

**Procédé de fabrication d'une composition protéique laitière déminéralisée,  
adapté notamment à la filière biologique, et composition protéique laitière  
déminéralisée**

5

L'invention concerne principalement un procédé de déminéralisation d'une composition protéique laitière.

L'invention porte également sur une composition protéique laitière déminéralisée susceptible d'être obtenue par un tel procédé.

10 Parmi les compositions protéiques laitières connues, le lactosérum est la partie liquide issue de la coagulation du lait pendant la fabrication de fromage.

Le lactosérum est principalement formé d'eau, de lactose, de protéines et de minéraux. L'une des voies de valorisation du lactosérum concerne la fabrication de poudre de lactosérum servant d'ingrédient pour la réalisation des laits  
15 infantiles. Pour ce faire, il est notamment nécessaire de procéder à une réduction de la teneur en minéraux pour obtenir un produit riche en protéines et en lactose.

De façon connue, le procédé de déminéralisation de lactosérum comprend notamment une étape d'écémage permettant de diminuer la teneur en matières grasses du lactosérum, suivie d'une étape d'électrodialyse par laquelle est obtenu  
20 un lactosérum dialysé contenant 50 à 60% en poids en moins de minéraux. Le lactosérum écrémé et dialysé passe ensuite dans une colonne cationique d'où il ressort fortement appauvri en cations, puis dans une colonne anionique à la sortie de laquelle le lactosérum est dit déminéralisé.

Mais la régénération des résines échangeuses d'ions engendre l'utilisation de bases et d'acides forts tels que la soude, la potasse ou l'acide chlorhydrique  
25 qui peuvent être préjudiciables à la qualité du produit déminéralisé obtenu. De par leur fonctionnement, les résines d'échange d'ions induisent l'ajout d'espèces minérales exogènes et sont à ce titre considérées comme des auxiliaires technologiques au sens de la norme européenne CE 889/2008. Leur utilisation  
30 dans la filière biologique en est de ce fait interdite.

Dans ce contexte, la présente invention vise un procédé de déminéralisation d'une composition protéique laitière dépourvu de toute opération mettant en œuvre des résines échangeuses d'ions et permettant d'obtenir un niveau de

déminéralisation au moins égal à 90% tout en respectant un profil minéral compatible avec l'élaboration d'un produit tel que le lait infantile.

À cet effet, le procédé de fabrication de la composition protéique laitière déminéralisée est essentiellement caractérisé en ce qu'il comporte au moins les

5 étapes de :

- préparation ou fourniture d'une composition protéique laitière,
- ultrafiltration de la dite composition protéique laitière,
- nanofiltration du rétentat d'ultrafiltration obtenu à l'étape précédente, et
- électrodialyse du rétentat de nanofiltration obtenu à l'étape précédente,

10 le dit procédé étant dépourvu de toute étape de passage sur des résines échangeuses d'ions.

Ainsi, le procédé de l'invention est exclusivement un procédé membranaire mettant en jeu, dans un ordre spécifique, des étapes d'ultrafiltration, de nanofiltration et d'électrodialyse. Le procédé de l'invention permet d'obtenir une  
15 composition protéique laitière déminéralisée à hauteur de 90% dans laquelle la teneur en minéraux est contrôlée en permettant notamment la préservation du rapport entre le calcium et le phosphore aussi proche que possible du lait, ce qui n'est pas le cas pour un procédé de déminéralisation classique avec passage sur des résines échangeuses d'ions qui présente un rapport entre le calcium et le  
20 phosphore bien plus bas. La composition protéique laitière présente en outre un taux de dénaturation protéique bien inférieur à celui des compositions obtenues par le procédé de déminéralisation de l'art antérieur mettant en jeu des résines échangeuses d'ions.

Le procédé de l'invention peut également comporter les caractéristiques  
25 optionnelles suivantes considérées isolément ou selon toutes les combinaisons techniques possibles :

- le rétentat d'ultrafiltration présente une teneur en matière azotée totale au moins égale à 14% de l'extrait sec.

- selon une première variante, la composition protéique laitière est du sérum  
30 de fromagerie.

- le sérum de fromagerie est issu de l'agriculture biologique.

- selon une seconde variante, la composition protéique laitière est issue d'un procédé comprenant au moins les étapes de :

- fourniture de lait cru,
  - écrémage, traitement thermique et épuration bactérienne dudit lait cru,
  - microfiltration sur membrane du lait obtenu à l'étape précédente, et
  - 5       - récupération du perméat de microfiltration formant la composition protéique laitière.
- la membrane de microfiltration présente une porosité comprise entre 0,1 et 0,2 micromètres.
- le lait cru est issu de l'agriculture biologique.
- 10       L'invention porte également sur une composition protéique laitière déminéralisée susceptible d'être obtenue par le procédé tel que précédemment décrit.
- La composition protéique laitière de l'invention peut également comporter les caractéristiques optionnelles suivantes considérées isolément ou selon toutes
- 15       les combinaisons techniques possibles :
- dans la composition protéique laitière susceptible d'être obtenue par le procédé tel que précédemment décrit, le rapport entre les teneurs en calcium et en phosphore est supérieur à 0,65.
  - dans ce cas, la composition protéique laitière déminéralisée peut
  - 20       comporter :
- du calcium à une teneur inférieure à 11 milligrammes par gramme de matière azotée totale,
  - du sodium à une teneur inférieure à 5 milligrammes par gramme de
  - 25       matière azotée totale,
  - du magnésium à une teneur inférieure à 3 milligrammes par gramme de matière azotée totale,
  - du potassium à une teneur inférieure à 5,5 milligrammes par
  - gramme de matière azotée totale,
  - des chlorures à une teneur inférieure à 1,7 milligrammes par
  - 30       gramme de matière azotée totale, et
  - du phosphore à une teneur inférieure à 8,5 milligrammes par
  - gramme de matière azotée totale.

