

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 09740

(54)

Procédé d'extraction de lactoferrine et d'immunoglobulines du lait.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). A 23 J 1/20; A 61 K 37/14, 39/395.

(22)

Date de dépôt..... 15 mai 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 46 du 19-11-1982.

(71)

Déposant : Société anonyme dite : SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE, résidant en
France.

(72)

Invention de : André Peyrouset et François Spring.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Armand Kohn,
5, av. Foch, 92380 Garches.

La présente invention a pour objet un procédé perfectionné pour l'extraction de certaines protéines de produits laitiers ; elle vise plus spécialement l'obtention des protéines fixant le fer, transferrine et
5 lactoferrine, ainsi que des immunoglobulines.

L'intérêt des différentes protéines, autres que la caséine, que l'on trouve dans le lait des mammifères, a attiré l'attention de nombreux industriels et chercheurs. Aussi des travaux ont été effectués en vue de la sépara-
10 tion de ces différentes protéines, plus particulièrement de celles qui se retrouvent dans le petit lait, c'est-à-dire dans le lacto-serum, après la séparation des caséines. Parmi les substances fort intéressantes, appartenant à cette catégorie, se trouvent les α -lactalbumine, trans-
15 ferrine, lactoferrine, lysozyme, serum-albumine, immunoglobulines, etc. La lactoferrine présente non seulement un intérêt nutritionnel, mais également pharmacologique ; on sait en effet, à présent, que cette protéine qui fixe le fer est non seulement d'une grande utilité alimentaire
20 pour le nourrisson, mais constitue également un véritable protecteur contre différentes infections bactériennes. Ce dernier rôle est expliqué justement par l'action chélatante de cette protéine vis-à-vis du fer, qui soustrait cet élément au milieu, empêchant ainsi le développement des
25 bactéries auxquelles cet élément est absolument nécessaire. Cette propriété bactériostatique présente évidemment un avantage important. En ce qui concerne les immunoglobulines IgA, IgM, IgG, leur importance augmente chaque jour avec le développement prodigieux de l'immunologie. On con-
30 naît d'autre part l'utilité et les applications des lactalbumines, de la sérum-albumine, du lysozyme et de certaines autres protéines et également des protéines fixant la vitamine B12 ou la céruloplasmine qui a la propriété de se combiner au cuivre. On comprend donc que des travaux aient
35 été menés en vue de la séparation de ces différentes pro-

téines à partir des produits laitiers et surtout à partir du petit lait qui les contient à l'état dissous et qui généralement constitue un résidu dans l'industrie laitière. La plupart des procédés utilisés sont basés sur l'application des échangeurs d'ions ou sur la chromatographie sur Sephadex, à des pH ne dépassant pas 7 et, le plus souvent, inférieurs à 6,3. Telle est par exemple la méthode préconisée dans les brevets U.S. n° 3 234 199 ou 3 969 337. On a également eu recours à l'électrophorèse ou à la précipitation par des sels et centrifugation, cette dernière méthode étant décrite par Montreuil et Mullet C.R. 250, 1736-7 (1960). Plus récemment des travaux sur la séparation des protéines du lait ont été décrits dans les publications de brevets français n° 2 390 906 et 2 399 214 où les protéines, autres que la caséine, sont d'abord extraites avec une résine échangeuse d'anions et ensuite avec de la silice, ou inversement ; l'extraction a lieu à des pH compris entre 4 et 7,5.

Si les différents procédés de la technique connue conviennent bien à la séparation de protéines telles que les lactalbumines ou la sérum-albumine, aucune d'elles ne permet l'obtention efficace et pratique des protéines fixant le fer, c'est-à-dire des transferrines et lactoferrines. Bien que le lacto serum soit une matière peu coûteuse, il ne contient qu'environ 6,5 g de protéines par litre, dont une faible proportion est constituée par les lactoferrines : on est donc amené à traiter d'assez grands volumes de cette matière première pour extraire un faible poids de protéines intéressantes. Il est par conséquent important de disposer d'un procédé permettant de réaliser cette extraction avec d'aussi bons rendements que possible. C'est ce but qui est atteint par la présente invention. En effet, le nouveau procédé suivant l'invention convient tout particulièrement à l'obtention des protéines ferro chélatantes, notamment lactoferrine et transferrine et, d'autre

part, des immunoglobulines, à partir du serum de lait restant après la séparation des caséines.

