

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑲

N° 79 16482

⑤④ Procédé pour l'obtention à partir de lactosérum, d'un produit enrichi en alpha-lactalbumine et applications dudit procédé.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.³). A 23 J 1/20; A 61 K 35/20.

②② Date de dépôt..... 26 juin 1979, à 16 h 27 mn.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 3 du 16-1-1981.

⑦① Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, établissement public,
résidant en France.

⑦② Invention de : Loïc Roger, Jean-Louis Maubois, Gérard Brulé et Michel Piot.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Harlé et Léchopiez,
21, rue de La Rochefoucauld, 75009 Paris.

L'invention concerne le domaine du traitement du lactosérum en vue d'en extraire des produits de valeur.

Le lactosérum est un produit bien connu qui est issu de l'industrie fromagère. La composition du lactosérum est
5 approximativement celle d'un lait écrémé, privé de sa caséine. On distingue en général deux types principaux de lactosérum, un lactosérum doux, ou lactosérum de fromagerie, et les lactosé-
rums de type acide, ou lactosérums de caséinerie.

L'addition de présure au lait provoque une synérèse qui
10 conduit à un lactosérum dénommé lactosérum présure. Si l'empré-
surage a lieu au pH du lait ou à un pH légèrement inférieur, par exemple après légère maturation par des levains lactiques, mais au-dessus d'une gamme de 5,8 à 6 environ, le lactosérum prend la dénomination de lactosérum doux. Par ailleurs, l'acidi-
15 fication du lait, soit par addition d'acide minéral, soit par production d'acide lactique (ensemencement du lait par des fer-
ments lactiques) à un pH proche du point isoélectrique des caséines, provoque la floculation de ces dernières. Après séparation du caillé, on obtient le lactosérum de type acide.

20 On définit donc le lactosérum par rapport à la nature de la coagulation du lait. Dans l'industrie fromagère, la plupart des lactosérums sont en fait des lactosérums mixtes où l'un des procédés de coagulation est prédominant par rapport à l'autre. Les lactosérums doux sont issus des fabrications de fromages
25 dits à pâte pressée, cuite ou non (Emmental, Gruyère, Cheddar, Cantal, Saint-Paulin etc...). Les lactosérums acides sont issus principalement des fabrications de pâtes fraîches et des caséi-
neries. On trouve également des variétés intermédiaires provenant de la fabrication de la plupart des pâtes molles et des
30 pâtes persillées. Ainsi, la composition des lactosérums est sou-
mise à de grandes variations qui dépendront principalement du lait d'origine et de la technologie fromagère utilisée.

Les lactosérums possèdent des composants intéressants, notamment la fraction azotée qui est essentiellement constituée
35 par les protéines solubles du lait, lesquelles possèdent une valeur biologique élevée, supérieure à 90%. On peut se référer à ce sujet à l'article de E. FORSUM, HAMBRAEUS L. (1977) -
Nutritional and biochemical studies of whey products, J. of

Dairy Sc. 60 (3)/370-377 . Jusqu'à présent, les trois destinations traditionnelles des lactosérums étaient l'épandage, le rejet en rivière et l'alimentation animale. Mais l'intérêt se porte maintenant vers de nouvelles technologies, impliquant
5 par exemple l'ultrafiltration qui permet de séparer, de concentrer et de purifier sélectivement les composants du lactosérum et de modifier leurs caractéristiques physico-chimiques tout en maintenant et même en améliorant leur qualité nutritionnelle. On recherche donc de plus en plus à l'heure actuelle
10 des techniques de traitement des lactosérums permettant la préparation de produits originaux et variés, susceptibles en particulier de trouver des applications dans l'alimentation. Les techniciens portent un intérêt tout particulier aux protéines contenues dans le lactosérum afin d'obtenir des produits alimentaires variés et capables de répondre à des besoins
15 spécifiques.

De nombreux documents de la technique antérieure illustrent des traitements de lactosérum par ultrafiltration de celui-ci. Dans la technique fromagère, par exemple, il a déjà été
20 proposé d'ultrafiltrer le lactosérum pour produire un rétentat contenant les protéines solubles, ce rétentat étant ensuite réintroduit dans le fromage en cours de fabrication. Mais il existe des procédés d'ultrafiltration du lactosérum qui permettent d'effectuer des séparations différentielles entre
25 ses divers composants. Le procédé de la présente invention se situe dans ce dernier genre de technique.

L'invention a en effet pour objet un procédé permettant d'obtenir, à partir du lactosérum et par une technique d'ultrafiltration, un produit enrichi en α -lactalbumine. Bien
30 qu'en valeur relative, les protéines représentent une faible part de la matière sèche du lactosérum (inférieure à 12%) elles sont l'attrait principal dans la valorisation de ce sous-produit. La fraction protéique, essentiellement constituée par les protéines solubles du lait: β -lactoglobuline, α -lactalbumine, α -
35 sérum albumine et immunoglobulines, est intéressante en raison de sa valeur nutritionnelle et de ses propriétés fonctionnelles.

De nombreux travaux existent pour caractériser les protéines solubles du lactosérum. En ce qui concerne la β -lacto-

globuline on peut par exemple se référer aux travaux de
BRAUNITZER, G. CHEN, R. SCHRANK, B. STANGL A. (1972) Automatic
sequence analysis of a protein (β -lactoglobulin AB). Hoppe
Seyler's Z. Physiol Chem. 353 (5) 832-834. D'une façon
5 résumée, on peut observer que la β -lactoglobuline, en raison de
la présence d'un groupement SH libre, a tendance à polymériser
et à exister sous forme d'un équilibre monomère-dimère-
octamère. La forme dimère prédomine en général dans les
conditions d'ultrafiltration et à une température basse à des
10 pH plus proches du pH isoélectrique (pH 5 environ favorise
l'octamérisation). A pH supérieur à 7,5, l'équilibre se déplace
en faveur de la forme monomère. La conformation de la β -lacto-
globuline est relativement stable au-dessous de pH 7. Mc
Kenzie, H.A. (1971)-Milk proteins; Vols 1 et 2, Academic
15 Press New York, a fait une étude sur les formes et caractéris-
tiques de la β -lactoglobuline. L'effet du pH sur la
conformation de cette protéine a été confirmé (voir par
exemple MIHALYI E. (1972) Application of proteolytic enzymes to
protein structure.