- plus précisément, la composition protéique laitière déminéralisée peut comporter :

- du calcium à une teneur inférieure à 7,7 milligrammes par gramme de matière azotée totale,
- 5        - du sodium à une teneur inférieure à 3,65 milligrammes par gramme de matière azotée totale,
- du magnésium à une teneur inférieure à 2,15 milligrammes par gramme de matière azotée totale,
- du potassium à une teneur inférieure à 3,70 milligrammes par
- 10        gramme de matière azotée totale,
- des chlorures à une teneur inférieure à 1,5 milligrammes par gramme de matière azotée totale, et
- du phosphore à une teneur inférieure à 7,7 milligrammes par gramme de matière azotée totale.

15        - la composition protéique laitière déminéralisée susceptible d'être obtenue par le procédé tel que précédemment décrit présente un pourcentage de protéines natives par rapport aux protéines totales qui est supérieur à 85.

- la composition protéique laitière déminéralisée présente un pourcentage de protéines natives par rapport aux protéines totales qui est supérieur à 90.

20        - le taux d'agrégation de la protéine A-lactalbumine dans ladite composition est inférieur à 5%.

- le diamètre moyen de type D4,3 des particules de la composition protéique laitière déminéralisée susceptible d'être obtenue par le procédé précédemment décrit est inférieur à 0,3 micromètres.

25        - le diamètre moyen de type D4,3 des particules de la composition protéique laitière déminéralisée est inférieur à 0,2 micromètres et en ce qu'au moins 40% des particules en volume ont une taille inférieure à 0,15 micromètres.

L'invention porte enfin sur l'utilisation d'une composition protéique déminéralisée telle que précédemment décrite, dans laquelle utilisation cette

30        composition est utilisée comme ingrédient pour l'élaboration d'un lait infantile.

Avantageusement, le lait infantile est issu de l'agriculture biologique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront clairement de la description qui en est donnée ci-dessous, à titre indicatif et nullement limitatif, et en référence aux figures suivantes

- la figure 1 est un schéma synoptique du procédé de fabrication d'une composition protéique laitière déminéralisée selon l'invention et selon deux voies différentes de fourniture ou de fabrication de la composition protéique laitière destinée à subir les étapes de déminéralisation,

- la figure 2 illustre les teneurs en minéraux respectivement obtenues à partir de la composition déminéralisée de l'invention et de la composition de l'art antérieur, ainsi que les maximums réglementaires autorisés pour ces minéraux dans un lait infantile,

- la figure 3 représente le spectre de fluorescence d'une solution pure d'alphalactalbumine soumise aux fluctuations de pH du procédé de l'invention,

- la figure 4 représente le spectre de fluorescence d'une solution pure d'alphalactalbumine soumise aux fluctuations de pH du procédé de l'art antérieur, et

- la figure 5 illustre la répartition de la taille des particules dans la composition de l'invention et dans la composition de l'art antérieur.

Le procédé de l'invention réside essentiellement dans la succession, dans l'ordre, des étapes d'ultrafiltration, de nanofiltration et d'électrodialyse d'une composition protéique laitière. Cette composition protéique laitière pourra, à titre d'exemple, être du sérum de fromagerie ou du lait cru écrémé, thermisé, bactofugé et microfiltré.

Dans la description qui suit, l'emploi de l'expression « art antérieur » se réfère au procédé et à la composition déminéralisée associée obtenue lorsque sont utilisées des résines échangeuses d'ions.

En référence à la figure 1, on décrit en premier lieu l'élaboration de la composition protéique laitière 1 à partir de lait cru 2. Le lait cru 2 est préférentiellement issu de la filière biologique.

Le lait cru 2 subit en premier lieu un écrémage 3 dans des conditions standards avec une température d'écémage de l'ordre de 50°C, puis le lait écrémé 4 subit ensuite une thermisation 5 à une température de l'ordre de 65°C-68°C pendant moins d'une minute. Ce traitement thermique est volontairement

limité à cette étape pour éviter l'agrégation des protéines sériques sur les micelles de caséine et obtenir le meilleur rendement protéique à l'étape ultérieure de microfiltration.

Le lait écrémé et thermisé 6 subit alors une bactofugation mécanique 7  
5 pour assurer son épuration bactérienne et parfaire son écrémage. On peut prévoir alternativement une autre opération d'épuration bactérienne telle que par exemple une microfiltration.

