

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 03.01.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.07.92 Bulletin 92/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SOCIETE EURIAL — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Maugas Jean-Jacques et Le Magnen  
Christine.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Armengaud Ainé.*

⑤4 Procédé de séparation de protéines de lactosérum et produits obtenus.

⑤7 L'invention a pour objet un procédé de séparation de  
protéines de lactosérum caractérisé en ce qu'on utilise  
comme matière première un lactosérum concentré en pro-  
téines, et le cas échéant délipidé, et qu'on isole par précipi-  
tation la  $\beta$ -lactoglobuline, puis, si on le souhaite, les autres  
protéines d'intérêt, par addition séquentielle d'agents préci-  
pitants en milieu acide au lactosérum concentré, puis aux  
phases solubles successivement formées comme co-  
produits des précipités de protéines.

**FR 2 671 351 - A1**



1

PROCEDURE DE SEPARATION DE PROTEINES DE LACTOSERUM  
ET PRODUITS OBTENUS

L'invention a pour objet un procédé de séparation  
5 de protéines de lactosérum et les produits obtenus.

On sait que le lactosérum représente la phase  
soluble du lait après élimination de la fraction caséine. Il  
n'existe pas un seul lactosérum, mais plusieurs, de  
10 compositions différentes suivant la technologie mise en  
oeuvre pour récupérer les caséines. Parmi ces technologies,  
on citera les fabrications fromagères, les procédés de  
fabrication des caséines (acides ou présures), ou encore  
l'utilisation de membranes de microfiltration.

15 Longtemps considéré comme sous-produit de  
l'industrie laitière, cette matière première est actuellement  
bien valorisée et a été le support de nombreux programmes de  
recherches.

20 Les protéines du lactosérum présentent l'avantage  
d'être remarquablement équilibrées en acides aminés. Parmi  
ces protéines, on distingue principalement, en concentration  
décroissante, la  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha$ -lactalbumine, la sérum  
25 albumine bovine, les immunoglobulines, les protéases  
peptones, et la lactoferrine. La fraction protéique  
représente 5 à 10 % de l'extrait sec total. On mesure donc  
l'intérêt de la séparer des autres composants moins  
valorisables tels que le lactose, les lipides résiduels, les  
30 sels minéraux et d'isoler chacun des constituants protéiques,  
compte tenu de leur valeur propre.

Plusieurs techniques permettent de réaliser une  
concentration sélective des protéines du lactosérum comme par  
35 exemple l'ultrafiltration, la filtration sur gel,  
l'adsorption sur des échangeurs d'ions, la précipitation avec  
divers agents, notamment des polyélectrolytes, c'est-à-dire  
des produits comportant plusieurs charges.

Cette dernière technique repose sur la formation d'agrégats macromoléculaires insolubles par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre les protéines du milieu et les agents utilisés.

5

Les principaux agents précipitants mis en oeuvre sont la carboxyméthylcellulose, l'acide polyacrylique, le chlorure ferrique, le polyéthylène-glycol, le chitosane, la bentonite, le lignosulfate, le laurysulfate de sodium.

10

Dans Journal of Science, vol. 52, n° 5, page 1237, 1240, 1987, Mashikh et Nakai décrivent un procédé permettant de diminuer la teneur en  $\beta$ -lactoglobuline de lactosérum de fromage par précipitation à l'aide d'hexamétaphosphate. Par ce procédé, 80 % de  $\beta$ -lactoglobuline sont éliminés par précipitation, le surnageant renfermant en mélange les protéines restantes.

D'autres auteurs ont effectué des séparations de  $\beta$ -lactoglobuline avec  $\text{FeCl}_3$  (voir Kuwata et al., Journal of food science, vol. 50, page 605-609, 1985 et Kaneko et al. dans la même référence page 1531 à 1536).

Ces différents travaux montrent qu'il est possible de précipiter à partir de lactosérum brut une fraction importante de  $\beta$ -lactoglobuline avec certains additifs alors que les autres constituants protéiques du lactosérum restent en solution. Néanmoins, ces procédés ne permettent pas de séparer toutes les protéines du lactosérum et ne restent qu'un moyen de préparer un lactosérum appauvri en  $\beta$ -lactoglobuline.