20 Quant à l' α -lactalbumine, on connaît également sa séquen-
ce, voir BREW, K. CAS TELLINO, F.J. VANAMAN, T.C. HILL R.L .
(1973) The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin
J. Biol. Chem. 245, (17) 4570-4582. A l'inverse de la
 β -lactoglobuline, elle ne possède pas de groupe SH libre. Les
25 travaux de LEE, D.N. et MERSON , R.L . (1976) "Prefiltration of
cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration
membranes . J. of Food Sc., 41 403-410, ont montré que la forme
des molécules d' α -lactalbumine peut varier selon le pH. A pH
acide, les molécules ont tendance à s'associer sous forme dimère-
30 re ou trimère. A pH supérieur à 8, on assiste également à une
polymérisation de la protéine.

Comme la β -lactoglobuline, la sérum albumine possède un
SH libre et existe sous forme de monomère et dimère.

35 On sait également que la coagulation du lait est obtenue
par acidification ou par protéolyse de la caséine K. Cette
hydrolyse enzymatique par la présure libre dans le lactosérum
un phosphoglycopeptide appelé le caséinomacropéptide (CMP).
La quantité de CMP dans les lactosérums varie suivant la natu-

re et le temps de coagulation, elle peut atteindre au maximum 1 g/l dans les lactosérums doux.

De nombreuses autres protéines solubles existent dans le lait et le lactosérum. Leur présence en quantités plus faibles que les précédentes font qu'elles sont moins importantes par leur contribution au comportement physico-chimique du concentré protéique de lactosérum que par leur rôle biologique.

La technique la plus ancienne pour extraire les protéines du lactosérum consiste à les insolubiliser par un traitement thermique dénaturant à un pH proche de leur point isoélectrique. Ce procédé, largement répandu, a été récemment revu par ROBINSON B.P. SHORT J.L. MARSCHALL, K.R. (1976) Traditional lactalbumin manufacture, properties and uses, NZ J. Dairy Sc. and Techn. , 11 (2) 114-126. L'inconvénient de cette technique est évidemment l'aspect dénaturant. D'autres procédés de laboratoire essentiellement ont essayé de remédier à cet inconvénient. On a par exemple proposé de réaliser une adsorption des protéines sur échangeur d'ions (WARD, J.B. (1976) Separation Processes in the biochemical Industrial .Process Biochemistry 11(1), 17-20). La technique d'échange d'ions cependant entraîne des difficultés d'automatisation et d'opération en continu, des investissements lourds (volume de résine et d'éluant, concentration des éluats). L'obtention de produits purifiés n'est pas toujours un avantage.

D'autres procédés font appel à des extractions chimiques et ne donnent donc pas complètement satisfaction sur le plan nutritionnel. On a également suggéré des procédés chromatographiques d'échange d'ions (MIRABEL B. (1978) Nouveau procédé d'extraction des protéines du lactosérum. Ann. de la Nutrition et de l'Alim. 32 (2-3), 243-253). On a également utilisé la filtration sur gel, essentiellement au niveau du laboratoire. On peut se référer par exemple aux travaux de LINDQUIST, L.O & WILLIAMS, K.W. (1973)-Aspects of whey processing by gel filtration. Dairy Industries, 38 (10) 459-464, ainsi que ceux de FORSUM, E.; HAMBRAEUS, L. et SIDDIQT, I.H. (1974) Large scale fractionation of whey protein concentrates. J. of Dairy Sc., 57 , (6) , 659-664. Le procédé sur gel présente un certain nombre d'inconvénients. Il exige notamment une préconcentration des protéines qui ne devra pas être dénaturante au risque

d'altérer la résolution entre les différentes fractions. Ces dernières devront ensuite être elles-mêmes concentrées et séchées. Les faibles propriétés mécaniques des gels et le pouvoir colmatant élevé des lactosérums concentrés en raison de la présence de complexes lipoprotéiques ont fait que cette technique est restée très limitée.

L'ultrafiltration sur membrane, étant donné les progrès réalisés tant sur les appareillages que sur leur mode de mise en oeuvre, s'est largement répandue dans l'industrie laitière aussi bien pour le traitement du lait que pour celui du lactosérum (voir par exemple les travaux de MOCQUOT et al (1971) Préparation de fromage à partir de "préfromage liquide" obtenu par ultrafiltration du lait. Le lait, 51,508, 495-533.

Lors du passage du lactosérum sur la membrane d'ultrafiltration, l'eau, les sels minéraux solubles, le lactose, les composés azotés de faible poids moléculaire et les vitamines hydrosolubles traversent la membrane. Le produit traversant la membrane se dénomme ultrafiltrat ou perméat. Par contre, les protéines et les constituants associés (calcium, phosphore) les globules gras et les éléments lipophiles sont retenus et se concentrent au fur et à mesure de l'élimination de la phase aqueuse. Ils constituent le rétentat ou concentré protéique. Les concentrés protéiques obtenus par ultrafiltration peuvent être définis soit par le facteur de concentration, soit par le degré de pureté des protéines. L'obtention de concentrés de pureté élevée nécessite la mise en oeuvre d'ultrafiltration suivie ou accompagnée d'une diafiltration qui consiste en un lavage des concentrés protéiques. Au cours de la diafiltration, le liquide à ultrafiltrer est mis en contact avec la membrane en même temps qu'une solution, par exemple une solution aqueuse. De nombreuses études ont été faites sur la composition de l'ultrafiltrat de lactosérum. Voir par exemple HARGROVE et al (1976) Production and properties of deproteinized whey powders. J. of Dairy Sc., 59 (1) 25-33. HIDDINK et al (1978) Ultrafiltration of condensed a whey. Zuivelzicht 68, (48), 51) 1064-1066; 1126-1127, KIVIENIEMI L. (1974) Microbial growth during the ultrafiltration of sweet whey and skim milk. Kemia-Kemi 12 ; 791-795. La composition des rétentats ou concentrés

protéiques a également été déterminée. (Voir par exemple HORTON, B.S., GOLDSMITH R.L. et ZALL R.R. (1972) Membrane processing of cheese whey reaches commercial scale. Food Technol. 26, 30).

