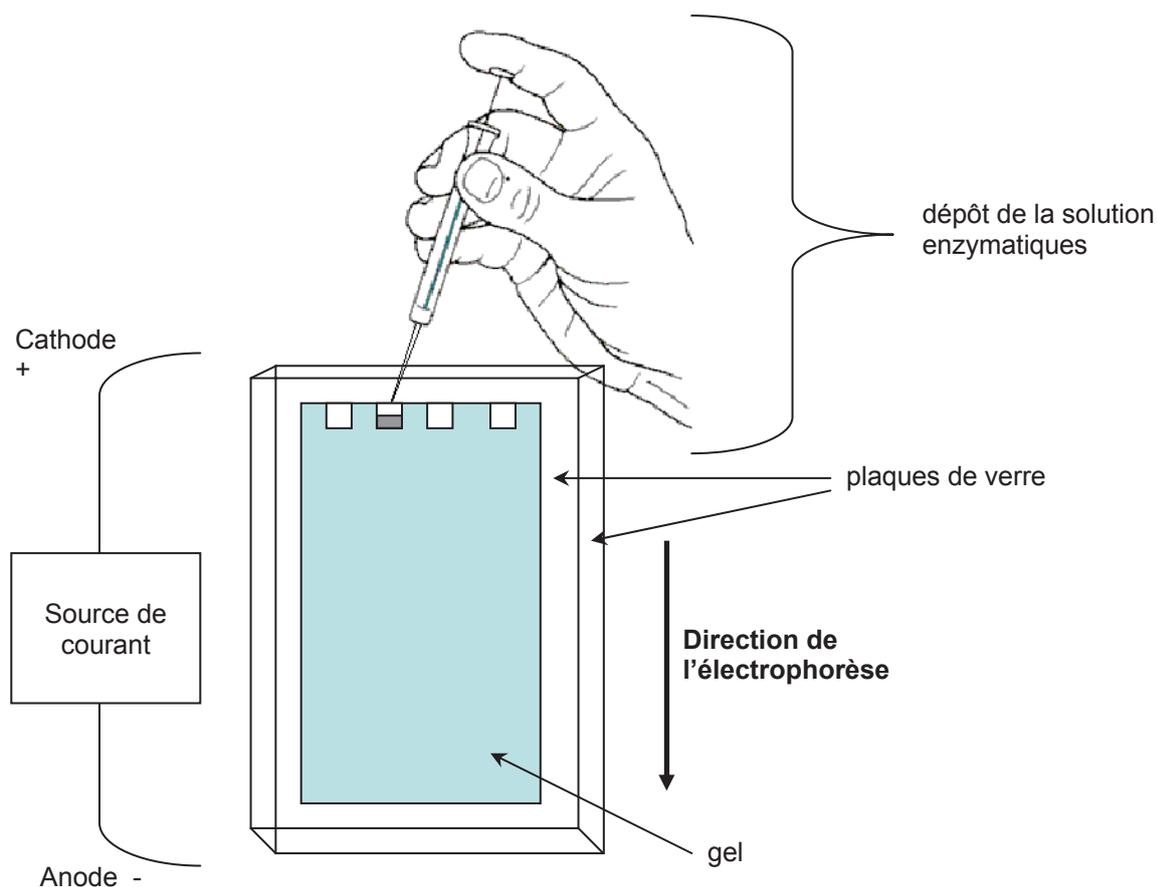


Figure.A.2: Schéma du dépôt de la solution d'enzyme par la raie supérieure de la cassette de gel

## Références bibliographiques

- [1] Trivin F., Le Bricon T., (2003). "New electrophoresis techniques applied to protein and DNA analysis", Immuno-analyse & Biologie spécialisée **18**: 11-22
- [2] Andrews A.T., "Electroporesis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications". Edité par Oxford: Clarendon Press. 1981. p. 0-336. ISBN 0198546262
- [3] Tiollais P., Galibert F., Lepetit A., Auger M.A., (1972). "L'électrophorèse des acides ribonucléiques en gel de polyacrylamide", Biochimie **54**: 339-354



## ANNEXE B

### Détails du calcul de l'activité relative de l'enzyme par rapport au liquide sans enzyme

L'activité supplémentaire relative  $v_r$  de l'enzyme par rapport au même milieu liquide sans enzyme est exprimée en « Unités » par mg ( $U \text{ mg}^{-1}$ ) selon la présentation initiée par Wilbur <sup>1</sup> dont le détail des calculs est décrit ci-dessous:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$$

$$\ln [\text{H}^+] = -\text{pH} \ln 10$$

$$[\text{H}^+] = e^{-\text{pH} \ln 10}$$

$$\frac{d[\text{H}^+]}{dt} = -(\ln 10) \cdot e^{-\text{pH} \ln 10} \frac{d\text{pH}}{dt}$$

$$\frac{d[\text{H}^+]}{dt} = -(\ln 10) \cdot [\text{H}^+] \frac{d\text{pH}}{dt}$$

On prend la valeur absolue, on obtient ainsi:

$$\frac{d[\text{H}^+]}{dt} = (\ln 10) \cdot [\text{H}^+] \frac{d\text{pH}}{dt} \approx 2.3 [\text{H}^+] \frac{\Delta\text{pH}}{\Delta t}$$

Pour  $\Delta\text{pH} = 1$ , on a  $\Delta t = t$ , ce qui nous donne:

$$\frac{d[\text{H}^+]}{dt} = 2.3 [\text{H}^+] \frac{1}{t}$$

Concernant le tampon, l'équation devient:

$$\left(\frac{d[H^+]}{dt}\right)_0 = 2.3 [H^+] \frac{1}{t_0}$$

Concernant l'enzyme, l'équation devient:

$$\left(\frac{d[H^+]}{dt}\right)_{enz} = 2.3 [H^+] \frac{1}{t_{enz}}$$

L'écart absolu donne:

$$\left(\frac{d[H^+]}{dt}\right)_{enz} - \left(\frac{d[H^+]}{dt}\right)_0 = 2.3 [H^+] \left(\frac{1}{t_{enz}} - \frac{1}{t_0}\right)$$

$$v = \left( \frac{2.3[H^+] \left(\frac{1}{t_{enz}} - \frac{1}{t_0}\right)}{2.3[H^+] \frac{1}{t_0}} \right) = \left(\frac{1}{t_{enz}} - \frac{1}{t_0}\right) t_0 = \frac{t_0 - t_{enz}}{t_{enz}}$$