Le lait écrémé, thermisé et bactofugé subit ensuite une étape de  
10 chambrage non représentée, à une température de l'ordre de 50-52°C en vue de sa préparation pour l'étape de microfiltration 10.

La composition du lait écrémé, thermisé et bactofugé est donné sur le  
Tableau 1 ci-dessous. La matière azotée totale englobe principalement les  
protéines, les peptides et l'azote non protéique, par exemple l'urée. Dans les  
résultats présentés ci-dessous, la matière azotée totale est quantifiée par dosage  
15 de l'azote total par distillation selon la méthode Kjeldahl.

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| pH à 20°C                                  | 6,6-6,7   |
| Extrait sec (g/L)                          | 90 - 96   |
| Matière azotée totale (en % d'extrait sec) | 36 - 39   |
| Fraction azotée non protéique<br>(g/L)     | 1,8 – 2,2 |
| Matière grasse résiduelle (g/L)            | 0,4 – 1   |
| Cendres (g/L)                              | <9        |
| Lactose (g/L)                              | 46 - 50   |

Tableau 1 : Composition du lait écrémé, thermisé et bactofugé

La microfiltration 10 est une microfiltration tangentielle dont la membrane  
20 céramique présente une porosité de 0,1 micromètre. Sa température de fonctionnement est comprise entre 49 et 53 °C, de préférence de 52°C. Le

perméat 11 subit un refroidissement 12 et est récupéré à une température comprise entre 10 et 15°C, de préférence de 12°C. Le perméat 11 refroidi forme alors une composition protéique laitière 1a issue du lait et destinée à subir les étapes successives ultérieures de concentration et déminéralisation qui seront  
5 décrites plus loin.

La composition protéique laitière obtenue 1a présente une teneur en extrait sec de l'ordre de 57 à 62 g/kg, une teneur en matière azotée totale de l'ordre de 9 à 12% de l'extrait sec, et une teneur en matière grasse inférieure à 0,5% de l'extrait sec.

10 La composition protéique laitière 1 peut alternativement être issue de lactosérum de fromagerie d'origine biologique 13 qui subit un refroidissement 14 pour être récupéré à une température comprise entre 10 et 15°C, de préférence de 12°C, et former une composition protéique laitière 1b.

La composition protéique laitière 1 à déminéraliser peut ainsi être soit une  
15 composition protéique laitière 1a issue du lait d'origine biologique, soit une composition protéique laitière 1b issue du lactosérum de fromagerie d'origine biologique. La composition protéique laitière peut bien entendu ne pas être d'origine biologique.

La composition protéique laitière 1 subit alors une succession d'opérations  
20 membranaires. L'exemple ci-après se rapporte à la déminéralisation de la composition protéique laitière 1a issue du lait d'origine biologique 2.

En premier lieu, la composition protéique laitière 1a subit une opération d'ultrafiltration 15 de laquelle est récupérée le rétentat 16. Cette opération d'ultrafiltration s'apparente à une pré-concentration et une première  
25 déminéralisation de la composition protéique laitière 1. Cette opération d'ultrafiltration 15 est menée de façon que le rétentat 16 présente une teneur en extrait sec supérieure à 60g/kg, une teneur en matière grasse inférieure à 0,5% de l'extrait sec, mais surtout une teneur en matière azotée totale au moins égale à 15% de l'extrait sec. La teneur en nitrates et nitrites est nulle ou quasiment nulle.  
30 Cette opération permet par ailleurs d'augmenter la teneur en matière azotée totale et d'éliminer partiellement les cations solubles, ce dont il résulte la diminution du rapport entre les cations divalents et la teneur en matière azotée totale.

Le rétentat d'ultrafiltration 16 subit alors une opération de nanofiltration 17 qui permet de concentrer le rétentat d'ultrafiltration 16 à plus de 19% d'extrait sec et préférentiellement à plus de 21% d'extrait sec. Cette opération permet d'optimiser le fonctionnement de l'étape ultérieure d'électrodialyse en assurant en  
5 outre une pré-déminéralisation à hauteur de 30 à 35% en poids de minéraux. Le rétentat de nanofiltration 18 est récupéré, et présente, outre une teneur en extrait sec supérieure à 21%, une teneur en matière azotée totale supérieure à 13,6% de l'extrait sec, et toujours une teneur en matière grasse inférieure à 0,5% de l'extrait sec.

10 Le rétentat de nanofiltration 18 subit alors une opération d'électrodialyse 19 conduite dans des conditions adaptées pour l'obtention d'une composition protéique laitière déminéralisée 20. Lors de l'électrodialyse, le rétentat de nanofiltration 18 circule dans un compartiment diluât 21. Sous l'effet d'un champ électrique, le rétentat de nanofiltration 18 se déminéralise et les ions  
15 passent dans un compartiment concentrât 22 en traversant de manière sélective des membranes anioniques ou cationiques 23. La circulation du rétentat de nanofiltration 18 est effectuée jusqu'à ce que le niveau de déminéralisation soit atteint pour une conductivité comprise entre 0,3 et 0,5 mS/cm, de préférence entre 0,3 et 0,4 mS/cm pour obtenir des performances de déminéralisation encore  
20 meilleures.

