

Contribution à la valorisation des lactosérums industriels à l'aide des techniques de séparation par membranes

Michel Calco

▶ **To cite this version:**

Michel Calco. Contribution à la valorisation des lactosérums industriels à l'aide des techniques de séparation par membranes. Biochimie [q-bio.BM]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1997. Français. NNT : 1997NAN10287 . tel-01748597

HAL Id: tel-01748597
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748597

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

FACULTE DES SCIENCES
U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I EN BIOCHIMIE

par

Michel CALCO

Contribution à la valorisation des lactosérums industriels à l'aide des techniques de séparation par membranes

Soutenance publique le 19 novembre 1997 devant la commission d'examen :

Président :	
M. B. VITOUX	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	
M. F. RENÉ	Chargé de Recherches INRA, Thiverval-Grignon
M. B. TARODO DE LA FUENTE	Professeur, Université des Sciences et Techniques, Montpellier
Examinateurs :	
M. G. LINDEN	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Mme V. PASSALENT	Ingénieur Développement , Lacto Sérum France,Verdun

---

Laboratoire des Biosciences de l'Aliment associé à l'INRA
Faculté des Sciences - 54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

S.C.D. - U.H.P.
NANCY 1
SCIENCES

AVANT-PROPOS

Que Monsieur le Professeur B. VITOUX, Université Henri Poincaré de Nancy, soit remercié d'avoir accepté de présider la commission d'examen pour ce mémoire. Je n'oublierai pas la qualité de son enseignement et sa grande disponibilité après les cours.

Qu'il me soit permis de remercier sincèrement Monsieur le Professeur G. LINDEN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et proposé ce sujet de recherche.

Que Monsieur J-L. MAUBOIS, Directeur de Recherches à l'INRA de Rennes, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance, pour m'avoir accueilli plusieurs mois dans son laboratoire, et de ma sincère gratitude, pour l'attention qu'il m'a accordée, ses encouragements, ses nombreux conseils et sa très grande disponibilité. Je le remercie très sincèrement de m'avoir donné le "virus" des techniques à membranes.

Que Monsieur F. RENE, Chargé de Recherches INRA au LGMPA de Thiverval-Grignon, soit remercié d'avoir accepté d'être rapporteur de la commission d'examen pour ce mémoire.

Que Monsieur Le Professeur B. TARODO DE LA FUENTE, Université des Sciences et Techniques du Languedoc à Montpellier, soit remercié d'avoir accepté d'être rapporteur de la commission d'examen pour ce mémoire.

Que Monsieur le Professeur J.L. GAILLARD, Université Henri Poincaré de Nancy, soit remercié d'avoir accepté de faire parti de la commission d'examen pour ce mémoire.

Que Monsieur F. FERRERO, Responsable Qualité de la société Lacto Sérum France, soit remercié pour sa collaboration, ses conseils et son importante disponibilité.

Que Madame V. PASSALENT, Ingénieur Développement de la société Lacto Sérum France, soit remerciée d'avoir acceptée de faire partie de la commission d'examen pour ce mémoire.

Que Mademoiselle S. CAMPAGNA et Monsieur F. SAULNIER soient profondément remerciés pour m'avoir soutenu, encouragé et conseillé tout au long de mes recherches. En toute sympathie ... .

J'associe à mes remerciements tous les membres du Laboratoire des Biosciences de l'Aliment pour leurs aides et encouragements.

Enfin, je dédie ce mémoire de thèse à mes parents pour leurs encouragements, et à ma femme Karine pour son soutien dans les moments les plus difficiles.

A Karine
A mes Parents

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

I. CARACTERISTIQUES DES LACTOSERUMS 1
I.1. Généralités 1
I.2. Composition générale 1
I.3. Le lactose 2
I.4. Les protéines 2
I.4.1. Propriétés générales 2
I.4.2. Comportement de la β-lactoglobuline (β-Lg) 3
I.4.3. Comportement de l'α-lactalbumine (α-La) 4
I.4.4. Comportement de la sérumalbumine bovine et des immunoglobulines 5
I.4.5. Comportement de mélange de protéines lactosériques 5
I.5. Présentation de la fraction minérale 6
I.6. Conclusion 7

II. LES TECHNOLOGIES DE SEPARATION SUR MEMBRANE POUR VALORISER LES CONSTITUANTS DU LACTOSERUM 8
II.1. Historique 8
II.2. Présentation de la technologie (cas de l'UF et la MF) 9
II.2.1. Principe 9
II.2.2. Caractéristiques des membranes 10
II.2.2.1. Domaine de travail 10
II.2.2.2. Nature des membranes 10
II.2.2.3. Configurations des membranes 11
II.2.3. Les différents modes de fonctionnement 11
II.2.4. Avantages de la technologie 12
II.2.5. Les phénomènes limitants 12
II.2.6. Buts de l'UF et de la MF 13
II.2.7. La conception du procédé : une démarche pas à pas 13
II.2.8. Développements futurs des procédés à membranes 14
II.3. Les Concentrés Protéiques de Lactosérum (CPL) 14
II.3.1. Fabrication des CPL 14
II.3.2. Utilisation des CPL 16
II.4. Autres voies de valorisation 17
II.4.1. Séparation et purification de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline 17
II.4.2. Séparation de la lactoferrine (Lf) et de la lactopéroxydase (Lp) 18
II.4.3. Séparation des immunoglobulines et du caséinomacropeptide 18
II.4.4. Conclusion 19

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE 20

Chapitre I

INFLUENCE DU pH SUR LE TRANSFERT DES PROTEINES MAJEURES LORS DE L'ULTRAFILTRATION DE LACTOSERUM DOUX

I. CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE 21

II. MATERIEL ET METHODES 23
II.1. Boucle expérimentale d'UF et conditions opératoires 23
II.2. Nature du lactosérum 24
II.3. Caractérisation du transfert de matière 24
II.3.1. Flux de perméation J 24
II.3.2. Résistances hydrauliques des membranes propres (Rm) et résistances hydrauliques dues au colmatage total (Rf) 25
II.3.3. Taux de Rétention (TR) 26
II.4. Caractérisation biochimique des produits obtenus 26

III. RESULTATS 28
III.1. Influence du pH sur la perméabilité des membranes 28
III.2. Influence du pH sur le niveau de colmatage total des membranes 28
III.3. Incidence du pH sur la composition des rétentats et des perméats 29
III.4. Influence du pH sur la transmission des protéines sériques majeures 29

IV. DISCUSSION 31

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 34

Chapitre II

VALORISATION DE LA FRACTION MINERALE DE LACTOSERUM ACIDE : EXTRACTION DE PHOSPHATE DE CALCIUM ET PURIFICATION PAR MICROFILTRATION

