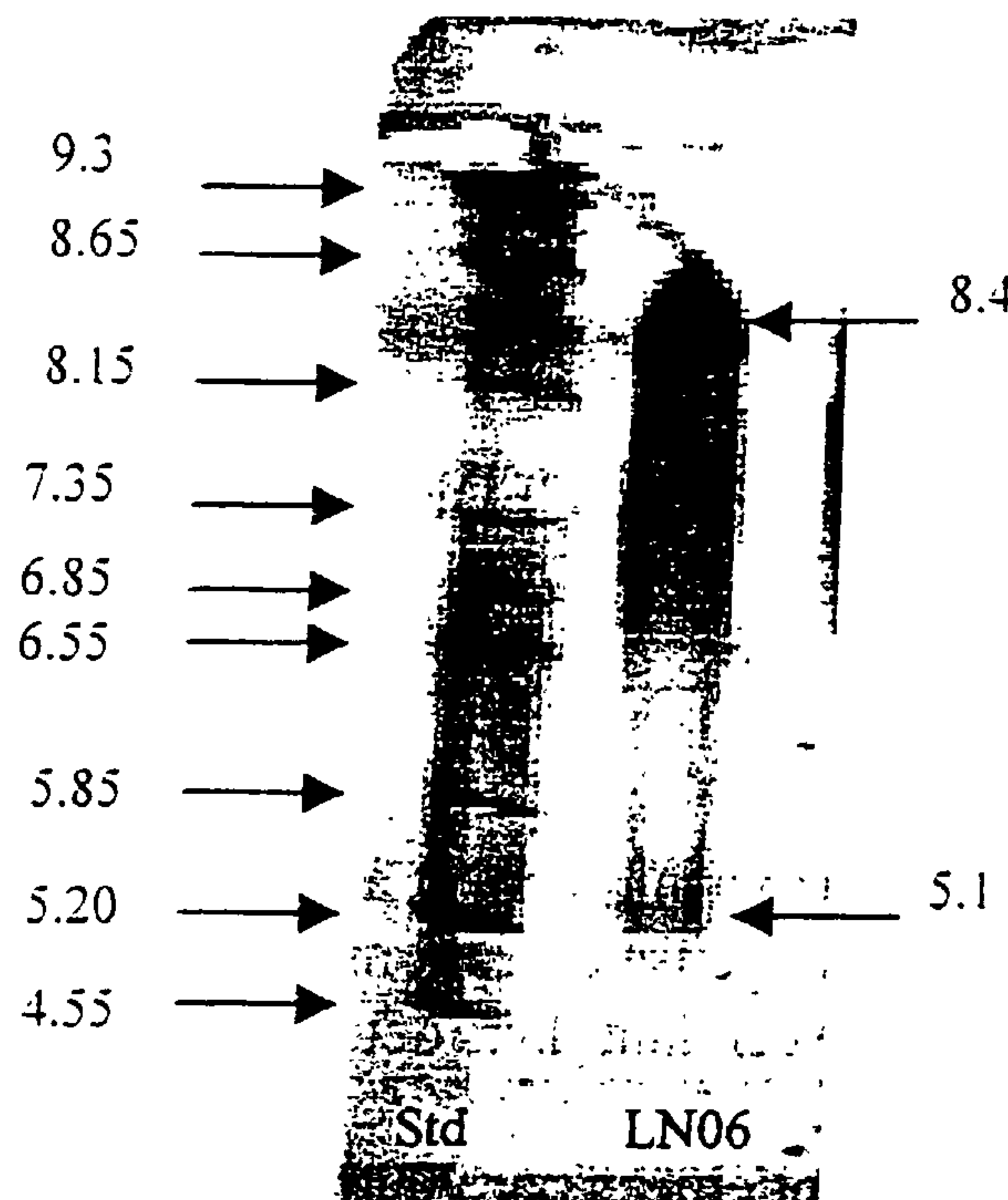




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2003/06/30
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2004/01/15
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/02/28
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2004/12/21
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2003/002015
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2004/004482
(30) Priorité/Priority: 2002/07/02 (FR02 08234)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A23J 1/20* (2006.01),
A23C 9/146 (2006.01), *A23L 1/305* (2006.01),
A61K 35/20 (2006.01), *A61K 38/17* (2006.01),
A61K 38/40 (2006.01)
(72) Inventeur/Inventor:
SOUPPE, JEROME, FR
(73) Propriétaire/Owner:
COMPAGNIE LAITIERE EUROPEENNE, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION
(54) Title: MILK PROTEIN ISOLATE AND METHOD FOR PREPARING SAME



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention concerne un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes de passage du lait ou lactosérum sur une résine échangeuse de cations, éluage de la fraction retenue par une solution aqueuse salée et dessalage et stérilisation de l'éluat. Elle a également pour objet une fraction protéique laitière obtenue par ce procédé et son utilisation pour la préparation de compositions pharmaceutiques ou alimentaires.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 janvier 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/004482 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ : **A23J 1/20**,
A23C 9/146, A23L 1/305, A61K 35/20, 38/40, 38/17, 8/98**Jérôme** [FR/FR]; 3 rue du Bois Rondel, F-35700 RENNES
(FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002015(74) Mandataires : **ORES, Béatrice** etc.; CABINET ORES,
36 rue de Saint Petersburg, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 30 juin 2003 (30.06.2003)

(81) États désignés (*national*) : BR, CA, JP, KR, PL, US.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02 08234 2 juillet 2002 (02.07.2002) FR

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **COM-PAGNIE LAITIÈRE EUROPÉENNE** [FR/FR]; F-50890
CONDE SUR VIRE (FR).

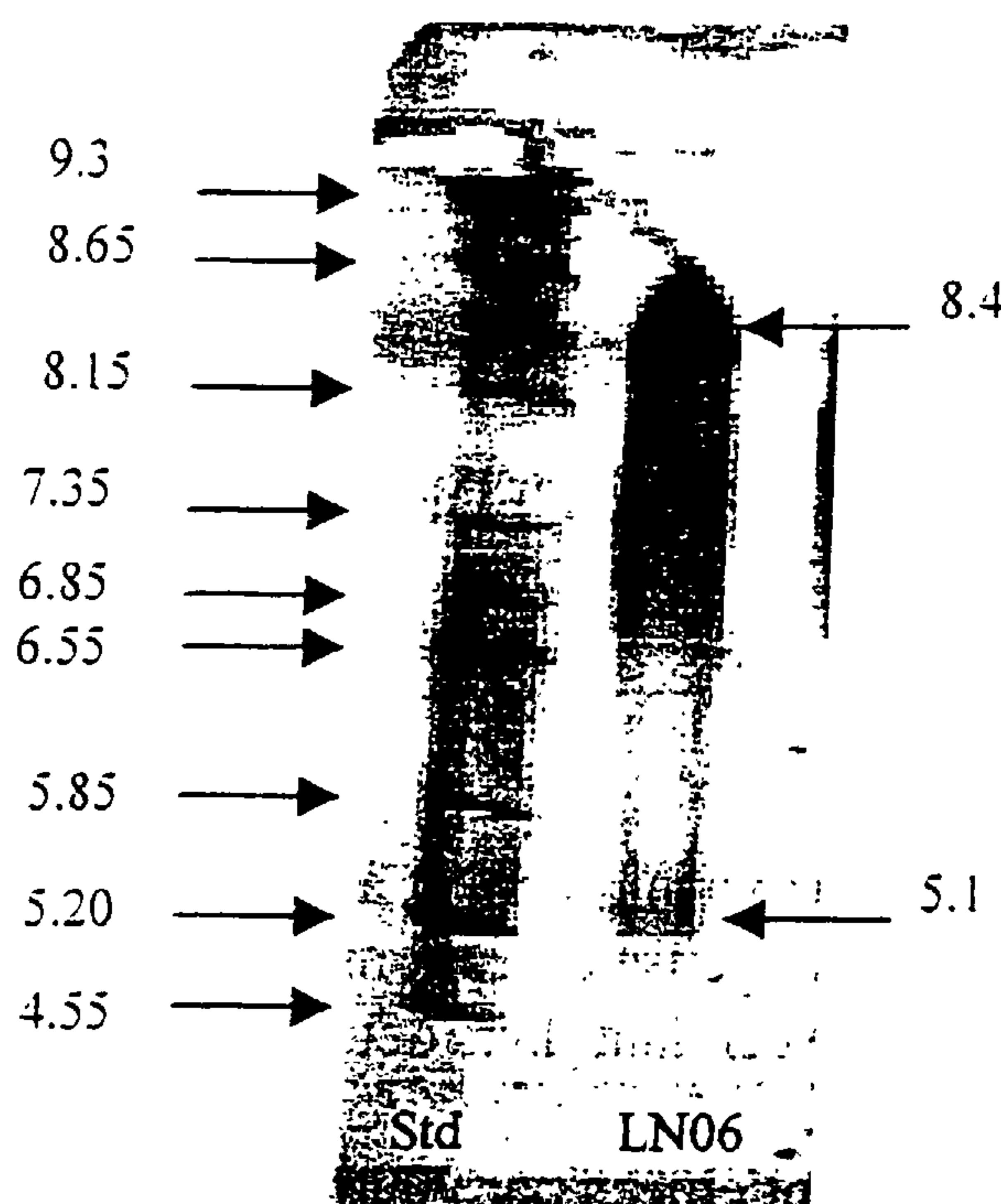
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : **SOUPPE**,

(54) Title: MILK PROTEIN ISOLATE AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION



(57) **Abstract:** The invention concerns a method for isolating milk proteins from milk or from whey comprising steps which consist in passing the milk or whey over a cation-exchanging resin, eluting the fraction retained by an aqueous salted solution and desalting and sterilizing the eluate. The invention also concerns a milk protein fraction obtained by said method and its use for preparing pharmaceutical and food compositions.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes de passage du lait ou lactosérum sur une résine échangeuse de cations, éluage de la fraction retenue par une solution aqueuse salée et dessalage et stérilisation de l'éluat. Elle a également pour objet une fraction protéique laitière obtenue par ce procédé et son utilisation pour la préparation de compositions pharmaceutiques ou alimentaires.

ISOLAT DE PROTEINES DE LAIT ET PROCEDE POUR SA PREPARATION

La présente invention a pour objet un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait, la composition, isolat de protéines de lait ou fraction protéique laitière, en résultant et ses applications, notamment alimentaires et pharmaceutiques.

5 On connaît plusieurs documents de l'art antérieur décrivant la purification de protéines de lait.

Le document EP-253395 décrit l'obtention d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>80% en une étape ou >98% en deux étapes) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations comprenant des radicaux carboxyméthyle, puis rinçage et désorption de la lactoferrine.

Le document EP-348508 décrit également un procédé de préparation d'une lactoferrine bovine de haute pureté (>95%) par adsorption de lait ou de lactosérum sur une résine échangeuse de cations de type polysaccharide comprenant des fonctions ester d'acide sulfurique et élution par une solution aqueuse de sel.

15 Le document EP-298875 décrit un procédé permettant d'isoler certaines protéines du lactosérum par adsorption sur un support minéral poreux sous forme de grains, ces grains étant recouverts d'une couche de polysaccharide aminé présentant en surface des groupements fonctionnels acides, tels que des groupements carboxyliques ou sulfoniques.

20 Le document EP-418704 décrit un procédé pour purifier séquentiellement la lactoferrine et la lactoperoxydase par élution sur une colonne chargée avec une résine polysaccharide greffée par des groupes acide sulfonique.

Le document US-6,096,870 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit lait par élution sur des résines cationiques.

25 Le document EP-1017286 décrit un procédé de séparation séquentielle de protéines du petit-lait par chromatographie à flux radial.

La lactoferrine et la lactoperoxydase sont des protéines du lait dotées de propriétés intéressantes : leur capacité à lier le fer leur confère un rôle d'agent anti-bactérien contre les bactéries dont le métabolisme requiert d'importantes quantités de fer.