Le lactosérum déminéralisé 20 présente une teneur en extrait sec de l'ordre de 192 à 194 grammes par kilogramme, en tout état de cause supérieure à 190 grammes par kilogramme, une teneur en matière grasse inférieure à 0,5% de l'extrait sec, une teneur en matière azotée de l'ordre de 15 à 16 % de l'extrait sec,  
25 en tout état de cause au moins égale à 14% de l'extrait sec, une teneur en lactose inférieure à 83% de l'extrait sec, et une teneur en cendres inférieure à 1% de l'extrait sec, de préférence inférieure à 0,7% de l'extrait sec. La teneur en nitrates, et nitrites est nulle ou quasi nulle.

Le Tableau 2 ci-dessous met en évidence la synergie des opérations de  
30 nanofiltration et d'électrodialyse. À partir d'une composition protéique laitière 1 (colonne 1) obtenue à partir de lait cru d'origine biologique ayant subi le traitement décrit précédemment, et connaissant les pourcentages respectifs de

déminéralisation pour la nanofiltration (colonne 2) et pour l'électrodialyse (colonne 4), on calcule les teneurs théoriques d'un lactosérum déminéralisé (colonne 5). Ces teneurs théoriques correspondant à la somme des pourcentages de déminéralisation de la nanofiltration et de l'électrodialyse. Sur la colonne 6, on

5 reporte les teneurs en minéraux effectivement obtenues après passage par la nanofiltration et l'électrodialyse dans le cadre du procédé de l'invention.

|                                 | Composition protéique laitière (1a) | % de déminéralisation par nanofiltration | % de déminéralisation par électrodialyse | Lactosérum déminéralisé théorique | Lactosérum déminéralisé selon le procédé de l'invention |
|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| calcium (mg/kg d'extrait sec)   | 5010                                | 2,5                                      | 37,3                                     | 3066                              | 651                                                     |
| magnésium (mg/kg d'extrait sec) | 1095                                | 3,2                                      | 24,7                                     | 798                               | 208                                                     |
| potassium (mg/kg d'extrait sec) | 24585                               | 35,6                                     | 71,0                                     | 4593                              | 313                                                     |
| sodium (mg/kg d'extrait sec)    | 5920                                | 36,8                                     | 54,5                                     | 1703                              | 339                                                     |
| phosphore (mg/kg d'extrait sec) | 5615                                | -7,5                                     | 45,0                                     | 3321                              | 990                                                     |

10 Tableau 2 : Mise en évidence de la synergie des étapes de nanofiltration et d'électrodialyse

Le Tableau 3 ci-dessous expose les compositions minérales de lactosérums déminéralisés à hauteur de 90% de l'art antérieur et de l'invention

15 ainsi que leur rapport respectif des teneurs en calcium et phosphore.

|                 | Art antérieur<br>1<br>(mg/100mg) | Art antérieur<br>2<br>(mg/100mg) | Invention 1<br>(mg/g<br>MAT) | Invention 2<br>(mg/g<br>MAT) | Invention 3<br>(mg/g<br>MAT) | Invention 4<br>(mg/g<br>MAT) |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Sodium          | 7                                | 80                               | 3,63                         | 2,48                         | 2,35                         | 5                            |
| Potassium       | 3,5                              | 185                              | 3,30                         | 2,59                         | 1,80                         | 5,5                          |
| Calcium         | 15                               | 30                               | 7,66                         | 5,78                         | 4,71                         | 11                           |
| Magnésium       | 8                                | 16,5                             | 2,14                         | 1,64                         | 1,38                         | 3                            |
| Phosphore       | 85                               | 100                              | 7,62                         | 7,15                         | 6,86                         | 8,5                          |
| Chlorures       | 30,5                             | 15                               | 1,25                         | 1,45                         | 1,14                         | 1,7                          |
| Cendres         | 0,4% d'ES                        | 0,9% d'ES                        | 0,6% d'ES                    | 0,4 % d'ES                   | 0,4% d'ES                    | -                            |
| Rapport<br>Ca/P | 0,49                             | 0,3                              | 1,01                         | 0,81                         | 0,69                         | 1,29                         |

Art antérieur 1 : Lactosérum déminéralisé biologique en poudre obtenu par un premier procédé comportant des passages sur résines échangeuses d'ions

Art antérieur 2 : Lactosérum déminéralisé en poudre obtenu par un second procédé comportant des passages sur résines échangeuses d'ions

Invention 1 : Lactosérum déminéralisé liquide obtenu à partir d'une composition protéique laitière

issue du lait d'origine biologique – conductivité en fin d'électrodialyse : 0,5 mS/cm – sans ajustement de pH - résultats exprimés en milligrammes par gramme de Matière Azotée Totale

Invention 2 : Lactosérum déminéralisé liquide obtenu à partir d'une composition protéique laitière issue du lait d'origine biologique – conductivité en fin d'électrodialyse : 0,4 mS/cm – sans ajustement de pH - résultats exprimés en milligrammes par gramme de Matière Azotée Totale

Invention 3 : Lactosérum déminéralisé liquide obtenu à partir d'une composition protéique laitière issue du lait d'origine biologique – conductivité en fin d'électrodialyse : 0,35 mS/cm – sans ajustement de pH - résultats exprimés en milligrammes par gramme de Matière Azotée Totale