I. INTRODUCTION....35
I.1. Les lactosérums acides....35
I.1.1. Composition des lactosérums acides....35
I.1.2. Etude de la fraction minérale du lactosérum et des équilibres salins....35
I.1.2.1. Généralités....35
I.1.2.2. Facteurs modifiant les équilibres salins....37
I.1.2.2.1. Influence de la température....37
I.1.2.2.2. Influence du pH....37
I.1.2.3. Nature de l'insoluble minéral....38
I.2. Les différentes formes de phosphates calciques....38
I.2.1. Nature chimique des principaux phosphates de calcium....38
I.2.1.1. Orthophosphate monocalcique....39
I.2.1.2. Orthophosphate dicalcique....39
I.2.1.3. Orthophosphate tricalcique....39
I.2.2. Etude cristalline de la brushite....39
I.2.2.1. Rappels sur les systèmes cristallins....39
I.2.2.1.1. Notion de maille élémentaire....39
I.2.2.1.2. Les sept systèmes cristallins....40
I.2.2.2. Structure cristalline de la brushite....40
I.2.3. Quelques utilisations des phosphates calciques....41
I.3. Objectif de l'étude....42

II. MATERIEL ET METHODES....43
II.1 Méthodes analytiques courantes....43
II.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche....43
II.1.2. Détermination de la limpidité des lactosérums....43
II.1.3. Détermination de la fraction protéique....43
II.1.3.1. Détermination de la Matière Azotée Totale (MAT)....43
II.1.3.2. Dosage des protéines lactosériques majeures....44
II.1.4. Détermination du lactose....44
II.2. Méthodes d'analyse de la fraction minérale....44
II.2.1. Détermination du taux de cendres....44
II.2.2. Dosage des minéraux....45
II.2.2.1. Dosage des cations....45
II.2.2.2. Dosage des anions et des acides organiques....45

II.2.3. Méthodes de détermination de la nature des structures cristallines....46
II.2.3.1. Diffraction des rayons X....46
II.2.3.1.1. Principe....46
II.2.3.1.2. Mode opératoire....46
II.2.3.2. Microscopie électronique à balayage (M.E.B.)....46
II.2.3.2.1. Principe....46
II.2.3.2.2. Préparation des échantillons....47
II.3. Origine et composition du lactosérum utilisé....47
II.4. Traitement du lactosérum....48
II.5. Microfiltration tangentielle du décantat minéral....49
II.5.1. Description de la boucle de MF tangentielle....49
II.5.1.1. Description des équipements....49
II.5.1.2. Avantages du pilote KARIN 2....50
II.5.2. Nature des membranes utilisées....50
II.5.3. Conditions opératoires....51
II.5.4. Procédure de nettoyage des membranes....51

III. RESULTATS ET DISCUSSION....53
III.1. Influence du pH et de la température sur la co-précipitation de phosphate et de calcium....53
III.1.1. Rappel du "cahier des charges"....53
III.1.2. Choix des températures et des pH....53
III.1.3. Résultats....54
III.1.3.1. Influence du pH....54
III.1.3.1.1. Volume de décantat obtenu....54
III.1.3.1.2. Densité optique à 600nm....55
III.1.3.1.3. pH du surnageant après précipitation....55
III.1.3.1.4. Extrait sec du surnageant de décantation....55
III.1.3.1.5. Pourcentage de calcium précipité....56
III.1.3.1.6. Pourcentage de phosphate précipité....56
III.1.3.1.7. Pourcentage de pertes en Matières Azotées Totales....57
III.1.3.1.8. Augmentation du taux de cendres....57
III.1.3.1.9. Conclusion....58
III.1.3.2. Influence de la température....58
III.1.3.2.1. Volume de décantat obtenu....58
III.1.3.2.2. Densité optique à 600nm....59
III.1.3.2.3. pH du surnageant après précipitation....59
III.1.3.2.4. Extrait sec du surnageant de décantation....59
III.1.3.2.5. Pourcentage de calcium et de phosphate précipité....59
III.1.3.2.6. Pourcentage de pertes en Matières Azotées Totales....59
III.1.3.2.7. Augmentation du taux de cendres....60
III.1.3.2.8. Conclusion....60

III.1.4. Discussion....60
III.1.4.1. Influence du pH....60
III.1.4.2. Influence de la température....63
III.1.5. Composition des produits obtenus....65
III.1.5.1. Surnageant de décantation statique....65
III.1.5.2. Poudre de décantat "lavé"....67
III.1.5.2.1. Composition biochimique....67
III.1.5.2.2. Analyse de la poudre aux rayons X....68
III.1.6. Conclusion....68
III.2. Extraction et purification de phosphate de calcium à l'échelle "pilote"....69
III.2.1. Traitement du lactosérum....69
III.2.2. Essais de filtration particulaire sur le décantat "lavé"....69
III.2.2.1. Essais préliminaires....69
III.2.2.1.1. Essais sur filtres-presses à bandes presseuses....69
III.2.2.1.2. Essais de microfiltration....70
III.2.2.2. Microfiltration en flux tangentiel du décantat "lavé"....70
III.2.2.2.1. Rôle et choix des paramètres opératoires....70
III.2.2.2.2. Influence du mode de démarrage....71
III.2.2.2.3. Cinétique du flux de perméat....72
III.2.2.2.4. Taux de rétention en calcium et phosphate....73
III.2.2.2.5. Traitement du rétentat et obtention de poudre de phosphate de calcium....73
III.2.3. Caractérisation biochimique des différents produits obtenus au cours du process....74
III.2.3.1. Surnageant de décantation statique....74
III.2.3.2. Poudre de décantat "lavé"....74
III.2.3.3. Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration....75
III.2.3.4. Conclusion....75
III.2.4. Analyses des poudres aux rayons X et au microscope électronique à balayage....76
III.2.4.1. Résultats des rayons X....76
III.2.4.1.1. Cas de la poudre de décantat "lavé"....76
III.2.4.1.2. Cas de la poudre du dépôt de rétentat de microfiltration....76
III.2.4.2. Résultats de la M.E.B....77
III.2.4.2.1. Poudre de décantat "lavé"....77
III.2.4.2.2. Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration....77
III.2.4.2.3. Conclusion....77
III.2.5. Rendements d'extraction....78
III.2.6. Conclusion....79

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES....80

CONCLUSION GENERALE....81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES....83

ABREVIATIONS

α-lactalbumine	:	α-La
β-lactoglobuline	:	β-Lg
C_i, Cp_i, Cr_i	:	Concentration de i dans le lactosérum initial, le perméat, le rétentat ($g.kg^{-1}$)
D.O.	:	Densité optique (nm)
EST	:	Extrait Sec Total ($g.kg^{-1}$)
FCV	:	Facteur de Concentration Volumique
J_W	:	Densité de flux à l'eau ($l.h^{-1}.m^{-2}$)
J_p	:	Densité de flux de perméat ($l.h^{-1}.m^{-2}$)
MAT	:	Matières Azotées Totales ($g.kg^{-1}$)
M.E.B.		Microscopie Electronique à Balayage
MF	:	Microfiltration
μ_w, μ_p	:	Viscosité dynamique de l'eau, du perméat (Pa.s)
PT	:	Pression Transmembranaire (bar)
Rf	:	Résistance hydraulique de colmatage total (m^{-1})
Rm	:	Résistance hydraulique de la membrane propre (m^{-1})
R.X	:	Rayons X
TR	:	Taux de Rétention (%)
UF	:	Ultrafiltration
VT	:	Vitesse Tangentielle de balayage ($m.s^{-1}$)
V_i	:	Volume de lactosérum mis en oeuvre (l)
V_r	:	Volume de rétentat (l)