Dans la suite de la présente description, par mesure de simplification, on ne parle que de la lactoferrine, mais il est bien entendu que ce terme comprend aussi la transferrine et éventuellement d'autres protéines ferrochélatantes du même type qui peuvent exister dans les laits des différents mammifères.

Le procédé suivant l'invention résulte de la constatation que - contrairement à la technique antérieure - la séparation par l'adsorption des protéines sus-indiquées se fait le mieux en milieu légèrement basique.

Le procédé suivant l'invention consiste à soumettre le milieu renfermant la lactoferrine à la fixation sur un adsorbant approprié, en milieu faiblement basique, à savoir dans un liquide de pH supérieur à 7,5. De préférence, le pH du milieu est compris entre 7,7 et 8,8 et mieux encore entre 7,9 et 8,5.

Le milieu à traiter suivant l'invention peut être constitué par tout liquide aqueux renfermant les différentes protéines du lait, débarrassé au moins de la majeure partie des caséines ; la source la plus pratique est le petit lait, éventuellement concentré ou déjà traité pour l'extraction de protéines autres que la lactoferrine.

Après l'adsorption en milieu faiblement basique, et élimination du liquide surnageant, les protéines fixées sur l'adsorbant sont éluées par abaissement du pH au-dessous de 7 et, de préférence, environ 4 ; un mode opératoire préféré consiste à utiliser un éluant acide dont la force ionique a été augmentée par adjonction d'un sel soluble.

En tant qu'adsorbant, on peut employer avantageusement une silice de surface spécifique d'environ 5 à 150 m²/g, présentant un diamètre poreux de 25 à 250 nm (250 à 2 500 Å). La silice peut être employée sous une forme pul-

véruiente, de granulométrie assez large, par exemple de 5 μ m à 5 mm. Pour l'utilisation en colonne, il est préférable de se servir de billes sphériques de diamètres de l'ordre de 10 à 500 μ m.

5 Bien que la silice constitue un excellent support pour la fixation préférentielle de la lactoferrine, d'autres supports peuvent être employés, notamment différents silicates naturels ou artificiels, tels que pierre ponce, terres diatomées, bentonite, etc., ainsi que des

10 alumines activées.

La fixation en milieu faiblement basique présente l'avantage d'une grande sélectivité vis-à-vis de la lactoferrine qui n'est accompagnée que d'une partie d'immunoglobulines. Les autres protéines, notamment lactalbumines, 15 lactoglobulines, serum albumine et le reste des immunoglobulines demeurent en solution dans le liquide surnageant.

Après la récupération de la lactoferrine et des immunoglobulines, le support - en particulier la silice - est remis en contact avec une solution légèrement basique, 20 par exemple de pH 8 à 9, ce qui le rend apte à servir à une nouvelle extraction à partir d'un produit laitier. On voit que le procédé suivant l'invention est beaucoup plus simple que ceux de l'art antérieur ; ainsi, par rapport aux brevets français cités plus haut, il suffit d'un seul 25 support minéral au lieu de deux supports dont un est un échangeur d'ions. En outre, la fixation a lieu en milieu basique au lieu d'être effectuée à des pH inférieurs à 7,5 et surtout inférieurs à 7, comme c'est le cas de toute la technique antérieure.