5 Les conditions pratiques de l'ultrafiltration font que celle-ci ne se déroule pas selon les hypothèses idéales. Par exemple, le rétentat d'ultrafiltration présente une teneur résiduelle relativement importante en matière grasse ainsi qu'en éléments minéraux. En outre, les membranes d'ultrafiltra-
10 tion actuelles présentent une certaine dispersion du diamètre de leurs pores. Leur pouvoir de coupure n'est donc pas absolument précis et ne correspond pas à une membrane idéale isoporeuse. En outre, la membrane n'est pas inerte. La température, la pression, le pH peuvent modifier ses caractéristiques
15 physiques, de sorte que le diamètre des pores et l'hydratation de la membrane peuvent varier. Selon la nature chimique de la membrane, des interactions de type ionique ou hydrophobe s'établissent avec les protéines et/ou les minéraux. A ces types de liaisons, il faut ajouter un possible emprisonnement
20 physique des molécules dans les pores de la membrane. Tous ces phénomènes modifient la perméabilité de la membrane aux éléments ultrafiltrables ainsi qu'à l'eau. Enfin, il ne faut pas oublier de souligner l'importance de la formation au niveau de la membrane d'une couche de polarisation également dénommée membra-
25 ne dynamique qui est principalement constituée par des protéines. Sans la maîtrise de ce phénomène, toute amélioration au niveau de la sélectivité des membranes est largement compromise: (Voir MURKES, J. (1978), Quelques opinions sur les applications
industrielles de la technologie des membranes. Journées Euro-
30 péennes de la Filtration. Paris 24, 10.1978). En d'autres termes, l'aptitude d'une membrane à remplir une fonction donnée ne doit pas être appréciée a priori d'une manière idéale mais il faut obligatoirement essayer la membrane dans les conditions d'utilisation car il est impossible de
35 négliger la couche protéique qui se forme au cours de l'ultrafiltration et modifie les transferts des solutés au travers de la membrane, réduisant ainsi les performances de l'appareillage et en particulier du débit de perméation. Il peut même

être observé des modifications qualitatives du rétentat et du perméat. Cette couche joue en effet le rôle d'une seconde membrane et la perméabilité de la membrane totale en cours de fonctionnement dépendra de son épaisseur mais également de
5 la nature de ses constituants.

Pour ce qui concerne l'ultrafiltration du lactosérum, on peut en particulier se reporter aux travaux de Lee D.N. & MERSON, R.L. (1976) Prefiltration of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes. J. of Food Sc.
10 41, 403-410. Ces auteurs ont déterminé un certain nombre de conditions qui permettent de minimiser l'épaisseur et la densité de la couche de polarisation afin d'améliorer la perméabilité de la membrane. Ils ont noté notamment l'influence du pH qui agit sur la solubilité des protéines. Il est donc recommandé
15 d'ajuster le pH pour tenir compte de l'origine du lactosérum. Voir également HAYES J.F., DUNKERLEY, J.A. MULLER, L.L., GRIFFIN ., A.T. (1974) Studies on whey processing by ultrafiltration II. Improving permeation rates by preventing fouling. The Australian J. of Dairy Tech. 37 (3) 132-140. Ces auteurs
20 prévoient un préchauffage du lactosérum, par exemple à 80°C pendant 15", qui aurait pour effet d'améliorer les performances des appareillages. D'une façon générale, il est également connu de prétraiter les lactosérums c'est-à-dire de les traiter thermiquement, notamment par pasteurisation pour éviter les contaminations bactériennes. On sait en effet que le lactosérum contient
25 10 à 20% des bactéries du lait de fabrication. On a donc souvent recommandé un traitement de pasteurisation pour conserver la qualité hygiénique du lactosérum.

Les articles de LEE & MERSON (1976) ainsi que de HAYES
30 précités, auxquels on pourra se référer en cas de besoin, montrent que les conditions de mise en oeuvre de l'ultrafiltration de lactosérums présentent une grande importance pratique.

On connaît également les opérations dites de diafiltration qui consistent à ajouter de l'eau au rétentat et à
35 éliminer simultanément ou successivement une quantité équivalente de perméat. La diafiltration a pour effet d'appauvrir le rétentat en éléments filtrables. Elle peut être soit discontinue, (dilutions puis concentrations successives)

soit continue (l'eau est ajoutée au même débit que le perméat est éliminé). La diafiltration permet en général d'obtenir des concentrés protéiques de pureté accrue.

Les observations de la technique antérieure ont montré
5 que la rétention des protéines solubles de lactosérum par les membranes d'ultrafiltration, telles qu'elles sont classiquement utilisées à l'heure actuelle dans l'industrie, n'est pas totale. La rétention de ces protéines diffère également suivant la nature de celles-ci.

10 C'est ainsi que l' α -lactalbumine peut passer librement au travers des membranes actuellement utilisées grâce à son poids moléculaire faible (14.000-15.000), sa conformation globulaire compacte et son inaptitude à polymériser à l'état non dénaturé en raison de l'absence de groupes SH libres.
15 Cependant, dans les conditions pratiques de la mise en oeuvre de l'ultrafiltration, on constate une rétention partielle de l' α -lactalbumine qui est certainement due à la présence de la couche de polarisation ou membrane dynamique au droit de la membrane réelle. Quant à la β -lactoglobuline dont on constate
20 également la rétention partielle, son passage à travers la membrane se fait sous forme monomère. Les conditions de pH prennent alors une grande importance.