INTRODUCTION :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE
ET
OBJECTIFS DE L'ETUDE

I. CARACTERISTIQUES DES LACTOSERUMS

I.1. Généralités :

Les fabrications fromagères et l'extraction de la caséine du lait écrémé laissent comme "co-produit" un liquide clair, jaune verdâtre : le lactosérum (Rolet, 1920). Il représente la phase aqueuse qui se sépare du caillé ou de la caséine (Sottiez, 1985). Il a une composition variable selon le type de fabrication dont il provient (Veisseyre, 1979). Son volume par rapport à celui du lait mis en oeuvre est de 80 à 90% (Alais, 1984). On distingue le lactosérum doux et le lactosérum acide selon que son acidité est respectivement inférieure et supérieure à 18°D (Méréo, 1971).

Les lactosérums doux sont obtenus durant la fabrication des fromages à caractère présure, après précipitation de la caséine et de la matière grasse. Ils proviennent des technologies pâtes pressées cuites, pâtes pressées non cuites, caséine présure (Adrian et Bourlier, 1980) et pâtes molles type Brie ou Camembert.

Les lactosérums acides sont obtenus par coagulation isoélectrique. Ils proviennent de technologies pâtes fraîches, pâtes molles lactiques et de caséineries (caséines acides) (Veisseyre, 1979 ; Adrian et Bourlier, 1980).

Ces quelques définitions laissent présager qu'il n'y a pas un lactosérum doux ou un lactosérum acide, mais qu'il y a à l'intérieur d'une catégorie une multitude de sérums. Il existe autant de lactosérums que de technologies fromagères, voire pour un même fromage, les lactosérums peuvent différer selon l'usine dont ils proviennent. En somme, "il n'y a pas de lactosérum mais des lactosérums" (Alais, 1981).

I.2. Composition générale :

L'hétérogénéité des lactosérums acides et doux rend difficile la présentation d'une composition détaillée pour les deux types. Le tableau I permet toutefois de comparer les lactosérums doux et acides.

SCD - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES

Tableau I. Composition moyenne des lactosérums (d'après Alais, 1984).

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
	(%)	
Eau	93,0	93,5
Extrait sec	7,0	6,5
	(g/100 g d'extrait sec)	
Lactose	71,0	69,0
Matières azotées[1]	13,0	10,5
Sels minéraux	8,6	10,5
Matières grasses	1,5	1,5

[1] *La caséine est à l'état de traces.*

La teneur en eau des lactosérums est très importante : elle est de l'ordre de 93%. Elle devra être réduite notamment pour les transporter vers des unités de transformation.

Les éléments constituant la matière sèche du lactosérum sont par ordre d'importance : le lactose, les matières azotées et les cendres.

I.3. Le lactose :

Il est le constituant majeur de la matière sèche des lactosérums (Alais, 1981). C'est un glucide réducteur qui appartient au groupe des diholosides. Il est formé d'une molécule de β galactose et d'une molécule de α ou β glucose. Sa formule de structure implique l'existence de deux formes isomères : α et β. Elles se distinguent par leurs propriétés physiques, en particulier leur pouvoir rotatoire et leurs caractères de solubilité et de cristallisation. Le lactose α se présente communément à l'état monohydraté contenant 5% d'eau de cristallisation. Il est obtenu par cristallisation de solutions saturées à une température inférieure à 93,5°C (Veisseyre, 1979).
La forme β anhydre s'obtient par cristallisation de solution à une température supérieure à 93,5°C (Veisseyre, 1979).

La solubilité initiale du lactose à 15°C est faible : 7,3g/100g d'eau. D'après Buma et Van der Veen (1974), la solution renferme à l'équilibre 2/3 de lactose β. Une élévation de température entraîne une chute du rapport β/α (Roetman et Buma, 1974).

I.4. Les protéines :

I.4.1. Propriétés générales :

Les protéines majeures du lactosérum sont la β-lactoglobuline (β-Lg), l'α-lactalbumine (α-La), la sérumalbumine bovine et les immunoglobulines. Les protéines ne représentent que 10 à 13% de la matière sèche, mais elles constituent la partie noble du lactosérum. En effet, elles possèdent d'une part d'excellentes valeurs nutritionnelles qui sont supérieures à celles des caséines ou des isolats de soja (Forsum, 1974 ; Wennar, 1982), et d'autre part, d'excellentes

propriétés fonctionnelles (Kinsella, 1976 ; Cheftel et Lorient, 1982 ; Vuillemard *et al.*, 1989). Ces deux propriétés font qu'elles sont et qu'elles seront de plus en plus utilisées en industrie agro-alimentaire et dans une moindre mesure en industrie pharmaceutique ou parapharmaceutique.

Mais avant de les séparer de leur milieu lactosérum industriel, ou bien de les fractionner, il est nécessaire de connaître leur comportement (à l'égard de la température et du pH notamment), car un produit enrichi en protéines sériques, ou bien une fraction de protéines sériques, ne sera commercialisé au stade industriel que sous forme de poudre. On passe inévitablement par des étapes de séchage qui peuvent dénaturer les protéines.

Les protéines lactosériques possèdent une structure globulaire et compacte qui leur confère des propriétés particulières, notamment une thermosensibilité qui conduit à leur dénaturation (tableau II). La dénaturation des protéines sériques se déroule en deux étapes consécutives :

- un déplissement moléculaire qui conduit à la perte des structures secondaire et tertiaire ;
- une agrégation des chaînes polypeptidiques déplissées, essentiellement par interactions hydrophobes conduisant souvent à une perte de solubilité de la protéine.

Ce phénomène de dénaturation est fonction des conditions du milieu environnant (pH, force ionique, concentration en protéines) et de l'intensité du traitement thermique (De Wit et Klarenbeek, 1984).

Nous étudierons chacune des protéines majeures du lactosérum, car elles ont un comportement spécifique vis-à-vis du processus de dénaturation thermique lié à leur propre structure.

I.4.2. Comportement de la β-lactoglobuline (β-Lg) :

La protéine majeure dicte le comportement thermique du lactosérum. En effet, De Wit (1981) retrouve les deux pics endothermiques de cette protéine en chauffant du lactosérum. La dénaturation thermique de la β-lactoglobuline se produit entre 50 et 75°C par un changement de conformation et le démasquage des groupements -SH (Lyster, 1970 ; Hillier et Lyster, 1979).

La structure et l'état d'association de la β-Lg sont très dépendants du pH (Pessen *et al.*, 1985) :

- entre pH 5,2 et 7,5, la β-Lg existe plutôt sous forme de dimère (36 800 Da) ;

Tableau II. Caractéristiques structurales et physicochimiques des protéines du lactosérum (d'après CHEFTEL et LORIENT, 1982).

