

**Nouveau procédé de préparation d'un isolat de protéines cationiques de lactosérum
et le produit ainsi obtenu**

La présente invention se rapporte à un nouveau procédé de préparation d'un isolat de protéines cationiques de lactosérum de pureté élevée en lactoferrine.

- 5 La Demanderesse a mis au point un procédé d'obtention d'un isolat de protéines de lactosérum dont la pureté protéique en lactoferrine est supérieure à 90% ; ce procédé permet en outre le contrôle de la teneur en vitamine B12 (cobalamine) dans l'isolat de lactoferrine.

- Ce procédé est caractérisé d'une part par une utilisation de matière laitière préalablement concentrée (telle que le lait écrémé concentré ou le lactosérum concentré) par une technologie
10 membranaire (telle que l'osmose inverse, la nanofiltration, ou l'ultrafiltration) et d'autre part par une extraction sélective en utilisant les résines échangeuses de cations fortes de type sulfopropyl (SP) packées dans une colonne de chromatographie radiale. La fraction pure en lactoferrine éluée est concentrée et déminéralisée par ultrafiltration afin d'obtenir un isolat de protéines cationiques de lactosérum dont la pureté en lactoferrine est supérieure à au moins
15 90% et de préférence à 95%. Cet isolat liquide obtenu est débactérisé ou stérilisé par une microfiltration et optionnellement séché par atomisation (spray-dry) ou lyophilisation (freeze-dry) pour obtenir l'isolat en poudre.

Le procédé de préparation d'un isolat de protéines cationiques de lactosérum de pureté élevée en lactoferrine comprend les étapes a) à f) suivantes :

- 20 a) La matière première de départ peut être un lait de mammifère préalablement écrémé et concentré par une technologie membranaire ; il peut aussi s'agir d'un mélange de lait de mammifère préalablement écrémé et concentré par une technologie membranaire et de lait écrémé (non concentré) ; le lait de mammifère est par exemple du lait de vache ou du lait de chèvre ; la matière première de départ peut aussi être du lactosérum issu de lait de
25 mammifère et préalablement concentré ;

- i. lorsque la matière première de départ est préparée avec un lait mammifère tel que du lait de vache ou du lait de chèvre, il est écrémé et optionnellement pasteurisé, par exemple par un traitement thermique entre 60 et 78°C de courte durée (un traitement thermique minimum de niveau équivalent de 72°C
30 pendant 15 secondes ; l'écémage peut être exécuté soit avant ou après la pasteurisation) ou débactérisé par une microfiltration avec une membrane de porosité entre 0,8 et 1,4 µm, puis concentré par osmose inverse (OI) ou nanofiltration (NF) ou ultrafiltration (UF) ; pour la mise en œuvre du procédé,

5 on peut aussi utiliser un mélange de lait écrémé (non concentré) et de lait écrémé préalablement concentré par une technologie membranaire telle que décrite ci-avant ; le produit à traiter à l'étape b) a de préférence une concentration en matière protéique (MP) entre 40 et 72 g/L, de préférence entre 43 et 57 g/L ; quand une membrane d'OI est utilisée, la concentration de matière sèche (MS) de lait écrémé pasteurisé est entre 110 et 200 g/L, de préférence entre 120 et 160 g/L ;

10 ii. lorsque la matière première de départ est préparée avec du lactosérum, il peut être concentré après séparation des caséines, par acidification ou action de présure, soit par microfiltration (dont la membrane a une porosité d'environ 0,1 µm), concentré par osmose inverse (OI) ou nanofiltration (NF) ou ultrafiltration (UF) ; pour la mise en œuvre du procédé, on peut aussi utiliser un mélange de lactosérum (non concentré) et de lactosérum préalablement concentré par une technologie membranaire telle que décrite ci-avant ; le produit à traiter à l'étape b) a de préférence une concentration en protéines entre 20 et 100 g/L, de préférence entre 30 et 80 g/L ;

Il convient de noter que les traitements de pasteurisation et de microfiltration ne sont pas indispensables pour la conduite du procédé.

b) extraction sélective de protéines cationiques comprenant les étapes suivantes :

20 i. passage de la matière première de départ (par exemple, un lait écrémé pasteurisé, préconcentré) au travers d'une colonne de chromatographie en flux radial (« radial flow chromatography »), contenant les résines échangeuses de cations fortes de type sulfopropyl SP, de préférence supérieur à 100 µm de diamètre (par exemple, SP Sepharose Big Beads de Cytiva Sweden) :

25 - Le volume de matière première de départ (exprimé en volume équivalent à celui de la matière première non concentrée ; c'est-à-dire que le volume indiqué est celui qu'avait la matière première avant d'être concentrée) est compris entre 40 et 500 fois, en particulier entre 80 et 500 fois de volume des résines (BV, Bed Volume), de préférence entre 80 et 300 BV ;

30 - La vitesse linéaire de passage de matière première de départ est comprise entre 1,0 et 4,0 m/h, de préférence entre 2,0 et 3,0 m/h ;

- ii. rinçage avec de l'eau déminéralisée, de préférence traitée par une membrane d'OI (eau osmosée) :
- Le volume d'eau déminéralisée est compris entre 2 et 6 BV, de préférence entre 3 et 5 BV ;
 - La vitesse de passage d'eau déminéralisée est comprise entre 3,0 et 5,0 m/h, de préférence entre 3,5 et 4,5 m/h ;
- iii. élution des protéines cationiques fixées avec une solution saline (NaCl dans de l'eau déminéralisée, de préférence de l'eau osmosée) à conductivité électrique entre 30 et 50 mS/cm :
- Le volume de la solution saline est compris entre 4 et 8 BV, de préférence entre 5 et 7 BV ;
 - La vitesse de passage de la solution saline est comprise entre 0,3 et 2,0 m/h, de préférence entre 0,5 et 1,0 m/h ;
- iv. élution des protéines cationiques fixées avec une solution saline (NaCl dans de l'eau déminéralisée, de préférence de l'eau osmosée) à conductivité électrique entre 80 et 140 mS/cm, de préférence entre 90 et 110 mS/cm :
- Le volume de la solution saline est compris entre 3 et 6 BV, de préférence entre 4 et 5 BV ;
 - La vitesse de passage de la solution saline est comprise entre 0,5 et 2,5 m/h, de préférence entre 1,0 et 2,0 m/h ;
- L'étape de passage sur des résines échangeuses de cations sert à la fixation de protéines cationiques présentes dans la matière première de départ tout en laissant passer des constituants majeurs du lait écrémé tels que le lactose, les minéraux, les protéines acides comme les caséines, la β -lactoglobuline, l' α -lactoglobuline, l'albumine sérique et la plupart des immunoglobulines. La première étape d'élution sert à une extraction sélective de protéines cationiques spécifiques en gardant la majorité de la lactoferrine, la protéine majeure de protéines cationiques de lait, fixée sur les résines. La fraction pure de lactoferrine bovine est donc éluee dans le deuxième éluat.
- c) concentration des protéines cationiques de pureté élevée en lactoferrine éluées dans la solution saline en utilisant une membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure (MWCO) compris entre 10 et 20 kDa ;
- d) déminéralisation des protéines cationiques de pureté élevée en lactoferrine par une diafiltration avec de l'eau déminéralisée, de préférence l'eau osmosée, en utilisant une

membrane d'ultrafiltration de MWCO compris entre 10 et 20 kDa pour atteindre un ratio cendres/protéines compris entre 0,001 et 0,03, de préférence entre 0,003 et 0,01 ;

- e) microfiltration avec une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm , de préférence 0,8 et 1,4 μm en double couche, de la solution concentrée de protéines cationiques spécifiques afin d'en réduire la charge microbienne ;
- 5 f) optionnellement, séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution concentrée de protéines cationiques spécifiques préalablement microfiltrée afin d'obtenir un isolat de lactoferrine en poudre.