30 La lactoperoxydase est indispensable au marquage protéique par l'iode. La lactoferrine favorise la croissance des lymphocytes et favorise l'absorption du fer par l'organisme, elle régule la différenciation des leucocytes et elle inhibe la peroxydation des lipides.

Toutefois, tous ces documents concernent des procédés visant à obtenir une lactoferrine et/ou une lactoperoxydase les plus pures possibles, c'est-à-dire des

procédés visant à réduire le plus possible la proportion des autres protéines initialement présentes dans le lait ou le lactosérum. En outre, les conditions de fixation de la matière première et d'élution des protéines sont des conditions douces, avec des flux de matières lents. En revanche, l'objectif que s'est fixé la demanderesse est l'obtention d'une fraction

5 protéique laitière comprenant, entre autres constituants, de la lactoferrine et de la lactoperoxydase, mais comprenant surtout une proportion des autres protéines plus élevée que dans le lait ou le lactosérum de départ. Pour cela la demanderesse a mis au point un procédé avec des flux beaucoup plus élevés que ceux décrits dans les documents analysés ci-dessus, ce procédé permettant une fixation plus sélective vis-à-vis de certaines protéines.

10 Le document WO93/13676 divulgue un procédé permettant d'isoler la lactoferrine et la lactoperoxydase par passage sur une résine échangeuse de cations à flux élevé, à partir de petit-lait. Ce procédé se distingue du procédé selon la présente invention par le fait que le flux est plus élevé que dans le procédé selon l'invention (supérieur à 5 m/h) et qu'il vise à purifier la lactoferrine et la lactoperoxydase, et non pas à obtenir une

15 fraction protéique laitière particulière contenant un taux relativement élevé des autres protéines et dotée de propriétés biologiques améliorées.

On connaît également, par le document EP-704218 un agent destiné à renforcer les os, cet agent comprenant une fraction protéique basique ou une fraction peptidique basique, issues du lait et obtenues par passage du lait sur une résine cationique

20 et élution. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ce document sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

Les documents JP-8165249, JP-9187250, JP-9294537 et EP-1010430 décrivent des compositions destinées au renforcement des os et/ou de prévention des

25 maladies parodontales, ces compositions comprenant une fraction protéique basique dérivée du lait obtenue par adsorption du lait et élution sur une résine cationique. Toutefois, les conditions d'adsorption et d'élution décrites dans ces documents sont distinctes de celles employées dans le procédé selon l'invention et permettent d'isoler une fraction protéique distincte de celle obtenue selon la présente invention.

30 Ainsi, c'est avec étonnement que la demanderesse a découvert un nouveau procédé d'isolement de protéines de lait permettant d'obtenir une fraction protéique laitière dotée de propriétés biologiques améliorées, notamment une fraction protéique laitière favorisant la croissance des ostéoblastes et l'inhibition de la prolifération des pré-ostéoclastes et des ostéoclastes.

3

L'invention a pour objet un procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes suivantes :

- a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;
- b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;
- c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse salée ;
- d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé, de préférence par ultrafiltration, et diafiltration puis stérilisé, de préférence par microfiltration.

Ce procédé est caractérisé en ce que :

α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes ;

le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne à la section de la colonne,

β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs suivantes :

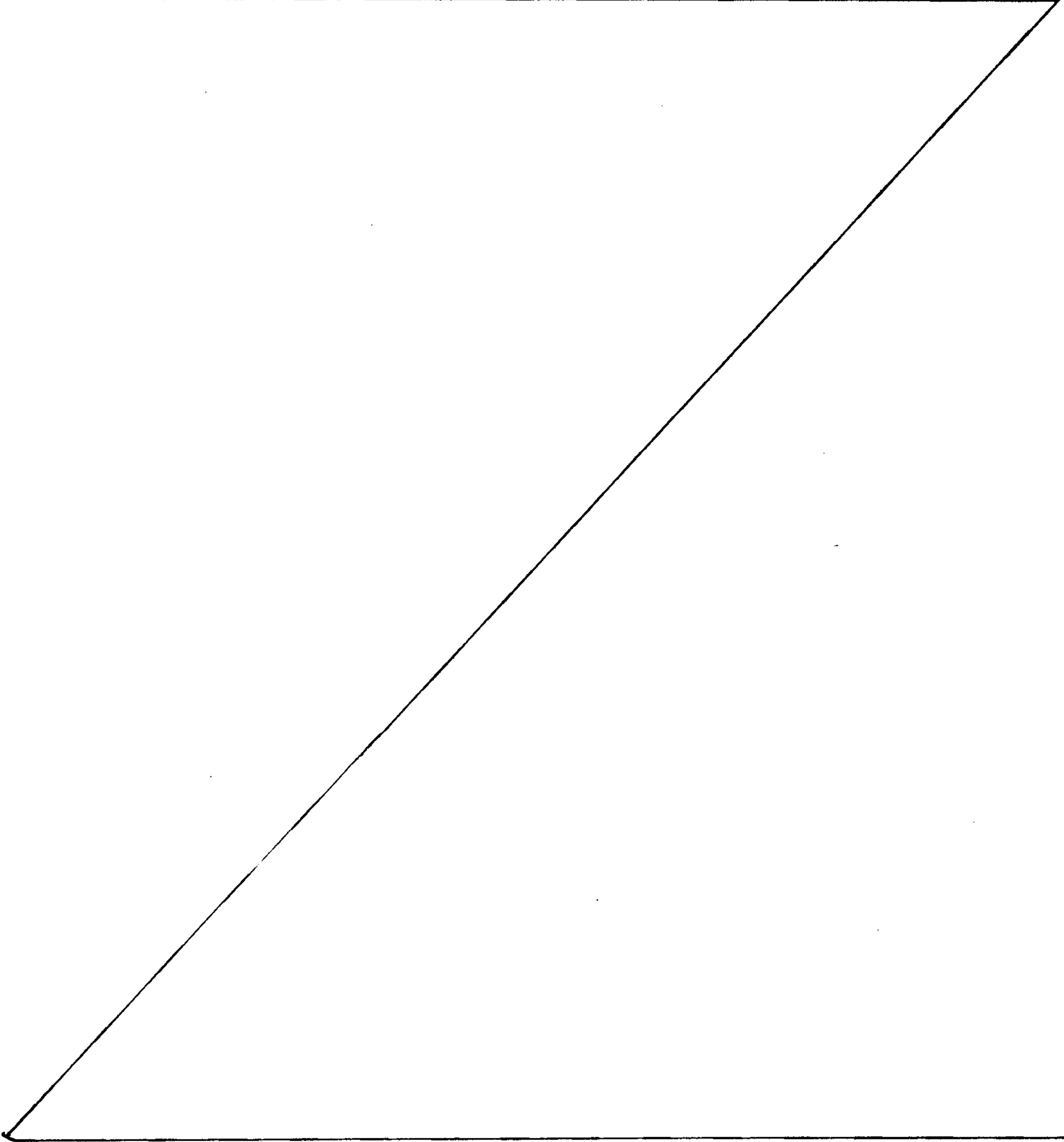
- BV_f est compris entre 50 et 400, de préférence entre 80 et 300 ;
- SV_f est compris entre 2 et 40 h^{-1} ;
- LV_f est supérieur ou égal à 1 m/h et inférieur ou égal à 5 m/h;

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs suivantes :

- BV_e est compris entre 1,5 et 7 ;
- LV_e est inférieur à 1 m/h, de préférence inférieur à 0,5 m/h.

3a

On peut utiliser comme produit de départ dans le procédé selon l'invention soit du lait, soit du lactosérum, préférentiellement issus de la vache. Le lactosérum est le liquide résiduel obtenu après l'extraction des protéines et de la matière grasse du lait ou du petit-lait. On distingue en général trois catégories de lactosérum. Les deux premières catégories sont classées selon l'acidité du lactosérum qui peut être inférieure ou supérieure à 1,8 g d'acide lactique/l : le lactosérum doux, issu de la



fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (emmental, saint-paulin etc.) et le lactosérum acide, issu de la caséine ou d'autres fromages obtenus par coagulation mixte ou lactique (pâtes molles, pâtes fraîches). La composition moyenne du lactosérum doux est à titre indicatif, pour 61 g de matières sèches par kg de lactosérum, de 42 à 48 g de lactose, 8 g de protéines, 2 g de graisses, 5 à 7 g de minéraux, 1 à 5 g d'acide lactique et le reste en minéraux et vitamines.

On connaît également le lactosérum idéal obtenu par microfiltration du lait sur un support de porosité moyenne de 0,1 μm .

Selon une première variante de l'Invention, on utilise comme produit de départ du lait, et avantageusement du lait de vache, dont la composition permet, par le procédé selon l'invention, l'obtention d'un isolat de protéines ayant des propriétés biologiques plus intéressantes. Cette variante permet également d'obtenir un rendement en protéines supérieur aux variantes utilisant le lactosérum comme produit de départ.

Selon une seconde variante préférée de l'Invention, on utilise comme produit de départ du lactosérum acide de caséinerie. Cette variante représente un avantage économique important dans la mesure où le produit de départ est un sous-produit issu de l'exploitation industrielle et donc d'un faible coût.

Dans la première étape du procédé, le lait ou le lactosérum sont stérilisés et dégraissés par écrémage, de façon connue :

L'écémage du lait désigne la séparation de la crème du lait, quel que soit le procédé mis en œuvre pour obtenir cette séparation.

De façon traditionnelle, la fabrication de la crème se fait selon un processus naturel : lorsque le lait repose, les éléments qui le composent se séparent en fonction de leur densité. Les globules de matière grasse étant plus légers que l'eau remontent à la surface pour former une couche de crème. En production industrielle, la formation de la crème est accélérée par passage du lait dans une écrémeuse centrifuge.

De façon habituelle, la pasteurisation est faite par un chauffage contrôlé de courte durée de façon à éliminer les germes pathogènes éventuellement présents dans la crème. Avantageusement, la pasteurisation est faite à une température comprise entre 65 et 95°C, préférentiellement entre 80 et 95°C. On peut par exemple traiter le lait ou le lactosérum pendant 15 secondes à une température comprise entre 65 et 82°C. On peut également stériliser le lait ou le lactosérum de départ par microfiltration sur un filtre doté de pores d'un diamètre allant de 0,1 à 2 μm .

La matière première stérile et dégraissée est alors passée sur une résine échangeuse de cations. Selon l'invention la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes et ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000 $\mu\text{E/ml}$, de préférence entre 400 et 700 $\mu\text{E/ml}$. Par fonction acide forte on entend une fonction acide dotée d'un $\text{pK}_a \leq 2$. Notamment elle peut être greffée par des fonctions acide sulfonique, généralement sous forme de sels de sulfonate pour leur mise en œuvre, la nature du sel étant déterminée par la solution qui a servi à conditionner la colonne avant la mise en œuvre du procédé. Préférentiellement, on choisit un greffage par des groupements aromatiques ou aliphatiques porteurs de fonctions acide sulfonique, encore plus préférentiellement sous forme de sels de propyl sulfonate. La résine sur laquelle sont greffées les fonctions acides sulfoniques peut être de toute nature, notamment polyacrylique ou polystyrène. La granulométrie de la résine est avantageusement comprise entre 100 μm et 900 μm , de préférence entre 200 et 750 μm , encore plus préférentiellement entre 250 et 600 μm . La résine utilisable selon l'invention doit préférentiellement présenter une densité supérieure à 1,15.

Parmi les résines commercialement disponibles utilisables dans la présente invention, on peut citer notamment : la résine Trisacryl SP ® commercialisée par la société BIOSEPRA, la résine MacroPrep High S ® commercialisée par la société BioRad. De préférence, on choisit une résine polystyrène greffée par des fonctions alkyl ou aryl sulfonate.

La résine est conditionnée dans une colonne avant son utilisation, de façon connue de l'homme du métier, par traitement par une solution désinfectante et rinçage afin d'éviter la contamination par des micro-organismes. Elle est ensuite éventuellement équilibrée par passage d'une solution tampon et rinçage.