	Protéines du lactosérum				
	β-Lactoglobuline	α-lactalbumine	sérumalbumine	immunoglobulines	protéose-peptones
proportion moyenne (%)	50	22	5	12	10
masse moléculaire (Da)	18 400	14 200	66 000	16 000 à 10^6	4000 à 40 000
phosphore (%)	0	0	0	0	0,5 à 2,4
glucides (%)	0	0	0	2 à 12	2 à 16
cystéine (-SH libres)	5 (1)	8 (0)	35 (1)	-	-
sensibilité à la chaleur	instable si > 75°C	instable si > 95°C	instable si > 65°C	instable si > 60°C	stables
pH isoioniques	5,2	5,1	4,8	4,6 - 6,0	3,7

- entre pH 3,5 et 5,2, à basse température (2°C), les dimères s'associent en octamères (147 000 Da) ;

- la tendance à la dissociation augmente et devient apppréciable en dessous de pH 3,5. Cette dissociation réversible du dimère en monomères n'est pas accompagnée de changements importants de conformation de la protéine (Swaisgood, 1982) ;

- une zone de transition se manifeste au dessus de pH 7,5. Au delà de ce pH, on assiste à une augmentation de la dissociation du dimère en monomères. La transition s'accompagne d'une augmentation de la réactivité du groupement sulfhydrile libre (Pessen *et al.*, 1985) ;

- au dessus de pH 8,0 se produisent des changements irréversibles, dûs à l'oxydation du groupement sulfhydrile libre et à la rupture des ponts disulfures, conduisant à une agrégation moléculaire.

L'effet du pH est important : la dénaturation thermique de cette protéine dans le lactosérum est plus importante à pH 6,00 qu'à pH 4,00 d'après Hillier *et al.* (1979). D'autres auteurs ont également montré pour des solutions de β-Lg que la dénaturation à pH 2,50 a lieu à des températures supérieures à celles à pH 6,50-6,70 (De Wit et Klarenbeek, 1981) ou à pH basique (Harwalkar, 1980).

Ainsi, si l'on se réfère à ces données, les lactosérums acides (pH compris entre 4,40 et 5,20) devraient être thermiquement plus stables que les lactosérums doux (pH compris entre 5,80 et 6,50).

I.4.3. Comportement de l'α-lactalbumine (α-La) :

Selon Hillier et Lyster (1979), elle est plus stable à la chaleur que la β-lactoglobuline. Cette meilleure stabilité est à imputer à sa liaison avec le calcium (Kronman, 1981 ; Bryant et Andrew, 1984 ; Baumy et Brulé, 1988) ainsi qu'à la présence de quatre ponts disulfures qui limitent les changements conformationnels lors des traitements thermiques.

A pH acide, le chauffage de cette protéine occasionne un changement de conformation dû à une compétition entre les ions H^+ et Ca^{2+} pour les mêmes sites de fixation, provoquant un affaiblissement des liaisons α-lactalbumine-calcium (Kronman, 1981).

A pH 6,50, cas des lactosérums doux, une dénaturation se produit à 62°C, mais elle est suivie d'une renaturation à 90% après un refroidissement (De Wit *et al.*, 1983). Cette renaturation ne se produit pas s'il y a présence d'EDTA dans le milieu (Bernal et Jelen, 1984).

Cela prouve l'importance du calcium sur la stabilité thermique de cette protéine. Par contre, un traitement à des températures plus drastiques (95°C-30 min) conduit à une transformation irréversible de la protéine (Chaplin et Lyster, 1986).

I.4.4. Comportement de la sérumalbumine bovine et des immunoglobulines :

Ruegg *et al.* (1977) révèlent par analyse enthalpique différentielle une température de dénaturation pour la sérumalbumine bovine de 64°C. Sa stabilité thermique peut être accrue par la fixation d'acides gras sur la protéine (Gumpen *et al.*, 1979 ; Bernal et Jelen, 1984). En effet, une des fonctions biologiques de cette protéine consiste à participer au transport d'acides gras insolubles du système sanguin respiratoire (Spector, 1975).

Les immunoglobulines sont les protéines du lactosérum les plus thermosensibles. Elles ne sont pas dénaturées à 62°C-3 min mais elles le sont totalement à 70°C-30 min (Lyster, 1972).

I.4.5. Comportement de mélange de protéines lactosériques :

Selon Baert *et al.* (1976), un ajout de β-lactoglobuline à une solution d'α-lactalbumine avant chauffage entraîne des modifications du comportement immunochimique de cette dernière. L'accroissement de la température et du pH (6,40 à 7,20) renforcerait la liaison entre les deux protéines majeures du lactosérum (Mulvihill et Donovan, 1987). Des réactions d'échanges de ponts disulfures pourraient contribuer à la formation de ce complexe (Melo et Hansen, 1978). Hill (1988) met en évidence la possiblité d'agrégations entre la β-lactoglobuline et l'α-lactalbumine entre pH 4,00 et pH 6,50 ainsi qu'à pH supérieur à 7,00 dans le lait et le lactosérum.

La plupart des études conduites sur la dénaturation des protéines solubles ont été réalisées à partir de solutions modèles contenant des protéines pures. L'application d'un traitement thermique à un milieu complexe tel que le lactosérum entraîne des interactions des protéines avec les autres constituants (lactose et minéraux notamment).

De Wit (1981), De Wit et Klarenbeek (1984) ainsi que Park et Lund (1984) montrent que l'apport de glucides limite la dénaturation thermique des protéines sériques. Le lactose pourrait alors réduire la dénaturation des protéines dans leur milieu lactosérum.

Comme l'illustre cette brève présentation sur les protéines du lactosérum, peu d'études relatent l'état de celles-ci tel que les industriels transformateurs les réceptionnent (Ferrero, 1991). De surcroît, pour une bonne valorisation elles doivent être le moins dénaturées possible. Or, une unité de transformation reçoit chaque jour des lactosérums de différentes origines, donc "d'état protéique différent", et elle doit produire un produit fini de qualité constante. L'application des techniques de séparation sur membrane a permis, entre autre, de répondre à cet objectif.

I.5. Présentation de la fraction minérale :

Le lactosérum contient les minéraux et acides organiques de la phase aqueuse du lait (Sottiez, 1985). Les principaux sont le potassium, le calcium, le sodium et le magnésium pour les cations, et les chlorures, les citrates, les lactates et les phosphates pour les anions.

La répartition des minéraux au sein du lait est complexe. Les matières minérales ne sont pas toutes à l'état dissout, elles se répartissent entre les phases soluble et colloïdale.

La phase colloïdale contient 67% du calcium total (Alais, 1984), 37% du magnésium, 46% du phosphore inorganique et 6% des citrates. Le calcium et le magnésium sont fixés directement pour 21% et 38% respectivement aux molécules de caséines des submicelles, qui par leurs esters phosphoriques, ont une grande affinité pour les cations bivalents (Pierre *et al.*, 1983 ; Baumy *et al.*, 1989 ; Gaucheron *et al.*, 1995). Van Kemenade (1988) et Holt *et al.* (1989) identifient la forme cristalline du phosphate de calcium micellaire comme de la brushite (ou monohydrogénophosphate de calcium dihydraté).