- Avantageusement, l'utilisation d'une matière laitière de mammifères (par exemple, le lait de vache écrémé pasteurisé, le lactosérum de fromagerie issu de lait de chèvre pasteurisé)
- 10 concentrée par membrane UF/NF/OI permet de réduire la vitesse de passage de flux pour la quantité équivalente de protéines présente pour un passage à travers d'une colonne d'extraction. Grâce à cette prolongation de temps de contact avec les résines échangeuses de cations fortes de type SP, l'efficacité d'extraction des protéines cationiques est nettement
- 15 améliorée.

En outre, étonnamment, l'utilisation d'une colonne flux radial (ex. celle de Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH), en raison de la géométrie trapézoïdale de cette colonne, permet de supporter durablement la pression générée par passage d'une matière laitière de mammifères concentrée à travers de résines packées (packed resins).

- 20 Cette combinaison d'une matière laitière concentrée et une colonne de flux radial est essentielle pour exécuter une production industrielle de façon stable et régulière.

Un autre avantage du procédé selon l'invention est qu'il peut être conduit efficacement dans une large gamme de température ; en particulier, alors que les fabricants de résine recommandent une mise en œuvre à des températures comprises entre 30 et 50°C, la

25 Demanderesse est parvenue à mettre au point un procédé efficace à froid, c'est-à-dire à des températures inférieures à 15°C, de préférence, inférieures à 10°C.

- La présente invention se rapporte ainsi à un isolat de protéines cationiques de lactosérum enrichi en lactoferrine obtenu ou susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention, tel que la proportion de protéines sur matière sèche est supérieure ou égale à 90% en poids et
- 30 dont la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 90% en poids, de préférence supérieure à 95% en poids, encore préférentiellement supérieur à 98% en poids.

La présente invention se rapporte également à un isolat de protéines cationiques de lactosérum enrichi en lactoferrine issu de lait ou de lactosérum issu de lait de vache ou de lait de chèvre

obtenu ou susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention dont la proportion de protéines sur matière sèche est supérieure ou égale à 90% en poids, la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 95% en poids (p/p), de préférence supérieure à 98% en poids, et contenant la cobalamine sous forme complexe avec transcobalamine à une concentration inférieure ou égale 5 µg/g de protéines, en particulier, la concentration de cobalamine sous forme complexe avec la transcobalamine est comprise entre 1 à 5 µg/g de protéines.

La présente invention se rapporte encore à un isolat de protéines cationiques de lactosérum enrichi en lactoferrine issu de lait ou de lactosérum issu de lait de vache ou de lait de chèvre obtenu ou susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention dont la proportion de protéines sur matière sèche est supérieure ou égale à 90% en poids, la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 90% (p/p), de préférence supérieure à 95% en poids, contenant la cobalamine sous forme complexe avec transcobalamine à une concentration supérieure ou égale à 5 µg/g, de préférence supérieure ou égale à 8 µg/g, encore préférentiellement supérieure ou égale à 10 µg/g de protéines.

Les isolats selon l'invention peuvent se présenter sous forme liquide (étape f non mise en œuvre) ou sous forme de poudre (mise en œuvre de l'étape f). Dans le cas où elle est sous forme liquide, elle présente les mêmes caractéristiques que la poudre en termes de composition par rapport à la matière sèche et comprend généralement entre 5 et 25%, de préférence entre 10 et 20%, en poids d'eau.

Selon un autre de ses objets, la présente invention se rapporte à un produit alimentaire pour l'alimentation humaine ou animale, à un médicament humain ou animal ou à un complément alimentaire contenant un isolat de protéines cationiques selon l'invention.

De préférence, les isolats selon l'invention ont une charge microbienne telle que le dénombrement de la flore mésophile aérobie est inférieur à 1000, préférentiellement inférieur à 100 ou 10 et encore préférentiellement inférieure à 1 ufc/g de poudre d'isolat selon l'invention ou inférieur à 100, préférentiellement inférieur à 10, encore préférentiellement inférieur à 1 ufc/ml d'isolat liquide. La combinaison d'utilisation d'une matière laitière concentrée et d'une colonne flux radial permet de produire de façon stable et efficace, deux sortes d'isolats de pureté élevée en lactoferrine par la chromatographie par échange de cations en choisissant les conditions appropriées :

- un isolat dont la pureté protéique de lactoferrine est > 95% ou à 98% et dont la teneur en vitamine B12 est ≤ 5 µg/g de protéines ou comprise entre 1 et 5 µg/g de protéines ;

De tels isolats selon l'invention trouvent un intérêt particulier pour la préparation de laits infantiles (laits pour nourrisson ou laits de suite) à base de lait de vache ou de chèvre.

et

- un isolat dont la pureté protéique de lactoferrine est $> 90\%$ ou 95% et dont la teneur en vitamine B12 est $\geq 5 \mu\text{g/g}$ de protéines, de préférence $\geq 8 \mu\text{g/g}$ de protéines, encore de préférence $\geq 10 \mu\text{g/g}$ de protéines ;

Cet isolat peut présenter un avantage nutritionnel pour un complément alimentaire destiné aux végétariens ou pour une préparation nutritionnelle destinée aux personnes déficientes pour l'absorption de vitamine B12 telles que les personnes ayant subi une gastrectomie ou des personnes traitées chroniquement avec des IPP (inhibiteurs de la pompe à protons). En effet, cet isolat peut apporter, en plus de bénéfices de la lactoferrine, une source importante de vitamine B12 de biodisponibilité élevée même en situation d'absence du facteur intrinsèque sécrété par l'estomac.

La présente invention se rapporte ainsi également à des compléments alimentaires comprenant l'isolat selon l'invention enrichi en vitamine B12, c'est-à-dire un isolat dont la pureté protéique de lactoferrine est $> 90\%$ ou 95% et dont la teneur en vitamine B12 est $\geq 5 \mu\text{g/g}$ de protéines, de préférence $\geq 8 \mu\text{g/g}$ de protéines, encore préférentiellement supérieure ou égale à $10 \mu\text{g/g}$ de protéines.

La teneur en isolat selon l'invention dans le complément alimentaire sera choisie en fonction du profil de la population à supplémenter, donc de la dose de vitamine B12 à administrer, et de la teneur en vitamine B12 de l'isolat. Par exemple, une dose journalière de 150 à 1000 mg en protéines de l'isolat selon l'invention enrichi en vitamine B12 à $6 \mu\text{g/g}$ de protéines peut apporter 0,9 à 6,0 μg de vitamine B12 sous forme complexe avec transcobalamine. Aussi, 100 à 600 mg en protéines de l'isolat selon l'invention enrichi en vitamine B12 à $10 \mu\text{g/g}$ de protéines peut apporter 1,0 à 6,0 μg de vitamine B12 sous forme complexe avec transcobalamine. Ainsi, un tel complément alimentaire peut couvrir les besoins de chaque groupe de population montrés dans le tableau ci-dessous même si l'absorption intestinale de vitamine B12 est perturbée.