De plus, la fraction précipitée n'est généralement pas pure et renferme une partie des lipides résiduels du lactosérum qui précipitent également par ces procédés.

Les inventeurs ont constaté qu'il est possible de remédier à ces inconvénients et d'obtenir des protéines de pureté élevée en traitant le lactosérum de manière à lui

conférer des caractéristiques déterminées et en contrôlant spécifiquement les conditions de précipitation pour chaque protéine à séparer.

5 L'invention a donc pour but de fournir un procédé permettant de récupérer à partir de lactosérum, des protéines de grande valeur biologique, sous une forme de pureté élevée.

10 Elle vise également à fournir ces produits purifiés à l'échelle industrielle.

15 Le procédé conforme à l'invention de séparation de protéines de lactosérum est caractérisé en ce qu'on utilise comme matière première un lactosérum concentré en protéines, et le cas échéant délipidé, et qu'on isole par précipitation la  $\beta$ -lactoglobuline puis, si on le souhaite, les autres protéines d'intérêt, par addition séquentielle d'agents précipitants en milieu acide au lactosérum concentré, puis aux phases solubles successivement formées comme co-produits  
20 des précipités de protéines.

25 Par le terme lactosérum, on entend aussi bien un lactosérum doux provenant de fromagerie ou de caséinerie présure qu'un lactosérum acide provenant également de fromagerie ou de caséinerie acide. Il peut s'agir aussi de la phase soluble de lait (microfiltrat) obtenue par microfiltration de lait entier ou écrémé à l'aide d'une membrane. Le lactosérum est obtenu à partir de lait, de colostrum, ou bien est reconstitué à partir de poudre.

30 L'utilisation de lactosérum concentré permet de disposer d'une matière première dont le rapport protéines/extrait sec est plus élevé que dans le lactosérum, avec un rapport matières minérales/protéines favorisant les  
35 séparations envisagées.

A cet effet, on soumet avantageusement le lactosérum à un traitement permettant de disposer d'une phase

soluble débarrassée d'au moins la plupart, sinon la totalité, des constituants non protéiques.

5            Selon une variante, on a recours à au moins une opération d'ultrafiltration en utilisant des membranes qui retiennent spécifiquement les protéines présentes et laissent passer le lactose, les sels minéraux et les molécules azotées de petite taille (fraction azotée non protéique).

10           On opère de préférence à une température supérieure à l'ambiante, notamment de 30° à 60°C environ.

15           Selon une autre variante, le concentré est obtenu par ajout dans un lactosérum brut de protéines de lactosérum concentrées, se présentant plus spécialement sous forme de poudre.

20           Lorsqu'on souhaite augmenter le rapport protéines/extrait sec, on soumet le rétentat d'ultrafiltration à une diafiltration ou analogue.

25           Le rétentat ainsi obtenu présente une concentration d'environ 12 à 90 g, plus spécialement d'environ 20 à 40 g/kg de protéines/kg et un rapport matières azotées/extrait sec de l'ordre de 20 à 70 %, plus spécialement de l'ordre de 30 à 40 %.

30           L'élimination de la fraction lipidique du lactosérum est rendue possible par agrégation thermocalcique ou non des lipides par l'intermédiaire d'ions calcium et élimination des agrégats obtenus par microfiltration ou séparation centrifuge selon les procédés décrits par FAUQUANT et al. dans Le lait 65(1)1-20, 1985 et Maubois et al. dans Bulletin of the IDF 212, chapitre 24, 154-159, 1987.

35           En variante, cette étape est réalisée sur un rétentat obtenu par ultrafiltration de lactosérum comme décrit ci-dessus, avec ou sans ajout de calcium.

La délipidation permet avantageusement d'accroître la pureté des protéines purifiées, ce qui leur confère de meilleures propriétés fonctionnelles.

5 De plus, les lactosérums contiennent souvent des "fines" de caséine qui sont avantageusement éliminées lors de l'étape de délipidation par les techniques physiques employées.

10 Pour isoler de manière sélective les constituants protéiques présents dans le lactosérum concentré, on ajoute séquentiellement aux phases solubles successivement formées, des agents précipitants en milieu acide. Il s'agit avantageusement de polyélectrolytes.