La phase soluble du lait est également complexe puisqu'on y rencontre à la fois des formes ioniques, des sels et des complexes non dissociés. Notons que le phosphate de calcium est à saturation dans cette phase. De plus, il est plus soluble à froid qu'à chaud (Ferrero, 1991).

Ces deux phases sont en équilibre. Des variations de température, de pH et de force ionique peuvent modifier cet équilibre (Brulé *et al.*, 1978 ; Pierre *et al.*, 1983 ; Pouliot *et al.*, 1989a et b ; Pouliot et Boulet, 1995).

L'étude de la fraction minérale des lactosérums et des équilibres salins sera abordée plus en détail dans le chapitre II.

I.6. Conclusion :

Les lactosérums représentent 80 à 90% des volumes de laits transformés. La matière sèche ne représente que 6 à 7% de matière valorisante (Alais, 1981).

Pendant de nombreuses décennies, l'alimentation des porcs dans un élevage annexé à la laiterie était le principal débouché de ce produit. La restructuration du secteur laitier a donné naissance à d'importantes fromageries, parfois monoproduit, et à la récupération et valorisation du lactosérum dans des usines spécifiques. Il est donc nécessaire de le véhiculer vers ces unités. Or transporter un produit qui contient 93 à 94% d'eau n'est guère rentable. Il est alors impératif d'éliminer une partie de l'eau du lactosérum dans les fromageries. Pour ce faire, l'industriel dispose de deux technologies pour la préconcentration avant acheminement vers les unités de traitement des lactosérums : l'évaporation sous-vide et les technologies à membranes (osmose inverse essentiellement et plus récemment nanofiltration).

Quant aux unités de traitement des lactosérums, le développement au début des années 70 de la technique d'ultrafiltration sur membrane (UF), et plus récemment de la microfiltration (MF), a permis de trouver des débouchés pour les constituants du lactosérum. Il est évident que d'autres voies de valorisation vont apparaître dans les années à venir, compte tenu de l'essor des technologies à membranes. En effet, on assiste au développement de procédés industriels, mettant en oeuvre ces techniques, pour produire des composés laitiers nouveaux à haute valeur ajoutée.

II. LES TECHNOLOGIES DE SEPARATION SUR MEMBRANE POUR VALORISER LES CONSTITUANTS DU LACTOSERUM

II.1. Historique :

L'industrie laitière est à l'origine de la plupart des développements des technologies de séparation sur membrane. Il peut être affirmé que le couple "produits laitiers-membrane" est et reste le principal vecteur de progrès, non seulement dans l'extension des utilisations membranaires mais aussi dans l'obtention de nouveaux produits à haute valeur ajoutée.

Historiquement, les technologies à membrane ont quitté le laboratoire à la fin des années 60 à la suite de la mise au point des membranes asymétriques. Ces membranes avaient une perméabilité aux liquides 100 fois supérieure à celle des membranes symétriques. Un taux de progression de 20% des surfaces installées a été atteint et, à la fin des années 70, la surface totale représentait 55 000 m^2 dont 60% pour le traitement du lactosérum.

Au cours des années 70, l'industrie nucléaire a développé des membranes inorganiques pour la séparation des isotopes de l'uranium. Grâce à ses propriétés de résistances physico-chimiques et mécaniques élevées, cette troisième génération de membrane a permis de nouvelles applications très diversifiées dans l'industrie laitière (Merin et Daufin, 1989). Enfin, la mise au point de matériaux poreux céramiques au cours de la deuxième partie des années 80 a apporté des progrès supplémentaires quant à la perméabilité et aux assemblages modulaires (conception "multicanal", Bonneau *et al.*, 1991).

Le développement des procédés à membrane dans l'industrie laitière mondiale a été chiffrée récemment par Van Der Horst et Hanemaaijer (1989). L'ultrafiltration (UF) est la technologie la plus employée avec plus de 150 000 m^2 installés à ce jour. La plus grosse partie des surfaces est dévolue au traitement du lactosérum, mais la proportion de l'aire membranaire traitant du lait s'est considérablement accrue depuis 1980. La surface installée en osmose inverse (OI) semble s'être stabilisée à 50-55 000 m^2 et ne sert que pour le traitement du lactosérum. Quelques installations de microfiltration (MF) ont été réalisées au cours des dernières années. La surface installée est certes encore très faible mais le potentiel de cette nouvelle technologie est si élevé que l'on peut s'attendre à un accroissement spectaculaire au cours de la prochaine décennie.

La nanofiltration (NF), séparation dans un domaine de sélectivité intermédiaire entre UF et OI, en est à ses balbutiements mais un avenir prometteur lui est réservé dans le domaine de la déminéralisation, déionisation et de la purification. Selon Van Der Horst (1995), plus de 20 000 m^2 de membranes de nanofiltration sont installés. La nanofiltration a tout à fait sa place pour la préconcentration des lactosérums, puisqu'elle permet à la fois d'éliminer l'eau et de déminéraliser le produit (Pontalier *et al.*, 1995 ; Gungerich et Huston, 1996).

II.2. Présentation de la technologie (cas de l'UF et la MF) :

II.2.1. Principe :

Les procédés de séparation membranaire regroupent un vaste ensemble de techniques qui mettent à profit les propriétés de rétention sélective d'une mince barrière appelée membrane. Les techniques de filtration UF et MF utilisent spécifiquement un gradient de pression pour effectuer une séparation en phase liquide à travers une membrane poreuse (Brun, 1989 ; Meireles *et al.*, 1992).

La membrane poreuse joue le rôle de barrière physique en s'interposant sur le trajet des molécules et en modifiant sélectivement leur vitesse de passage. Le mécanisme de sélectivité s'apparente à un effet de tamis : il existe une taille approximative de molécules au-delà de laquelle les molécules sont retenues (celles-ci se retrouvent alors dans le **rétentat**) tandis que celles dont la taille est inférieure la traversent, entraînées par le solvant, et constituent la fraction **perméat** ou **filtrat**.

Le liquide à filtrer est introduit dans le système par une pompe d'alimentation qui crée la pression transmembranaire, force motrice de la filtration (de 2 à 10 bar en UF, de 0,2 à 2 bar en MF). Une pompe de circulation véhicule le liquide dans la boucle contenant le module de membranes.

Il existe 2 modes de filtration :

- **la filtration frontale** où le liquide est amené perpendiculairement à la membrane. Mais les espèces retenues s'accumulent rapidement dans une couche de dépôt (ou "gâteau"), s'opposant

ainsi au transfert. Les flux de filtration chutent rapidement, ce qui nécessite de démonter fréquemment la membrane pour la nettoyer ou la remplacer.