Références nutritionnelles pour la vitamine B12 ($\mu\text{g/j}$) selon ANSES 2016

Groupes de population	Apport satisfaisant ($\mu\text{g/jour}$)
Nourrissons de moins de 6 mois	0,4
Nourrissons de 6 mois et plus	1,5
Enfants de 1 à 3 ans	1,5
Enfants de 4 à 10 ans	1,5

Adolescents de 11 à 17 ans	2,5
Hommes et femmes de 18 ans et plus	4
Femmes enceintes	4,5
Femmes allaitantes	5

La présente invention se rapporte encore à un isolat dont la pureté protéique de lactoferrine est >90% ou 95% et dont la teneur en vitamine B12 est $\geq$ à 5 $\mu\text{g/g}$ de protéines, de préférence à $\geq$ 8 $\mu\text{g/g}$ de protéines, encore de préférence à $\geq$ 10 $\mu\text{g/g}$ de protéines pour prévenir et/ou

5 traiter une absorption déficiente en vitamine B12, par exemple chez des patients ayant subi une gastrectomie ou traités chroniquement avec des IPP (inhibiteurs de la pompe à protons). La cobalamine (vitamine B12) est présente dans le lait sous forme de complexe avec une protéine fixatrice. Dans le lait de vache, elle est présente sous forme complexe avec la transcobalamine qui est une protéine cationique de 43 kDa (S.N. Fedosov, T.E. Petersen, E.

10 Nexø, Transcobalamin from cow milk: isolation and physico-chemical properties, Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1292 (1996) 113–119). L'intérêt nutritionnel de ce complexe cobalamine–transcobalamine est important, puisqu'il semblerait qu'il soit responsable de la biodisponibilité de vitamine B12 (S.N. Fedosov, Ebba Nexø, Christian W. Heegaard, Vitamin B12 and its binding proteins in milk from cow and

15 buffalo in relation to bioavailability of B12, Journal of Dairy Science. American Dairy Science Association. 102 (2019) 4891–4905).

Bien que le comportement de ce complexe lors du traitement par chromatographie par échange de cations soit proche de celui de la lactoferrine, il est possible de faire varier la teneur en vitamine B12 dans l'éluat obtenu par le procédé selon l'invention en fonction des conditions

20 utilisées.

En outre, malgré son intérêt nutritionnel, pour certaines applications (ex. formules infantiles, soit préparations/laits pour nourrissons ou/et préparations/laits de suite) dans certains cas spécifiques (dose d'incorporation élevée), il peut y avoir un intérêt de limiter cette teneur en vitamine B12 dans un ingrédient de fraction pure en lactoferrine. Dans ce contexte, le procédé

25 selon l'invention, qui permet d'ajuster la teneur finale en vitamine B12, présente un grand intérêt.

L'invention se rapporte donc à des produits alimentaires pour l'alimentation humaine ou animale comprenant un isolat selon l'invention ; dans le cadre de formules infantiles, soit préparations/laits pour nourrissons ou/et préparations/laits de suite, on utilisera de préférence

30 un isolat dont la pureté protéique de lactoferrine est >95% et dont la teneur en vitamine B12

est $\leq 5 \mu\text{g/g}$ de protéines. Le taux d'incorporation de l'isolat selon invention est de 50 à 1000 mg en protéines dans un litre d'une formule prêt à consommer.

La présente invention se rapporte également à des produits non alimentaires, tels que des produits d'hygiène et des produits cosmétiques comprenant un isolat selon l'invention.

- 5 Sont également inclus dans la présente invention, les produits d'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 un isolat selon l'invention. Le taux d'incorporation de l'isolat selon invention est de 1 à 100 mg en protéines dans un gramme d'un produit.

FIGURES

- 10 Figure 1 : Représentation schématique du procédé d'obtention de l'isolat de protéines cationiques de lactosérum de pureté élevée en lactoferrine.

Figure 2 : Perte de charge générée par la colonne à flux radial et différents paramètres du passage de lait écrémé pasteurisé (concentrations en MS et en MP, débits en MS et en MP) (exemple 4)

- 15 Figure 3 : Corrélation entre la perte de charge générée par la colonne à flux radial et différents paramètres du passage de lait écrémé pasteurisé (débits en MS et en MP) (exemple 4)

- Figure 4 : Profil CLHP PI (Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse ; colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm)
20 de l'Ingrédient 1 de l'exemple 5.

Figure 5 : Profil CLHP SEC (Chromatographie en phase liquide à haute performance d'exclusion stérique ; colonne TSK G3000PWxl, CH₃CN/H₂O/TFA, détection à 210 nm) de l'Ingrédient 1 de l'exemple 5. Les indications de poids moléculaires en haut selon les temps de rétention des protéines témoins.

- 25 Figure 6 : Profil CLHP PI de l'Ingrédient 2 de l'exemple 6.

Figure 7 : Profil CLHP PI de l'Ingrédient 3 de l'exemple 6.

Exemple 1 : essai en paillasse avec le lait de vache écrémé pasteurisé (témoin)

- 1) Le lait de vache écrémé dont la MS est 92 g/L a été pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C. La concentration de lactoferrine bovine dans ce lait écrémé pasteurisé a
30 été mesurée par CLHP SCX (Chromatographie en phase liquide à haute performance par échange de cations fortes ; colonne Propac SCX, 20 mM tampon phosphate en gradient de NaCl, détection à 280 nm) ;
- 2) Le lait de vache écrémé pasteurisé a été passé sur une colonne de flux axial (1,6 cm de

diamètre) contenant 20 mL (BV) de SP Sepharose Big Beads à une vitesse linéaire de 400 cm/h à volume variable de lait écrémé pasteurisé ;

3) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, les protéines fixées sont éluées avec 6 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20°C ;

- 5 4) La teneur en lactoferrine bovine de chaque éluat a été mesurée par CLHP PI (Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse ; colonne C18 300 Å, 0.1% TFA/CH₃CN gradient, détection à 280 nm). Ainsi, la quantité de lactoferrine bovine dans chaque éluat a été obtenue.

Les conditions et les résultats des essais sont montrés dans le Tableau 1 :

Lait écrémé pasteurisé						Eluat	
MS (g/L)	Lactoferrine (mg/L)	Volume (L) (BV)		Débit de passage (cm/h) (g MS/cm ² /h)		Lactoferrine (mg)	(mg/L de lait écrémé)
92	89	4,00	200	400	36,8 g	255,5	63,9
92	78	6,00	300	400	36,8 g	317,3	52,9
92	86	9,00	450	400	36,8 g	511,7	56,9

10 *Tableau 1 - Lactoferrine bovine obtenue avec le passage de lait écrémé à 92 g/L*

Exemple 2 : essai en paillasse avec le lait de vache écrémé pasteurisé concentré

1) Le lait de vache a été écrémé, puis pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C. Ce lait de vache écrémé pasteurisé dont la MS est 92 g/L a été concentré par une osmose inverse jusqu'à 130 g/L de MS à 6°C. La concentration de lactoferrine bovine dans ce lait
15 écrémé pasteurisé concentré a été mesurée par CLHP SCX (colonne Propac SCX, 20 mM tampon phosphate en gradient de NaCl, détection à 280 nm) ;

2) Le lait de vache écrémé pasteurisé concentré (130 g/L de MS) est passé sur une colonne de flux axial (1,6 cm de diamètre) contenant 20 mL (BV) de SP Sepharose Big Beads à une vitesse linéaire variable à volume variable de lait écrémé pasteurisé ;

- 20 3) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont éluées avec 5 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20°C ;

4) La teneur en lactoferrine bovine de chaque éluat a été mesurée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA/CH₃CN gradient, détection à 280 nm). Ainsi, la quantité de lactoferrine bovine dans chaque éluat a été obtenue.