15 Les polyélectrolytes utilisés sont plus spécialement choisis parmi les sels de phosphates ou des dérivés des acides phosphoriques. A titre d'exemple, on citera des polymétaphosphates comme les sels de Graham, 20 l'hexamétaphosphate de sodium, l'hexamétaphosphate de potassium, ou encore des pyrophosphates, des polyphosphates, des sels dérivés de l'acide phosphorique, ou des mélanges de deux ou plusieurs de ces composés.

25 La concentration en polyélectrolytes dans la première étape de séparation dépend de la concentration de  $\beta$  lactoglobuline dans le lactosérum de départ. Elle est, par exemple, de 4 à 20 % en poids environ par rapport à la concentration de la protéine lors de l'utilisation de sels de 30 phosphates, notamment de l'ordre de 5 à 16 % en poids.

L'addition des sels est réalisée avec avantage à une température d'environ 0 à 35°C, de préférence voisine de l'ambiante.

35 Après dissolution des sels dans le milieu, on procède à une acidification pour ajuster le pH à une valeur conduisant à la précipitation de la  $\beta$ -lactoglobuline. Le pH

est avantageusement ajusté dans un intervalle de 4,9 à 4,00 selon les rétentats mis en oeuvre.

5 L'acidification est réalisée par addition d'un acide organique ou minéral, sous agitation. A titre d'exemple, on citera l'acide chlorhydrique, sulfurique, phosphorique pour les acides minéraux et l'acide lactique pour les acides organiques.

10 On observe alors la formation d'un trouble dans la solution et d'un précipité qui décante lorsque l'agitation est interrompue. On procède à la séparation du précipité selon tout moyen approprié.

15 On citera par exemple, l'utilisation d'un décanteur, d'une centrifugeuse, d'un clarificateur, d'une installation de microfiltration ou d'ultrafiltration équipée de membranes présentant un seuil de coupure tel que la phase soluble et les constituants qui la composent passent au  
20 travers de la membrane et la phase précipitée est retenue, ces dispositifs fonctionnant en continu ou non. On peut également opérer par décantation dans un bac ou une cuve, sous l'effet de la pression atmosphérique.

25 Selon la technique de séparation utilisée, la phase précipitée représente de 5 à 20 % en poids environ de la matière première utilisée, plus particulièrement de 8 à 12 % lors de l'utilisation d'un décanteur ou d'un clarificateur, techniques qui seront préférées. La phase précipitée ainsi  
30 obtenue présente un rapport pondéral protéines/extrait sec d'environ 85 à 95 %.

La  $\beta$ -lactoglobuline représente environ 85 à 90 % en poids des protéines de cette phase précipitée lorsque la  
35 matière première n'a pas été délipidée.

En utilisant un rétentat délipidé, la  $\beta$ -lactoglobuline représente jusqu'à environ 90 à 95 % des protéines de la phase précipitée, ce qui montre la

spécificité élevée du procédé de séparation de l'invention au regard de l'isolement de la  $\beta$ -lactoglobuline.

5 Le précipité obtenu peut être remis en solution par addition d'un alcali afin d'obtenir une valeur de pH de l'ordre de 5,5 à 8,0. Comme produit alcalin, on citera la soude, la potasse ou encore l'ammoniaque.

10 Cette solution est séchée par exemple par atomisation ou lyophilisée. En variante, elle est concentrée avant séchage par ultrafiltration et le cas échéant diafiltration ou osmose inverse.

15 La solution de  $\beta$ -lactoglobuline peut aussi être diafiltrée pour augmenter le rapport protéines/extrait sec.

20 Pour extraire, si on le souhaite, les sels utilisés pour provoquer la précipitation, on soumet la solution alcaline de  $\beta$ -lactoglobuline à une chromatographie d'échange d'anions, réalisée selon les techniques classiques. Des résines échangeuses d'anions appropriées comprennent celles commercialisées sous les marques Dowex R 1 x 1, Dowex R 1 x 2, Dowex R 1 x 4, Amberlite R, IRA R 401, et de préférence Duolite R A 102 D.