Invention 4 : Extrapolation des résultats des Inventions 1, 2 et 3 pour une conductivité en fin d'électrodialyse de 0,7 mS/cm - résultats exprimés en milligrammes par gramme de Matière Azotée Totale

Tableau 3 : Compositions minérales de compositions protéiques laitières déminéralisées de l'art antérieur et de l'invention – comparaison des rapports des teneurs en calcium et phosphore

5            On constate des Tableaux 2 et 3 que le procédé de l'invention permet d'obtenir une composition protéique laitière déminéralisée à hauteur de 90% par une succession de procédés membranaires et ce, sans utiliser de résines échangeuses de cations ni de résines échangeuses d'anions.

10           On constate par ailleurs au regard du Tableau 2 ci-dessus que les taux de déminéralisation réels obtenus par le procédé de l'invention sont au moins quatre fois supérieurs à ceux théoriquement calculés.

15           On constate par ailleurs que le lactosérum déminéralisé de l'invention présente avantageusement une teneur en phosphore basse et une teneur en calcium suffisamment contrôlée pour que le rapport des teneurs en calcium et en phosphore soit compris entre 0,65 et 1,29. Ce rapport se rapproche de celui du lait, qui est environ de 1,25 et ce, contrairement aux lactosérums déminéralisés des deux procédés de l'art antérieur qui présentent des rapports respectifs du calcium sur le phosphore de 0,49 et 0,3.

20           L'obtention d'un rapport plus élevé des teneurs en calcium et phosphore permet avantageusement de limiter la quantité de minéraux à ajouter lors de l'élaboration ultérieure du lait infantile.

La figure 2 illustre la teneur en certains minéraux (sodium, potassium, calcium, phosphore, magnésium et chlorures) exprimée en poids par 100kcal dans un mélange fait d'une composition protéique laitière déminéralisée et de lait,

avant toute supplémentation en minéraux, en vue de l'élaboration d'un lait infantile premier âge. Les résultats référencés 30 concernent le cas où la composition protéique laitière déminéralisée est celle de l'invention, et les résultats référencés 31 concernent le cas où la composition protéique laitière déminéralisée est celle de l'art antérieur. Sont également représentés sur cette figure les maximums réglementaires autorisés pour ces minéraux (référencement 32) dans un lait infantile premier âge. On constate que la composition protéique laitière déminéralisée de l'invention, lorsque mélangée à du lait en vue de la réalisation d'un lait infantile, par exemple un lait premier âge, présente un profil en minéraux bien inférieur aux maximums réglementaires autorisés. Ces résultats illustrent également la grande latence possible pour rajouter certains minéraux selon le type de lait infantile visé et ce, sans dépasser les maximums autorisés.

Le procédé de l'invention décrit dans cet exemple de réalisation s'applique à la déminéralisation de toute composition protéique laitière.

Le procédé de l'invention permet de réaliser une nouvelle ligne de production d'une composition protéique laitière déminéralisée à hauteur de 90% avec un profil minéral spécifique et compatible avec la formulation de lait infantile et ce, uniquement par des procédés membranaires de filtration et de déminéralisation. La composition protéique laitière déminéralisée obtenue respecte ainsi les spécifications ioniques spécifiques, notamment pour servir d'ingrédient à la fabrication de lait infantile. Le procédé de l'invention ne nécessite pas d'ajout d'auxiliaire technologique qui modifie la composition intrinsèque du produit. L'absence de résines échangeuses d'ions permet à la composition protéique laitière déminéralisée obtenue de satisfaire aux conditions décrites dans le règlement européen CE 889/2008 régissant la fabrication des produits transformés d'origine biologique, à la seule condition que le lait cru ou le sérum de fromagerie utilisés pour fabriquer la composition protéique laitière soient issus de l'agriculture biologique.

La Demanderesse a eu la surprise de constater que le procédé de l'invention engendrait des conséquences avantageuses sur la composition protéique laitière déminéralisée obtenue allant au-delà de l'objectif premier de réaliser une composition laitière déminéralisée sans utiliser de résines échangeuses d'ions.

Il a en effet été constaté en premier lieu que le taux de protéines natives dans la composition protéique laitière déminéralisée de l'invention est nettement supérieur au taux de protéines natives présents dans la composition déminéralisée de l'art antérieur. Ou autrement dit, le taux de dénaturation des protéines dans la composition protéique laitière déminéralisée de l'invention est bien inférieur au taux de dénaturation des protéines dans la composition déminéralisée de l'art antérieur.

Ce faible taux de dénaturation est directement lié au procédé de l'invention qui n'implique ni variation importante de pH, ni traitement thermique substantiel comme il est démontré ci-après.

Les figures 3 et 4 présentent, respectivement pour la composition protéique déminéralisée de l'invention et pour la composition déminéralisée de l'art antérieur, les spectres de fluorescence intrinsèque sur une solution pure d'alpha-lactalbumine à laquelle les fluctuations de pH du procédé de l'invention et du procédé de l'art antérieur ont été appliquées. Ces figures reflètent la fluorescence émise lors de l'excitation des acides aminés « tryptophane » présents au sein de l'alpha-lactalbumine.