- 25 Les conditions et les résultats des essais sont présentés dans le Tableau 2 :

Lait écrémé pasteurisé						Eluat	
MS (g/L)	Lactoferrine (mg/L)	Volume (L)	(BV) [équivalence]*	Débit de passage (cm/h)	(g MS/cm ² /h)	Lactoferrine (mg)	(mg/L de lait écrémé)
130	127 [89]	4,20 [5,93]	210 [297]	200	26,0	487,9	116,2 [82,2]
130	127 [89]	4,20 [5,93]	210 [297]	300	39,0	457,8	109,0 [77,1]
130	127 [89]	6,00 [8,48]	300 [424]	200	26,0	671,0	118,8 [79,1]
130	127 [89]	6,00 [8,48]	300 [424]	300	39,0	617,6	102,9 [72,8]

Tableau 2 - Lactoferrine bovine obtenue avec le passage de lait écrémé concentré à 130 g/L

*Les valeurs équivalentes avec le lait écrémé pasteurisé non concentré (dont la MS est de 92 g/L).

La comparaison des tableaux 1 et 2 montre que le rendement en lactoferrine bovine obtenue est bien supérieur (>20%) avec le lait écrémé pasteurisé préalablement concentré en utilisant les conditions de fixation comparables (ex. le passage de ~300 BV équivalent de lait écrémé pasteurisé avec le débit de MS 37-39 g/cm²/h).

Exemple 3 : essai en paillasse avec le lait de vache écrémé pasteurisé concentré

- 1) Le lait de vache a été écrémé, puis pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C. Ce lait de vache écrémé pasteurisé dont la MS est 92 g/L a été concentré par une osmose inverse jusqu'à 130 g/L de MS à 6°C. La concentration de lactoferrine bovine dans ce lait écrémé pasteurisé concentré a été mesurée par CLHP SCX (colonne Propac SCX, 20 mM tampon phosphate en gradient de NaCl, détection à 280 nm) ;
- 2) Le lait de vache écrémé pasteurisé concentré (130 g/L de MS) est passé sur une colonne de flux axial (1,6 cm de diamètre) contenant 20 mL (BV) de SP Sepharose Big Beads à une vitesse linéaire variable à volume variable de lait écrémé pasteurisé ;
- 3) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont partiellement éluées avec 6 BV d'une solution de NaCl à 2,6% (p/v) soit 38 mS/cm à 20°C. La lactoperoxydase, les ribonucléases et d'autres protéines basiques ont été récupérées dans cet éluat ;
- 4) Des protéines encore fixées sont éluées avec 5 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à

20°C. La lactoferrine bovine a été récupérée dans cet éluat ;

5) La proportion de lactoferrine dans les protéines totales dans ce 2^e éluat a été déterminée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm) comme l'aire relatif du pic du lactoferrine bovine.

- 5 La teneur en cobalamine (vitamine B12) dans ce 2^e éluat a été également mesurée par la méthode AOAC. Ainsi, sa teneur par protéines totales a été obtenue.

Les conditions et les résultats de 2 séries d'essais sont montrés dans le Tableau 3 :

Lait écrémé pasteurisé				2 ^e Eluat	
Lactoferrine (mg/L)	Volume (L) (BV)		Débit de passage (cm/h)	Lactoferrine (%/protéines)	Cobalamine (µg/ g protéines)
130	1,60	80	150	94,0%	12,20
130	1,60	80	200	94,3%	12,15
130	1,60	80	300	94,7%	9,44
130	1,60	80	400	95,6%	9,13
127	4,20	210	200	95,2%	5,53
127	4,20	210	300	95,9%	2,69
127	6,00	300	200	95,0%	2,60
127	6,00	300	300	95,4%	1,85

Tableau 3 - Lactoferrine bovine obtenue dans le 2^e éluat avec le passage de lait écrémé concentré à 130 g/L

- 10 Ces résultats montrent qu'en utilisant des conditions appropriées, deux sortes de fraction de la pureté élevée en lactoferrine (ex. >95% sur protéines totales) peuvent être obtenues par la chromatographie par échange de cations avec le passage de lait écrémé pasteurisé concentré :
- une fraction dont la pureté protéique de lactoferrine est >95% et dont la teneur en vitamine B12 est ≤ 5 µg/g de protéines ;
- 15 - une fraction dont la pureté protéique de lactoferrine est >90% et dont la teneur en vitamine B12 est ≥ 10 µg/g de protéines.

Exemple 4 : essai à l'échelle industrielle avec le lait de vache écrémé pasteurisé (témoin)

Bien que le lait écrémé pasteurisé concentré à ~130 g/L puisse passer à travers une colonne axial à l'échelle paillasse, il est difficile d'envisager une production stable dans la durée à l'échelle industrielle avec un passage d'une matrice complexe comme une matière laitière, en

20

particulier concentrée, à la fois à cause d'une perte de charge élevée et un colmatage de surface filtrante.

Nous avons vérifié le comportement de perte de charge à travers d'une colonne industrielle à flux radial en faisant passer le lait écrémé de différent MS et à différents débits.

- 5 1) Une colonne industrielle à flux radial de 260 L (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) a été préparée avec 280 L de résines SP Sepharose Big Beads Food Grade. Elle a été régénérée avec 10% de NaCl, puis satinée avec 1 N NaOH, enfin rincée avec de l'eau osmosée ;
- 2) Le lait de vache a été écrémé, puis pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C. Une partie de lait de vache écrémé pasteurisé a été concentré par une osmose inverse à 6°C. Les compositions de ces laits écrémés pasteurisés non concentrés et concentrés sont les suivantes :

	Lait écrémé pasteurisé	Lait écrémé pasteurisé par OI
MS (g/L)	87,6	231,5
MAT [N×6,38] (g/L)	33,7	89,2
MP [(N-NPN) ×6,38] (g/L)	31,9	85,4

MS : matière sèche ; MAT : matières azotées totales ; MP : matières protéiques

Tableau 4 - Composition des laits écrémés de départ

- 15 3) Après avoir préparé le niveau de concentration de lait écrémé pasteurisé en mélangeant en ligne, il est passé à différents débits à travers de la colonne à flux radial préalablement préparée à une température à 10°C.

- Les compositions de lait écrémé, les débits et les pressions observés sont dans le Tableau 5. La perte de charge (soit la pression) générée par la colonne à flux radial a augmenté en fonction des débits et des concentrations en matières en phase mobile (Figure 2) et elle a une bonne corrélation entre le débit en MS ou en MP (Figure 3). Ces résultats montrent bien que cette colonne à flux radial à l'échelle industrielle permet un passage de lait écrémé pasteurisé concentré (par osmose inverse) jusqu'à 200 g/L en MS ou 72 g MP (ou 75 g/L en MAT) avec une perte de charge acceptable en utilisant un débit de passage approprié dans les conditions industrielles de production en routine.