L'étape b) de fixation de la matière première, lait ou lactosérum, stérile et dégraissée, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :

La résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C, préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première par le bas. Avantageusement on travaille en lit fluidisé. De préférence les paramètres de fixation sont ajustés de façon à ce que l'une ou plusieurs des conditions suivantes soient vérifiées :

- BV_f est compris entre 80 et 150, préférentiellement entre 80 et 120 ;
- SV_f est compris entre 5 et 40 h^{-1} , préférentiellement entre 8 et 20 h^{-1} , encore plus préférentiellement entre 8 et 15 h^{-1} ;

- LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h, préférentiellement entre 3,2 et 4 m/h.

De façon préférentielle, l'ensemble des conditions suivantes est vérifié au cours de l'étape b) :

- 5
- BV_f est compris entre 80 et 120 ;
 - SV_f est compris entre 8 et 15 h^{-1} ;
 - LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h.

au cours de l'étape c) :

- 10
- BV_e est compris entre 3 et 7
 - LV_e est inférieur à 1 m/h.

Par l'échange d'ions, les protéines de la fraction laitière utilisée comme produit de départ viennent se fixer sur les fonctions acides de la résine. Le choix des paramètres de fixation selon l'invention permet d'opérer une fixation sélective des protéines sur la colonne. Dans des conditions classiques de fixation du lait sur une résine cationique, 15 la lactoferrine et la lactoperoxydase, majoritaires, se fixent préférentiellement sur la résine. Dans le procédé selon l'invention, les autres protéines, minoritaires, sont favorisées par les conditions de fixation définies ci-dessus et leur proportion dans le mélange de protéines fixées sur la résine est significativement supérieure à leur proportion dans le produit de départ. Le procédé selon l'invention permet ainsi d'isoler une fraction laitière ayant une 20 composition en protéines nouvelle par rapport aux compositions protéiques laitières de l'art antérieur et présentant des propriétés biologiques intéressantes.

L'étape c) d'élution des protéines fixées, se déroule dans les conditions préférentielles suivantes :

La résine est maintenue à une température comprise entre 2 et 15°C, 25 préférentiellement entre 4 et 12°C. Préférentiellement, la colonne est alimentée en matière première (solution aqueuse salée) par le haut. La solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est généralement une solution d'un chlorure d'un métal alcalin tel que K^+ , Na^+ , Ca^+ , Mg^+ . De préférence on emploie une solution aqueuse de chlorure de sodium. Avantageusement, la solution aqueuse de sel a une concentration comprise entre 2 30 et 25%, préférentiellement de 5 à 15% en poids de sel par poids de liquide. De préférence, la force ionique de la solution aqueuse de sel est comprise entre 1 et 2 M. Le pH de la solution d'élution est généralement compris entre 6 et 7, avantageusement entre 6,5 et 7.

De préférence les paramètres d'élution vérifient l'une ou plusieurs des conditions suivantes :

- BV_e est compris entre 3 et 7 et préférentiellement entre 3 et 5 ;
- LV_e est inférieur à 0,5 m/h.

De façon connue, la colonne de résine est lavée avant une nouvelle utilisation.

5 Après cette étape, l'éluat obtenu contenant le mélange de protéines de lait est soumis de façon connue à une ou plusieurs étapes d'ultrafiltration et de diafiltration destinées à éliminer les sels. D'autres moyens connus de l'homme du métier tels que l'électrodialyse ou le passage sur des résines anioniques et cationiques faibles peuvent être employés dans cette étape en remplacement de l'ultrafiltration et de la diafiltration. De
10 préférence, ce traitement est effectué jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS. Tout autre procédé permettant d'éliminer les sels, comme notamment l'électrodialyse, peut être utilisé en remplacement de cette étape. La solution est alors soumise à une microfiltration destinée à stériliser le rétentat d'ultrafiltration avant séchage. D'autres moyens techniques peuvent être employés pour stériliser la fraction
15 laitière obtenue à cette étape, notamment un traitement thermique adapté, des ultrasons ou des champs électriques pulsés.

 Préférentiellement, le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre, ce qui permet ensuite son conditionnement et son stockage. De façon connue, le séchage peut être
20 fait par lyophilisation ou par atomisation.

 La fraction protéique laitière, préférentiellement issue du lait de vache et obtenue par le procédé selon l'invention est nouvelle. Sous forme sèche, elle est caractérisée en ce qu'elle est dotée :

- d'une teneur en protéines supérieure à 90%,
- 25 - d'une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- d'une teneur en matières grasses inférieure à 1%,
- d'une teneur en lactose inférieure à 1%,
- d'une teneur en humidité inférieure à 5%,
- d'une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- 30 - d'un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,
- d'une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$.

- d'au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8, les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

Dans le cas où le produit de départ utilisé est du lait et non un lactosérum, le produit obtenu par le procédé de l'invention se caractérise par les conditions supplémentaires :

- présence d'au moins 40% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8,
- la teneur en lactoferrine est supérieure à 30% et inférieure à 80%,
- l'activité lactoperoxydase est supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat (ABTS=2,2'-Azino-bis-(3-éthyl Benzo Thiazoline 6-Sulfonic Acid).

La mesure de DO à 412 nm donne une évaluation quantitative de la lactoferrine et de la lactoperoxydase présentes dans la fraction protéique laitière.

La mesure de DO à 280 nm donne une évaluation quantitative de la totalité des protéines présentes dans la fraction protéique laitière.

Le ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$ montre que la lactoferrine et la lactoperoxydase sont sous-représentées par rapport aux autres protéines dans la composition selon l'invention par comparaison avec les proportions dans lesquelles elles sont présentes dans le lait et dans les fractions protéiques laitières de l'art antérieur.

De préférence, la fraction protéique laitière obtenue par le procédé selon l'invention répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 95%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,
- une teneur en matières grasses inférieure à 0,5%,
- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,
- une teneur en humidité inférieure à 4%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,
- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,1$.
- contient au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique compris entre 8,2 et 8,7.

Dans le cas où le produit de départ utilisé est du lait et non du lactosérum, le produit obtenu par le procédé de l'invention se caractérise par la condition préférentielle additionnelle :

- la teneur en lactoferrine est supérieure à 50% et inférieure à 80%.

Les fractions protéiques laitières selon l'invention présentent des propriétés avantageuses : notamment elles favorisent la croissance des cellules ostéoblastiques et celle des cellules intestinales.

5 Les fractions protéiques laitières de l'invention sont également efficaces pour inhiber la croissance des ostéoclastes et des pré-ostéoclastes.

Ces propriétés ainsi que les propriétés déjà connues des fractions protéiques laitières de l'art antérieur permettent d'envisager l'utilisation de ces compositions dans de nombreuses applications, notamment dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. L'invention a donc également pour objet toute composition alimentaire, pharmaceutique et tout produit d'hygiène comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

Une composition alimentaire selon l'invention pourra par exemple être un lait alimentaire, en particulier un lait destiné à l'alimentation infantile, obtenu par simple réhydratation de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention. L'invention a donc pour objet l'utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'invention pour la préparation d'un lait alimentaire.

L'invention a également pour objet des compositions alimentaires comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention et d'autres ingrédients alimentaires. On peut en particulier envisager d'ajouter la fraction protéique laitière selon l'invention à un lait de vache afin d'enrichir celui-ci en certaines protéines. La présence de calcium dans les aliments comprenant la fraction protéique laitière selon l'invention sera particulièrement bénéfique dans la mesure où cette fraction protéique laitière améliore l'absorption du calcium par l'organisme humain, notamment la fixation du calcium dans le tissu osseux.

L'invention a donc également pour objet l'association d'une fraction protéique laitière selon l'invention avec du calcium.

L'invention porte également sur les kits alimentaires comprenant plusieurs constituants conditionnés de façon isolée, destinés à une préparation extemporanée de l'aliment et comprenant de la poudre de fraction protéique laitière selon l'invention.

De tels aliments peuvent être utilisés pour la prévention de pathologies telles que : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale ...

Une composition pharmaceutique selon l'invention, comprenant au moins une fraction protéique laitière selon l'invention et un support pharmaceutiquement acceptable peut être utilisée dans le traitement d'une ou plusieurs des pathologies suivantes : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale ...

Bien entendu une telle composition peut en outre comporter un ou plusieurs autres actifs thérapeutiques. Du calcium peut avantageusement être associé à la fraction protéique laitière selon l'invention. Une telle association fait partie de la présente invention. En effet, une fraction protéique laitière selon l'invention permet d'améliorer l'absorption du calcium dans l'organisme, notamment la fixation du calcium dans le tissu osseux, ce qui permet d'améliorer l'effet renforçateur des os.

Du calcium avec la vitamine D peut aussi avantageusement être associé à la fraction protéique laitière selon l'invention. Une telle association fait aussi partie de la présente invention. En effet, la vitamine D améliore l'absorption intestinale du calcium et une fraction protéique laitière selon l'invention permet d'améliorer la fixation du calcium dans le tissu osseux. Cet effet synergie permet particulièrement d'améliorer la santé des os.

Des compositions pharmaceutiques ou des compléments alimentaires selon l'invention peuvent être administrés sous toute forme appropriée telle que sous forme de poudre, de granulés, de comprimés, de gélules, de boisson, comme par exemple en solution ou en sirop. La fréquence d'administration et la dose à administrer sont adaptés de façon connue en fonction du poids et de l'âge de l'individu.

Sont également incluses dans la présente invention, les produits d'hygiène, notamment les produits destinés à l'hygiène de la cavité buccale, tels que les dentifrices sous forme de gel ou de pâte, les bains de bouche, les gommes à mâcher, comprenant une fraction protéique laitière selon l'invention.

EXEMPLES :

I- Préparation des isolats de protéines de lait

Conditions générales :

La résine employée dans les exemples ci-dessous est une résine Trisacryl SP ®. Elle subit les traitements de conditionnement suivants avant sa mise en œuvre initiale : mise en contact avec une solution aqueuse à 0,4% du désinfectant ASEPTO ®, à raison de 3 litres de désinfectant par kilo de résine humide, suivie d'un rinçage. Mise en équilibre par passage d'un tampon acétate (80 mM, pH=5,3) contenant du chlorure de calcium (33 g/l) et du chlorure de potassium (50 g/l), à raison de 4 litres de ce tampon par

kilo de résine humide. Enfin la résine est rincée à l'eau jusqu'à l'obtention d'un éluat ayant un pH compris entre 6 et 7 et une conductivité inférieure à 5 mS.

Après chaque séquence de fixation de matière première et d'élution, la résine est nettoyée par traitement enzymatique à la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* en tampon à pH=8, à 60°C pendant 2 heures, puis traitement par une solution de NaCl à 100g par litre pendant trente minutes (répété 2 fois). Avant sa réutilisation, elle est soumise au traitement de conditionnement exposé ci-dessus.

L'ultrafiltration est effectuée sur l'éluat à une température comprise entre 5 et 10°C sur des membranes organiques dont le seuil de coupure est de 10kD. Le facteur de concentration volumique pratiqué est compris entre 10 et 60, de façon à obtenir un rétentat ayant l'extrait sec le plus élevé possible, de préférence entre 15 et 20%. La diafiltration est effectuée à une température comprise entre 15 et 25°C sur les mêmes membranes, en utilisant un volume d'eau déminéralisée compris entre 8 et 10 fois le volume de rétentat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration jusqu'à atteindre une conductivité du perméat inférieure à 15mS.

La microfiltration est effectuée à 35°C à partir du rétentat issu de l'ultrafiltration /diafiltration sur des membranes céramiques de seuil de coupure de 1,4 µm.

Le séchage du perméat de microfiltration est effectué sur une tour d'atomisation à turbines avec une température d'entrée de 140°C et une température de sortie de 80°C.

Caractéristique de la résine :

La résine SPEC 70 est constituée d'un support chimiquement inerte et mécaniquement résistant.