25 Pour isoler d'autres protéines du lactosérum, on procède comme précédemment décrit pour la première séparation de protéines avec les phases solubles qui se séparent des précipités successivement formés lors de l'addition en milieu acide d'agents précipitants.

30 le co-produit ou phase soluble résultant de la première précipitation contient au moins la majeure partie des autres protéines du lactosérum concentré de départ. Il se présente sous la forme d'un liquide translucide.

Pour récupérer l' $\alpha$ -lactalbumine à partir de cette phase soluble, on ajuste la concentration des agents précipitants qu'elle renferme et son pH.



La concentration en  $\alpha$ -lactalbumine de cette solution dépend de la concentration initiale du rétentat utilisé et conditionne la quantité de polyélectrolytes supplémentaire nécessaire pour provoquer en milieu acide l'agrégation des protéines.

Par exemple, cette quantité varie d'environ 2 à 35 % en poids de la concentration pondérale d' $\alpha$ -lactalbumine dans le cas où le polyélectrolyte utilisé est un sel de phosphate comme l'hexamétaphosphate de sodium.

L'addition des sels est réalisée avantageusement à une température d'environ 0 à 35° C.

Le pH est ajusté après addition des sels à une valeur avantageusement de l'ordre de 2,4 à 4,00.

L'acidification est réalisée par addition d'un acide organique ou minéral sous agitation.

On constate l'apparition d'un trouble dans la solution et la précipitation d'une fraction qui décante lorsque l'agitation est interrompue.

La séparation du précipité est réalisée en utilisant les mêmes procédés que ceux décrits précédemment pour la première séparation.

Après séparation, et selon la technique utilisée pour effectuer cette séparation, la phase précipitée représente de 2 à 20 % environ du poids de la phase soluble mise en oeuvre.

La phase précipitée ainsi obtenue présente un rapport pondéral protéines/extrait sec de l'ordre de 85 à 95 %.

L' $\alpha$ -lactalbumine représente environ 75 à 85 % en poids des protéines de ce précipité. On mesure donc l'intérêt du procédé de l'invention qui permet d'obtenir cette protéine selon des quantités importantes.

5

Le procédé de l'invention peut être également mis en oeuvre pour obtenir du glycomacropeptide.

10 Lorsque la matière première utilisée est un lactosérum issu d'une coagulation présure du lait (seule ou associée à une acidification), il existe en solution un peptide appelé glycomacropeptide (GMP) issu de l'hydrolyse de la caséine kappa par la chymosine.

15 Or on ne connaît pas à ce jour de technique de purification de ce peptide qui posséderait une activité de stimulation du système immunitaire et constitue une matière première intéressante dans la préparation de formulations alimentaires en particulier pour des cas pathologiques  
20 souffrant de phénylcétonurie car il ne contient pas d'acides aminés aromatiques.

Lors de la première précipitation décrite précédemment, ce peptide reste dans la phase soluble non  
25 précipitée.

De même, lorsque l'on précipite l' $\alpha$ -lactalbumine dans les conditions décrites précédemment, le glycomacropeptide est encore soluble et représente la  
30 majorité des constituants azotés du second surnageant de précipitation.

Le surnageant renfermant en solution le glycomacropeptide résulte en variante de la précipitation  
35 conjointe de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine en utilisant une quantité d'agent précipitant appropriée à cet effet et en ajustant le pH à une valeur de l'ordre de 2,5 à 4,00.

Pour récupérer le glycomacropeptide du surnageant, on élimine de la phase soluble les constituants de poids moléculaire d'environ 3 000 à 10 000 daltons. A cet effet, on a recours plus spécialement à au moins une opération d'ultrafiltration et, le cas échéant, de diafiltration. L'ultrafiltration est réalisée à l'aide de membranes présentant un seuil de coupure d'environ 3 000 à 10 000 daltons. Les membranes utilisées peuvent être des membranes organiques, dites de deuxième génération, ou des membranes minérales, dites de troisième génération.

Il est également possible d'éliminer les sels de phosphates présents en réalisant un échange ionique sur un échangeur anionique avant ou après l'ultrafiltration. Le concentré ainsi obtenu présente un rapport pondéral matière azotée/extrait sec qui varie de 75 à 90 % environ et le glycomacropeptide représente de 80 à 95 % en poids environ de cette matière azotée.