Composition	MS (g/L)	87,6	110,7	116,9	119,2	145,0	160,3	159,3	173,3	193,3	87,6
de lait	MAT (g/L)	33,7	42,6	45,0	45,7	55,9	61,8	61,4	66,8	74,5	33,7
écrémé	MP (g/L)	31,9	40,5	42,8	43,5	53,3	58,9	58,6	63,8	71,2	31,9

Débit	Liquide (m ³ /h)	4,1	4,0	4,0	4,0	4,1	4,0	2,4	2,2	2,0	4,1
	MS (kg/h)	702	882	929	951	1170	1269	748	745	768	707
	MP (kg/h)	256	323	340	347	430	467	275	274	283	258

Pression de colonne	Entrée (bar)	0,93	1,11	1,13	1,12	1,5	1,68	0,87	0,91	1,02	1,01
	Sortie (bar)	0,16	0,14	0,14	0,15	0,16	0,15	0,13	0,12	0,13	0,13
	ΔP (bar)	0,77	0,97	0,99	0,97	1,34	1,53	0,74	0,79	0,89	0,88

Tableau 5 - Les compositions de lait écrémé, les débits et les pressions observés avec la colonne industrielle à flux radiale

Exemple 5 : essai industriel pour la fabrication de l'isolat de lactosérum pure en lactoferrine bovine avec le lait écrémé pasteurisé concentré

- 5 1) Le lait de vache a été écrémé, puis pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C, puis concentré par une osmose inverse jusqu'à 128 g/L de MS à 6°C ;
- 2) 80 m³ de ce lait écrémé pasteurisé concentré ont été passés sur une colonne industrielle à flux radial de 260 L (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) garnie avec 280 L de résines SP Sepharose Big Beads Food Grade au débit de 2,6 m/h ;
- 10 3) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont partiellement éluées par 6 BV d'une solution de NaCl à 38 mS/cm à 20°C. La lactoperoxydase, les ribonucléases et d'autres protéines basiques ont été récupérées dans cet éluat ;
- 4) Des protéines encore fixées sont éluées avec 4 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20°C. Cet éluat contenant la lactoferrine bovine a été refroidi et stocké à 6°C ;
- 15 5) Les étapes 2-4 ont été répétées 10 fois ;
- 6) 11,2 m³ de 2^e éluat regroupé ont été concentrés sur une ultrafiltration (membrane organique spirale avec MWCO de 20 kDa), puis diafiltré sur UF (MWCO 20 kDa) avec l'eau osmosée jusqu'à 1 mS/cm, enfin microfiltré sur une membrane céramique à 1,4 µm en double couche (Membrarox®, Pall Corporation) ;
- 20 7) L'isolat de protéines de lactosérum enrichie en lactoferrine bovine obtenu sous forme du microfiltrat a subi un séchage par atomisation et 40 kg de poudre ont été obtenus (Ingrédient 1) ;
- 8) L'Ingrédient 1 a été analysé ; notamment la proportion de lactoferrine dans les protéines totales a été déterminée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm) comme l'aire relatif du pic du lactoferrine bovine (Figure 5). La
- 25 teneur en cobalamine (vitamine B12) dans ce 2^e éluat a été également mesurée par la méthode

AOAC. Les résultats d'analyses sont présentés dans Tableau 6.

Exemple 6 : essai industriel pour la fabrication de l'isolat de lactosérum pure en lactoferrine bovine avec le lait écrémé pasteurisé concentré

- 1) Le lait de vache a été écrémé, puis pasteurisé à 73°C pendant 20 secondes, puis refroidi à 6°C, puis concentré par une osmose inverse jusqu'à 120 g/L de MS à 6°C ;
- 2) 60 m³ de ce lait écrémé pasteurisé concentré ont été passés sur une colonne industrielle à flux radial de 260 L (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) garnie avec 280 L de résines SP Sepharose Big Beads Food Grade au débit de 2,6 m/h ;
- 3) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont partiellement éluées par 6 BV d'une solution de NaCl à 36 mS/cm à 20°C. La lactoperoxydase, les ribonucléases et d'autres protéines basiques ont été récupérées dans cet éluat ;
- 4) Des protéines encore fixées sont éluées avec 4 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20°C. Cet éluat contenant la lactoferrine bovine a été refroidi et stocké à 6°C ;
- 5) Les étapes 2-4 ont été répétées 15 fois ;
- 6) 116.8m³ de 2^e éluat regroupé ont été concentrés sur une ultrafiltration (membrane organique spirale avec seuil de coupure (MWCO) de 20 kDa), puis diafiltré sur UF (MWCO 20 kDa) avec l'eau osmosée jusqu'à 1 mS/cm, enfin microfiltré sur une membrane céramique à 0,8 µm en double couche (Membrarox®, Pall Corporation) ;
- 7) L'isolat de protéines de lactosérum enrichi en lactoferrine bovine obtenu sous forme du microfiltrat a subi les traitements supplémentaires afin de garantir la stabilité de cette fraction protéique suivants :
 - i. Une partie du microfiltrat a été microfiltré sur membrane PES à 0,2 µm (Supor® Pall), puis mis dans les flacons stérilisés de 1 L (Ingrédient 3)
 - ii. Le reste du microfiltrat subi un séchage par atomisation et 60 kg de poudre ont été obtenus (Ingrédient 2).
- 8) Les Ingrédients 2 et 3 ont été analysés ; notamment la proportion de lactoferrine dans les protéines totales dans ce 2^e éluat ont été déterminée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm) comme l'aire relatif du pic du lactoferrine bovine (Figure 6 & Figure 7). La teneur en cobalamine (vitamine B12) dans ce 2^e éluat a été également mesurée par la méthode AOAC. Les résultats d'analyses sont présentés dans le tableau 6.

	Ingrédient 1	Ingrédient 2	Ingrédient 3	
Aspect	Poudre fine	Poudre fine	Liquide	
Couleur	Rose clair	Rose clair	Rose	
pH	6,1	5,8	5,9	2% solution pour poudre
Solubilité (Transmittance à 600nm)	92	93	90	% à 2% solution pour poudre
Humidité	3,4	3,6	-	g/100 g
Protéines (N×6,38)	95,9	97,2	14,1	g/100 g
Cendres	0,4	0,2	0,03	g/100 g
Lactoferrine	95,6	94,7	94,6	% protéines
Vitamine B12	2,3	8,0	8,0	µg/g protéines
Flore aérobie mésophile	<10	<10	<1	UFC/g
Coliformes	Absence	Absence	Absence	/g
Entérobactéries	Absence	Absence	Absence	/100 g
<i>Escherichia coli</i>	Absence	Absence	Absence	/100 g
Levures et moisissures	<10	<10	<1	UFC/g
Salmonelles	Absence	Absence	Absence	/750 g
Staphylocoques à coagulase positive	Absence	Absence	Absence	/25 g
Listeria	Absence	Absence	Absence	/250 g
<i>Cronobacter spp</i>	Absence	Absence	Absence	/750 g

Tableau 6 - Les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'Ingrédient 1, l'Ingrédient 2 et l'Ingrédient 3