- **la filtration tangentielle** où la membrane est balayée tangentiellement à grande vitesse par le liquide. Ainsi, l'accumulation de matière en surface de la membrane est limitée par d'importantes contraintes de cisaillement à la paroi. Le colmatage est donc fortement diminué par cette circulation rapide. L'avantage est de permettre une filtration sur de longues durées sans avoir à démonter le filtre pour le nettoyer.

Dans les deux cas, le principal paramètre est le gradient de pression transmembranaire qui provoque le transfert de matière. Concernant la filtration tangentielle, un autre paramètre important joue un grand rôle sur les résultats de la filtration : la vitesse tangentielle. Plus la vitesse tangentielle est élevée, meilleur est le balayage de la surface membranaire. Néanmoins, à partir d'une certaine vitesse, l'augmentation de la consommation énergétique compromet l'intérêt industriel de l'opération. En général, la vitesse tangentielle en UF est inférieure à 5 $m.s^{-1}$, celle utilisée en MF supérieure ou égale à 5 $m.s^{-1}$.

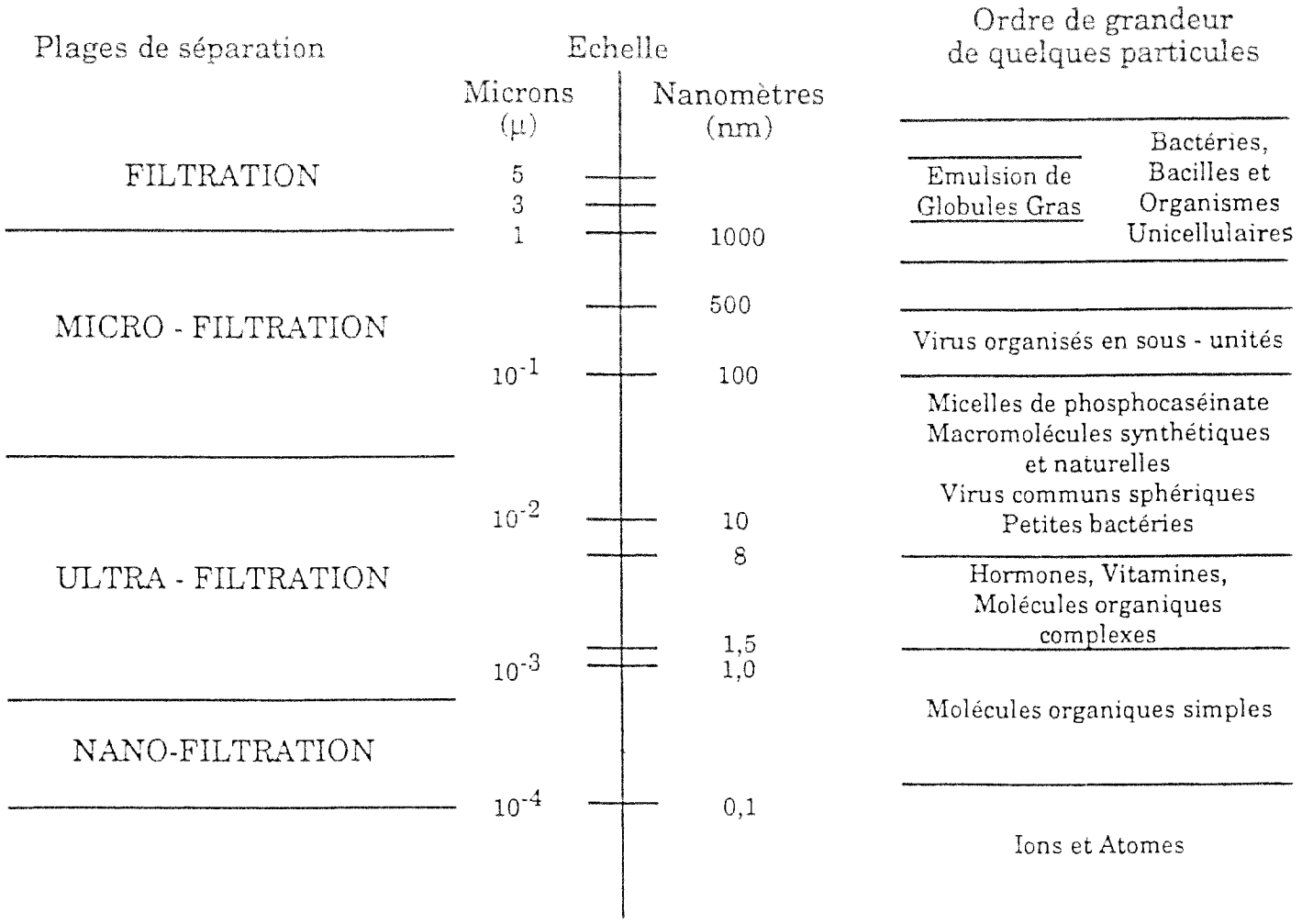
II. 2.2. Caractéristiques des membranes :

II.2.2.1. Domaine de travail :

Une membrane est caractérisée par la taille de ses pores. L'UF et la MF se différencient habituellement par le diamètre moyen des pores : de 1 à 50 nm en UF, de 50 à 1000 nm en MF. En UF, l'usage veut que l'on utilise la notion de seuil de coupure plutôt que celle de taille de pore. Le seuil de coupure (exprimé en Dalton) est défini comme la masse moléculaire de la macromolécule qui est retenue à 90% par la membrane (Brun, 1989 ; Meireles *et al.*, 1992). Cette notion s'en réfère donc à la macromolécule à séparer. Ainsi, les membranes d'ultrafiltration présentent des seuils de coupure allant de 10 000 à 300 000 Da (figure 1).

II.2.2.2. Nature des membranes :

Les membranes sont caractérisées par leur stabilité mécanique, thermique, physique et chimique (Hedrick, 1984). Plusieurs types de membranes existent sur le marché. On les différencie par leur matériau de fabrication et leur structure interne. On distingue trois classes principales de membranes, à savoir les membranes organiques, les membranes synthétiques et les membranes minérales.



igure 1 : Techniques de séparation sur membranes (d'après BRUN, 1989)

Le constituant essentiel des premières membranes organiques commercialisées était l'acétate de cellulose. En raison de ses limitations de résistance en température (50°C maximum), en pH (3 à 8) et aux agents oxydants, ces membranes organiques sont désormais peu utilisées (Maubois et Brulé, 1982).

La seconde génération de membranes dites synthétiques est constituée à partir de polymères (nylon, polyfluorure de vinylidène, polysulfones). Ce type de membranes présente une meilleure tenue en température (75 à 80°C) mais qui reste encore insuffisante.

A la fin des années 1970, a été introduite la troisième génération de membranes : les membranes minérales. Leur nature (par exemple zircone ou alumine supportée par du carbone graphite) leur confère une grande stabilité thermique (400°C), mécanique (40 bar) et physico-chimique (toute l'échelle de pH).