D'autres protéines présentes dans les phases solubles co-produits des précipitations peuvent être isolées, si on le souhaite, en opérant comme indiqué ci-dessus avec ajustement de la concentration en agent précipitant et du pH.

L'invention fournit donc les moyens d'obtenir à l'échelle industrielle des protéines de grande valeur biologique et de pureté élevée ce qui revêt un intérêt majeur pour les applications biologiques de ces produits.

Ces protéines purifiées de lactosérum, telles qu'obtenues par le procédé défini ci-dessus, en particulier les protéines ne renfermant pas de contaminants lipidiques, entrent dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne plus spécialement l' $\alpha$ -lactalbumine et le glycomacropeptide de pureté élevée ainsi obtenus.

Celle-ci vise également les phases solubles, co-produits des précipités formés lors de la mise en oeuvre du procédé de l'invention. Ces phases solubles sont formées de lactosérum concentré débarrassé d'au moins la majeure partie des constituants non protéiques dont on a éliminé à chaque étape de séparation, une protéine donnée. Il s'agit en particulier de la phase soluble telle qu'obtenue à partir de la première séparation, renfermant essentiellement comme constituant protéique de l' $\alpha$ -lactalbumine et selon la nature du lactosérum de départ du glycomacropeptide.

Afin d'illustrer l'invention, on rapporte dans la description qui suit des exemples de séparation de protéines de lactosérum.

#### Exemple 1

500 litres de lactosérum doux provenant d'un atelier de fabrication de caséines présures sont concentrés 2,5 fois au moyen d'un module équipé de membranes organiques.

Le rétentat ainsi obtenu appelé rétentat UF 1 est ensuite délipidé par microfiltration sur des membranes minérales présentant un seuil de coupure de 0,14  $\mu$ m.

Le microfiltrat délipidé est concentré 2 fois par ultrafiltration en utilisant le même matériel que celui ayant servi à la concentration initiale du lactosérum.

Le concentré obtenu par cette seconde ultrafiltration (appelé rétentat UF 2) constitue la matière première pour la séparation des protéines.

Le tableau 1 ci-dessous résume l'évolution des concentrations azotées et des extraits secs des différents produits.

Tableau 1

5		Matières azotées totales (g/kg)	Extrait sec (g/kg)	MAT/EST (%)
10	Lactosérum	9,5	64	14,8
	Rétentat UF 1	18,6	76	24,4
	Microfiltrat	12,5	65	19,2
	Rétentat UF 2	23,5	76	31

15                    1240 g de rétentat UF 2 sont refroidis à la  
température de 22°C. Comme agent polyélectrolyte, on utilise  
de l'hexamétaphosphate de sodium. La quantité de sels ajoutée  
au rétentat représente 11 % de la concentration en  $\beta$ -  
lactoglobuline. Après dissolution des sels, le pH est ajusté  
20 à 4,4 par addition d'acide chlorhydrique. Le précipité obtenu  
sous l'action conjuguée des sels de phosphate et de  
l'ajustement du pH est séparé par centrifugation à 4 000 g  
pendant 5 minutes. Le bilan en poids de la séparation est :  
culot précipité 9 %, surnageant phase soluble 91 %.

La répartition des concentrations en  $\alpha$ -lactalbumine et en  $\beta$ -lactoglobuline est donnée dans le tableau 2 ci-dessous

5                      Tableau 2

10		$\beta$ -lacto- globuline (g/kg)	$\alpha$ -lactalbu- mine g/kg	$\alpha$ -lacta/ $\alpha$ + $\beta$ (%)
15	Rétentat UF 2 Phase soluble 1 Précipité 1	14,5 0,4 158	4,1 3,7 9,1	22 90,2 5,4

Le précipité est dilué par un volume d'eau et le pH est ajusté à 6,5 par addition de soude sous agitation. Le précipité se resolubilise à cette valeur de pH et présente l'aspect d'une solution orange translucide. Cette solution est congelée puis lyophilisée.