Dans le procédé de l'invention dans lequel aucun ajustement de pH n'est réalisé, le pH fluctue d'environ 6,7 à 5,3.

En référence à la figure 3, la courbe référencée 33 représente le spectre de fluorescence de la solution d'alpha-lactalbumine à pH de 6,7. Cette courbe présente un lambda maximum de 329 nanomètres, caractéristique de l'état natif de cette protéine. La courbe référencée 34 représente le spectre de fluorescence de la solution d'alpha-lactalbumine à un pH de 5,3. On constate que l'allure du spectre change en s'élargissant et en présentant une intensité maximale de fluorescence diminuée. Cette modification du spectre illustre un changement de structure des édifices protéiques caractéristique d'un phénomène d'agrégation protéique.

La courbe référencée 35 représente le spectre de fluorescence de la solution d'alpha-lactalbumine lorsque le pH de 5,3 est remonté à 6,7 afin de vérifier le caractère réversible des modifications des édifices protéiques. On constate alors que l'allure de la courbe redevient identique et superposable à la

courbe initiale 33. En particulier, l'intensité maximale de fluorescence est de nouveau de 329 nanomètres.

Ces résultats illustrent que si l'acidification à un pH minimum de 5,3 conduit à un phénomène d'agrégation protéique, cette agrégation est totalement réversible. Ainsi, la structure des protéines dans la composition déminéralisée de l'invention subissant une faible acidification à un pH de 5,3, est totalement protégée.

Dans le procédé de l'art antérieur dans lequel sont utilisées des résines échangeuses d'ions, le pH fluctue d'environ 6,5 jusqu'à un pH minimum compris entre 2 et 2,5 avant d'être ajusté à 6,5. Le procédé de l'art antérieur implique également la mise en œuvre d'un traitement thermique supérieur à 90°C comme il sera détaillé plus loin.

En référence à la figure 4, la courbe 36, comme la courbe 33 de la figure 3, représente le spectre de fluorescence de la solution d'alpha-lactalbumine à pH de 6,7 et présente une longueur d'onde d'émission maximale de 329 nanomètres. La courbe 37 illustre le spectre obtenu lorsque la solution d'alpha-lactalbumine est portée à un pH de 2,4, et la courbe 38 illustre le spectre obtenu lorsque la solution d'alpha-lactalbumine à pH de 2,4 subit un traitement thermique de 95°C.

On constate que si les courbes 37 et 38 se superposent, elles présentent un décalage par rapport à la courbe 36 portant la longueur d'onde d'émission maximale à 334 nanomètres. Ce décalage vers des longueurs d'onde d'émission maximale plus grandes illustre le dépliement partiel de la structure unitaire protéique.

La courbe 39 représente le spectre de fluorescence de la solution d'alpha-lactalbumine lorsque le pH de 2,4 avec traitement thermique (courbe 38) est remonté à 6,5.

On constate que la courbe 39 n'est pas superposable avec la courbe initiale 36, l'intensité de fluorescence étant inférieure et la longueur d'onde maximale étant diminuée à environ 324 nanomètres.

Il en résulte que les modifications de structure protéique induite par l'acidification à un pH de 2,4 avec ou sans traitement thermique ne sont pas réversibles pour la composition déminéralisée de l'art antérieur, ce qui traduit une perte de l'état natif de la protéine.

Outre les variations de pH bien moins importantes dans le procédé de l'invention que dans le procédé de l'art antérieur, les variations de températures auxquelles sont soumises les protéines dans le procédé de l'invention sont également moins importantes que dans le procédé de l'art antérieur ce qui  
5 garantit la préservation de la structure native des protéines.

Dans le procédé de l'invention, une température de l'ordre de 65°C-68°C est appliquée lors de la thermisation du lait écrémé, puis la température est portée à 10°C-12°C lors de la déminéralisation. De façon optionnelle, une étape de pasteurisation à 72°C pendant quelques secondes peut être appliquée à la  
10 composition déminéralisée. Dans le procédé de l'art antérieur, l'utilisation comme matière première d'un lactosérum de fromagerie nécessite une première opération de pasteurisation réalisée à une température supérieure à 72°C puis, après déminéralisation, une seconde étape de pasteurisation à une température supérieure à 90°C est effectuée.

15 Si l'on considère les températures de thermo-dénaturation irréversibles de trois espèces protéiques majeures présentes dans la phase soluble du lait, à savoir la sérum albumine bovine, l'alpha-lactalbumine et la bêta-lactoglobuline, respectivement de 63°C, 69°C et 72°C, on constate que les températures du procédé de l'invention sont inférieures aux températures de dénaturation de  
20 l'alpha-lactalbumine et de la bêta-lactoglobuline. Il en résulte que l'état de ces protéines n'est pas modifié par le procédé de l'invention. A l'inverse, les températures du procédé de l'art antérieur conduisent à une modification des structures de ces trois espèces protéiques.

On se réfère au Tableau 4 ci-dessous qui présentent des résultats  
25 analytiques de dosage protéiques permettant de caractériser les teneurs en protéines dans leur état natif et leur taux d'agrégation.