Chimiquement, le support est fabriqué par polymérisation d'AMPS : 2-acrylamide 2-méthyl propane sulfonic acid. La résine a une capacité d'échange d'ions entre 400 et 700 µE/ml et une capacité de fixation protéique mesurée sur la lactoferrine (minimum 20 mg/ml) ou la lactoperoxydase (minimum 40 mg/ml) ou le lysozyme (minimum 70 mg/ml) ; sa densité est supérieure à 1,15 et sa granulométrie se situe entre 250 et 560 µm.

Exemple 1 :

300000 litres de lait écrémé et traité thermiquement à 68°C pendant 15 secondes, sont passés à 10°C sur 3000 litres de résine échangeuse de cations (Référence SPEC 70 fournie par la Société BIOSEPRA) à un débit de 14000 litres /h en flux ascendant dans deux colonnes fonctionnant en parallèle et ayant chacune un rayon de 1 mètre.

Les protéines fixées sur la résine sont éluées par 9000 litres d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

L'éluat obtenu présente un pH de 6,5 et un extrait sec de 80 g/kg. Il est passé sur membranes d'ultrafiltration de seuil de coupure de 10 kD et de 17 m² de surface
5 fournies par DSS, à 11°C avec un flux de perméation de 161/h/m² jusqu'à obtenir un facteur de concentration volumique de 7.

Le rétentat a un pH de 5,9 et un extrait sec de 170 g/kg ; afin d'éliminer le sel, ce rétentat est ensuite diafiltré sur les mêmes membranes à 25°C avec de l'eau à hauteur de 70% du volume d'éluat mis en œuvre et jusqu'à obtenir un facteur de
10 concentration volumique de 9,5 en final avec un flux de perméation de 161/h/m².

Le rétentat diafiltré a un pH de 6,5 et un extrait sec de 95 g/kg ; il est alors passé sur membranes de microfiltration de porosité de 1,4 µm à 30°C avec un flux de perméation de 320 l/h/m². Le perméat de cette microfiltration présente un pH de 6,6 et un extrait sec de 75 g/kg.

15 Ce perméat est ensuite séché sur une tour d'atomisation munie d'une turbine ; la température d'entrée en tour est de 140°C et la température de sortie est de 80°C.

L'isolat poudre ainsi obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- Humidité : 4,7%,
- 20 - Protéines (Nx6,38) : 96,2% dont :
 - Lactoferrine : 54%
 - Lactoperoxydase : 125 unité ABTS/mg
- Cendres : 0,1% dont :
 - Na : 0,02%
 - 25 Cl : 0,44%
- Pureté spectrophotométrique : $DO^{412}/DO^{280} = 0,06$,

Le profil électrophorétique obtenu par isofocalisation avec révélation au nitrate d'argent est illustré par la figure 1. Sur la figure 1 on compare la répartition des points isoélectriques de la fraction protéique laitière selon l'invention (notée LN06) et un
30 produit de référence noté Std qui est un kit de calibration protéique commercialisé par la Société Pharmacia sous la référence 17047101 et dénommé « Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad PI 3-10 ». On constate que sont majoritairement présentes des protéines ayant des points isoélectriques élevés (autour de 8,4). Ce produit comporte environ 50% en poids de lactoferrine par rapport au poids total de l'isolat.

Exemple 2 :

4,4 litres de sérum acide natif de caséinerie (pH 4,7, extrait sec 65 g/kg) sont passés à 10°C sur 22 ml de résine échangeuse de cations (Référence SPEC 70 fournie par la Société BIOSEPPRA) à un débit de 400 ml/h en flux descendant dans une colonne
5 ayant un diamètre de 15 mm.

Les protéines fixées sur la résine sont éluées par 90 ml d'une solution de chlorure de sodium à 10% en flux descendant.

Afin d'éliminer le sel, l'éluat obtenu (100 ml) est ensuite dialysé contre de l'eau déminéralisée pendant 48 heures à 4°C.

10 Le produit dialysé présente les caractéristiques suivantes :

- Extrait sec : 1,5 g/kg,
- pH : 5,4,
- Conductivité : 24 μ S,
- $DO^{412} < 0,005$,
- 15 - $DO^{280} = 4,6$ (0,46 dilué 10 fois).

Le profil électrophorétique permet de constater qu'au moins 1% des protéines présentes ont un point isoélectrique supérieur ou égal à 8. Ce produit contient environ 3% de lactoferrine en poids par rapport au poids total de l'isolat de protéines.

II- Tests biologiques

20 **A- Méthodes générales**

1. Tests de prolifération des cellules MC3T3 (lignée cellulaire ostéoblastique)

Les cellules MC3T3 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est de l' α -MEM (alpha-Modified Eagle Medium) supplémenté à l'aide de 10% de sérum de veau fœtal et de 50 U/ml de pénicilline et 50 μ g/ml
25 streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 5×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre
30 0.22 μ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72h de culture en évaluant la quantité d'ADN.

2. Tests de prolifération des cellules RAW 264.7 (lignée cellulaire pré-ostéoclastique)

Les cellules RAW 264.7 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) contenant 25 mM de glucose, 4 mM de glutamine et 1.5 g/litre de bicarbonate supplémenté à l'aide de 10% de sérum de veau foetal et de 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 5×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre 0.22µ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72 heures de culture en évaluant la quantité d'ADN.

3. Test de prolifération des cellules Caco-2 (lignée cellulaire intestinale)

Les cellules Caco-2 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) contenant 25 mM de glucose supplémenté à l'aide de 15% de sérum de veau foetal, d'1% d'acides aminés non essentiels, de 6 mM glutamine et de 50U/ml de pénicilline et 50µg/ml streptomycine.

Pour tester l'effet des différentes protéines sur la croissance cellulaire, les cellules sont ensemencées sur plaques 48 puits à une densité de 4×10^4 cellules/cm². 48 heures après ensemencement, les protéines sont ajoutées aux cellules. Les solutions protéiques sont préparées dans le milieu de culture à une concentration de 10 mg/ml puis filtrées sur filtre 0.22µ et diluées à la concentration désirée dans le milieu de culture juste avant usage. Les cellules sont dénombrées après 72h de culture en évaluant la quantité d'ADN.

B- Résultats

Les tests décrits ci-dessus ont été mis en œuvre sur trois produits :

- un isolat de protéines de lait de vache composé à 90% de lactoferrine (Produit témoin) : T₁,
- un isolat de protéines de lait de vache dont la teneur en lactoferrine est de moins de 0,01% (Produit témoin) : T₂,

- le produit préparé à l'exemple 1 : P₁,

- le produit préparé à l'exemple 2 : P₂.

Les résultats de ces tests sont exposés dans le tableau I :

Produit	Concentration	Stimulation de la prolifération des cellules MC3T3	Inhibition de la prolifération des cellules RAW 264.7	Stimulation de la prolifération des cellules Caco-2
T1	1.0 mg/ml	+65%	-70%	+67%
	0.1 mg/ml	+37%	-30%	+40%
T2	1.0 mg/ml	+9%	-8%	+9%
	0.1 mg/ml	+6%	-4%	-
P1	1.0 mg/ml	+36%	-70%	+40%
	0.1 mg/ml	+15%	-22%	+30%
P2	1.0 mg/ml	+31%	-32%	+41%
	0.1 mg/ml	+6%	-17%	+37%

5

TABLEAU I

La concentration désigne la concentration de l'isolat de protéines de lait dans le milieu de culture.

L'état de l'art tend à démontrer que l'activité d'un isolat de protéines de lait est liée au pourcentage de lactoferrine qu'il contient (voir résultats de T₂).

Contrairement à ce préjugé de l'art antérieur, les résultats des tests exposés ci-dessus montrent que des isolats de protéine de lait de l'invention, bien que contenant peu de lactoferrine par rapport au témoin T₁, présentent une activité remarquable dans les tests de croissance cellulaire sur des ostéoblastes et sur des cellules intestinales et d'inhibition de la prolifération des pré-ostéoclastes.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'isolement de protéines de lait à partir de lait ou d'un lactosérum comportant les étapes suivantes :

a) le lait ou le lactosérum est stérilisé et dégraissé ;

b) la fraction laitière issue de l'étape a) est passée sur une résine échangeuse de cations conditionnée dans une colonne d'élution ;

c) la fraction retenue sur la résine est éluée par une solution aqueuse salée ;

10 d) l'éluat résultant de l'étape c) est dessalé et stérilisé ;

ce procédé étant caractérisé en ce que :

α) la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides fortes ;

le paramètre BV désignant le rapport du volume de matière première au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre SV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne au volume de résine humide dans la colonne,

le paramètre LV désignant le rapport du débit d'alimentation de la colonne à la section de la colonne,

20 β) au cours de l'étape b), les paramètres de fixation ont les valeurs suivantes :

- BV_f est compris entre 5 et 400 ;

- SV_f est compris entre 2 et 40 h^{-1} ;

- LV_f est supérieur ou égal à 1 m/h et inférieur ou égal à 5 m/h ;

γ) au cours de l'étape c), les paramètres d'élution ont les valeurs suivantes :

- BV_e est compris entre 1,5 et 7 ;

- LV_e est inférieur à 1 m/h.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit de départ est du lait de vache.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit de départ est un lactosérum acide de caséine.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la résine échangeuse de cations est une résine greffée par des fonctions acides de $pK_a \leq 2$ ayant une capacité d'échange d'ions comprise entre 200 et 1000 $\mu E/ml$.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la résine est greffée
10 par des fonctions acide sulfonique ou sel de sulfonate.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la résine est greffée par des fonctions propyl sulfonique ou propyl sulfonate.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la granulométrie de la résine est comprise entre 100 μm et 900 μm .
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la granulométrie de la résine est comprise entre 200 et 750 μm .
9. Procédé selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que la granulométrie de la résine est comprise entre 250 et 600 μm .
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce
20 que au cours de l'étape b) de fixation de la matière première, une ou plusieurs des conditions suivantes sont remplies :
 - BV_f est compris entre 80 et 150 ;
 - SV_f est compris entre 5 et 40 h^{-1} ;

- LV_f est compris entre 3 et 4,3 m/h.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les conditions suivantes sont vérifiées au cours de l'étape b) :

- BV_f est compris entre 80 et 120 ;
- SV_f est compris entre 8 et 15 h^{-1} ;
- LV_f est compris entre 3 et 4,8 m/h.

au cours de l'étape c) :

- BV_e est compris entre 3 et 7
- LV_e est inférieur à 1 m/h.

10 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que au cours de l'étape b) la résine est conditionnée dans une colonne dont la température est maintenue entre 2 et 15°C,

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) d'élution des protéines fixées, l'une au moins des conditions suivantes est remplie :

- BV_e est compris entre 3 et 5 ;
- LV_e est inférieur à 0,5 m/h.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que au cours de l'étape c) la résine est conditionnée dans une colonne dont la
20 température est maintenue entre 2 et 15°C.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline employée pour la mise en œuvre de l'invention est une solution d'un chlorure d'un métal alcalin choisi parmi K^+ , Na^+ , Ca^+ , Mg^+ .

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est une solution aqueuse de chlorure de sodium.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline est d'une concentration comprise entre 2 et 25% en poids de sel par poids de liquide.
18. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la solution aqueuse saline a une force ionique comprise entre 1 et 2 M.
19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse saline d'élution est compris entre 6 et 7.
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse saline d'élution est compris entre 6,5 et 7.
- 10 21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le dessalage est fait par ultrafiltration et diafiltration.
22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les traitements d'ultrafiltration et de diafiltration sont effectués jusqu'à l'obtention d'un perméat ayant une conductivité inférieure à 15 mS.
23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisé en ce que la stérilisation est faite par microfiltration.
24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, caractérisé en ce que le produit dessalé et stérilisé est séché de façon à obtenir la fraction laitière issue du procédé de l'invention sous forme d'une poudre.
- 20 25. Fraction protéique laitière caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 24.