1000 g de phase soluble obtenue après séparation du précipité de  $\beta$ -lactoglobuline sont placés sous agitation dans un récipient à la température de 20°C.

On ajoute 27 % de polyélectrolytes par rapport au poids d' $\alpha$ -lactalbumine présente dans la solution. Le polyélectrolyte choisi est un sel de polyphosphate. Le pH de la solution est ajusté, après dissolution des sels, à 3.5 par addition d'acide chlorhydrique. On constate une précipitation de l' $\alpha$ -lactalbumine. Le précipité est séparé de la phase soluble par centrifugation à 4 000 g pendant 5 minutes. Le bilan en poids montre que la fraction précipitée représente 8 % et la phase surnageante 92 %. L'évolution de la répartition protéique est indiquée dans le tableau 3.

Tableau 3

5		$\alpha$ -lactal- bumine (g/kg)	$\beta$ -lactoglo- buline (g/kg)	glycomacro- peptide (g/kg)
	Phase soluble 1	3,7	0,4	3,9
	Phase soluble 2	0,3	0,1	3,65
10	Précipité 2	42,8	3,85	6,75

15 Le précipité 2 est dilué par un volume équivalent d'eau et le pH est ajusté à 6,5 par addition de soude. La resolubilisation est totale et la solution ainsi obtenue est diafiltrée sur une installation d'ultrafiltration équipée de membranes organiques présentant un seuil de coupure de 10 000 daltons.

20 La diafiltration met en oeuvre 4 volumes d'eau par volume de solution protéique. La solution diafiltrée est ensuite congelée et lyophilisée.

25 La phase soluble 2 est concentrée par ultrafiltration sur une installation équipée de membranes organiques présentant un seuil de coupure de 3 000 daltons.

Le facteur de concentration est de 5.

30 Le rétentat ainsi obtenu est diafiltré par 6 volumes d'eau.

La solution diafiltrée est congelée puis lyophilisée.

## Exemple 2

100 litres de lait écrémé sont microfiltrés sur une  
 5 installation équipée de membranes de microfiltration  
 présentant un seuil de coupure de 0,14  $\mu\text{m}$ . La température est  
 de 50°C et le pH de 6,6. Le facteur de concentration  
 volumique est de 2. Les 50 litres de microfiltrat récupérés  
 sont ensuite concentrés sur une installation  
 10 d'ultrafiltration équipée de membranes organiques. Le facteur  
 de concentration appliqué est alors de 5. Le rétentat est  
 ensuite diafiltré avec 1/2 volume d'eau.

L'évolution des concentrations azotées et des  
 15 extraits secs des différents produits est donnée dans le  
 tableau 4 :

Tableau 4

20		Matières azotées totales	Matières sèches
	Lait écrémé	33,6	91
	Microfiltrat	6,8	62
25	Rétentat UF	22	84
	Rétentat diafiltré	21,3	62,9

5 litres de rétentat diafiltré sont refroidis à la  
 30 température de 18°C. Le pH de la solution est de 7,1.

L'agent polyélectrolyte choisi pour la séparation  
 est un mélange de sels de phosphates contenant 85 %  
 d'hexamétaphosphate de sodium et 15 % de tripolyphosphate de  
 35 sodium.



La quantité de sels ajoutée représente 9,5 % de la  $\beta$ -lactoglobuline contenue dans la matière première de départ. Après dissolution complète de ces sels, le pH est ajusté à 4,37 par addition d'acide chlorhydrique. Le précipité est  
5 séparé de la phase soluble par centrifugation à 2500 g pendant 4 minutes.

Le poids de précipité représente 11 % du poids de rétentat mis en oeuvre, le surnageant 89 %.

10

La répartition des protéines dans ces différentes phases est donnée dans le tableau 5 :

Tableau 5

15

20

25

	$\beta$ -lacto- globuline (g/kg)	$\alpha$ -lactalbu- mine (g/kg)	$\beta$ -lacto/ $\beta$ + $\alpha$ (%)
Rétentat diafiltré	15,5	4,5	77,5
Précipité 1	137,8	8,1	94,4
Phase soluble 1	0,38	4,05	8,5

Le précipité est dilué par 3 volumes d'eau et remis en solution par addition de soude.