L'invention tire profit de ces observations de l'art
antérieur et propose un procédé qui permet, grâce à la mise en
25 oeuvre d'une technique d'ultrafiltration de lactosérum dans des conditions industrielles, d'obtenir un produit très enrichi en α -lactalbumine, au détriment des autres protéines solubles du lactosérum.

L'invention propose à cet effet un traitement différen-
30 tiel du lactosérum qui permet, après des ultrafiltrations successives, de sélectionner la fraction enrichie en α -lactalbumine. Chacune de ces ultrafiltrations est conduite dans des conditions et avec des membranes bien déterminées.

L'invention a également pour objet le produit directement
35 obtenu par un tel procédé, à savoir une fraction enrichie en α -lactalbumine.

L'invention concerne également les applications d'un tel produit, en particulier dans le domaine alimentaire, comme subs-

tituant ou complément de produits laitiers, notamment à titre d'aliment répondant à des besoins nutritionnels spécifiques par exemple pour la maternisation des laits, pour la réanimation par voie entérale ainsi que pour la nutrition thérapeutique humaine ou animale .

L'invention a pour objet un procédé pour l'obtention, par ultrafiltration du lactosérum, d'un produit enrichi en α -lactalbumine, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on réalise une première ultrafiltration à l'aide de membranes connues dont le seuil de coupure, généralement supérieur à 5 000, est réputé permettre la rétention des protéines du lactosérum, dites protéines solubles, ladite première ultrafiltration étant conduite sur un lactosérum brut, à un pH au moins égal à 6,3 et de préférence de l'ordre de 6,6, en ce qu'on soumet l'ultrafiltrat, séparé lors de la première ultrafiltration, à une seconde ultrafiltration en mettant en contact ledit ultrafiltrat avec une membrane capable de retenir l' α -lactalbumine, de préférence ayant un pouvoir de coupure inférieur à 5000 et avantageusement compris entre 1500 et 2000 environ, et en ce qu'on récupère le rétentat de cette deuxième ultrafiltration, lequel constitue le produit recherché.

Il importe tout d'abord de définir la matière première utilisée par le procédé de l'invention. La nature propre du lactosérum peut être tout à fait quelconque en ce sens que le procédé est aussi bien applicable au traitement du lactosérum doux de fromagerie qu'aux lactosérums acides. Cependant, les produits obtenus dans chaque cas seront différents. Lorsqu'on part de lactosérum doux, on obtient un produit enrichi en α -lactalbumine présentant une faible proportion de β -lactoglobuline et une certaine quantité de CMP. En revanche, si l'on part de lactosérum acide, le produit enrichi en α -lactalbumine ne comporte pratiquement pas de CMP. Ainsi, selon l'origine du lactosérum, le produit issu du procédé peut contenir plus ou moins ou pas du tout de caséinomacropéptide. Il convient de noter que le CMP existe sous deux formes :

-glycosylée: composé de sept fractions différentes selon la nature et le taux des sucres branchés (galactosamine galactose, acide N-acétyl-neuraminique);

-non glycosylée.

Le CMP contient par ailleurs une ou deux phosphosérines, aucun acide aminé aromatique (tryptophane,phénylalanine, tyrosine)et est riche en thréonine,proline,et sérine.

Selon l'invention, il convient d'utiliser un lactosérum, 5 quelle que soit son origine,n'ayant pas subi de traitement thermique préalable,du genre de celui qui est habituellement réalisé dans le cadre d'une pasteurisation. Cette opération a pour but d'éliminer les contaminations bactériennes éventuelles. Dans le 10 cadre du procédé de l'invention,dès que le lactosérum est collecté,il est soumis d'une manière conventionnelle à une opération d'écémage qui a pour but d'éliminer la matière grasse encore présente dans le lactosérum brut,après quoi il peut être directement soumis à la première ultrafiltration. On peut également le conserver pendant un temps convenable à une température 15 basse,par exemple de l'ordre de 0 à 4°C,tout en évitant cependant la cristallisation du lactose. Bien entendu,pendant la première ultrafiltration,le lactosérum pourra subir une élévation de température de manière à augmenter le rendement. Par exemple,la température convenable peut être de l'ordre de 30 à 60°C,de 20 préférence de l'ordre de 45°C. Mais l'ultrafiltration peut également être conduite à la température ambiante. Il importe surtout que,avant ou pendant l'ultrafiltration,le lactosérum ne soit pas soumis à une élévation de température aussi élevée que celle impliquée dans un traitement classique de pasteurisa- 25 tion.

Une autre condition importante concernant la mise en oeuvre de la première ultrafiltration est relative au pH du lactosérum. Selon l'invention,en effet,il convient d'ajuster le pH du lactosérum brut à une valeur légèrement inférieure à 30 7, quoiqu'au moins égale à 6,3 et de préférence de l'ordre de 6,6. Compte tenu des caractéristiques des lactosérums habituels,cet ajustement se fait commodément par addition de composés à réaction basique. En principe,on peut utiliser n'importe quelle base ,telle que l'hydroxyde de sodium, 35 l'hydroxyde de potassium,le carbonate de sodium,le carbonate de potassium,l'hydroxyde de calcium,l'hydroxyde d'ammonium et autres composés basiques analogues.

On donne la préférence à l'hydroxyde de potassium, compte tenu des applications futures des produits dans le

domaine alimentaire.