Exemple 7 : essai en paillasse avec le lactosérum concentré issu de lait de chèvre écrémé pasteurisé

- 5 1) Le lait de chèvre a été écrémé, puis pasteurisé à 74°C pendant 30 secondes, puis refroidi à 6°C ;
- 2) 3000 L de lait de chèvre écrémé pasteurisé, après avoir maintenu à 50°C pendant 30 minutes, ont été passés sur une microfiltration céramique à 0,1 µm (Membrarox®, Pall

Corporation) pour obtenir un lactosérum comme microfiltrat de lait de chèvre dépourvu de matière grasse et les micelles de caséines ;

- 3) 2000 L de lactosérum issu du lait de chèvre ont été concentrés sur une ultrafiltration (membrane organique spirale avec seuil de coupure (MWCO) de 10 kDa). Les compositions
- 5 du rétentat obtenu (450 L) étaient dans le tableau 7 ci-dessous :

MS	(g/L)	86
MAT [N×6,38]	(g/L)	33
dont β -Lactoglobuline caprine	(g/L)	21
α -Lactalbumine caprine	(g/L)	10
Lactoferrine caprine	(g/L)	0,10
Lactose	(g/L)	38
Cendres	(g/L)	6

Tableau 7 - Composition de lactosérum concentré issu du lait de chèvre

- La concentration de β -Lactoglobuline caprine et α -Lactalbumine caprine dans ce lactosérum concentré a été mesurée par CLHP SEC (colonne TSK G3000PWxl, CH₃CN/H₂O/TFA, détection à 210 nm). La concentration de lactoferrine caprine dans ce lactosérum concentré a
- 10 été mesurée par CLHP SCX (colonne Propac SCX, 20 mM tampon phosphate en gradient de NaCl, détection à 280 nm).

- 4) 3 L de lactosérum concentré de chèvre est passé sur une colonne de flux axial (1,6 cm de diamètre) contenant 20 mL (BV) de SP Sepharose Big Beads à une vitesse linéaire de 200 et 300 cm/h ;
- 15 5) Après un rinçage avec 5 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont partiellement éluées avec 6 BV d'une solution de NaCl à 2,2% (p/v) à 20°C. Des protéines cationiques autres que la lactoferrine telles que la lactoperoxydase ont été récupérées dans cet éluat ;
- 6) Des protéines encore fixées sont éluées avec 5 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20°C. La lactoferrine caprine a été récupérée dans cet éluat. La teneur en lactoferrine caprine
- 20 dans l'éluat a été mesurée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm).

Comme montré dans le tableau 8, une fraction de lactoferrine caprine dont la pureté protéique très élevée a été extraite très efficacement à partir du lactosérum concentré issu du lait de chèvre.

Lactosérum concentré issu du lait de chèvre			2 ^e Eluat	
Volume		Débit de passage (cm/h)	Lactoferrine caprine	
(L)	(BV)		(%/protéines)	(mg)
3,0	150	200	98,9%	277
3,0	150	300	99,0%	272

Tableau 8 - Lactoferrine caprine obtenue dans le 2^e éluat avec le passage de lactosérum concentré issu du lait de chèvre

Exemple 8 : essai en paillasse avec le lactosérum de fromagerie concentré issu de lait de chèvre écrémé pasteurisé

- 5 1) 240 L du lactosérum de fromagerie issu du lait de chèvre pasteurisé (à 74°C pendant 30 secondes) a été concentré sur une ultrafiltration (membrane organique spirale avec MWCO de 10 kDa). Les compositions du rétentat obtenu (60 L) étaient dans le tableau ci-dessous :

MS (g/L)	70
MAT [N×6,38] (g/L)	36
dont β -Lactoglobuline caprine (g/L)	16
α -Lactalbumine caprine (g/L)	8
Lactoferrine caprine (g/L)	0,26
Lactose (g/L)	7
Cendres (g/L)	5

Tableau 9 - Composition des lactosérum fromagerie concentré issu du lait de chèvre

- La concentration de β -Lactoglobuline caprine et α -Lactalbumine caprine dans ce lactosérum concentré a été mesurée par CLHP SEC (colonne TSK G3000PWxl, CH₃CN/H₂O/TFA, détection à 210 nm). La concentration de lactoferrine caprine dans ce lactosérum concentré a été mesurée par CLHP SCX (colonne Propac SCX, 20 mM NaPB/NaCl gradient, détection à 280 nm).
- 2) 3 L de lactosérum concentré de chèvre sont passés sur une colonne de flux axial (1,6 cm de diamètre) contenant 20 mL (BV) de SP Sepharose Big Beads à une vitesse linéaire de 200 et 300 cm/h ;
- 3) Après un rinçage avec 6 BV de l'eau osmosée, des protéines fixées sont partiellement éluées avec 6 BV d'une solution de NaCl à 2,2% (p/v) à 20°C. Des protéines cationiques autres que la lactoferrine telles que la lactoperoxydase ont été récupérées dans cet éluat ;

- 4) Des protéines encore fixées sont éluées avec 5 BV d'une solution de NaCl à 10% (p/v) à 20 °C. La lactoferrine caprine a été récupérée dans cet éluat. La teneur en lactoferrine caprine dans l'éluat a été mesurée par CLHP PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA dans H₂O/CH₃CN en gradient, détection à 280 nm).
- 5 Comme montré dans le tableau 10, une fraction de lactoferrine caprine dont la pureté protéique élevée a été extraite très efficacement à partir du lactosérum de fromagerie concentré issu du lait de chèvre.

Lactosérum concentré issu du lait de chèvre			2 ^e Eluat	
Volume (L) (BV)		Débit de passage (cm/h)	Lactoferrine caprine (%/protéines)	(mg)
1,2	60	200	93,3%	293
1,6	80	200	92,6%	393
1,9	95	200	92,3%	440
2,4	120	200	90,7%	506

Tableau 10 - Lactoferrine bovine obtenue dans le 2^e éluat avec le passage de lactosérum de fromagerie concentré issu du lait de chèvre

10 **Exemple 9 : essai de préparation d'un lait infantile en poudre supplémenté en lactoferrine bovine (teneur en Vitamine B12 faible)**

- 1) Un lait pour nourrissons en poudre à base de lait de vache a été préparé par un procédé de fabrication standard en formulant avec lait de vache écrémé, lactose, maltodextrines, huile de tournesol oléique, matière grasse de lait anhydre, lactosérum déminéralisé, protéines solubles,
- 15 galacto-oligosaccharides, huile de tournesol, huile de colza, lécithine de soja, lécithine de tournesol, phosphate de calcium, huile de poisson, phosphate de potassium, huile de Mortierella alpina, bitartrate de choline, chlorure de calcium, citrate de potassium, citrate de magnésium, chlorure de sodium, fructo-oligosaccharides, vitamine C, pyrophosphate ferrique, carbonate de calcium, taurine, hydroxyde de potassium, chlorure de potassium, inositol,
- 20 nucléotides, L-phénylalanine, extrait riche en tocophérols, palmitate de L-ascorbyle, sulfate de zinc, L-tryptophane, vitamine E, iodure de potassium, L-carnitine, nicotinamide, sélénite de sodium, pantothénate de calcium, sulfate de cuivre, thiamine, vitamine A, vitamine B6, sulfate de manganèse, acide folique, vitamine K, biotine, vitamine D, riboflavine, vitamine B12.
- 25 2) Le lait pour nourrissons en poudre a été mélangé avec l'Ingrédient 1 à un taux

d'incorporation de 82 mg/100 g.