30

La solution est alors à pH 7,0.

Cette solution est concentrée 5 fois par ultrafiltration à l'aide de membranes organiques.

35

4 litres de la phase soluble 1 sont additionnés de sels de phosphates (même mélange des deux sels que précédemment). La quantité d'agent polyélectrolyte représente

22 % de la quantité d' $\alpha$ -lactalbumine présente dans la phase soluble. Le pH est ajusté à 3,15 par addition d'acide chlorhydrique sous agitation.

5                    Le précipité d' $\alpha$ -lactalbumine ainsi obtenu est séparé par centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes.

Dans ces conditions on obtient un bilan en poids par rapport à la phase soluble 1 mise en oeuvre de :

10

- précipité 2            : 6 %
- phase soluble 2 : 94 %

15                    La composition protéique du précipité est de 65,9 g/kg d' $\alpha$ -lactalbumine et de 6,33 g/kg de  $\beta$ -lactoglobuline soit un rapport  $\alpha$ -lacta/ $\alpha$ -lacta +  $\beta$ -lacto de 91,2 %.

20                    Le précipité 2 est repris par 2 volumes d'eau et le pH est ajusté à 4,8 par addition de soude. Cette solution d' $\alpha$ -lactalbumine est chromatographiée sur un échangeur anionique sous forme OH-

25                    La solution récupérée après échange d'ions présente une valeur de pH de 8,5. Elle est concentrée par ultrafiltration sur un appareil équipé de membranes organiques présentant un seuil de coupure de 10 000 daltons. Le facteur de concentration volumique est de 2. Le rétentat est ensuite diafiltré par un volume d'eau. La solution finale présente un rapport  $\alpha$ -lactalbumine/matières azotées total de 30                    90,5 %.

Les séparations rapportées ci-dessus sont avantageusement effectuées en utilisant un dispositif comportant :

35

- une cuve avec des moyens d'agitation dans laquelle on introduit le lactosérum concentré, le cas échéant délipidé,

- un doseur pour l'addition de l'agent précipitant dans la cuve,

5                   - un système de pompe doseuse pour l'ajout de l'acide dans la cuve (asservi à la mesure de pH),

- avantageusement un élément permettant le contrôle et la régulation du pH,

10                   - un clarificateur, ou décanteur, ou tout autre élément permettant la séparation du précipité, relié à la cuve, dont on éliminera la phase soluble, et de préférence

15                   - une cuve permettant la reprise du précipité par un alcali, avec un système d'agitation, équipé d'une pompe doseuse délivrant l'alcali (asservi à mesure de pH) et comportant avantageusement un élément de contrôle et de régulation de pH.

20                   Ce dispositif peut être doublé pour une seconde précipitation ou peut fonctionner en batch avec stockage de la phase surnageante séparée du précipité et reprise de cette phase dans la première cuve à la fin du premier cycle de précipitation.

25

## REVENDEICATIONS

1/ Procédé de séparation de protéines de lactosérum, caractérisé en ce qu'on utilise comme matière  
5 première un lactosérum concentré en protéines, et le cas échéant délipidé, et qu'on isole par précipitation la  $\beta$ -lactoglobuline, puis, si on le souhaite, les autres protéines d'intérêt, par addition séquentielle d'agents précipitants en milieu acide au lactosérum concentré, puis aux phases  
10 solubles successivement formées comme co-produits des précipités de protéines.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lactosérum concentré est tel qu'obtenu en  
15 soumettant du lactosérum à au moins une opération d'ultrafiltration réalisée de manière à obtenir une phase soluble débarrassée d'au moins la plupart, sinon la totalité, des constituants non protéiques.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le lactosérum utilisé pour obtenir le lactosérum concentré est un lactosérum doux provenant de fromagerie ou de caséinerie présure, ou un lactosérum acide provenant de fromagerie, ou de caséinerie acide, ou encore un microfiltrat  
25 de lait.

4/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le lactosérum avant ou après l'opération de concentration est délipidé en le  
30 soumettant à une étape de microfiltration ou de clarification centrifuge afin d'éliminer au moins la majeure partie des lipides présents.