Par ailleurs, la première ultrafiltration est réalisée dans des conditions parfaitement connues. On peut utiliser n'importe quel équipement déjà disponible, par exemple des
5 modules d'ultrafiltration à plaques, à faisceaux ou à tubes. Les membranes semi-perméables utilisables sont celles déjà connues pour permettre la rétention des protéines solubles. En général, ces membranes ont un pouvoir de coupure supérieur à 5000, par exemple de l'ordre de 50 000. La nature
10 de ces membranes est quelconque. Il peut s'agir aussi bien de membranes inorganiques qu'organiques. A titre de membranes organiques, on peut utiliser n'importe quel substrat poreux répondant aux définitions ci-dessus. Toutes ces notions sont bien connues de l'homme de l'art dans le domaine de l'ultrafil-
15 tration du lait ou du lactosérum et n'ont donc pas besoin d'être explicitées davantage.

Dans les conditions de mise en oeuvre de la première ultrafiltration, la membrane se comporte comme une membrane n'impliquant pas de rétention d' α -lactalbumine et laissant donc
20 libre passage à cette dernière. A l'issue de l'ultrafiltration, on obtient donc, à titre d'ultrafiltrat, une solution enrichie en α -lactalbumine. En effet, dans une telle solution, le rapport β -lactoglobuline/ α -lactalbumine est inversé par rapport au lactosérum de départ. En outre, l'ultrafiltrat ne comporte pas de
25 protéine dont le poids moléculaire est supérieur à 20 000 environ.

Ainsi qu'on l'a mentionné précédemment, la première ultrafiltration est conduite de manière connue. Au besoin, il est possible de recourir à un essai préalable pour déterminer si
30 une membrane précise convient aux besoins de cette étape, compte-tenu de son comportement dynamique.

Conformément à l'invention, l'ultrafiltrat séparé lors de la première ultrafiltration est soumis à une seconde ultrafiltration dans laquelle on utilise une membrane capable de
35 retenir l' α -lactalbumine. En règle générale, une telle membrane possède un pouvoir de coupure inférieur à 5000 et de préférence compris entre 1500 et 2000 environ. La nature chimique et/ou physique de la membrane importe peu dès lors qu'elle

répond à la condition de rétention de l' α -lactalbumine dans les conditions de mise en oeuvre du procédé. De même que pour la première ultrafiltration, on peut utiliser n'importe quel équipement d'ultrafiltration disponible. La plupart du temps, il est avantageux de réaliser une diafiltration plutôt qu'une ultrafiltration, c'est-à-dire qu'on conduit l'ultrafiltration en ajoutant à l'ultrafiltrat issu de la première ultrafiltration, en continu ou en discontinu, une solution aqueuse ou de l'eau pure ou une solution aqueuse contenant des sels minéraux, en amont de la membrane utilisée dans la deuxième ultrafiltration.

La deuxième ultrafiltration conduit d'une part à un ultrafiltrat consistant en un jus lactosé, et en un rétentat qui constitue le produit recherché selon l'invention et qui consiste en une solution enrichie en α -lactalbumine. L'invention est illustrée par la figure 1 du dessin annexé qui montre schématiquement les étapes du procédé.

Les produits obtenus par le procédé selon l'invention sont utiles dans l'alimentation, en particulier l'alimentation humaine. On sait en effet que le lait humain contient approximativement 40% de caséine et 60% de protéines solubles, mais parmi celles-ci ne figure pas de β -lactoglobuline. Pour reconstituer un lait se rapprochant le plus possible du lait humain, il convient donc de disposer de produits laitiers ne comportant pas de β -lactoglobuline, tout en répondant par ailleurs aux compositions du lait maternel. Les produits de l'invention répondent à un tel besoin et conviennent donc à ce qu'il est connu d'appeler la maternisation du lait. Par ailleurs, il peut être utile de disposer pour des besoins précis de la nutrition d'un produit enrichi en α -lactalbumine, protéine qui a la particularité de présenter une richesse élevée en tryptophane. Dans de telles applications alimentaires, le produit de l'invention peut être mis en oeuvre à titre de complément ou de substituant d'aliments pour l'homme ou pour l'animal.

Les produits de l'invention peuvent encore recevoir de nombreuses applications en raison de leurs caractéristiques particulières. Il s'agit en effet de produits riches en tryptophane qui peuvent être utilisés comme aliments à des fins

diététiques et thérapeutiques.

En particulier, il s'agit de produits dans lesquels le rapport du tryptophane aux acides aminés dits neutres (tyrosine + phénylalanine + leucine + isoleucine + valine) est élevé, notamment supérieur ou égal à 0,06. Le rapport tyrosine / tryptophane est corrélativement bas, notamment inférieur à 2,5, et il peut atteindre des valeurs voisines de 1.

Les produits de l'invention sont donc utilisables comme produits diététiques destinés à l'homme ou à l'animal. Ils peuvent également servir de produits ou aliments de réanimation chez des malades nécessitant un apport protéique spécifique. Ces produits répondent à des besoins nutritionnels en cas par exemple de mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas, d'insuffisance rénale, ou pour des malades présentant une atteinte infectieuse ou inflammatoire de la paroi intestinale, ainsi qu'en cas de destruction tissulaire importante après des traumatismes sévères et des brûlures.

Les produits de l'invention peuvent également recevoir des applications dans la nutrition thérapeutique chez l'homme et l'animal. Des travaux antérieurs [voir en particulier les articles de R.J. Wurtmann et J.D. Fernstrom dans Nutrition Reviews n°7 Vol.32 Juillet 19'4 p.193-200 ainsi que dans The American Journal of Clinical Nutrition 28, Juin 19'5 p.638-647] ont montré que le tryptophane est un précurseur de la sérotonine, laquelle est un inhibiteur de la faim. A l'inverse, la dopamine et la norépinéphrine sont des médiateurs de la faim. L'élévation du taux de tryptophane augmente la satiété. Les produits de l'invention peuvent donc être utilisés, chez l'homme ou l'animal, en vue de la nutrition thérapeutique, notamment pour le traitement de l'obésité, pour mettre à profit leur effet anorexigène ou pour la régulation du comportement alimentaire. En outre, les produits de l'invention peuvent être appliqués pour améliorer l'efficacité médicamenteuse de médicaments permettant, chez l'homme ou l'animal, d'augmenter la production des amines neurotransmettrices, à savoir la sérotonine d'une part et la dopamine et la norépinéphrine d'autre part. A titre d'exemple, l'effet des tranquillisants peut être augmenté au cours du transport des animaux ayant reçu un produit de l'invention.