La composition protéique des compositions protéiques laitières déminéralisées a été déterminée par le biais d'une méthode chimique (dosage de l'azote par technique Kjeldahl) et par le biais de la chromatographie liquide en  
30 phase inverse conduite grâce à des analyses dans différentes conditions opératoires.

La composition en protéines solubles a été déterminée par chromatographie en phase liquide suite à l'élimination des protéines dénaturées et caséines

résiduelles par précipitation à un pH de 4,6. Cette analyse permet de déterminer les teneurs en protéines présentes dans leur état natif.

L'analyse des protéines totales a également été déterminée après dissociation des agrégats. Cette technique permet notamment de mesurer la  
5 dénaturation protéique globale de l'échantillon (taux d'agrégation), mais également celle des protéines individuelles.

Les résultats du Tableau 4 sont présentés également pour les protéines les plus représentatives à savoir la bêta-lactoglobuline et la caséine Kappa, les 2 protéines thermosensibles qui co-agrègent sous l'effet des traitements  
10 thermiques, ainsi que pour l'alpha-lactalbumine qui est la protéine d'intérêt nutritionnel en nutrition infantile.

|                                                                                           | Composition déminéralisée de l'invention | Composition déminéralisée de l'art antérieur |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Fraction azotée soluble à pH = 4,6 (par rapport à la fraction azotée totale)              | 96 %                                     | 69 %                                         |
| % de protéines natives (par rapport au % des protéines totales)                           | 93 – 97%                                 | < 85%                                        |
| Taux d'agrégation de la bêta-lactoglobuline (par rapport à la bêta-lactoglobuline totale) | < 8%                                     | 15%                                          |
| Taux d'agrégation de la caséine Kappa (par rapport à la caséine Kappa totale)             | ≤ 20%                                    | 55%                                          |
| Taux d'agrégation de l'alpha-lactalbumine (par rapport à de l'alpha-lactalbumine totale)  | < 5%                                     | Non déterminé                                |

Tableau 4 : Résultats analytiques de dosage protéiques dans la composition de l'invention et dans la composition de l'art antérieur.

15

Il est confirmé par les résultats présentés dans le Tableau 4 que le pourcentage de protéines natives dans la composition déminéralisée de l'invention est nettement supérieur à celui de la composition de l'art antérieur. On constate par ailleurs que les taux d'agrégation de la bêta-lactoglobuline et de la  
20 caséine Kappa sont bien plus faibles dans la composition de l'invention. Enfin, le taux d'agrégation de l'alpha-lactalbumine est également faible.

On se réfère à la figure 5 qui illustre la taille des particules présentes dans la composition de l'invention (courbe 41) et dans la composition de l'art antérieur (courbe 42). La taille des particules est mesurée par la technique de granulométrie. Dans la composition de l'invention, on constate une distribution de  
5 taille de particules assez homogène, avec une population très majoritaire de particules de petite taille et un très faible pic correspondant à des particules (ou agrégats particuliers) de taille quelque peu supérieure. Le diamètre moyen de type D4,3 est de 0,19micromètres et 50% des particules (en volume) ont une taille inférieure à 0,14micromètres.

10 Au contraire, la distribution de taille est bimodale pour la composition de l'art antérieur, avec une population de petite taille et une population correspondant à de gros agrégats. Ces données se retrouvent dans les tailles caractéristiques, avec un diamètre moyen de type D4,3 de 5,17micromètres et respectivement 50% et 90% des particules (en volume) ayant une taille supérieure à 0,75micromètres  
15 et 11,8micromètres.

Ces résultats s'inscrivent dans la continuité de la préservation de la structure protéique résultant du procédé de l'invention puisqu'il est ainsi constaté que la majeure partie des particules de la composition de l'invention ne sont pas agrégées alors qu'à l'inverse, dans la composition de l'art antérieur, en plus de  
20 subir une dénaturation, les protéines sont pour une grande partie d'entre elles sous forme d'agrégats.

Il a ainsi été précédemment démontré que les protéines sériques de la composition déminéralisée de l'invention étaient majoritairement conservées dans leur état natif, non agrégées. Au contraire, les protéines sériques de la  
25 composition de l'art antérieur sont dans un état partiellement dénaturé et agrégé, avec un mélange de protéines individuelles et d'agrégats de plus grande taille.

Il en résulte une différence de comportement des protéines sériques de la composition de l'invention et de la composition de l'art antérieur, et plus particulièrement une différence d'interaction avec les micelles de caséine  
30 apportées par l'ingrédient lait de la formule infantile.

Cette différence d'état structural des protéines sériques va impacter leur capacité à interagir avec la structure micellaire lors de l'étape de traitement thermique préalable à la déshydratation du lait infantile.

En effet, des protéines sériques natives présentent une capacité plus importante de fixation à la surface de l'édifice micellaire que des protéines sériques dénaturées agrégées. L'homogénéité et l'épaisseur du manteau sérique à la surface micellaire sera ainsi plus important dans le cas de la composition de l'invention ce qui pourrait présenter un impact sur l'accessibilité des micelles de caséines, retarder leur dégradation par les enzymes digestives dans le tractus gastrointestinal et avoir un impact sur le niveau d'allergénicité des caséines en réduisant de facto l'allergénicité de la composition de l'invention.