5/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les agents précipitants utilisés sont des polyélectrolytes, notamment des sels de phosphate ou des dérivés des acides phosphoriques.  
35

6/ Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la quantité de sels phosphates utilisée pour précipiter la  $\beta$ -lactoglobuline est de 4 à 20 % en poids environ par rapport à la concentration de  $\beta$ -lactoglobuline présente dans le concentré de lactosérum.

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le pH de la solution concentrée additionnée de polyélectrolytes est ajusté de manière à obtenir la précipitation de la  $\beta$ -lactoglobuline, avantageusement à une valeur dans un intervalle de 4,9 à 4,0 environ.

8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on ajuste la quantité de polyélectrolytes et le pH de la phase soluble correspondant au co-produit de la première précipitation pour précipiter sélectivement l' $\alpha$ -lactalbumine, et qu'on sépare le précipité de la phase soluble.

9/ Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la quantité d'agents précipitants utilisée pour précipiter l' $\alpha$ -lactalbumine est de 2 à 35 % en poids environ par rapport à la concentration d' $\alpha$ -lactalbumine présente dans la phase soluble issue de la première précipitation.

10/ Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que le pH de la phase soluble résultant de la première précipitation est ajusté à une valeur d'environ 2,4 à 4.

11/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9, caractérisé en ce que pour obtenir du glycomacropeptide, on utilise comme matière première du lactosérum issu d'une coagulation présure du lait, le cas échéant associée à une acidification, et on élimine de la phase soluble obtenue après précipitation fractionnée ou conjointe de la  $\beta$ -lactoglobuline et de l' $\alpha$ -lactalbumine, les constituants de poids moléculaires d'environ 3 000 à 10 000

daltons, avantageusement par au moins une opération d'ultrafiltration et le cas échéant de diafiltration, l'ultrafiltration étant précédée si on le souhaite d'une addition d'alcali.

5

12/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les séparations des précipités et des phases solubles sont réalisées au moyen d'une centrifugeuse, d'un clarificateur, d'un décanteur, de membranes d'ultrafiltration ou de microfiltration, ces dispositifs fonctionnant en mode continu ou non, ou par décantation sous l'effet de la pression atmosphérique.

10

13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour récupérer les protéines isolées, on dissout les précipités obtenus par addition d'alcali, jusqu'à l'obtention d'un pH d'environ 5,5 à 8,0, on sèche la solution par exemple par atomisation ou si on le souhaite, on la lyophilise, ces opérations étant précédées le cas échéant, d'opérations d'ultrafiltration et diafiltration ou osmose inverse.

15

20

14/ Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on élimine l'agent précipitant présent dans les solutions protéiques, par exemple par diafiltration ou dialyse ou de préférence par chromatographie par échange d'ions, en utilisant un échangeur anionique.

25

15/ Protéines du lactosérum de pureté élevée, en particulier délipidées, notamment l' $\alpha$ -lactalbumine et le glycomacropeptide et phases solubles co-produits des précipitations, telles qu'obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

30

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9100035  
FA 451495

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	FR-A-2 264 818 (STAUFFER) * En entier, surtout revendications 1,2 *	1-14
D,Y	--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 5, 1986, page 367, résumé no. 42381, Philadelphia, PA; T.B.T. KANEKO et al.: "Selective concentration of bovine immunoglobulins and alpha-lactalbumin from acid whey using iron chloride", & J FOOD SCI. 50(6): 1531-1536. 1985 * Résumé *	1-14
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol 105, no. 1, 7 juillet 1986, page 516, résumé no. 5359v, Columbus, Ohio, US; A.W. SLACK et al.: "Production of enriched beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin whey protein fractions", & J. FOOD PROCESS. PRESERV. 1986, 10(1), 19-30 * Résumé *	1-15
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 21, 22 novembre 1982, page 654, résumé no. 180496a, Columbus, Ohio, US; C.H. AMUNDSON et al.: "Production of enriched protein fractions of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cheese whey", & J. FOOD PROCESS. PRESERV. 1982, 6(2), 55-71 * Résumé *	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A 23 J C 07 K
Date d'achèvement de la recherche 18-08-1991		Examineur MASTURZO P.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		