Compte -tenu de la forme physique des nouveaux produits (poudre soluble en milieu aqueux) la forme de présentation ne soulève pas de difficulté. Les nouveaux produits peuvent être administrés en tant que tels par voie entérale, par

5 exemple en mélange avec l'aliment habituel.

Des doses de 0,1 à 2g/kg par jour sont convenables.

L'invention sera maintenant illustrée sans être aucunement limitée en référence aux exemples ci-après.

EXEMPLE 1-

10 Dans cet exemple, on a utilisé comme matière de départ un lactosérum de type présure. Ce lactosérum a été obtenu par coagulation de lait écrémé, thermisé (72°C-15 s), non refroidi, par 30 ml de présure Boll (10^{-4}) puis filtration.

Après conservation 18 heures à 4°C, ce lactosérum a
15 été ultrafiltré à 45°C sur module DC 10, membrane XM 50 (1,4 m²), de la Société ROMICON. Les membranes XM 50 sont données par le fabricant comme comportant un pouvoir de coupure voisin de 50 000. Le module DC 10 utilise des membranes du type fibres creuses, réparties en faisceaux tubulaires. On a récupéré
20 le perméat d'ultrafiltration et on a suivi sa composition au cours du temps. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1 qui suit:

TABLEAU 1

	NPN g/l	NT g/l	NPN/N _T	NT/ES
25 UF ₀	0,237	2,1	0,72	3,1%
UF _{1H}	0,250	2,6	0,62	
UF _{2H}	0,262	3,0	0,56	
UF _{3H}	0,255	2,9	0,57	
UF _{4H30}	0,259	2,5	0,47	
UF _{5H50}	0,243	3,9	0,40	6,1%

30 L'ultrafiltrat obtenu dans la première ultrafiltration sur membrane XM 50 a été repris et de nouveau ultrafiltré sur membrane AM₂ à 15°C, en utilisant également un module DC 10 de ROMICON. La surface de membrane était égale à 1,4 m².

et la membrane était du type fibres creuses. La membrane AM₂ comporte un pouvoir de coupure de l'ordre de 2000. L'évolution de la composition du rétentat au cours de cette deuxième ultrafiltration est rapportée dans le tableau 2 suivant.

TABLEAU 2

	Rétentat		Perméat	
	Prot.	NPN 6,38	N _T	E.S. g/l
A ₀	3,1	1,5	1,6	57,0
A ₂₂	4,5	1,7	1,6	
A ₄₂	5,3	1,7	1,7	
A ₆₂	7,1	1,8	1,7	
A ₈₂	8,0	1,9	1,7	60,3
A _F	12,4	2,1	1,7	60,7

On a procédé à l'analyse du rétentat final afin de le caractériser. A cet effet, on a opéré une filtration sur gel G75 en milieu tampon phosphate (pH 7,0) sur une colonne de 2 m x 0,02 à un débit de 15 ml/h). On a effectué le dosage sur l'éluent de l'acide neuraminique, la mesure de la densité optique à 280 nm et le dosage à la ninhydrine à 570 nm. Les résultats sont illustrés par la figure 2. On y distingue trois pics principaux.

1. DO₂₈₀ faible/NH₂ 570 NaNa élevé
2. DO₂₈₀ faible/ NH₂ 570
3. DO₂₈₀ élevé/NH₂ 570

L'analyse de l'échantillon total en électrophorèse et des différents pics permet d'affirmer que le rétentat est constitué d'un mélange d' α -lactalbumine, de β -lactoglobuline et de CMP glycosylé ou non.

Afin d'en déterminer les teneurs respectives, on a encore pratiqué des dosages de l'N soluble à différentes teneurs en acide trichloracétique [voir Fox K. et cal (1967) Separation of β -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid, Journal of Dairy Science vol.50 n°9 p.1363-1367].

On sait alors que:

à 2%: restent solubles 75% environ de la β -lactoglobuline, la totalité du CMP, un reliquat d' α -lactalbumine - N soluble (peptides + acides aminés libres).

à 4%: restent solubles 50% environ de la β -lactoglobuline, la totalité du CMP, un reliquat d' α -lactalbumine-N-soluble (peptides + acides aminés libres).

à 6%: reste soluble le CMP total-N soluble.

à 12%: reste soluble le CMP glycosylé - N soluble.

Résultats :

	2%	4%	6%	12%
ppm d'N	262	224	183	119

5 Le produit répond à la composition pondérale
approximative ci-après :

lactalbumine	: 47%
lactoglobuline	: 20%
CMP	: 25%
soluble	: 8%

10 A partir des chiffres ci-dessus et de la composition
en acides aminés de chacun des constituants, on a déterminé
l'aminogramme théorique qui a été comparé à l'aminogramme
réel.

On a trouvé un coefficient de corrélation de 0,96.
En écartant l'acide glutamique et la proline dont on sait
15 qu'ils sont les principaux acides aminés de la phase soluble
du perméat d'U.F. (Hargrove et al. 1976, J. Dairy Science
59, 25-33) le coefficient devient 0,986, ce qui ^{est} en bon accord
avec la réalité.

20 Il est intéressant de noter, de par la présence de
l'α-lactalbumine, la richesse en tryptophane (près de deux
fois supérieure à la teneur normale du concentré initial).