26. Fraction protéique laitière, caractérisée en ce qu'elle répond aux caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 90%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 1%,
- une teneur en matières grasses inférieure à 1%,
- une teneur en lactose inférieure à 1%,
- une teneur en humidité inférieure à 5%,
- une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,5,

10 - une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio $DO^{412}/DO^{280} < 0,15$,

- comporte au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8,

les pourcentages étant donnés en poids par rapport au poids de matière sèche de la fraction laitière selon l'invention.

27. Fraction protéique laitière selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle répond au moins à l'une des caractéristiques suivantes :

- une teneur en protéine supérieure à 95%,
- une teneur en sels minéraux inférieure à 0,5%,
- 20 - une teneur en matière grasse inférieure à 0,5%,
- une teneur en lactose inférieure à 0,5%,
- une teneur en humidité inférieure à 4%,
- une teneur en lactoferrine inférieure à 80%,
- un pH en solution à 2% compris entre 6 et 7,2,
- une pureté spectrophotométrique en UV-visible définie par un ratio

$DO^{412}/DO^{280} < 0,1$.

- comporte au moins 1% de protéines ayant un point isoélectrique compris entre 8,2 et 8,7.

28. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'elle est issue du lait de vache.
29. Fraction protéique laitière selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 40% de protéines ayant un point isoélectrique supérieur ou égal à 8.
30. Fraction protéique laitière selon la revendication 28 ou 29, caractérisée en ce qu'elle comporte une teneur en lactoferrine supérieure ou égale à 30% et une activité lactoperoxydase supérieure ou égale à 120 unités ABTS par mg d'isolat.
- 10 31. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 27, caractérisée en ce qu'elle est issue d'un lactosérum acide de caséine.
32. Fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 31, caractérisée en ce qu'elle est associée à du calcium.
33. Fraction protéique laitière selon la revendication 32, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre de la vitamine D.
34. Composition alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comporte une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33.
35. Kit alimentaire comprenant une poudre de fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33 et au moins un autre constituant pour la préparation extemporanée d'aliment.
- 20 36. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33, pour la préparation d'un lait alimentaire.

37. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33, pour la préparation d'un aliment destiné à la prévention d'une pathologies sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale.

38. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33 pour la préparation d'un aliment destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes et/ou des cellules intestinales et/ou à inhiber la croissance des pré-ostéoclastes.

10 39. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33 et un support pharmaceutiquement acceptable.

40. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi : retard de croissance, ostéoporose, fragilité osseuse, fragilité osseuse, fractures osseuses, rhumatismes, arthrose, maladies périodontales, déficience de la barrière intestinale.

20 41. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33, pour la préparation d'un médicament destiné à améliorer l'absorption du calcium dans l'organisme.

42. Utilisation d'une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33 pour la préparation d'un médicament destiné à favoriser la croissance des ostéoblastes et/ou des cellules intestinales et/ou à inhiber la croissance des pré-ostéoclastes.

43. Produit d'hygiène caractérisé en ce qu'il comprend au moins une fraction protéique laitière selon l'une quelconque des revendications 25 à 33.

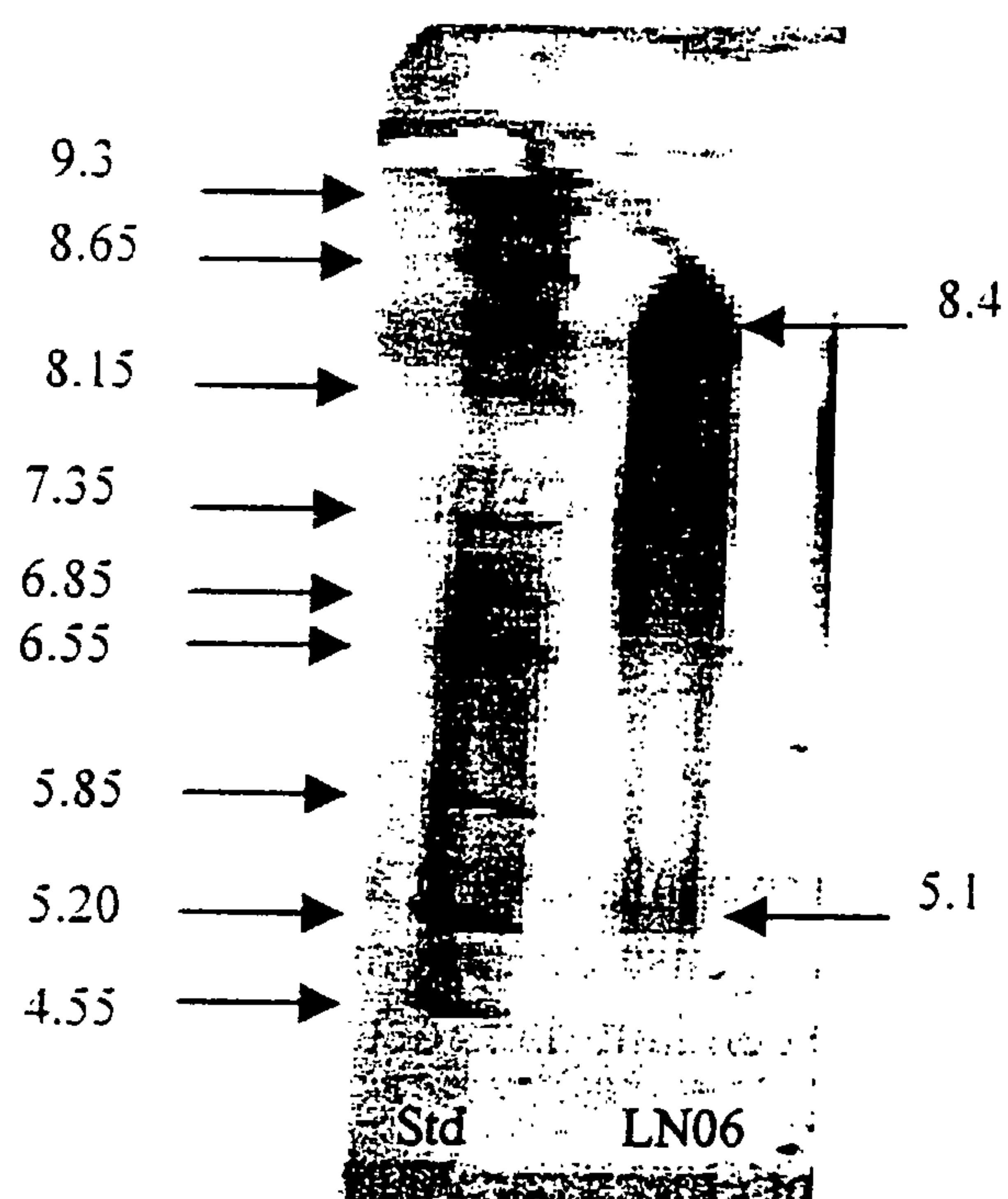


Figure 1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
2 December 2010 (02.12.2010)(10) International Publication Number
WO 2010/136204 A1

(51) International Patent Classification:

H01M 4/86 (2006.01) *B41M 1/10* (2006.01)
H01M 4/88 (2006.01) *B41N 1/06* (2006.01)
H01M 8/10 (2006.01) *G03F 5/20* (2006.01)

WILLERT, Andreas [DE/DE]; Sandgrubenweg 3,
 09127 Chemnitz (DE). **SIEGEL, Frank** [DE/DE]; West-
 strasse 55, 09112 Chemnitz (DE). **KOHL, Albert**
 [DE/DE]; Schlossstrasse 26, 67229 Laumersheim (DE).

(21) International Application Number:

PCT/EP2010/003226

(74) Agent: **STARZ, Karl-Anton**; Umicore AG & Co. KG,
Postfach 13 51, 63403 Hanau-Wolfgang (DE).

(22) International Filing Date:

27 May 2010 (27.05.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

102009023160.9 29 May 2009 (29.05.2009) DE
 09010356.5 12 August 2009 (12.08.2009) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **SOLVI-
 CORE GMBH & CO. KG** [DE/DE]; Rodenbacher
 Chaussee 4, 63457 Hanau-Wolfgang (DE).

(72) Inventors; and

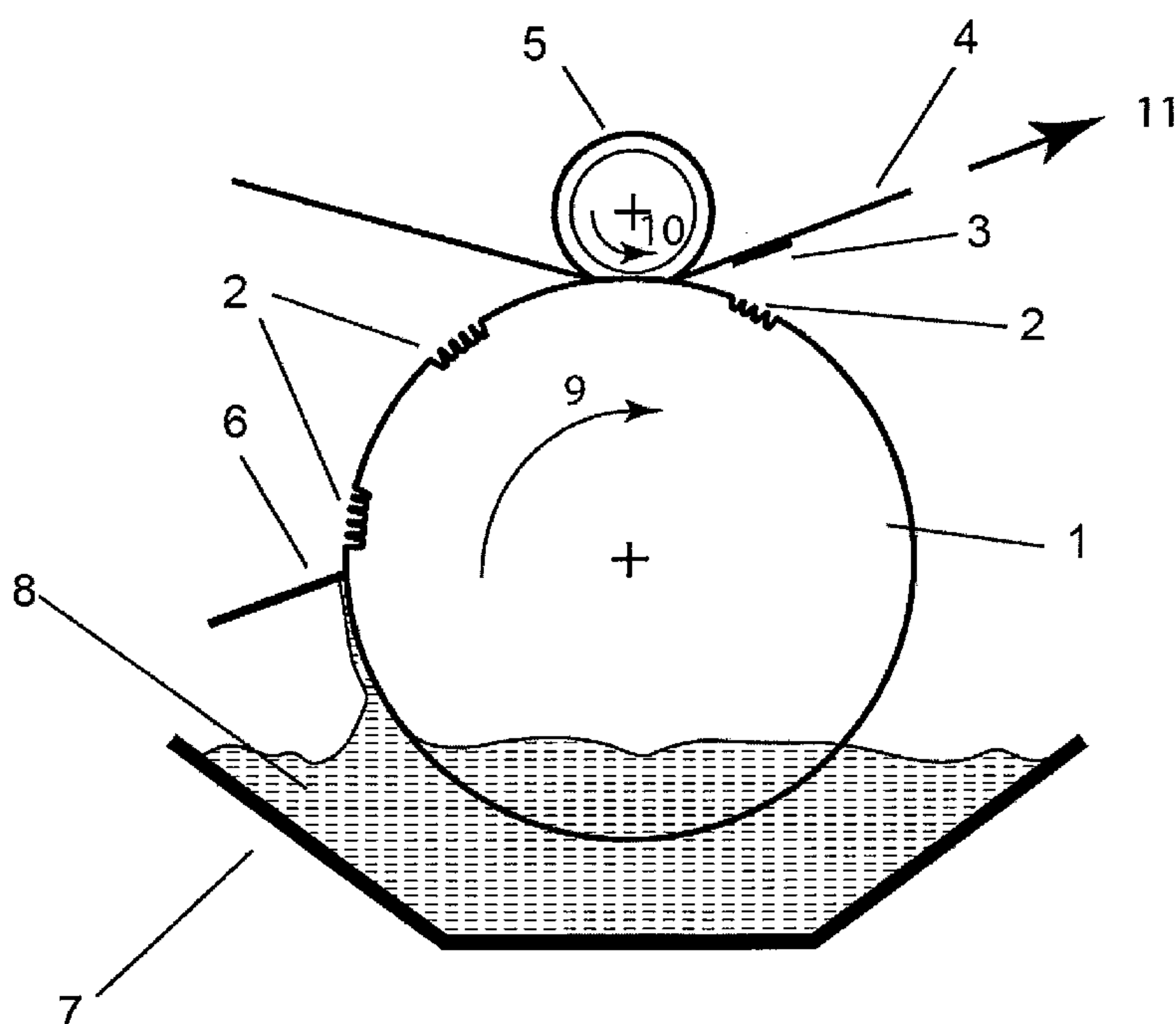
(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAUMANN, Rein-
 hard** [DE/DE]; Mitterweg 15c, 82152 Krailling (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
 kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
 AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
 CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ,
 EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
 HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
 KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
 MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
 NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
 SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
 TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
 kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
 GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
 ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CATALYST LAYERS FOR FUEL CELLS

Figure 1

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing continuous catalyst layers on substrate materials by gravure printing with the aid of catalyst-containing inks, a printing plate being used which has at least one print image with an interrupted line screen whose longitudinal lines are arranged at an angle α of from 10 to 80° relative to the printing direction. Preferably, the print images have dip volumes in the range from range from 100 to 300 ml/m². The catalyst layers produced are cohesive and continuous and have dry layer thicknesses in the range from 1 to 20 μ m, preferably in the range from 2 to 15 μ m.