Dans chacune de ces classes, on différencie également les membranes par leur structure interne : les membranes homogènes, les membranes asymétriques homogènes, composées d'un seul matériau, et les membranes composites fabriquées en deux matériaux (Hedrick, 1984).

II.2.2.3. Configurations des membranes :

Les membranes sont assemblées en modules selon 4 configurations spatiales :

- la configuration plane ;
- la configuration tubulaire (diamètre variant de 6 à 25 mm) ;
- la configuration "fibre creuse" (diamètre de l'ordre du millimètre) ;
- la configuration spirale (module plan enroulé autour d'un tube collecteur de perméat).

Chaque configuration présente ses propres avantages et inconvénients en matière de performance (exprimées en litres de produit traité ou de perméat recueilli par heure et par unité de surface membranaire), de coûts d'investissement et de fonctionnement (énergie de pompage, durée de vie des membranes), de facilité de nettoyage (tableau III ; Meireles *et al.*, 1992).

II.2.3. Les différents modes de fonctionnement :

Les membranes sont disposées dans un module. Les modules peuvent être installés de différentes manières, chacune étant adaptée à un type d'utilisation et à une taille d'installation (échelle laboratoire ou industrielle). Les systèmes peuvent être discontinus ("batch" simple ou

Tableau III. Comparaison des diférentes configurations de modules (ultrafiltration et microfiltration (MF))
(d'après MEIRELES *et al*, 1992).

Modules	Avantages	Inconvénients	Stérilisation	
			chim	vapeur
Plans	faible volume mort utilisable avec des fluides visqueux, coût membrane plus faible, faible volume de fonctionnement	colmatage/zones mortes, pertes de charge, nécessité de démonter pour changer les membranes, ne convient pas pour MF	oui	labo : oui ind : non
Spirales	peu coûteux, compact, rapport surface/volume élevé, faibles volumes de fonctionnement	colmatage, nettoyage difficile, zones mortes, démontage impossible, pertes de charge	oui	labo : non ind : non
Fibres creuses	peu coûteux, compact nettoyage par inversion de sens de filtration, rapport surface : volume élevé	colmatage/zones mortes, basse pression (< 2 bars), pertes de charge	oui	labo : oui ind : non
Tubulaires	membrane organique ou minérale, facilité de nettoyage, nettoyage par inversion du sens de filtration	volume mort important, perte de charge, grande dimension des pompes et des systèmes	oui	labo : oui ind : oui

avec une boucle de circulation) ou continus (à un ou plusieurs étages) (figure 2 ; Brun, 1989 ; Meireles *et al.*, 1992).

II.2.4. Avantages de la technologie :

Cette technique offre de multiples avantages (Cohen-Maurel, 1990) :

- elle offre, par rapport aux techniques plus classiques (distillation, congélation, évaporation sous vide,...), l'avantage de pouvoir séparer des macromolécules sans faire intervenir de changement d'état, de réaction chimique ou de températures extrêmes ;

- elle est "douce" car elle n'altère pas la qualité nutritionnelle et gustative des composants sensibles aux traitements thermiques comme les protéines ;

- elle requiert une installation simple et compacte ;

- elle se prête facilement à l'automatisation, donc extrapolable au niveau industriel ;

- cette technique est souvent moins coûteuse et moins consommatrice d'énergie que les techniques habituelles de séparation.

II.2.5. Les phénomènes limitants :

Au niveau de la membrane, il n'est pas exclu qu'interviennent des interactions physico-chimiques entre les espèces à filtrer et la membrane, dans sa partie dense ou à la surface des pores (Vetier *et al.*, 1986).

Deux phénomènes sont dits limitants parce qu'ils entraînent une diminution du flux de filtration (Bennasar, 1984 ; Meireles *et al.*, 1992) :

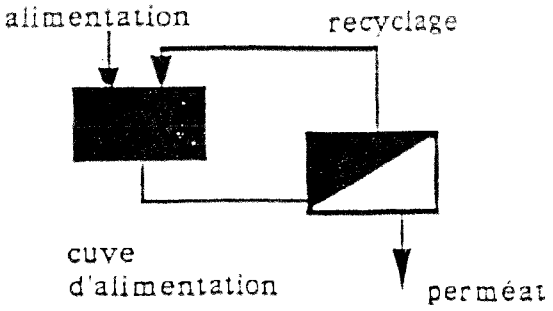
- la polarisation de concentration ou couche de dépôt, induite par l'accumulation des solutés à l'interface membrane/solution ;

- le colmatage ou encrassement des membranes, dû à une adsorption de matière à la surface ou dans les pores des membranes (figure 3).

Les paramètres de fonctionnement jouent un rôle déterminant sur cette couche qui se forme le long de la membrane. Il s'agit de limiter la résistance de cette zone par diminution de son épaisseur à l'aide de la vitesse tangentielle, de la pression transmembranaire, du pH ou encore de la température du produit à filtrer. Enfin, il est évident que la nature du produit est le point

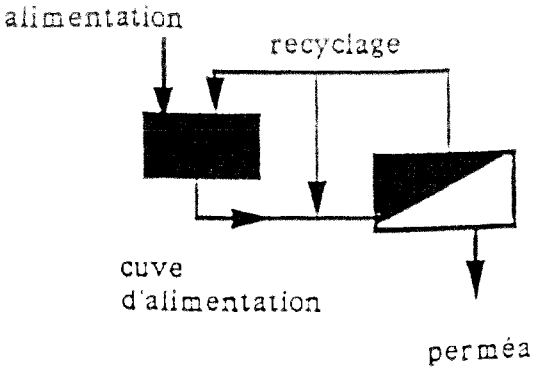
o Les systèmes discontinus

● SYSTEME EN BATCH SIMPLE



Avantages: faible coût d'installation
simplicité
surface de membrane minimale
Inconvénients : cuverie importante
brassage du produit

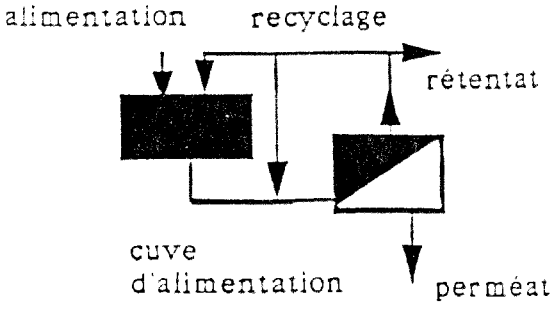
● BATCH AVEC BOUCLE DE CIRCULATION



Avantages: moindre volume de cuve
moindre brassage

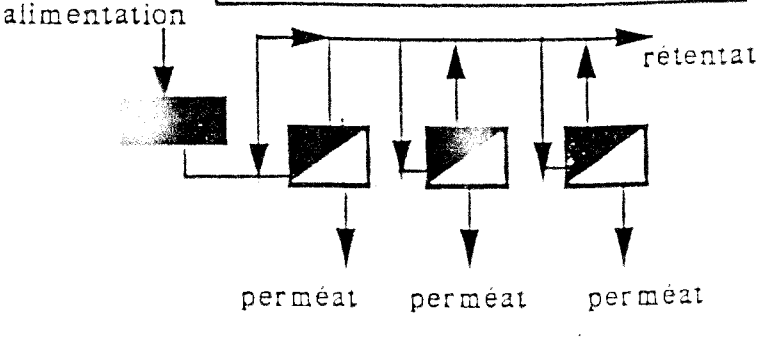
o Les systèmes continus

● MONO ETAGE



Avantages: système continu
simplicité
Inconvénients: concentration élevée
dans la boucle

● MULTI-ETAGES (en série)



Avantages: optimisation de la surface
de la membrane
Inconvénients: investissement lourd

Figure 2 : Les différents modes de fonctionnement en ultrafiltration (d'après MEIRELES *et al*, 1992).