	Modèle théorique (-soluble)	Aminogramme
Ile	6,8	6,8
Leu	8,9	8,2
Hys	8,7	8,8
25 Met	1,6	1,6
Cyst	3,7	2,4
Phe	2,8	3,1
Tyr	3,3	3,3
Thr	7,8	7,0
30 Trp	3,4	3,3
Val	5,3	5,8
Ars	1,1	1,6
His	1,7	1,9
Ala	3	3,7
35 Asp	11,5	11,2
Glu	13,9	18,1
Gly	2,0	2,3
Pro	4,7	6,1
Ser	5,0	4,7

Le produit est par ailleurs très soluble et présente un goût agréable sucré, goût qui peut être causé par la présence des CMP glycosylés.

EXEMPLE 2

5 Dans cet exemple on a traité du lactosérum lactique. Le lactosérum issu d'une coagulation lactique ne présente pas de CMP .

La coagulation du lait a été obtenue par addition d'acide lactique jusqu'à pH 4,6 . Après élimination du caillé,
10 le pH a été ajusté à pH 6,6 par addition d'hydroxyde de potassium. Du citrate trisodique 2/1000 a été ajouté pour éviter les problèmes de colmatage des membranes par les sels de calcium . Préalablement à l'ultrafiltration, le lactosérum acide a été soumis à une centrifugation à 1000 g pendant 15
15 minutes .

On a ensuite opéré l'ultrafiltration à 25°C sur module DC 10 avec des membranes XM 50 (voir exemple 1). Les compositions du perméat et du rétentat au cours de cette ultrafiltration sont indiquées dans le tableau 3.

20 L'ultrafiltrat précédemment obtenu a été ensuite de nouveau ultrafiltré sur membrane AM₂ avec un module DC 10 de Romicon , la température d'ultrafiltration étant égale à 15°C . La composition du rétentat et du perméat est indiquée dans le tableau 4.

Le rétentat de cette deuxième ultrafiltration, qui
25 constitue le produit recherché, répond donc à la composition pondérale approximative suivante:

β lactoglobuline	37%
⊗ lactalbumine	56%
Azote soluble 12%	7%

30 Une filtration sur gel réalisée dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 1 mais sur une colonne de 1 mètre contenant du gel G 75 fait apparaître nettement le pic 1 correspondant à l'⊗ lactalbumine et le pic 2 à la β lactoglobuline . La figure 3 des dessins annexés correspond à ce cas.

L'aminogramme théorique de cette solution protéique

serait:

	Ile	6,4	Val	4,9
	Leu	12,2	Arg	1,7
5	Lys	10,2	His	2,2
	Met	1,7	Ala	3,8
	Cys	4,8	Asp	14,7
	Phe	3,8	Glu	14,4
	Tyr	4,4	Gly	23
10	Thr	4,9	Pro	2,7
	Trp	4,4	Ser	4,2

EXEMPLE 3-

Cet exemple concerne la préparation de lait maternisé.

Un produit répondant à ce besoin possède la composition suivante:

15	-Protéines	1,65 g
	dont 0,82 g produit de l'exemple 1 ou 2	
	ci-dessus	
	dont 0,83 g de protéines totales de lait	
	-Lipides	3,5 g
20	dont huile végétale riche en acides	
	gras ou acides polyinsaturés: 1 g	
	-Glucides:	
	lactose	7,5 g
	-Vitamines	
25	A, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ PP	selon les recommanda-
	panthoténate de calcium, acide folique,	tions de l'ESPGAN [*]
	C, Biotine, K	Committee on Nutrition
	-Eléments minéraux	"Guidelines on infant
	fer, sodium, calcium, potassium,	nutrition" 1974
30	magnésium, manganèse, phosphore,	selon les recommanda-
	chlore, cuivre, zinc	tions de l'ESPGAN
		Committee on Nutrition
		"Guidelines on infant
		nutrition", 1974

EXEMPLE 4-

Cet exemple concerne un produit de réanimation utilisable par voie entérale chez des malades nécessitant un apport protéique de l'ordre de 7 à 12% de l'Apport Calorique Total.

Un tel produit répond à des besoins nutritionnels en cas de mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas, d'insuffisance

* European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition.

rénale ainsi que pour des malades présentant une atteinte infectieuse ou inflammatoire de la paroi intestinale. Ces protéines sont amenées de préférence sous forme pré-digérée.

Une composition centésimale appropriée est la suivante:

5	Protéines		2,50g
	dont 50% protéines totales de lait		
	50% produit de l'invention		
	<u>-lipides:</u>		
	mélange à parties égales de:		
10	-huile de beurre	0,5 g	} 4,10 g
	-T.C.M.	0,5 g	
	-huile de maïs	0,5 g	
	-huile de tournesol	0,5 g	
	monostéarate de glycérol	2,1 g	
15	<u>-glucides</u>		
	-polymères de glucose	10 g	} 13,00 g
	-glucose	1,5 g	
	-galactose	1,5 g	
	<u>-vitamines</u>		
20	A, D, E, B ₁ , B ₂ , PP, B ₅ , B ₆ B ₁₂ , acide folique, biotine Vit. C		} selon les recommandations FAO/OMS 0,455 g
	<u>-éléments minéraux</u>		
	(calcium, sodium, potassium, magnésium, phosphore, zinc, fer, cuivre manganèse, chlore, iode)		
25	<u>-eau distillée</u>		q.s.p. 100

EXEMPLE 5

Cet exemple concerne un produit de réanimation utilisable par voie entérale chez des malades nécessitant un apport protéique de l'ordre de 25% de l'apport calorique total, sous forme prédigérée et un apport lipidique faible. Il peut en être ainsi en cas de destruction tissulaire importante après grands traumatismes, et de brûlures.