	Unités	100 g	100 mL
VALEUR ÉNERGÉTIQUE	kcal	502	67
	kJ	2098	282
PROTÉINES	g	9,6	1,3
Caséine	g	3,4	0,5
Protéines solubles	g	6,2	0,8
Lactoferrine	mg	74	10
MATIÈRES GRASSES	g	26	3,4
Acides gras saturés	g	6,7	0,9
Acide linoléique	mg	4500	608
Acide α -linoléique	mg	430	58
Acide arachidonique (ARA)	mg	139	19
Acide docosahexaénoïque (DHA)	mg	126	17
GLUCIDES	g	56,9	7,7
Sucres	g	37,6	5,1
Lactose	g	37,6	5,1
Maltodextrines	g	19,3	2,6
FIBRES ALIMENTAIRES	g	3	0,4
FOS & GOS	g	3	0,4
SELS MINÉRAUX	g		
Sodium	mg	150	20
Potassium	mg	540	73
Chlorure	mg	380	51
Calcium	mg	490	66
Phosphore	mg	340	46
Magnésium	mg	42	5,7
Fer	mg	5	0,68
Zinc	mg	3,8	0,51
Cuivre	μ g	400	54
Iode	μ g	100	14
Sélénium	μ g	21	2,8
Manganèse	μ g	100	14
Fluorure	μ g	275	37
VITAMINES			
Vitamine A (ER)	μ g	430	58
Vitamine D	μ g	11	1,5
Thiamine	μ g	500	68
Riboflavine	μ g	600	81
Niacine	mg	4	0,54
Acide pantothénique	mg	3,2	0,43
Vitamine B6	μ g	400	54
Biotine	μ g	16	2,2
Folates (EFA)	μ g	175	24
Vitamine B12	μ g	1,1	0,14
Vitamine C	mg	70	9,5
Vitamine K	μ g	40	5,4
Vitamine E (ET)	mg	13	1,8

Nucléotides	mg	21	2,8
Choline	mg	160	22
Inositol	mg	53	7,2
Taurine	mg	41	5,5
Carnitine	mg	11	1,5
Taux de reconstitution		13,5%	

Tableau 11 - La composition d'un lait infantile en poudre incorporé en l'Ingrédient 1

Exemple 10 : essai de formulation nutritionnelle en poudre supplémentée en lactoferrine bovine (teneur en Vitamine B12 élevée)

- 1) Un lait pour nourrissons (denrées alimentaires destinés à des fins médicales spéciales, soit DADFMS) en poudre à base de lait de vache a été préparé par un procédé de fabrication standard en formulant avec lait écrémé, huiles végétales (palme, colza, coprah, tournesol), protéines solubles déminéralisées, lactose, amidon, farine de graines de caroube, lécithine, citrate de calcium, huile de poisson, huile de Mortierella alpina, carbonate de calcium, vitamine C, phosphate de calcium, citrate de potassium, citrate de sodium, hydroxyde de calcium, chlorure de choline, taurine, vitamine E, inositol, sulfate ferreux, L-tryptophane, chlorure de potassium, chlorure de calcium, extrait riche en tocophérols, palmitate de L-ascorbyle, L-carnitine, sulfate de magnésium, nucléotides, sulfate de zinc, vitamine A, nicotinamide, vitamine K, vitamine D, pantothénate de calcium, sulfate de cuivre, thiamine, vitamine B6, riboflavine, sulfate de manganèse, acide folique, iodure de potassium, sélénite de sodium, biotine.
- 2) Le lait DADFMS pour nourrissons en poudre a été mélangé avec l'Ingrédient 2 à un taux d'incorporation de 400 mg/100 g. Un apport de 3,1 µg de vitamine B12 sous forme complexe avec transcobalamine par 100 g de la formulation en poudre a été obtenu par cette incorporation de l'Ingrédient 2.

	Unités	100 g	100 mL
VALEUR ÉNERGÉTIQUE	kcal	504	68
	kJ	2108	284
PROTÉINES	g	11	1,5
Caséine	g	6,6	0,9
Protéines solubles	g	4,4	0,6
Lactoferrine	mg	370	50
MATIÈRES GRASSES	g	26	3,5
Acides gras saturés	g	11,2	1,5
Acide linoléique	mg	4500	608
Acide α-linolénique	mg	430	58
Acide arachidonique (ARA)	mg	139	19
Acide docosahexaénoïque (DHA)	mg	126	17

GLUCIDES	g	55	7,4
Sucres	g	49,5	6,7
Lactose	g	49,5	6,7
Amidon	g	5,5	0,7
FIBRES ALIMENTAIRES	g	3	0,4
SELS MINÉRAUX	g		
Sodium	mg	150	20
Potassium	mg	540	73
Chlorure	mg	330	45
Calcium	mg	540	73
Phosphore	mg	300	41
Magnésium	mg	42	5,7
Fer	mg	5,0	0,68
Zinc	mg	3,8	0,51
Cuivre	µg	320	43
Iode	µg	100	14
Sélénium	µg	11	1,4
Manganèse	µg	100	14
Chrome	µg	20	2,7
Molybdène	µg	30	4,1
Fluorure	µg	<275	<37
VITAMINES			
Vitamine A (ER)	µg	450	58
Vitamine D	µg	7,5	1,0
Thiamine	µg	500	68
Riboflavine	µg	600	81
Niacine	mg	5,0	0,68
Acide pantothénique	mg	3,2	0,43
Vitamine B6	µg	400	54
Biotine	µg	16	2,2
Acide folique	µg	70	9,5
Vitamine B12	µg	3,5	0,47
Vitamine C	mg	70	9,5
Vitamine K	µg	40	5,4
Vitamine E (ET)	mg	10	1,4
Nucléotides	mg	22	2,9
Choline	mg	100	14
Inositol	mg	45	6,0
Taurine	mg	33	4,5
Carnitine	mg	17	2,3
Taux de reconstitution		13,5%	

Tableau 12 - La composition de DADFMS en poudre incorporé en l'Ingrédient 2

Exemple 11 : essai de formulation nutritionnelle en poudre supplémentée en lactoferrine bovine (teneur en Vitamine B12 élevée)

- 1) Un lait pour nourrissons (aliments diététique destinés à des fins médicales spéciales,
- 5 DADFMS) en liquide à base de lait de vache a été préparé par un procédé de fabrication

- standard en formulant avec Lait écrémé, protéines solubles déminéralisées, huiles végétales (palme, palmiste, colza, tournesol), lactose, lécithine de soja, lécithine de tournesol, citrate de sodium, phosphate de calcium, citrate de potassium, chlorure de calcium, carbonate de calcium, vitamine C, huile de Mortierella alpina, huile de poisson, hydroxyde de calcium,
- 5 chlorure de potassium, vitamine E, chlorure de choline, taurine, sulfate ferreux, extrait riche en tocophérols, palmitate de L-ascorbyle, inositol, sulfate de zinc, nucléotides, L-carnitine, nicotinamide, vitamine A, sulfate de magnésium, vitamine K, vitamine D, pantothénate de calcium, sulfate de cuivre, thiamine, vitamine B6, riboflavine, sulfate de manganèse, acide folique, iodure de potassium, sélénite de sodium, biotine.
- 10 2) Le lait DADFMS pour nourrissons en liquide a été stérilisé par un traitement thermique ultra-haute température (UHT), puis mélangé avec l'Ingrédient 3 avec un taux d'incorporation de 410 mg/100 g (sur la matière sèche). Un apport de 0,43 µg de vitamine B12 sous forme complexe avec transcobalamine par 100 mL de la formulation en liquide a été obtenu par cette incorporation de l'Ingrédient 3.