30 Dans une variante de l'invention, après l'élu-tion du support par une solution acide, on lave ce support avec une solution basique, ce qui permet d'extraire la fraction des immunoglobulines qui n'a pas été élue en milieu acide ; dans ce cas, la solution basique peut permettre aus- 35 si la récupération d'un reste de lactoferrine. Le lavage,

suivant cette variante, peut être effectué avec un pH de 8 à 10 par exemple. Cependant, la capacité d'un support de silice, vis-à-vis de la lactoferrine, n'est pas influencée par un tel lavage ; ce dernier peut donc être omis
5 lorsqu'on cherche à extraire seulement la lactoferrine.

Le procédé, suivant l'invention, s'applique au lactosérum quel que soit le mode d'élimination de la caséine qui a conduit à ce lacto-sérum : autrement dit, que la caséine ait été précipitée par acidification du lait
10 initial ou bien par l'action d'une enzyme. Le procédé convient au petit lait tel que, ainsi qu'à des liquides obtenus par la remise en solution des solides du lacto-sérum, obtenus par tout moyen connu, par exemple ultra filtration ou dessiccation.

15 L'invention peut être utilisée pour l'extraction de la lactoferrine de différentes sortes de laits, en particulier de ceux des ovins ou bovins, comme du lait humain. Comme les premiers contiennent beaucoup moins de lactoferrine que le second, leur traitement est moins efficace par les techniques connues et c'est là que l'utilité de l'invention se fait particulièrement sentir.
20

L'invention peut être réalisée dans les conditions prévues par Gordon, Ziegler & Basch, Biochim.Biophys. Acta 60, 410-411 (1962) : dans cette variante, la fixation
25 sur un support adsorbant en milieu faiblement basique porte sur un liquide renfermant la lactoferrine, auquel on a préalablement ajouté un composé du fer, de façon à saturer de fer la totalité de la lactoferrine présente.

Le taux d'extraction de la lactoferrine, par le
30 procédé suivant l'invention, est élevé. En ce qui concerne la composition des protéines obtenues par ce procédé, à la suite de l'élution du support adsorbant par une solution acide, elle comprend plus de 50% de lactoferrine, le reste étant constitué principalement d'immunoglobulines. La pureté
35 de la lactoferrine, utilisée essentiellement comme agent

bactériostatique, est tout à fait suffisante, et il n'est pas nécessaire de la séparer d'avec les immunoglobulines ; en effet il a été démontré, in vitro, que le pouvoir d'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes dû à la lactoferrine, était exalté par la présence d'immunoglobulines.

Dans le cas, industriellement très avantageux, où le support est constitué par de la silice, on trouve une capacité de celle-ci, vis-à-vis de la lactoferrine, de plus de 20 mg par gramme de silice, ce qui justifie pleinement l'application industrielle du procédé suivant l'invention.

Dans les conditions opératoires de l'invention, les immunoglobulines, qui accompagnent la lactoferrine, ne subissent aucune dénaturation, et peuvent, par conséquent, être utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et vétérinaires, puisqu'elles conservent toutes leurs propriétés.

Les différentes protéines, pouvant être séparées par le procédé de l'invention, sont identifiables par les méthodes classiques et, en particulier, par celles qui ont été décrites par J. Garnier dans Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 1964, 4 (2) 163-187. Les exemples qui suivent illustrent, non limitativement, la présente invention.

25 EXEMPLE 1

Dans une colonne de 1 cm de diamètre intérieur sont placés 5 g de grains de silice, d'une granulométrie de 100-200 μ m ; cette silice présente une surface spécifique de 20 m²/g et un diamètre poreux de 80 nm.

30 La silice est lavée avec une solution de phosphate disodique Na₂HPO₄ 0,005 M.

Dans 1 litre de cette même solution de phosphate, on dissout 10 g d'une poudre obtenue par séchage des solides recueillis (rétenant) dans l'ultrafiltration d'un lactosérum ;
35 cette poudre contient 6,5 g de protéines. Le pH de la solu-

tion obtenue est ajusté à 8,2.