WO 2010/136204 A1

TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:
— with international search report (Art. 21(3))

Declarations under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

Method for producing catalyst layers for fuel cells

Description

The present invention relates to a method for producing fuel cell
5 components, in particular a gravure printing method for producing catalyst
layers, electrodes and membrane electrode units ("MEUs") for polymer
electrolyte membrane fuel cells ("PEM fuel cells").

Fuel cells convert a fuel and an oxidizing agent in separate locations
from one another at two electrodes into electricity, heat and water. As a
10 rule, hydrogen or a hydrogen-rich gas serves as fuel and oxygen or air as
the oxidizing agent. The process of energy conversion in the fuel cell is
distinguished by a particularly high efficiency. For this reason, fuel cells in
combination with electric motors are becoming increasingly important as an
alternative to conventional internal combustion engines. Owing to its
15 compact design, its power density and its high efficiency, the PEM fuel cell is
suitable for use as an energy converter in motor vehicles.

The PEM fuel cell consists of a stack of membrane electrode units
("MEU"), between which bipolar plates for gas supply and current discharge
are arranged. A membrane electrode unit consists of a solid polymer
20 electrolyte membrane which is provided on both sides with catalyst-
containing reaction layers. One of the reaction layers is in the form of an
anode for the oxidation of hydrogen and the second reaction layer is in the
form of a cathode for the reduction of oxygen. So-called gas diffusion layers
(GDLs) comprising carbon fiber paper or carbon felt which promote good
25 access of the reaction gases to the electrodes and good discharge of the cell
current are applied to these reaction layers. Anode and cathode contain
so-called electrocatalysts which catalytically support the respective reaction
(oxidation of hydrogen at the anode or reduction of oxygen at the cathode).
Catalytically active components used are as a rule the noble metals,
30 preferably the metals of the platinum group of the Periodic Table of the

Elements (PGMs). The majority of so-called supported catalysts used are those in which the catalytically active platinum group metals were applied in highly dispersed form to the surface of a conductive support material.

The polymer electrolyte membrane consists of proton-conducting polymer materials. These materials are also referred to below as ionomers for short. Preferably, a tetrafluoroethylene-fluorovinyl ether copolymer having acid functions, in particular sulfo groups, is used. Such materials are marketed, for example, under the trade name Nafion® (E.I. du Pont) or Flemion® (Asahi Glass Co.). However, other, in particular fluorine-free, ionomer materials, such as sulfonated polyether ketones or aryl ketones or polybenzimidazoles, can also be used. Moreover, ceramic membranes and other high-temperature materials can also be used.

The performance data of a fuel cell depend decisively on the quality of the catalyst layers applied to the polymer electrolyte membrane. These layers are generally highly porous and usually consist of an ionomer and a finely divided electrocatalyst dispersed therein. Together with the polymer electrolyte membrane, so-called three-phase interfaces form in these layers, the ionomer being in direct contact with the electrocatalyst and the gases led to the catalyst particles via the pore system (hydrogen at the anode, air at the cathode).

In view of a broad market penetration of the fuel cell technology in the mobile sector, a substantial reduction in the costs for the production of fuel cells, in particular of electrodes and membrane electrode units, is necessary.

Standard methods which permit coating speeds (or production speeds) in the range from 0.5 m/min to 2 m/min (= 0.008 to 0.03 m/s) have been used to date for producing membrane electrode units. These are, for example, screen printing methods or knife coating methods. Substantially higher production speeds are required for use for mass production.

Coating methods having substantially higher speed are known from the area of print media. In this context, gravure printing technology is of particular interest. Gravure printing is used as a mass printing method in the printing of periodicals with long print runs and in the printing of
 5 packaging paper, decorative paper and securities. In the standard gravure printing method, screen patterns or dot patterns are produced but not cohesive areas.

The gravure printing method is of interest in particular because of the achievable high production speeds for mass production of fuel cell
 10 components. It permits a continuous process for substrate coating; moreover, the substrates can be coated in discrete patterns (printed images) or in solid, cohesive form in gravure printing.

The mode of operation of the gravure printing method is well known to the person skilled in the art in the area of printing technology. A detailed
 15 discussion in this context is to be found in Helmut Kipphan (editor), Handbuch der Printmedien - Technologien und Produktionsverfahren [Handbook of print media - technologies and production processes], Springer-Verlag, Berlin (2000). The general principle of gravure printing is shown in **Figure 1**.

20 There, the meanings are as follows (cf. DIN 16528 - Begriffe für den Tiefdruck [Definitions for gravure printing] in this context):

- | | | |
|----|----|--|
| | 1 | printing plate cylinder (printing plate) |
| | 2 | print image |
| | 3 | print motif (printed catalyst layer) |
| 25 | 4 | substrate material |
| | 5 | impression cylinder |
| | 6 | doctor with doctor blade |
| | 7 | ink reservoir (inking system) |
| | 8 | printing paste (ink, dispersion) |
| 30 | 9 | direction of rotation of printing cylinder |
| | 10 | direction of rotation of impression cylinder |

11 direction of movement of substrate material (printing direction)

In principle, in gravure printing, the ink present in an ink reservoir (7) is transferred to a roller-like printing plate cylinder (1) which moves in the direction of rotation (9). In the present application, this cylinder is referred to as "printing plate" or "sleeve". Print images or screen areas (2) are introduced as cells on the printing plate (1). The printing paste/ink (8) flows into the cells of the print image (2) and fills them. With the aid of a doctor having a doctor blade (6), the excess printing paste/ink (8) is scraped off the printing plate. Thereafter, the printing paste/ink remaining in the cells of the print image (2) is transferred by means of an impression cylinder (5) to the surface of a substrate (4). The impression produced by the printing process or the layer (3) produced on the substrate (4) is referred to as print motif (3) in the present application.

15 Alternatively, the doctor (6) and the ink reservoir (7) can be combined and may be in the form of a closed inking system (for example in the form of a "chambered doctor blade system"). The ink supply then takes place via a chamber. Supernatant material is scraped off with a doctor blade which runs directly on the surface of the printing plate cylinder (1). The arrangements of the ink chamber and doctor blade system are arbitrarily variable.

As is evident from **Figure 2**, a plurality of print images (2) can be provided on the printing plate cylinder (1). The number of print images is dependent on the available area of the printing plate cylinder and the size of the individual print images.

Figure 3 shows an individual print image (2) in detail. The various bars (12) which form a screen or a screen structure are evident. This figure shows by way of example a line screen having additional transverse lines; however, all other screen structures according to the invention are also possible. The bars (12) represent partitions which separate the cells of a

gravure printing plate from one another and, on scraping by the doctor blade (6), serve as a support for the latter.

Gravure printing permits a variable geometry of the desired print motif (3), i.e. elliptical or circular catalyst layers (print motifs) can also be produced in addition to rectangular ones. The amount of ink/paste transferred is determined by the dip volume of the printing plate (1) or the individual print images (2). High reproducibility of the layer thickness of the individual print motifs is obtained.

The use of gravure printing methods for producing electrodes and fuel cell components has already been proposed. Thus, DE 195 48 422 teaches a continuous production of material composites (i.e. MEU laminates) for fuel cells, screen printing, raised relief printing and gravure printing being used as coating methods. EP 1,037,295B2, too, discloses a method for applying electrode layers to a strip-like polymer electrolyte membrane for fuel cells. Screen printing is preferably used as the printing method. In both documents, the gravure printing method is mentioned but not described further.

US 6,967,038B2 and US 7,316,794 describe the production of catalyst-coated membranes by a flexographic raised relief printing method. This method comprises the use of preformed plates having raised reliefs which define the print motif. Catalyst paste is applied to the raised relief and is then transferred to the membrane. Disadvantages of this printing method are the inhomogeneous layer thickness and the poor edge definition of the print motifs.

US 6,280,879 discloses a method for producing electrode/current collector laminates for electrochemical apparatuses, in particular Li polymer batteries. The patent teaches a method for producing thick layers of an electrode material on a current collector foil with the aid of the gravure printing method.

US 2004/0221755A1 describes a gravure printing method for producing multilayer ceramic capacitors. Electrode paste is applied in the form of rectangular print motifs to a ceramic foil. Each print image ("image area") has bounding lines both parallel and perpendicular to the printing direction. As a result, individual cells are formed in the print images; nothing is known about the dip volume or the etch depth of these cells. The method is suitable in particular for highly viscous pastes containing metal powder.

WO 03/054991 A1 describes a gravure printing method for coating a fuel cell membrane with catalyst. The catalyst layers produced thereby are not homogeneous but have a multiplicity of three-dimensional structural units. The individual screen structures of the print image are present again in the catalyst layer. Owing to the lack of a continuous structure and the inhomogeneous layer thickness, the catalyst layers thus produced are not very suitable for PEM fuel cells.

EP 344089 A1 discloses a process for applying a fuel cell electrolyte matrix on an electrode by intaglio gravure printing. A conventional cell shape of a quadrangular pyramide is used.. Such screens create a typical saw-chain structure at the edges of the printed image and the edge definition is not satisfactory..

WO 01/32422 A1 and DT 2624930 A1 describe a gravure printing equipment with conventional criss-cross line screens. Such screens are well known and state of the art in the graphic industry. They are not suitable for printing of thick and continuous layers, as the dip volume and the etch depth is too low and the typical cell structure (truncated pyramid) do not provide an adequate ink transfer and leveling process.

It is therefore an object of the present invention to provide an improved gravure printing method by means of which catalyst layers having a cohesive, continuous structure can be produced. The method should be capable of being operated continuously, should permit a high printing speed or production speed and should be capable of being used both for direct

coating of ionomer membranes and for coating of other substrate materials (transfer picture substrates, decals, PET films, coated papers, carbon fiber cloth, etc.). The catalyst layers produced by the method should show good electrical power in the fuel cell.

5 This object is achieved by the method according to the present claims. Preferred embodiments of the method are mentioned in the dependent claims. Furthermore, a printing plate according to the invention is claimed.

10 The present invention relates to a gravure printing method for producing catalyst layers on substrate materials with the aid of catalyst-containing inks, wherein a printing plate is used which contains at least one print image which has an interrupted line screen. The longitudinal lines of this interrupted line screen are arranged at an angle α of from 10° to 80° , preferably at an angle α of from 20° to 70° , relative to the printing
15 direction.

20 In a possible embodiment of the method, the printing plate (or the print image) has a dip volume in the range from 100 to 300 ml/m², preferably in the range from 150 to 250 ml/m². In a further possible embodiment, the printing plate (or the print image) has an etch depth in the range from 100 to 250 μm , preferably in the range from 120 to 200 μm .

25 The catalyst layers produced by the method according to the invention should be cohesive or continuous. They should have a dry layer thickness in the range from 1 to 20 μm , preferably in the range from 2 to 15 μm and particularly preferably in the range from 5 to 10 μm .

30 It has been found that this object can be achieved by providing suitable printing plates or print images. The experiments showed that the dry layer thickness necessary for the catalyst layer can be achieved if a sufficient amount of catalyst ink is transferred to the substrate. As a result, it was found that the printing plate (or the print image) should have a certain dip volume. The printing plates (or print images) suitable for the

method according to the invention have dip volumes in the range from 100 to 300 ml/m²; dip volumes in the range from 150 to 250 ml/m² are particularly suitable. This ensures that a sufficient volume of catalyst ink is transferred to the substrate. In the case of dip volumes which are too high,
5 the ink is difficult to scrape off and this leads to print images which are not sharp (i.e. streaks outside the print images).