Une composition centésimale appropriée est la suivante :

35	<u>-protéines</u>	
	dont 50% protéines de viande (viande de boeuf parée et dégraissée)	8 g
	50% produit de l'invention	

	<u>-Lipides:</u>		
	-T.C.M.	1,40 g	} 2,90 g
	-huile très		
	riche en		
5	acides gras		
	essentiels	1,40 g	
	-émulsifiant	0,10 g	
	<u>-glucides:</u>		
10	-petits poly-		} 18,7 g
	mères de	12,7 g	
	glucose		
	-glucose	3 g	
	-galactose	3 g	
15	<u>-vitamines</u>		
	-A,D,E,B ₁ ,B ₂ ,PP, B ₅ , B ₆		selon les recommandations FAO/OMS
	B ₁₂ ,acide folique,biotine		
	Vitamine C		
	<u>-éléments minéraux</u>		
20	-(calcium,sodium,potassium,magnésium,phosphore,zinc,fer cuivre,manganèse,chlore,iode)		0,455 g
	<u>-eau distillée</u>		q.s.p. 100

TABLEAU 3

RETENTAT		PERMEAT				
N _T g/l	NPN 12% ppm	N _T	NPN 12%	NPN 2%	ES	NPN 12% / N _T
0	7,7	2,0	294	220	58,1	70,2
1						
2			224			
3	16,3	2,7	249			59,0
4			242			
5	23,6	3,2	241	326		48,3
6			243			
7			245			50
8	24,8	3,1	247	333		52,7
9			254			
10	25,8		256			
Ret.fin 21.2			262	314		
			249	305	63,9	

Perméat moyen 3,1

A partir des valeurs TCA_{2%} et TCA_{12%}, la composition moyenne du perméat en ultra-filtrat est la suivante:

N 450 ppm se répartissant en :	60 ppm	β lactoglobuline	13,3%
	250 ppm	N soluble	55 %
	140 ppm	α lactalbumine	31 %

TABLEAU 4

	RETENTAT				PERMEAT				
	N _T g/l	NPN 2% ppm	NPN 12% ppm	ES g/l	N _T N/ES	N	NPN 12 ppm	NPN/N	N/ES
0	3,1	305	249	63,9	4,8	1,40	198,4	88	2,7
1									
2	4,5								
3	5,5		265	69,6	7,8	1,80			
4	6,8								
5	9,1		269	73,8	12,4	1,9			
6	9,7								
D									
7	12,4		203,1	54,3	22,9	1,4			
8	12,2								
9	12,8	873	121	32,1	39,8	0,61	96	100	2,7
*Ret.	15,9		132	35,3	45				

* Rétenant final après concentration.

-REVENDICATIONS-

1. Procédé pour l'obtention, par ultrafiltration du lactosérum, d'un produit enrichi en α -lactalbumine, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'on réalise une première ultrafiltration à l'aide de membranes connues dont le seuil
5 de coupure, généralement supérieur à 5.000, est réputé permettre la rétention des protéines du lactosérum, dites protéines solubles, ladite première ultrafiltration étant conduite sur un lactosérum brut, à un pH au moins égal à 6,3, en ce qu'on soumet l'ultrafiltrat, séparé lors de la première ultrafiltration,
10 à une seconde ultrafiltration en mettant en contact ledit ultrafiltrat avec une membrane capable de retenir l' α -lactalbumine, de préférence ayant un pouvoir de coupure inférieur à 5000 et avantageusement compris entre 1500 et 2000 environ, et en ce qu'on récupère le rétentat de cette deuxième ultrafiltration,
15 lequel constitue le produit recherché.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on utilise un lactosérum n'ayant pas subi un traitement thermique préalable, du genre pasteurisation.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on ajuste le pH du lactosérum à une valeur
20 légèrement inférieure à 7, et au moins égale à 6,3, de préférence de l'ordre de 6,6.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le réglage du pH se fait par addition au lactosérum de
25 composés à réaction basique, tels que l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, le carbonate de sodium, le carbonate de potassium, l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde d'ammonium et autres composés basiques analogues, l'hydroxyde de potassium étant préféré.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la première ultrafiltration est conduite à une température de 30° à 60°C, par exemple de l'ordre de 45°C, sur des membranes ayant un pouvoir de coupure supérieur à 5000, en particulier de l'ordre de 50.000.
30

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on soumet l'ultrafiltrat séparé lors de
35

la première ultrafiltration à une seconde ultrafiltration, à l'aide d'une membrane capable de retenir l' α -lactalbumine, la dite membrane ayant un pouvoir de coupure inférieur à 5000, et de préférence compris entre 1500 et 2000 environ, et à une

5 température voisine de la température ambiante ou légèrement inférieure, par exemple de l'ordre de 15°C.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la deuxième ultrafiltration est une diafiltration, au cours de laquelle on ajoute, en continu ou en discontinu, à l'ultra-

10 filtrat issu de la première ultrafiltration, une solution aqueuse contenant des sels minéraux ou de l'eau pure en amont de la membrane mise en oeuvre dans ladite deuxième ultrafiltration.

8. Produits obtenus par le procédé selon l'une quelcon-

15 que des revendications 1 à 7.

9. Produit selon la revendication 8, obtenu à partir d'un lactosérum doux, enrichi en α -lactalbumine, présentant une faible proportion de β -lactoglobuline et une certaine quantité de CMP.

20 10. Produit, caractérisé en ce qu'il répond à la composition pondérale approximative ci-après:

α -lactalbumine	47%
β -lactoglobuline	20%
CMP	25%
25 soluble	8%

11. Produit selon la revendication 8, obtenu à partir de lactosérum acide, enrichi en α -lactalbumine, et ne comportant pratiquement pas de CMP.

12. Produit, caractérisé en ce qu'il répond à la

30 composition pondérale approximative suivante:

α -lactalbumine	56%
β -lactoglobuline	37%
soluble	7%

13. Application des produits selon l'une quelconque des

35 revendications 8 à 12, à titre de substituants ou de compléments de produits laitiers, en vue de l'alimentation humaine ou animale.

14. Application selon la revendication 13 à la maternisation du lait et à l'obtention de produits alimentaires riches en tryptophane.

5 15. Application des produits selon l'une quelconque des revendications 8 à 12 à la réanimation par voie entérale et à la nutrition thérapeutique humaine ou animale.