On obtient ainsi  $v_r$ :

$$\text{Activité relative} = v_r \text{ (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{v}{m_{enz}} = \frac{t_0 - t_{enz}}{t_{enz} m_{enz}}$$

Avec

$t_0$  = temps en seconde pour passer de pH = 7.5 à pH = 6.5 sans enzyme

$t_{enz}$  = temps en seconde pour passer de pH = 7.5 à pH = 6.5 avec l'enzyme

$m_{enz}$  = masse en mg d'enzyme

## Référence bibliographique

[1] Wilbur K.M., Anderson N.G., (1948). "Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase", Journal of Biological Chemistry **176**(1): 147-154

## ANNEXE C

### Calcul de la perméance $\mathcal{P}$ d'une fine membrane aqueuse

Le flux de  $\text{CO}_2$ , en moles par s. à travers la membrane liquide est:

$$J(\text{CO}_2) (\text{mol s}^{-1}) = \mathcal{P} [P(\text{CO}_2)_{\text{cap}} - P(\text{CO}_2)_{\text{rel}}] \cdot S_{\text{memb}}$$

où  $P(\text{CO}_2)_{\text{cap}}$  et  $P(\text{CO}_2)_{\text{rel}}$  sont les pressions partielles de  $\text{CO}_2$  en Pa, de part et d'autre de la membrane

Soit  $n(\text{N}_2)_{\text{mol/L}}$  le nombre de moles de  $\text{CO}_2$  dans un 1 L de gaz  $\text{N}_2$  de balayage. Et  $\Phi(\text{N}_2)_{\text{L/h}}$  le débit d'azote en  $\text{L h}^{-1}$ .

$$\mathcal{P} (\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}) = \frac{[\text{CO}_2]_{\text{ppm}} \cdot 10^{-6} \cdot \Phi(\text{N}_2)_{\text{L/h}} \cdot n(\text{N}_2)_{\text{mol/L}}}{3600_{\text{s/h}} \cdot [P_{\text{Pa}}(\text{CO}_2)_{\text{cap}} - P_{\text{Pa}}(\text{CO}_2)_{\text{rel}}] \cdot S(\text{memb})_{\text{m}^2}}$$

En utilisant la loi des gaz parfaits pour calculer  $n(\text{N}_2)$ , pour une pression d'azote  $P_{\text{Pa}}(\text{N}_2)_{\text{rel}}$  coté relargage, il vient:

$$\mathcal{P} (\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}) = \frac{[\text{CO}_2]_{\text{ppm}} \cdot 10^{-6} \cdot \Phi(\text{N}_2)_{\text{L/h}} \cdot \left[ \frac{P_{\text{Pa}}(\text{N}_2)_{\text{rel}} \cdot 10^{-3} \text{ L/m}^3}{8,315 \cdot T_K} \right]}{3600_{\text{s/h}} \cdot [P_{\text{Pa}}(\text{CO}_2)_{\text{cap}} - P_{\text{Pa}}(\text{CO}_2)_{\text{rel}}] \cdot S(\text{memb})_{\text{m}^2}}$$

Ex : Pour un débit d'azote coté relargage de  $2.294 \text{ L/h}$  sous  $1 \text{ atm}$  ( $1.013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ ):

- Un pourcentage de  $\text{CO}_2$  coté relargage faible ( $< 1 \% = 10\,000 \text{ ppm}$ )
- Un gaz coté captage sous  $1 \text{ atm}$  ( $10^5 \text{ Pa}$ ), à  $10 \% \text{ CO}_2$
- Une surface de membrane de  $4.524 \text{ cm}^2$  (diamètre  $2.4 \text{ cm}$ )
- Et une température de  $22^\circ\text{C}$