	Unités	100 mL
VALEUR ÉNERGÉTIQUE	kcal	69
	kJ	288
PROTÉINES	g	1,5
Caséine	g	0,6
Protéines solubles	g	0,9
Lactoferrine	mg	50
MATIÈRES GRASSES	g	3,5
Acides gras saturés	g	1,6
Acide linoléique	mg	418
Acide α-linolénique	mg	46
Acide arachidonique (ARA)	mg	7
Acide docosahexaénoïque (DHA)	mg	7
GLUCIDES	g	7,8
Sucres	g	7,8
Lactose	g	7,8
FIBRES ALIMENTAIRES	g	0
SELS MINÉRAUX	g	
Sodium	mg	20,3
Potassium	mg	72,9
Chlorure	mg	44,6
Calcium	mg	66,2
Phosphore	mg	36,5
Magnésium	mg	5,67
Fer	mg	0,68
Zinc	mg	0,54
Cuivre	µg	43
Iode	µg	14

Sélénium	µg	1,4
Manganèse	µg	14
Chrome	µg	2,7
Molybdène	µg	1,4
Fluorure	µg	<37
VITAMINES		
Vitamine A (ER)	µg	61
Vitamine D	µg	1,0
Thiamine	µg	68
Riboflavine	µg	81
Niacine	mg	0,54
Acide pantothénique	mg	0,43
Vitamine B6	µg	54
Biotine	µg	2,2
Acide folique	µg	9,5
Vitamine B12	µg	0,47
Vitamine C	mg	9,5
Vitamine K	µg	5,4
Vitamine E (ET)	mg	2,0
Nucléotides	mg	2,9
Choline	mg	14
Inositol	mg	6,0
Taurine	mg	4,5
Carnitine	mg	2,3
MS totale	g	13,2

Tableau 13 - La composition de DADFMS en liquide incorporé en l'Ingrédient 3

Exemple 12 : préparation d'un complément alimentaire en gélule en utilisant la lactoferrine bovine (teneur en Vitamine B12 élevée)

Un complément alimentaire en gélule a été préparé à partir du mélange d'Ingrédient 2 de l'Exemple 5 (99,5% du mélange) et silice colloïdale (0,5% du mélange). Chaque gélule contient 200 mg de protéines.

La teneur en vitamine B12 sous forme complexe avec transcobalamine est de 1,6 µg/gélule.

La dose journalière recommandée pour chaque groupe de population est comme suite :

Groupe de population	Dose journalière	Vitamine B12 sous forme complexe	Lactoferrine bovine
Enfant de 4 à 10 ans	1 gélule	1,6 µg	189 mg
Adolescents de 11 à 17 ans	2 gélules	3,2 µg	379 mg
Adultes	3 gélules	4,8 µg	568 mg
Femmes enceintes/allaitantes	4 gélules	5,6 µg	757 mg

Tableau 14

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un isolat de protéines cationiques de lactosérum comprenant les étapes a) à f) suivantes :
 - a) la matière première de départ est un lait écrémé de mammifère ou un lactosérum issu de lait de mammifère préalablement concentré par une technologie membranaire de telle sorte que, lorsque la matière première de départ est préparée avec un lait écrémé de mammifère, la concentration en matière protéique MP est comprise entre 40 et 72 g/L et, lorsque la matière première de départ est préparée avec du lactosérum, la concentration en matière protéique est comprise entre 20 et 100 g/L ;
 - b) extraction sélective de protéines cationiques comprenant les étapes suivantes :
 - i. passage de la matière première de départ au travers d'une colonne de chromatographie en flux radial, contenant des résines échangeuses de cations fortes de type sulfopropyle SP, de préférence de diamètre supérieur à 100 µm:
 - Le volume de matière première de départ, équivalent à celui non concentré, est compris entre 40 et 500 fois de volume des résines BV ;
 - La vitesse linéaire de passage de matière première de départ est comprise entre 1,0 et 4,0 m/h ;
 - ii. rinçage avec de l'eau déminéralisée :
 - Le volume d'eau déminéralisée est compris entre 2 et 6 BV ;
 - La vitesse de passage d'eau déminéralisée est comprise entre 3,0 et 5,0 m/h ;
 - iii. élution des protéines cationiques fixées avec une solution saline à conductivité électrique entre 30 et 50 mS/cm :
 - Le volume de la solution saline est compris entre 4 et 8 BV ;
 - La vitesse de passage de la solution saline est comprise entre 0,3 et 2,0 m/h ;
 - iv. élution des protéines cationiques fixées avec une solution saline à conductivité électrique entre 80 et 140 mS/cm :
 - Le volume de la solution saline est compris entre 3 et 6 BV ;
 - La vitesse de passage de la solution saline est comprise entre 0,5 et 2,5 m/h ;
 - c) concentration des protéines cationiques de pureté élevée en lactoferrine éluées dans la solution saline en utilisant une membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure compris entre 10 et 20 kDa ;
 - d) déminéralisation des protéines cationiques de pureté élevée en lactoferrine par une diafiltration avec de l'eau déminéralisée en utilisant une membrane d'ultrafiltration ayant un

seuil de coupure compris entre 10 et 20 kDa pour atteindre un ratio cendres/protéines compris entre 0,001 et 0,03 ;

e) microfiltration avec une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm , de la solution concentrée de protéines cationiques spécifiques afin réduire la charge microbienne ;

f) optionnellement, séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution concentrée de protéines cationiques spécifiques préalablement microfiltrée afin d'obtenir un isolat de lactoferrine en poudre.

2. Isolat de protéines cationiques de lactosérum obtenu par le procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la proportion de protéines sur matière sèche est supérieure ou égale à 90% en poids et en ce que la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 90% en poids.

3. Isolat de protéines cationiques de lactosérum issu de lait de vache ou de lait de chèvre obtenu par le procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 95% en poids et contenant une cobalamine sous forme complexe avec transcobalamine à une concentration inférieure ou égale à 5 $\mu\text{g/g}$ de protéines.

4. Isolat de protéines cationiques de lactosérum issu de lait de vache ou de lait de chèvre susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la proportion de la lactoferrine sur les protéines totales est supérieure à 90% en poids et contenant une cobalamine sous forme complexe avec transcobalamine à une concentration supérieure ou égale à 5 $\mu\text{g/g}$ de protéines.

5. Isolat de protéines cationiques de lactosérum selon la revendication 4, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'une absorption déficiente en vitamine B12 chez des patients ayant subi une gastrectomie ou traités chroniquement avec des inhibiteurs de la pompe à protons IPP.

6. Produit alimentaire pour l'alimentation humaine ou animale comprenant un isolat selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.

7. Produit non alimentaire comprenant un isolat selon l'une quelconque des revendications 2 à 4.