Le Tableau 5 ci-dessous présente les teneurs en acides aminés essentiels d'intérêt nutritionnel majeur (histidine, tryptophane, tyrosine et leucine), en acides aminés essentiels et semi-essentiels et en acides aminés branchés dans la composition déminéralisée de l'invention et dans la composition déminéralisée de l'art antérieur. La teneur en acides aminés essentiels est un paramètre particulièrement important dans le lait infantile, le nourrisson n'ayant pas les capacités à les synthétiser ; ceux-ci doivent donc être apportés par le biais de l'alimentation, plus particulièrement avant la phase de diversification alimentaire.

|                                             | Composition de l'invention | Composition de l'art antérieur | Différence |
|---------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------|
| Histidine                                   | 2,30 ± 0,05                | 1,89 ± 0,05                    | + 22%      |
| Tryptophane                                 | 2,20 ± 0,14                | 1,85 ± 0,25                    | + 19%      |
| Tyrosine                                    | 3,23 ± 0,15                | 2,68 ± 0,14                    | + 21%      |
| Leucine                                     | 12,10 ± 0,23               | 10,84 ± 0,12                   | +12%       |
| Acides aminés essentiels et semi-essentiels | 56,5 ± 0,5                 | 54,4 ± 0,4                     | + 4%       |
| Acides aminés branchés                      | 22,4                       | 21,8                           | + 3%       |

Tableau 5 : Teneurs en acides aminés essentiels d'intérêt nutritionnel majeur, en acides aminés essentiels et semi-essentiels, et en acides aminés branchés dans la composition de l'invention et dans la composition de l'art antérieur

On constate que la composition de l'invention présente une forte teneur en acides aminés essentiels particulièrement pour ce qui concerne ceux d'intérêt nutritionnel majeur.

Ce résultat est particulièrement important pour le tryptophane. En effet, la réglementation interdit la supplémentation en tryptophane sous toutes ses formes dans les laits infantiles biologiques. Or le tryptophane est présent en forte quantité dans le lait maternel et participe activement au bon développement du nourrisson. Ainsi, la composition de l'invention se rapproche naturellement de la composition du lait maternel, également du point de vue de la teneur en tryptophane.

En outre, le tryptophane est décrit comme précurseur de la sérotonine et de la mélatonine. Le tryptophane interviendrait ainsi de manière positive sur la régulation du sommeil et du stress, de même que sur la concentration.

Enfin, des analyses granulométriques ont été menées sur la matière grasse formant le surnageant, après centrifugation, d'un lait infantile reconstitué, celui-ci étant élaboré à partir de la composition de l'invention ou de la composition de l'art antérieur.

La taille des particules est mesurée par la technique de granulométrie qui permet de mesurer la taille gouttelettes lipidiques individuelles lorsque la mesure est faite en présence de SDS, et la taille des agrégats de gouttelettes lipidiques dans le cas où il y a de la floculation (mesure dans l'eau uniquement). Dans ce dernier cas, les résultats sont exprimés en D<sub>4,3</sub> (en micromètres) qui augmente avec le taux d'agrégation des gouttelettes.

Il a été déterminé que le diamètre moyen de type D<sub>4,3</sub> pour la composition de l'invention est de  $0,75 \pm 0,03$  micromètres tandis que le diamètre moyen de type D<sub>4,3</sub> pour la composition de l'art antérieur est de  $4,59 \pm 0,05$  micromètres. On constate ainsi que le phénomène de floculation est bien moins important dans un lait infantile reconstitué, élaboré à partir de la composition de l'invention, la majorité des globules gras se trouvant dans un état individualisé. A l'inverse, dans un lait reconstitué élaboré à partir de la composition de l'art antérieur on observe une proportion non négligeable d'agrégats de globules gras.

Il a également été déterminé que la taille moyenne des globules gras individuels pour la composition de l'invention est de  $0,51 \pm 0,02$  micromètres, tandis que la taille moyenne des globules gras individuels pour la composition de l'art antérieur est de  $0,59 \pm 0,02$  micromètres.

Il en résulte une stabilité plus importante dans un lait infantile reconstitué à partir de la composition de l'invention. Cette organisation plus favorable de la matière grasse est sans doute liée à la moindre dénaturation protéique pendant le procédé de l'invention et à l'interaction privilégiée des protéines de la composition  
5 avec les édifices micellaires, telle que précédemment évoquée.

Il a ainsi été précédemment démontré qu'outre les effets bénéfiques sur la qualité des protéines, le procédé de l'invention et la composition déminéralisée en résultant participent également à une meilleure fonctionnalité du produit fini.

Les qualités précédemment évoqués de la composition de l'invention sont  
10 principalement liées au fait que le procédé de l'invention n'engendre ni acidification ni traitement thermique excessifs de nature à altérer les protéines et les autres constituants de la matière première.

Restant dans le cadre de l'invention, la composition déminéralisée précédemment décrite pourrait être obtenue par un autre procédé que celui  
15 précédemment décrit, à condition notamment que ce dernier respecte les faibles fluctuations de pH et de température.