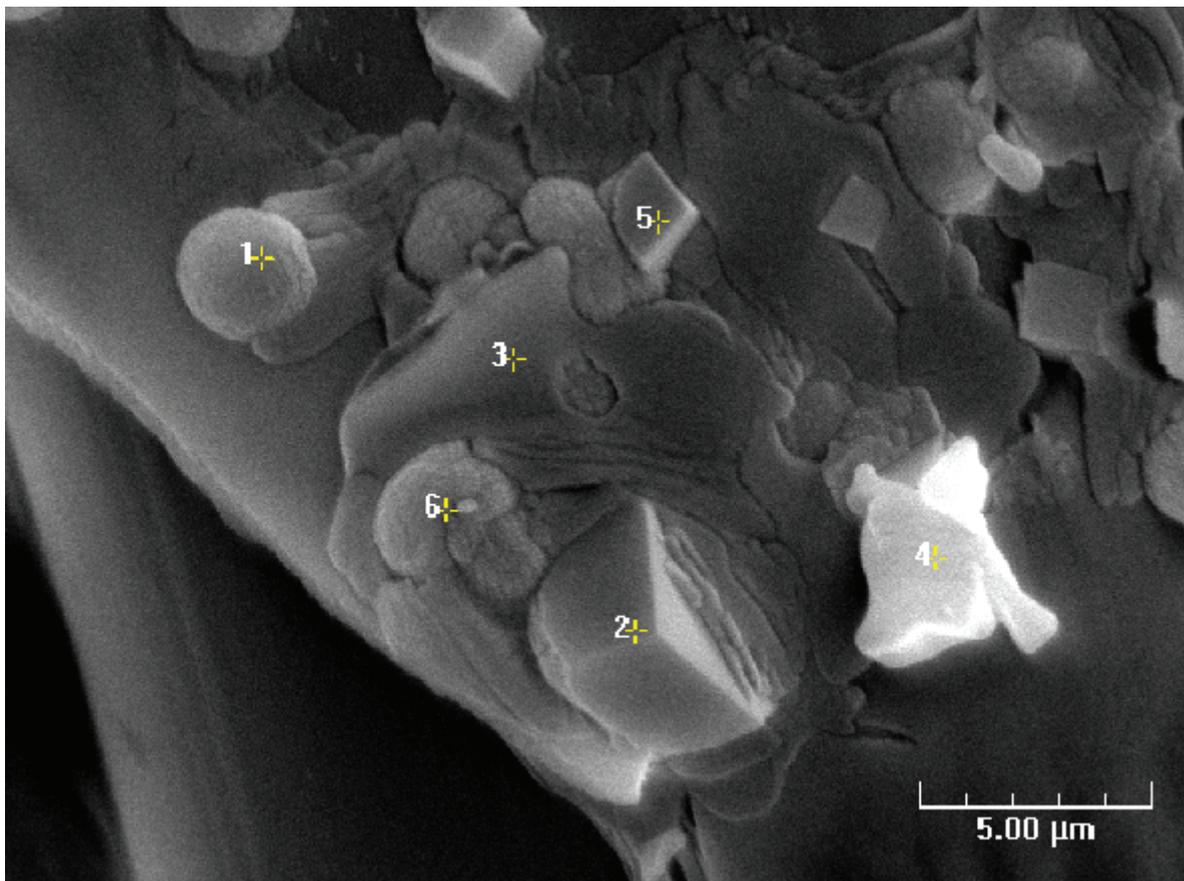
$$\mathcal{P} (\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}) = \frac{[\text{CO}_2]_{\text{ppm}} \cdot 10^{-6} \cdot 2,294_{\text{L/h}} \cdot \left[ \frac{10^5 \text{ Pa} \cdot 10^{-3} \text{ L/m}^3}{8,315 \cdot (273 + 22)_K} \right]}{3600_{\text{s/h}} \cdot 10^4 \text{ Pa} \cdot 4,524 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2} = 5,74 \cdot 10^{-12} [\text{CO}_2]_{\text{ppm}}$$

Ainsi, si  $[\text{CO}_2]_{\text{ppm}} = 10000 \text{ ppm}$ , alors  $\mathcal{P} = 5,74 \cdot 10^{-8} \text{ mol s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$ .



## ANNEXE D

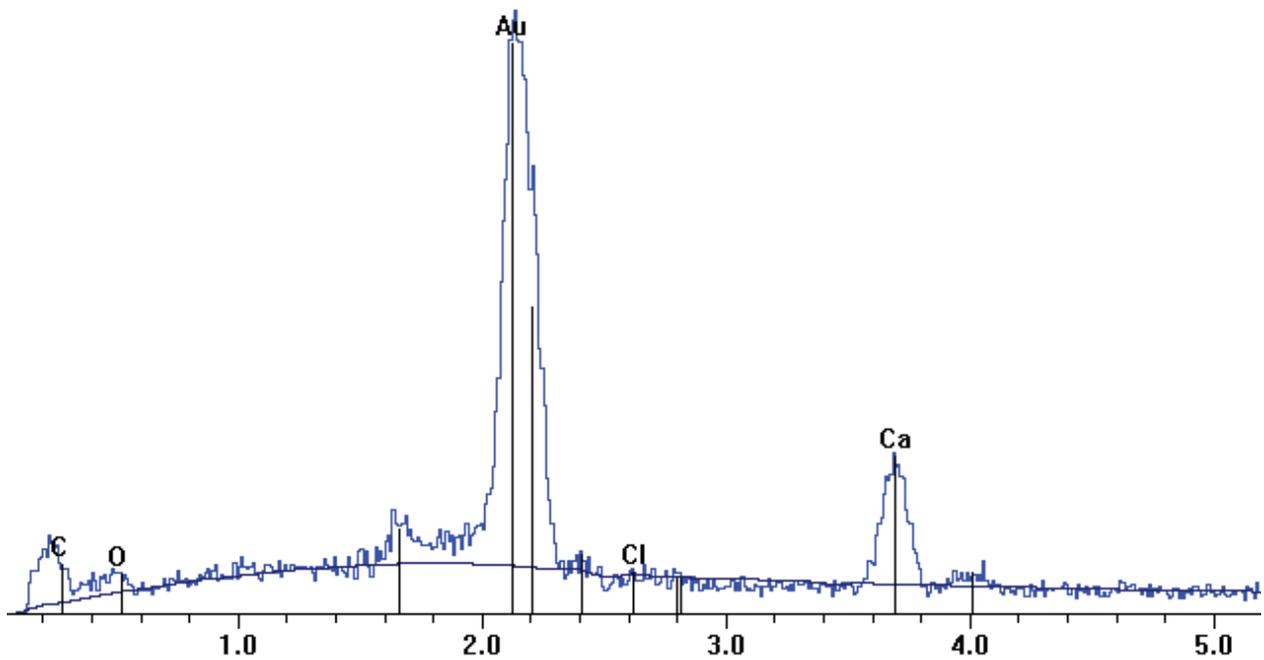
**Micro analyse X de la Fig.5.36 c): membrane nylon de 60µm constituée de gel de silice séché puis trempée dans du chlorure de calcium sans enzyme et testée sur le captage du CO<sub>2</sub>(g)**



Le point 1 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Vatérite:

■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T001.pgt

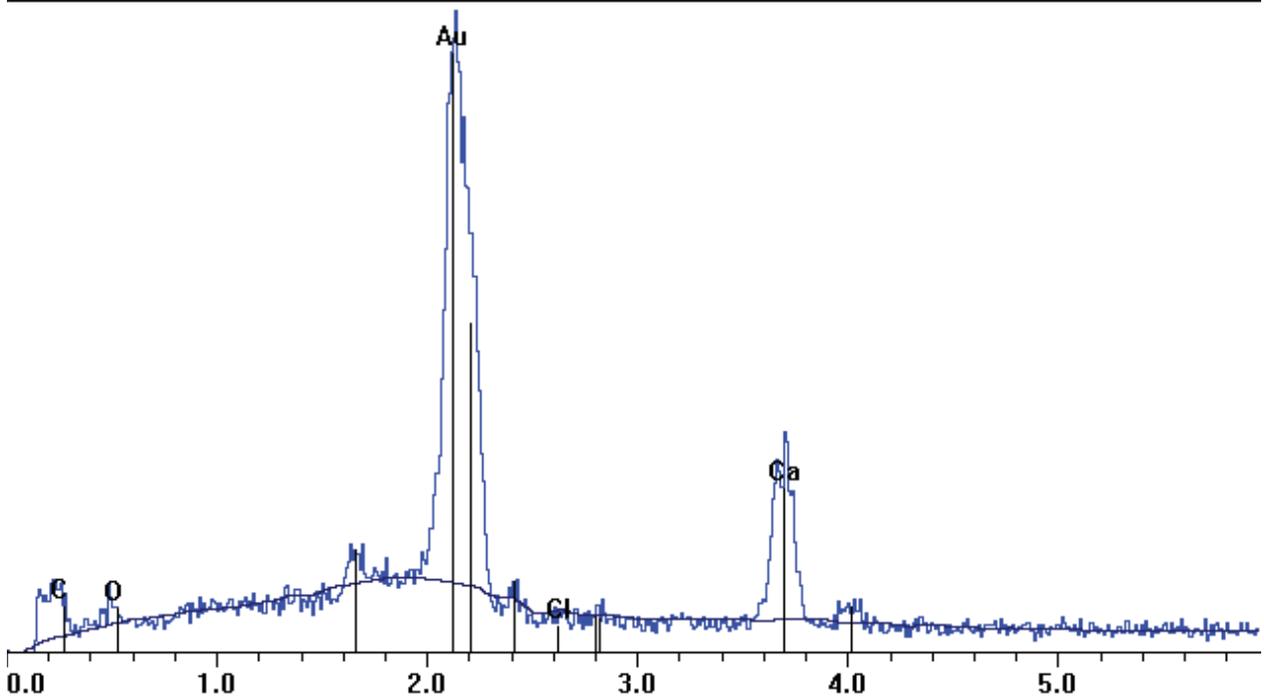
FS: 720



Le point 2 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Calcite:

■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T002.pgt

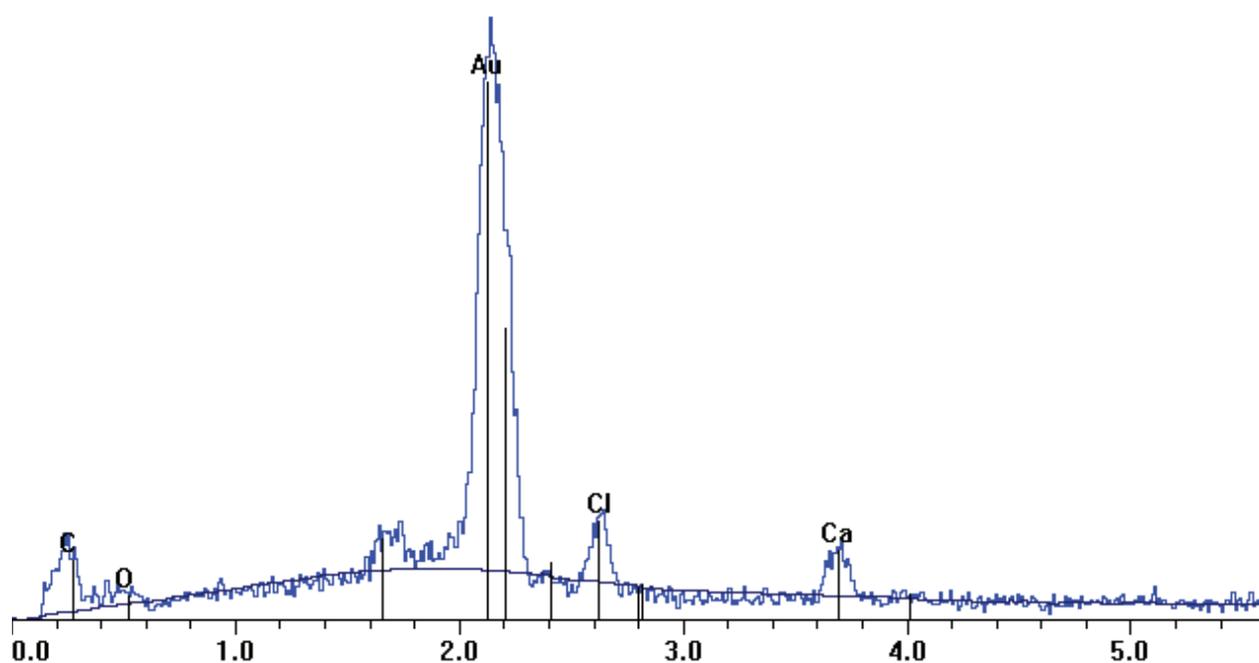
FS: 640



Le point 3 représente du chlorure de calcium et formation de carbonate de calcium:

■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T003.pgt

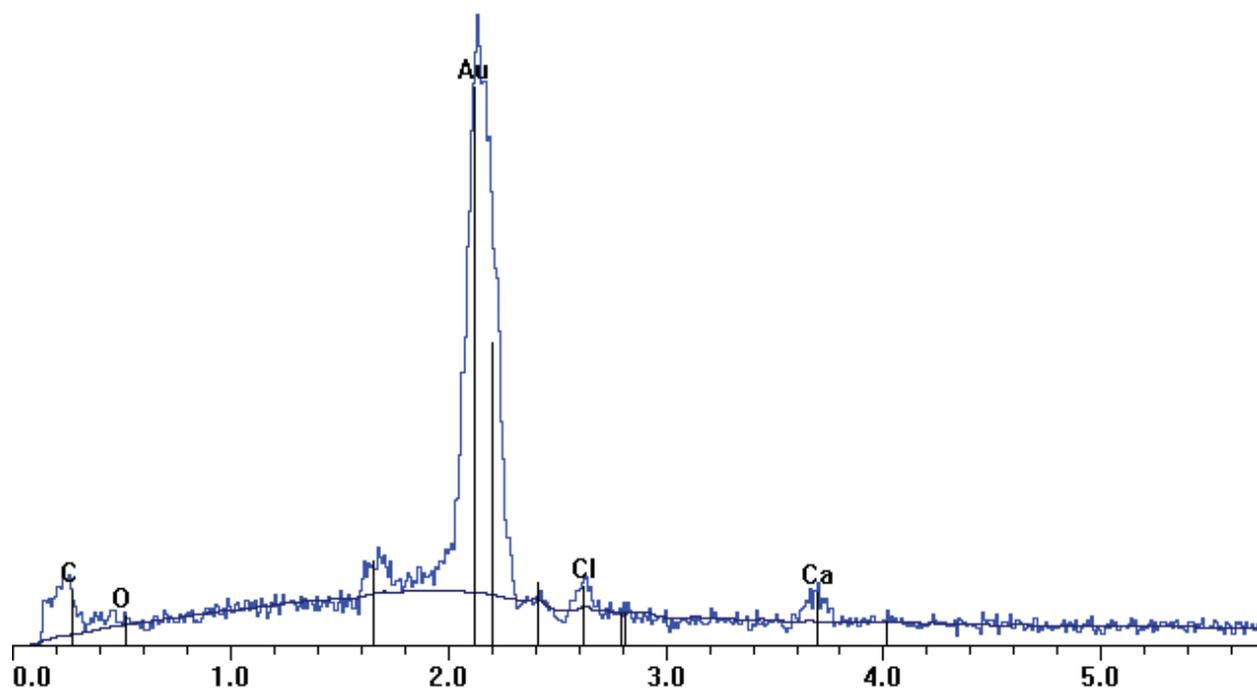
FS: 600



Le point 4 représente du chlorure de calcium et formation de carbonate de calcium:

■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T004.pgt

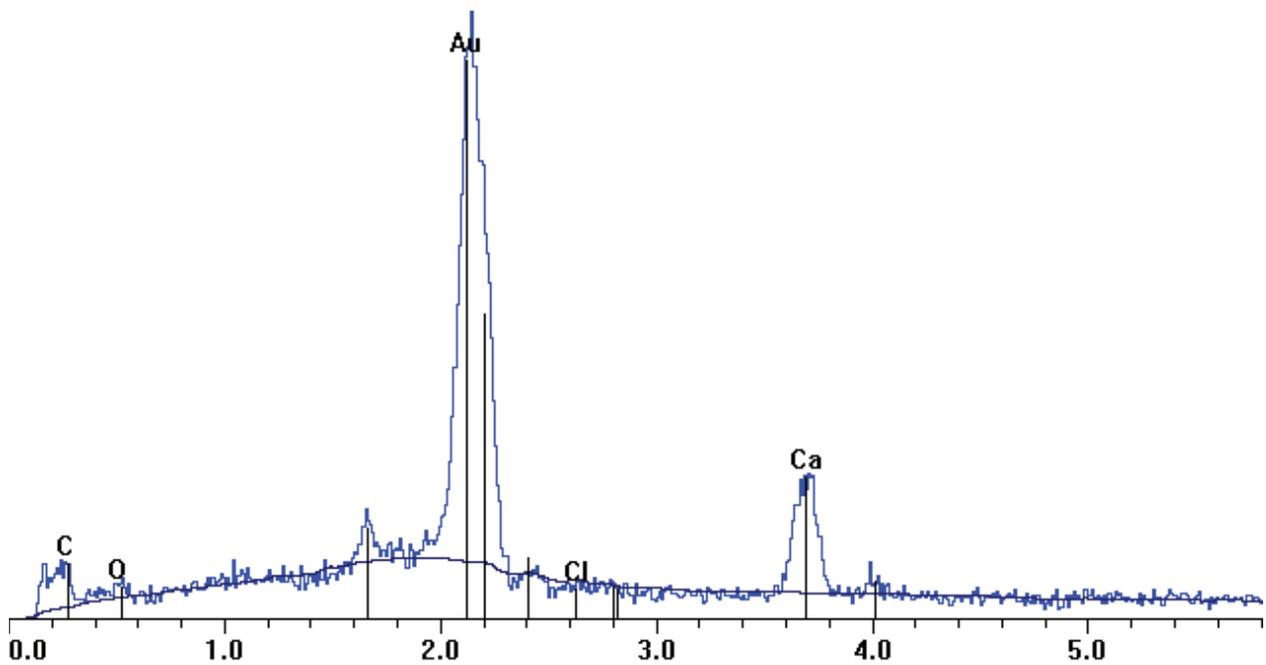
FS: 720



Le point 5 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Calcite:

■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T005.pgt

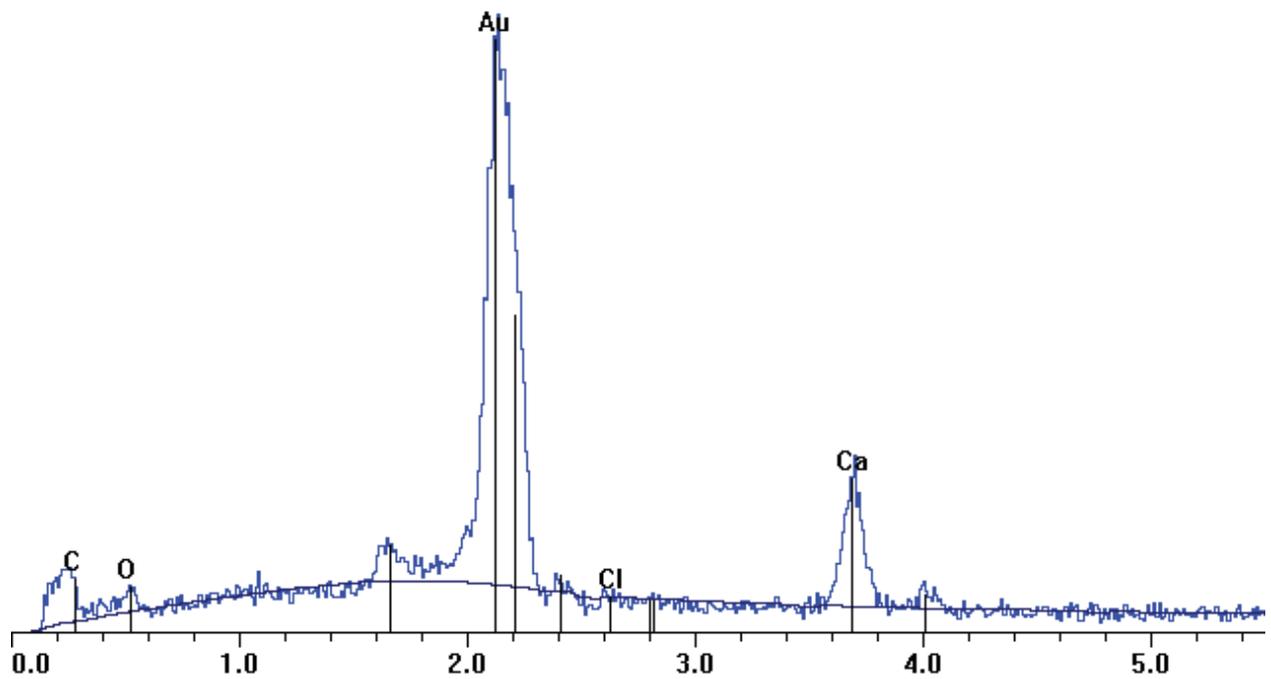
FS: 720



Le point 6 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Calcite:

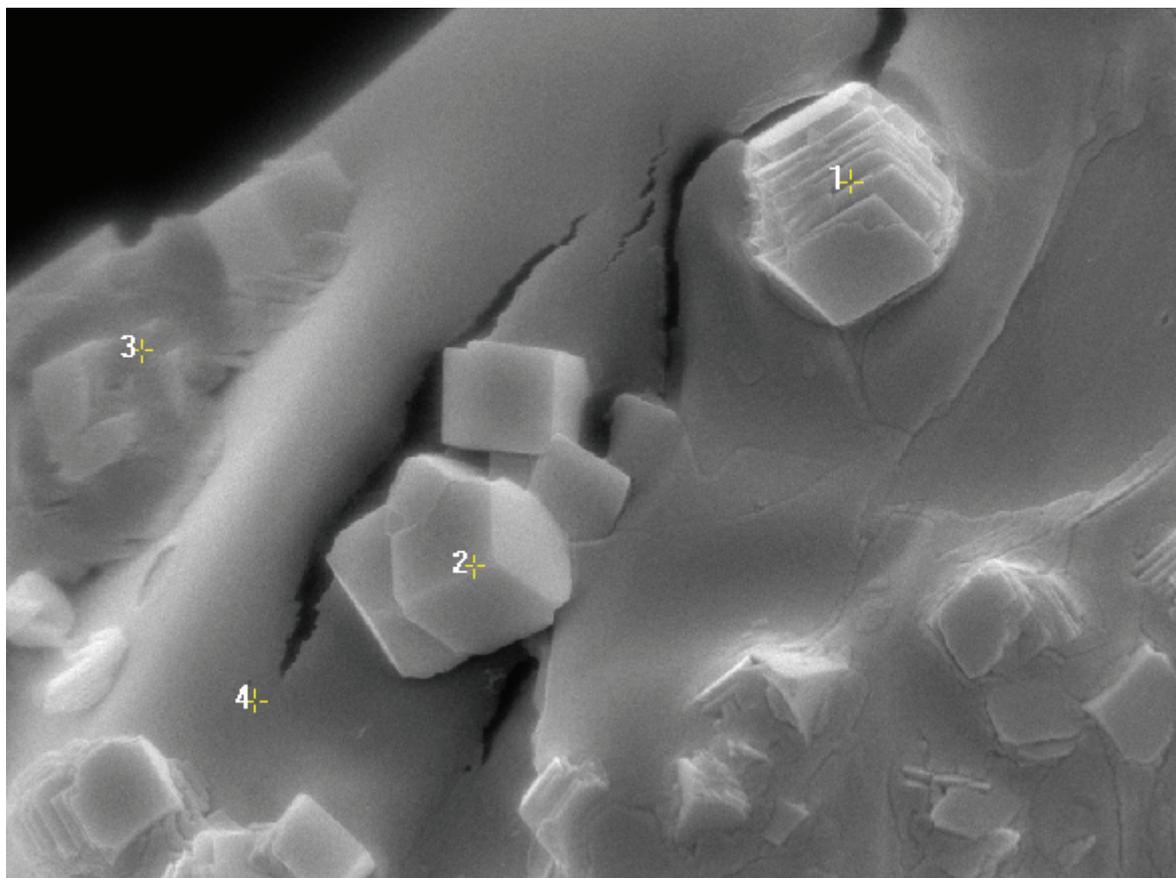
■ NFA-D-281-01-\_10\_X5000\_T006.pgt

FS: 720



## ANNEXE E

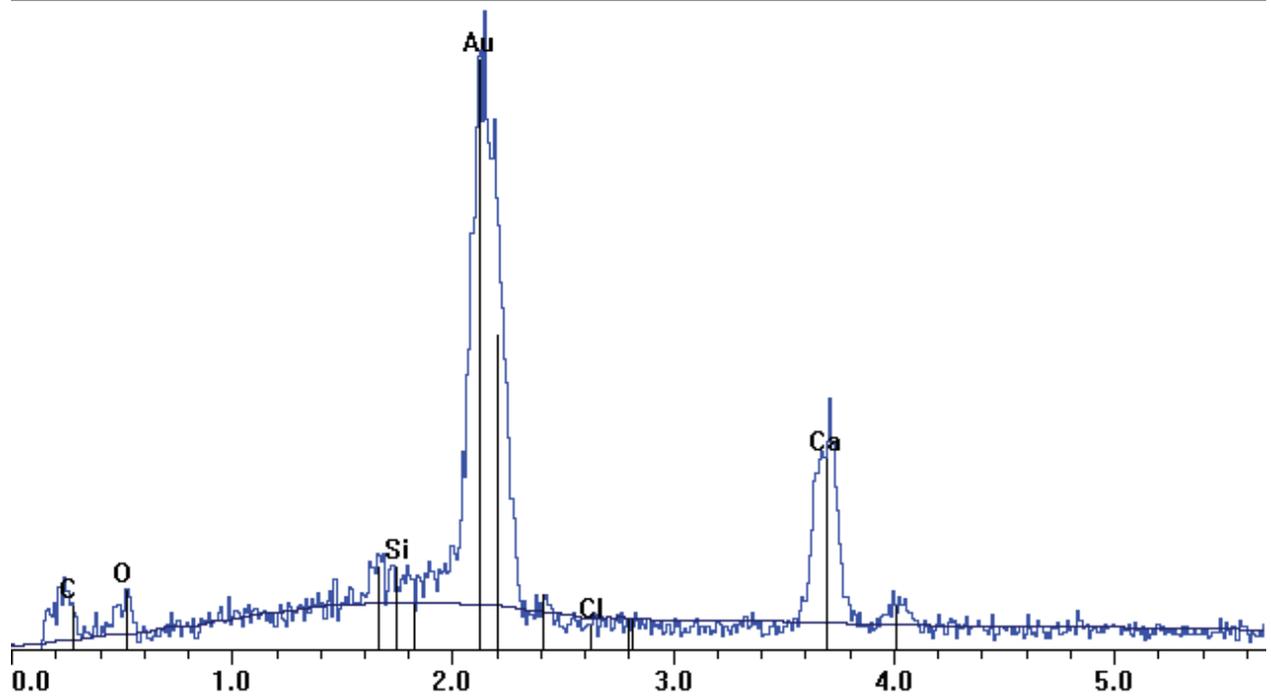
**Micro analyse X de la Fig.5.36 d) : membrane nylon de 60 $\mu$ m constituée de gel de silice séché puis trempée dans du chlorure de calcium avec enzyme et testée sur le captage du CO<sub>2</sub>(g)**



Le point 1 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Calcite:

■ NFA-D-282-01-\_13\_img1\_T001.pgt

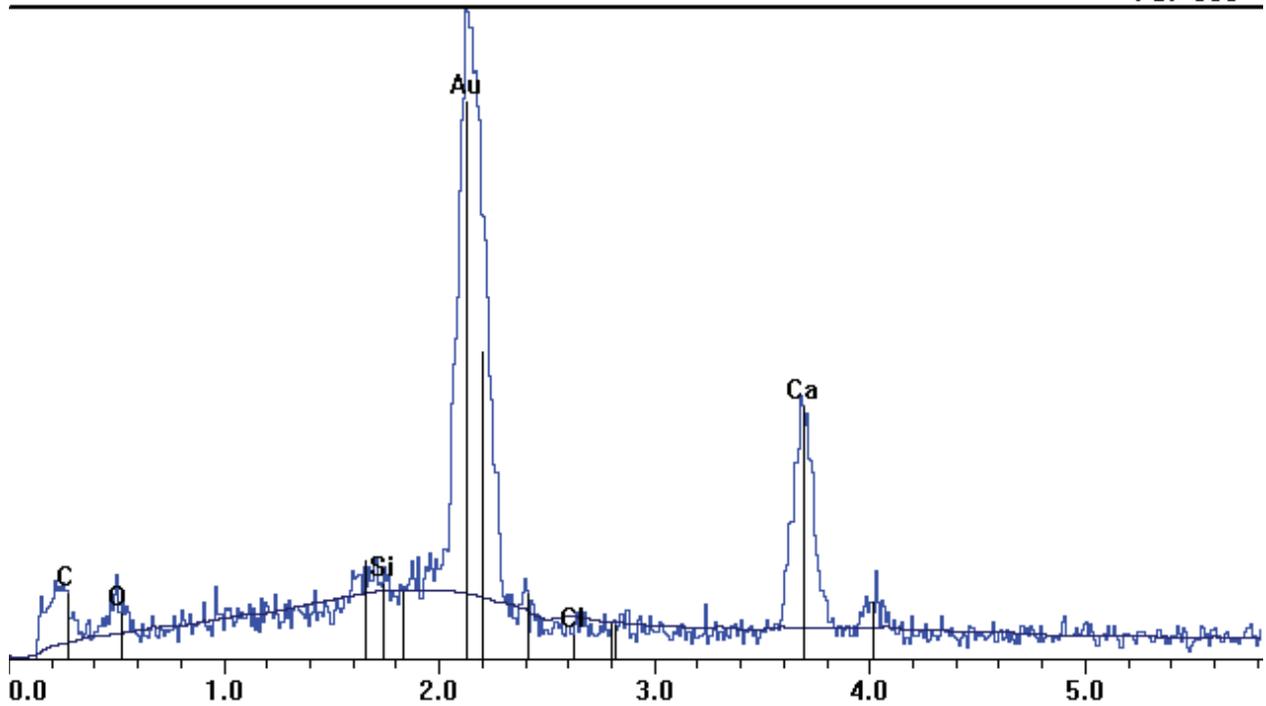
FS: 420



Le point 2 représente du carbonate de calcium, il s'agit de la Calcite:

■ NFA-D-282-01-\_13\_img1\_T002.pgt

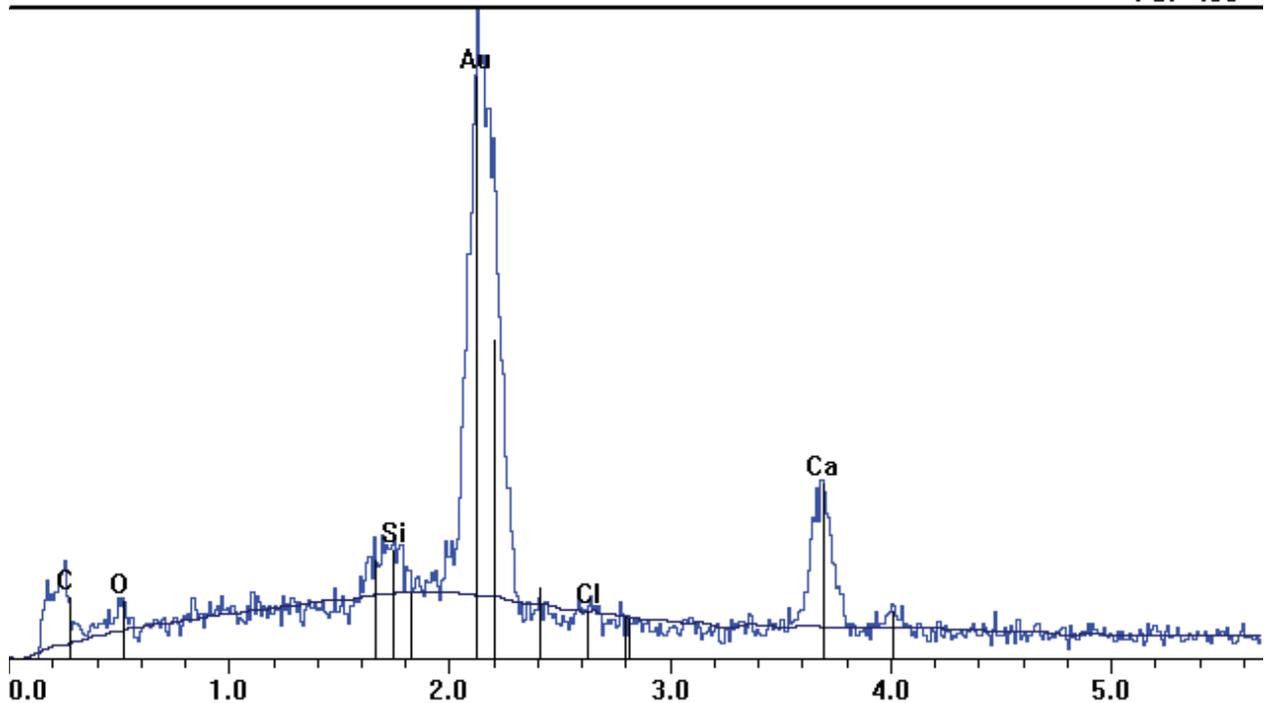
FS: 360



Le point 3 représente de la silice et du carbonate de calcium:

■ NFA-D-282-01-13\_img1\_T003.pgt

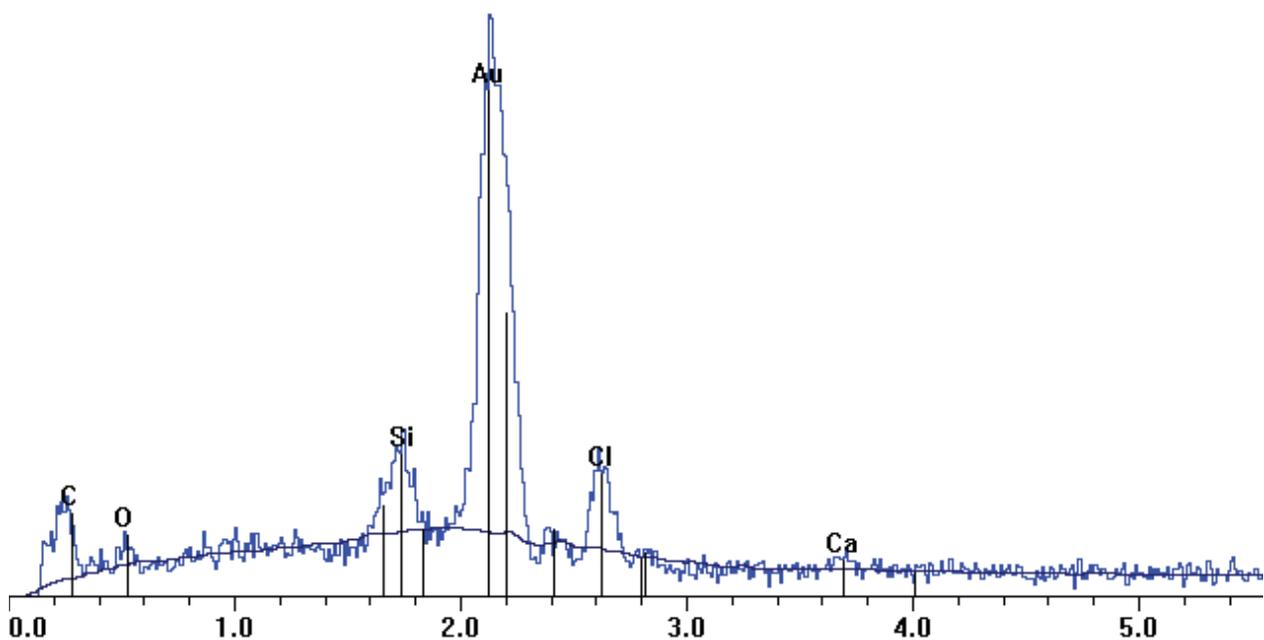
FS: 480



Le point 4 est composé d'un mélange de carbone, de silice, d'oxygène et de chlorure: cela peut être de la silice revêtue de silicate de calcium et un excès de  $\text{CaCl}_2$ .

■ NFA-D-282-01-13\_img1\_T004.pgt

FS: 480



Element	keV	KRatio	Wt%	At%	Net (cps)	P:B Ratio
O	0.523	0.1176	57.19	73.28	2.5	0.4
Au	2.121	0.0000	0.00	0.00	97.6	5.9
C	0.277	0.0000	0.00	0.00	0.0	0.0
Ca	3.691	0.0345	3.99	2.04	2.3	0.3
Cl	2.622	0.2058	24.14	13.96	14.4	1.2
Si	1.740	0.1326	14.68	10.71	13.9	1.0
<b>Total</b>		<b>0.4904</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>		