As was furthermore found in the experiments for the present invention, a printing plate (or print image) having an etch depth (H) in the range from 100 to 250 µm, preferably in the range from 120 to 200 µm, is
10 necessary in order to achieve the desired dry layer thicknesses. These values are substantially above the printing plates used in gravure printing, whose etch depths are in the range from 10 to 50 µm.

Conventional gravure printing plates, such as criss-cross line screens or dot screens, have, as a rule, dip volumes of up to 40 ml/m². Such
15 screens have a large number of regularly arranged cells which are filled with ink. In the printing process, the ink which has flowed into the cells is transferred to the substrate. In the course of the work, it was found that such conventional criss-cross line screens or dot screens are not very suitable for achieving the necessary dry layer thicknesses.

20 A further substantial aspect is the provision of a suitable screen structure or screen geometry for the printing plate. The screen structure suitable for the method according to the invention should occupy only a minimum volume in the transfer region on the printing plate (or in the print image) but should have a sufficient support function for the doctor (or the
25 doctor blade) and permit good transfer of the ink to the substrate.

Surprisingly, the use of interrupted line screens has proven advantageous.

Such interrupted line screens have geometrical structural units which possess different length and width dimensions and different angles,

optionally in combination. Within a print image, these structural units are repeated both one behind the other (i.e. in the x direction) and one above the other (i.e. in the y direction). The catalyst ink is present in the intermediate spaces between the individual lines or bars (12) of the print image (2) and is transferred to the substrate during the printing process. **Figures 4, 5, 6 and 7** schematically show the structure of the printing plates or print images according to the invention with linear screen structures. Below, the meanings are as follows:

L	= length of a longitudinal line
B	= width of a longitudinal line
A1, A2	= line spacings
Z	= intermediate space between two lines of a row
V, V1, V2	= row offset (positive and/or negative)
α	= angle between printing direction and longitudinal line

In principle, two stated angles which define the respective direction of rotation (+ α and - α) are possible for the angle α which defines the angle between the printing direction and the longitudinal lines. They result from the reflection of this angle at the printing direction as an axis. In the present patent application, the stated angle α comprises both directions of rotation or possibilities, especially since no observable differences in the arrangement of the line screen at the original or the reflected angle α relative to the printing direction have been found.

A further parameter for characterization of a gravure printing plate is the screen ruling F, defined in lines per unit of length (e. g. L/cm). The screen ruling is reciprocal to the sum of line spacing (A1, A2) and the width of the line next to the spacing (B) according to the following relationship:

$$F = 1 / A + B$$

In the case of different line spacings (A1 and A2), the screen ruling F is calculated as follows:

$$F = 1 / \frac{1}{2} (A1 + B + A2 + B) = 2 / (A1 + B + A2 + B)$$

For the printing plates or print images according to the present invention, the suitable values for the screen ruling F should be in the range of 5 L/cm to 20 L/cm, preferably in the range of 7 L/cm to 15 L/cm.

5 **Figure 4** shows an example of an interrupted line screen which has only parallel longitudinal lines but no transverse lines. In this example, the row offset V of the longitudinal lines is positive in each case, i.e. is in the form of an overlap.

10 **Figure 5** shows an example of an interrupted line screen with longitudinal lines which have both a positive offset ($V1$) and a negative offset ($V2$), i.e. a gap.

15 **Figure 6** illustrates an example of an interrupted line screen with longitudinal lines and transverse lines. The longitudinal lines are oriented with the angle α in the printing direction while the transverse lines are arranged at a certain angle β to the longitudinal lines. Here, the meanings are additionally as follows:

20	QL	= length of the transverse line
	QB	= width of the transverse line
	QZ	= intermediate space between transverse line and longitudinal line
	β	= angle between transverse line and longitudinal line.

25 **Figure 7** likewise shows a line screen with longitudinal lines and transverse lines. The longitudinal lines are oriented at an angle α relative to the printing direction while the transverse lines make a certain angle β with the longitudinal lines and no intermediate space QZ is present between transverse line and longitudinal line (i.e. $QZ = 0$).

In principle, all parameters, in particular lengths L , QL and widths B , QB and the row offset V , the intermediate space Z , the line spacing A and

the angles α and β , are variable. Within a print image, these screen structures are repeated but they can also be varied within a print image in order, for example, to achieve better edge definition at the edge of the print image (for example in edge/center variations). In the extreme case, all
 5 these parameters can be arranged stochastically, comparable with stochastically frequency-modulated screens ("FM screens") in the graphic arts industry. The following ranges have proven advantageous for the parameters:

	L	= from 1 to 20 mm, preferably from 1 to 15 mm
10	B, QB	= from 0.05 to 0.5 mm, preferably from 1 to 0.5 mm
	A1, A2	= from 0.5 to 2 mm
	Z	= from 0.1 to 10 mm
	V	= (+/-) 0.1 to 10 mm
	QL	= from 0.1 to 4.5 mm
15	QZ	= from 0 to 2.5 mm
	α	= from 10° to 80°, preferably from 20° to 70°
	β	= from 5° to 175°, preferably from 60° to 120°.

As a rule, thinner line structures are preferable to the broader structures in the method according to the invention since the broader
 20 structures prevent the formation of a self-leveling, homogeneous film. The line widths B (longitudinal lines) and QB (transverse lines) should be in the range from 0.1 to 0.5 mm. Furthermore, it has been found that, in the case of line lengths L of the longitudinal lines in the range from 0.1 to 20 mm, preferably in the range from 1 to 15 mm, good support of the doctor blade
 25 and hence a good printed copy are achieved. For the line lengths of the transverse lines (QL), values in the range from 0.1 mm to 4.5 mm have proven most useful. (Minimum value for QL: width of a longitudinal line (B); maximum value for QL: sum of the values B + A1 + A2.) Excessively long line structures have proven disadvantageous. They result in transport of the
 30 ink in the printing direction owing to the adhesion of the ink to the doctor blade (ink "dislocation").

The suitable dimensions for the parameter Z (= intermediate space between two lines of a row) are in the range from 0.1 to 10 mm; suitable values for V (= row offset between the line rows) are in the range from 0.1 to 10 mm. The row offset V may be in the form of either an overlap (i.e. positive) or a gap (i.e. negative).

The interrupted line screens are arranged in the longitudinal direction (i.e. based on the length L) at an angle α of from 10° to 80° , preferably at an angle α of from 20° to 70° , relative to the printing direction. The optional transverse lines QL are arranged at an angle β relative to the longitudinal lines L , the angle β being in the range from 5° to 175° , preferably in the range from 60° to 120° . Longitudinal lines and transverse lines can, however, also meet one another at an angle β , a hook-shaped screen being formed (cf. **Figure 7**).

In a further embodiment of the present invention, line screens with a flexible design structure can be used. It was found that by modifications of the line screen with different structures at the rim of the print image, a better edge definition in the printed motif (the layer on the substrate) can be achieved. To improve the ink transfer, the use of screens with semi-circles (**Figure 8a**), rounded triangles (**Figure 8b**), sinus waves (**Figure 8c**) or polygons (**Figure 8d**) is also suitable.

Mainly at the beginning and at the end of the print image, a dislocation of the printing ink is observed. It was found that this effect can be prevented by the use of screens with longer transversal lines in this region. **Figure 9** shows the modification of the length of the transversal lines (QL) against the printing direction. **Figure 9a** illustrates a print image on the gravure printing plate and the printing direction. It should be noted that the length of the transversal lines QL is decreasing towards the middle of the print image. Furthermore, the length of the transversal lines QL is decreasing and increasing in printing direction. For better illustration, **Figure 9b** shows a magnified section of **Figure 9a** with labeled L and QL .

The line screens with transversal lines mentioned above (e. g. **Figure 3** and **Figures 5** to **9**) provide smaller transversal lines compared to the longitudinal lines ($QL < L$). For this reason, the line screens have a preferred orientation in the printing direction.

5 In summary, it was found that, by means of the screen structures according to the invention, the transport movement ("dislocation") of the ink within the printing plate or the print image is reduced and a uniform print motif is achieved. Further advantages are the greater edge definition of the print motif, the stabilization of the doctor and the lower level of wear
10 (e.g. abrasion, damage to bars, etc.) of the printing plate cylinder.

In a preferred embodiment of the present invention, a chambered doctor blade system is applied. This system improves the ink distribution on the gravure cylinder and helps to prevent the evaporation of ink solvents in the ink reservoir. In general, a chambered doctor blade system comprises a
15 chamber where the ink is filled in, an operative doctor blade and a closing doctor blade. Normally, the closing doctor blade is angled against the direction of rotation (i.e. negatively angled). It was found by the inventors, that, in order to prevent catching of the doctor blade, it is advantageous to set the closing doctor blade in the direction of rotation, i.e. identical to the
20 operative doctor blade. Furthermore, the chamber should envelop a major part of the gravure printing plate cylinder in order to maximize the real inking time and to decrease the evaporation of ink solvents.

The catalyst layers produced with the printing plates or print images according to the invention are cohesive and continuous. They generally
25 have a dry layer thickness in the range from 1 to 20 μm , preferably in the range from 2 to 15 μm and particularly preferably in the range from 5 to 10 μm . In the standard gravure printing method, screen patterns or dot patterns are usually produced but not cohesive areas. With the method according to the invention, on the other hand, catalyst layers having a
30 cohesive, continuous structure can be produced. In the resulting print motif,

only a negligible surface structure is detectable; the catalyst layers have little surface roughness.

The production of printing plates, printing plate cylinders, print images and screen structures is known to the person skilled in the art in the area of gravure printing technology. The print images required for the method according to the invention and having interrupted line screens are exposed on a printing plate cylinder (or sleeve cylinder) and then etched to the desired depth in the range from 50 to 250 μm , preferably in the range from 100 to 200 μm . Diameter and circumference of the printing plate cylinder or sleeve cylinder are dependent on the type of gravure printing press and can be varied within wide limits. The finished printing plate sleeve is drawn onto the sleeve cylinder for the printing process so that the dimensional stability necessary for the printing process is present.

In principle, any catalyst pastes or catalyst inks having a very wide range of compositions can be used for the method according to the invention. The catalyst inks suitable for the method contain in principle at least one catalyst material, at least one ionomer material and at least one solvent. All catalysts known in the area of fuel cells, in particular electrocatalysts, can be used as catalyst materials. In the case of supported electrocatalysts, a finely divided, electroconductive material is generally used as a support, whereby carbon blacks or graphites, but also conductive oxides, can preferably be used. The noble metals, preferably the elements of the platinum group of the Periodic Table of the Elements (Pt, Pd, Ru, Rh, Os, Ir) or alloys thereof, serve as a catalytically active component. The catalytically active metals may contain further alloy additives, such as, for example, cobalt (Co), chromium (Cr), tungsten (W) or molybdenum (Mo). As a rule, supported catalysts (e.g. 40% by weight of Pt/C) in which the catalytically active platinum group metals are applied in finely divided form to the surface of a conductive carbon black support are used. For the production of the electrode layers, however, support-free catalysts, such as, for example, platinum blacks or platinum powder having a large surface area, can also be used.

As a rule, proton-conducting polymer materials are used as ionomer material. A tetrafluoroethylene-fluorovinyl ether copolymer having acid functions, in particular having sulfo groups, is preferably used. Such materials are marketed, for example, under the trade name Nafion® (Du
5 Pont) or Flemion® (Asahi Glass Co.). Many fluorine-containing ionomer materials are obtainable in the form of solutions or dispersions in different concentrations. In addition, ionomers having different equivalent weights (EW) are also available from various manufacturers.