On fait ensuite passer la solution à travers la charge de silice dans la colonne susindiquée, à un débit de 60 ml/h; cette charge est ensuite lavée avec une solution 0,005 M de phosphate disodique, de pH 8,2, de façon à chasser toutes les protéines non fixées sur la silice.

La lactoferrine fixée est alors éluée à l'aide d'une solution d'acide acétique 0,1 N additionnée de NaCl à la concentration de 0,5 M. On obtient ainsi une fraction de 25 ml de liquide coloré en rose, contenant 40 mg de protéines constituées de 66% de lactoferrine, le reste étant des immunoglobulines. Après un lavage de la charge de silice, par passage d'une solution de phosphate disodique 0,005 M, la colonne est prête pour un nouveau cycle d'adsorption.

EXEMPLE 2

Dans une opération similaire à celle de l'exemple 1, la charge de la colonne est lavée avec un tampon tris-HCl, pH 9, additionnée de 0,5 M NaCl, après l'élu- tion à l'acide acétique et récupération de la fraction de lactoferrine. Cela fournit une nouvelle fraction de 20 ml contenant 30 mg de protéines constituées essentiellement d'immunoglobulines, de lactoperoxydase et d'une très faible quantité de lactoferrine.

Après un lavage de la silice, dans la colonne, par une solution de phosphate disodique 0,005 M, la colonne est à nouveau prête à l'emploi.

EXEMPLE 3

Le mode opératoire de l'exemple 1 est répété, mais la source de lactoferrine est constituée par 1 litre de petit lait, directement issu de la fabrication de fromage, sans concentration, ce liquide étant additionné de 0,005 M de phosphate disodique par litre.

Les résultats sont les mêmes que dans l'exemple 1.

EXEMPLE 4

Le lavage alcalin de l'exemple 2 est appliqué
à un mode opératoire utilisant le petit lait, selon l'e-
xemple 3. Cela conduit à des résultats identiques à ceux
5 de l'exemple 2.

Revendications

1. Procédé d'extraction de protéines du lait, en particulier de celles qui sont capables de fixer le fer, à partir d'un milieu aqueux substantiellement exempt de caséines, par adsorption sur un support solide et ensuite
5 élution des protéines adsorbées, caractérisé en ce que l'adsorption a lieu en milieu faiblement basique, de pH supérieur à 7,5, tandis que l'élution est effectuée au moyen d'une solution acide.
2. Perfectionnement suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le pH du milieu soumis à l'adsorption est compris entre 7,7 et 8,8, et, de préférence, entre 7,9 et 8,5.
10
3. Procédé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'élution a lieu à un pH inférieur à environ 4, l'éluant contenant de préférence un sel soluble augmentant sa force ionique.
15
4. Procédé suivant une des revendications 1 à 3, dans lequel l'adsorbant est constitué par de la silice, dont la surface spécifique est d'environ 5 à 150 m²/g et le diamètre poreux de 25 à 250 nm.
20
5. Procédé suivant la revendication 4, dans lequel la silice étant sous une forme pulvérulente, sa granulométrie est de 5µm à 5 mm et, de préférence, de 10 à 500µm.
6. Procédé suivant une des revendications 1 à 3,
25 dans lequel l'adsorbant est constitué par un silicate naturel ou artificiel ou/et par une alumine activée.
7. Procédé suivant une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'élution en milieu acide du support adsorbant est suivie d'un traitement par une solution basique et de la récupération des immunoglobulines et de la lactoferrine ainsi libérées.
30
8. Application du procédé suivant une des revendications 1 à 7 à l'extraction de la lactoferrine et d'immunoglobulines d'un liquide dérivé du lait, en particulier du

lactosérum, éventuellement concentré avant l'extraction.

9. Application suivant la revendication 8, caracté-
risée en ce que des immunoglobulines et/ou d'autres pro-
téines sont récupérées du liquide restant après adsorption
5 de la lactoferrine.