For achieving a homogeneous layer having a uniform layer structure,
10 good leveling or "spreading" of the individual ink deposit after application should be achieved. For the gravure printing method according to the invention, catalyst inks having adapted rheological properties (i.e. adapted viscosity) should therefore be used. The viscosity of the inks should advantageously not be too high so that, after application, a certain leveling
15 on the substrate material is possible. The solids content of the catalyst ink should, however, also not be too low, so that the required dry layer thickness can be achieved.

Suitable catalyst inks or catalyst dispersions have a viscosity in the range from 50 to 1000 mPa·s, preferably in the range from 50 to 900 mPa·s
20 and particularly preferably in the range from 150 to 400 mPa·s (at a shear rate of $D = 1000 \text{ s}^{-1}$, measured using a plate/cone viscometer). For the measurements for the present application, a plate/cone viscometer of the type MCR 300 from the company Physica (from Anton Paar GmbH, D-73760 Ostfildern) was used. However, devices of other manufacturers can also be
25 used.

Suitable inks have a solids content (i.e. the sum of catalyst fraction and ionomer fraction) from 3 to 20% by weight, preferably from 5 to 20% by weight and particularly preferably a solids content from 7 to 16% by weight (measured in each case by the loss on drying, based on the total
30 weight of ink taken). The loss on drying is determined on drying in a circulation drying oven at 120°C for 60 minutes.

In principle, all organic solvents which are suitable for catalyst inks which are processed in coating methods, in particular printing methods, can be used as solvents. Water-containing catalyst inks are preferred from environmental points of view and with regard to work safety.

5 The present invention provides a gravure printing method for producing continuous, cohesive catalyst layers on a very wide range of substrate materials. The printing parameters which are advantageous for the method according to the invention, such as production speed, throw-on angle of the doctor blade, doctor blade contact pressure, impression
10 cylinder pressure and impression cylinder hardness, are stated below.

The impression cylinder is pressed onto the printing plate cylinder with a pressure from 2 to 10 bar, preferably from 3 to 6 bar. The impression cylinder hardness is usually in the range from 50 to 100 Shore. As a rule, a contact pressure of the doctor of from 1 to 2 bar is employed.
15 The web speed (or printing speed) is in the range from 0.02 to 3 m/s, preferably in the range from 0.1 to 1 m/s. As a rule, stainless steel or plastic is used as material for the doctor or doctor blade. The throw-on angle of the doctor is in the range from 50 to 85°, preferably in the range from 60 to 83° (measured to the cylinder tangent of the printing plate
20 cylinder). Such doctor angles give good results with the use of the catalyst inks according to the invention.

In a particular embodiment, a gravure printing unit having a closed inking system (i.e. chambered doctor blade system) is used. As a result, evaporation effects due to volatile solvents in the printing ink are avoided.

25 In principle, all strip-like ionomer membranes (in supported or unsupported form, as composites, as laminated membranes or as multilayer membranes), treated or untreated plastics films (polyesters, PET, polyamides, polyimides, etc.), transfer picture substrates ("decal substrates"), coated and/or treated papers, laminated films, but also carbon
30 fiber substrates (such as, for example, carbon fiber webs, woven carbon fiber fabrics or carbon fiber papers) can be used as substrate materials.

Suitable substrate materials should have little surface roughness and low thermal expansion, in order to ensure stable web running during printing and during the subsequent drying.

The drying after the printing can be effected by a batchwise and/or
5 continuous method. For batchwise operation, drying ovens or drying cabinets are suitable; for continuous operation, it is possible to use, for example, continuous belt dryers, which can be integrated in the gravure printing unit. Preferably, the drying of the substrate web is effected by the in-line method using hot-air dryers or IR dryers. The temperature of the
10 drying is typically from 20 to 150°C, and the drying parameters should be adapted to the respective method and are in general from a few seconds to several minutes.

As already mentioned, the catalyst layers produced by the method according to the invention are cohesive and continuous. They are as a rule
15 opaque, i.e. they have a low light transmittance when viewed in the transmitted light mode. In the present application, the surface roughness is used as a measure of the homogeneity and the continuous structure of the applied catalyst layer. The surface texture is measured by the profile method according to DIN EN ISO 4287 (October 1998) via the
20 determination of the R_a value (= the arithmetic mean of the profile ordinates). For this purpose, the surface roughness is determined over a measuring distance of 1 mm length on a smooth substrate (PET film) and in each case the R_a value is determined. The mean value of three measurements is calculated and is stated as the value. The device used is a
25 tactile profilometer (tactile roughness measuring device). The measurements for the present application were carried out using the Veeco Dektak 8 (Veeco Instruments Inc; Plainview, NY 11803, USA). However, other devices can also be used for this purpose.

The catalyst layers produced furthermore have a dry layer thickness
30 in the range from 1 to 20 μm , preferably in the range from 2 to 15 μm and

particularly preferably in the range from 5 to 10 μm . The determination of the dry layer thickness is also effected using a profilometer (Veeco).

The layers produced according to the invention are cohesive and continuous and have low surface roughness. Typically, the R_a value is in the
5 range of $< 10\%$ of the respective dry layer thickness. This means that catalyst layers having a thickness of 1 μm have an R_a value of $< 0.1 \mu\text{m}$, while catalyst layers having a thickness of not more than 20 μm have an R_a value in the range $< 2 \mu\text{m}$. The layers produced in the examples and having a thickness of about 8 μm accordingly have R_a values in the range
10 $< 0.8 \mu\text{m}$.

An advantage of the gravure printing method according to the invention lies in the achievement of high printing speeds (or web speeds), values of from 0.02 to 3 m/s, preferably in the range from 0.1 to 1 m/s, being achieved. Furthermore, the method can be operated continuously and
15 the drying process can be integrated into the method (for example as a roll-to-roll process). Production speeds of from 0.02 to 3 m/s, preferably from 0.1 to 1 m/s, are achievable thereby. Moreover, continuous, automated MEU production in which further steps, such as, for example, isolation, cutting to size and lamination of the substrates, are included is possible.

20 With the catalyst layers produced by the method according to the invention, membrane electrode units were produced and were tested in PEM fuel cells. The electrical performance values of the MEUs produced according to the invention are comparable with the values which are achieved with MEUs which are produced in the conventional production process.

25 The method according to the invention is to be described in more detail in the following examples.

Examples

General preliminary remarks

The experiments are effected on a laboratory gravure printing unit developed by ourselves, at room temperature and relative humidity of 30 - 50% relative humidity. In the case of the experiments carried out here, the sleeve cylinder produced has a diameter of 220 mm and hence a circumference of 691.2 mm. The finished printing plate sleeve is drawn onto the sleeve cylinder with the aid of compressed air for the printing process. Print images (screen segments) having a geometrical size of 3 x 3 cm² and 3 x 5 cm² are used. The printing plates used were produced by Sächsische Walzengravur GmbH (SWG, D-09669 Frankenberg). The web width is 35 mm. The gravure printing is effected using an chambered doctor blade system, a throw-on angle of 60° to the cylinder tangent being used. The printing ink supply is performed via a printing tank having a container pressure of 1.0 bar.

Example 1

Production of Pt catalyst layers on a decal substrate

A Pt-containing catalyst ink "DS4/type 31" (containing a carbon black-supported Pt catalyst of the type 20% by weight Pt/C and ionomer and organic solvents) is processed on the laboratory gravure printing press at a temperature of 21°C and relative humidity of 30%.

The viscosity of the ink is 350 mPa·s @ $D = 1.000 \text{ s}^{-1}$ (measured with Physica MCR 300). The solids content is 13% by weight.

Experimental parameters:

Substrate:	decal film (polyester film, 80 µm thickness)
Printing speed:	0.125 m/s
Etch depth of printing plate:	180 µm
Screen structure:	long line screen (interrupted)
	angle $\alpha = 45^\circ$

20

		$A1 = 0.5 \text{ mm}$
		$A2 = 2 \times A1 = 1.0 \text{ mm}$
		$B = 0.3 \text{ mm}$
		$L = 12 \text{ mm}$
5		$Z = 8 \text{ mm}$
		$V1 = 5 \text{ mm}$
		$V2 = - 0.5 \text{ mm}$ (negative offset)
		$F = 10 \text{ L/cm}$ (screen ruling)
	Drying:	40 s at 100°C (continuous drier)
10	Active area:	about 10 cm ² (after printing)
	Dry layer thickness:	8 μm
	Roughness:	cohesive, opaque layer
		$R_a = 0.66 \text{ μm}$ (PET substrate, mean value) (Veeco Dektak 8)
15	Active area:	about 10 cm ² (after printing)

Electrochemical test:

Two print motifs printed on the decal film (active area 10 cm²) are relaminated with the front and back of an ionomer membrane (type Nafion[®] 112, thickness 50 μm, H⁺ form). The catalyst-coated membrane is processed with suitable GDLs ("gas diffusion layers") to give a 5-layer membrane electrode unit (MEU) and measured in a PEM fuel cell (single cell) in hydrogen/air operation (pressure 1 bar abs). The electrochemical performance of this MEU is comparable with the performance of an MEU produced in the standard printing method.

Example 2Production of Pt catalyst layers in the gravure printing method

The catalyst ink "DS4/type 31" is processed as described in example 1 on the laboratory gravure printing press. The printing plate used is a short line screen. The geometrical dimensions are stated below.

Screen structure: short line screen (interrupted)

angle $\alpha = 25^\circ$

$A1 = A2 = 0.4 \text{ mm}$

$B = 0.3 \text{ mm}$

5 $L = 1.5 \text{ mm}$

$Z = 0.5 \text{ mm}$

$V = 0.4 \text{ mm}$

$F = 14 \text{ L/cm}$

A 125 μm thick polyester film (PET) is used as the decal substrate.

10 After drying in the continuous dryer, cohesive, opaque catalyst layers which have a dry layer thickness of 7 - 8 μm are obtained. The roughness R_a is about 0.6 μm .

Comparative example 1 (VB1)

15 Production of layers on a decal substrate in the gravure printing method (conventional criss-cross line screen)

A model ink of the type HWD 06 is processed on the laboratory gravure printing press at a room temperature of 21°C and a relative humidity of 30%. A decal film (polyester film, 80 μm thickness) is used as
20 the substrate. The viscosity of the ink is 250 mPa·s @ 1.000 s⁻¹ (measured with Physica MCR 300). The solids content is 14% by weight.

Experimental parameters:

Printing speed: 0.4 m/s

25 Printing plate: cell depth 53 μm

Dip volume: 17 ml/m²

Screen structure: printing plate DF 1

four-track criss-cross line screen

screen ruling $F = 54 \text{ L/cm}$

30 Layer thickness: about 0.7 μm (not homogeneous)

After drying in the continuous dryer, cohesive, opaque catalyst layers are not obtained. The layer is transparent to light, the individual screen dots being recognizable as a pattern.

5

Comparative Example 2 (VB2)

Production of layers on a decal substrate in the gravure printing method (closed and interrupted line screen at low angle ($\alpha = 3^\circ$))

10

In these experiments, a laboratory gravure printing press was used at a web width of 140 mm. A model ink (type R-07-G, solids content 13% by weight, viscosity 200 mPas @ $D = 1.000 \text{ s}^{-1}$) was employed for printing on a PET substrate. Printing conditions were 19 °C and 40% relative humidity.

15

Experimental parameters:

Printing speed: 0.2 m/s

Etch depth of printing plate: 160 μm

Printing plate: Closed line screen (a)
Interrupted line screen (b)

20

Screen structure (a) and (b): angle $\alpha = 3^\circ$
 $A1 = A2 = 1.1 \text{ mm}$

$B = 0.3 \text{ mm}$

$L = 6 \text{ mm}$

$Z = 1.5 \text{ mm}$

25

$V = 0.5 \text{ mm}$

After drying, the printed electrodes were examined visually. The closed line screen (a) with angle $\alpha = 3^\circ$ shows many print defects, particularly in the middle region and on the edges of the printed motif due to dislocation of the ink by the doctor blade. The printed electrodes made with an interrupted line screen (b) with angle $\alpha = 3^\circ$ revealed some printing defects and a low edge definition.

30