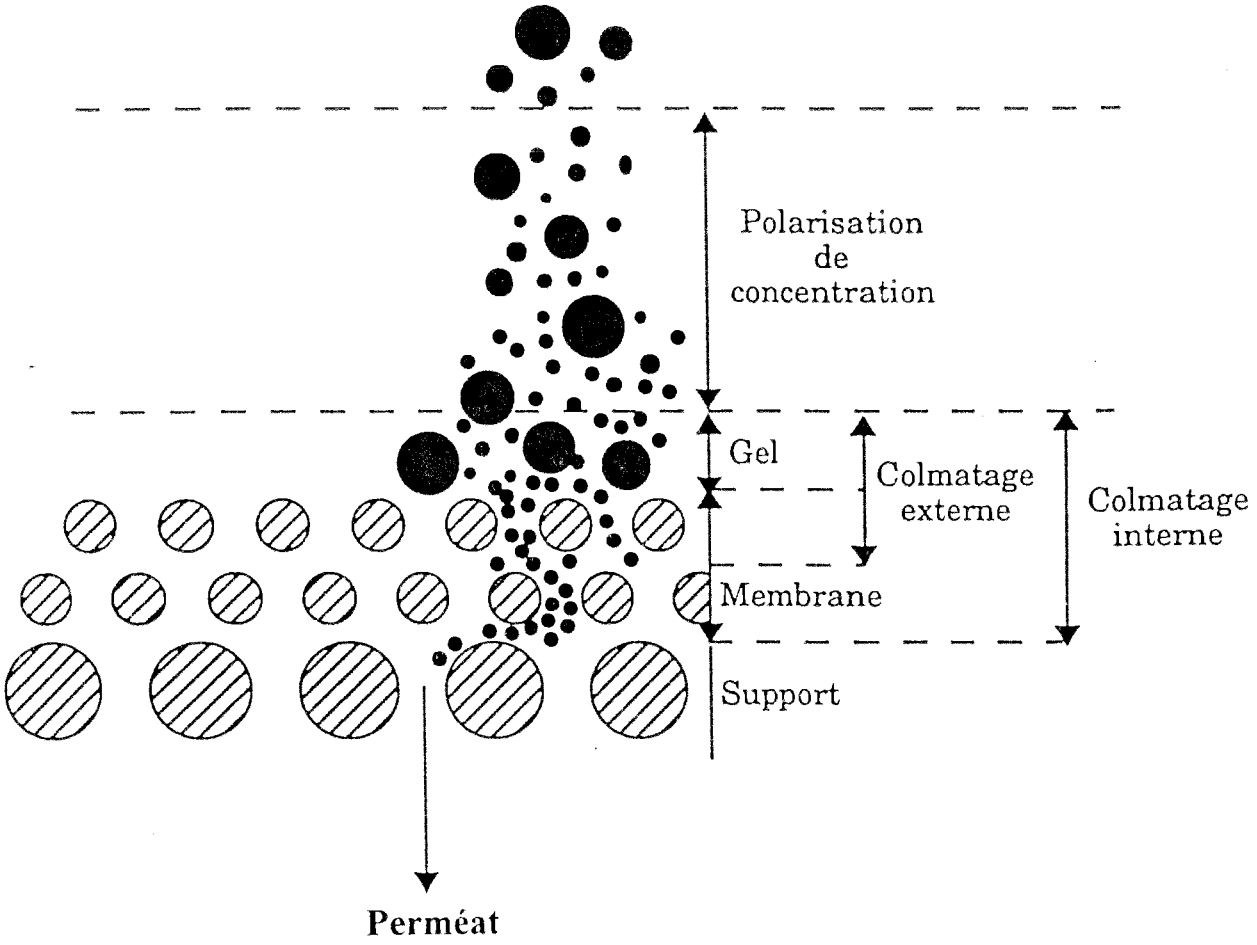


Figure 3 : Schéma du principe de l'ultrafiltration sur membrane minérale

en hachuré : les grains d'oxyde de zirconium
en plein : les protéines du lactosérum

central. La bonne connaissance de celui-ci est indispensable pour orienter, selon les objectifs, le choix du procédé et des conditions opératoires.

II.2.6. Buts de l'UF et de la MF :

Ces technologies permettent d'atteindre trois objectifs (Brun, 1989) :

- la concentration de solutions macromoléculaires (enzymes, protéines, virus, polymères variés, polysaccharides) ;
- le fractionnement et la séparation de macromolécules ;
- la rétention et l'élimination de macromolécules plus ou moins nocives.

La MF est ainsi appliquée pour la clarification (Fauquant *et al.*, 1985a et b ; Cohen-Maurel, 1990 ; Meireles *et al.*, 1992), la pasteurisation (Piot *et al.*, 1987 ; Fauquant *et al.*, 1988) ou la pasteurisation à froid ou encore la délipidation de divers produits liquides (Fauquant *et al.*, 1985a et b). L'UF est, quant à elle, plutôt mise en oeuvre pour le fractionnement ou la concentration de macromolécules en solution (Maubois et Brulé, 1982 ; Escudier *et al.*, 1988 ; Maynard *et al.*, 1989 ; Maugas et Le Magnen, 1992).

II.2.7. La conception du procédé : une démarche "pas à pas" :

A travers cette brève présentation, il ressort que le choix de la membrane et des conditions opératoires, qui conduisent aux meilleurs résultats par rapport à l'objectif fixé, est donc une étape indispensable à la rationalisation du procédé au niveau industriel.

De par la complexité des phénomènes intervenant en UF et en MF, il n'existe pas encore de modèle totalement prédictif permettant de concevoir une installation industrielle à partir de données acquises au laboratoire. Les essais pilotes restent donc presque toujours nécessaires. Les modélisations actuellement disponibles sont semi-empiriques. Elles permettent d'extrapoler les résultats obtenus sur pilote à des installations de plus grande taille. Il convient toutefois de réaliser à l'échelle pilote des expériences cohérentes avec les modèles. C'est également à ce stade qu'il convient de choisir en fonction, par exemple de la quantité de produit à traiter, le mode de fonctionnement du procédé, en gardant toujours en mémoire la corrélation entre le temps de séjour et la cinétique de dénaturation des solutions.

II.2.8. Développements futurs des procédés à membranes :

Dans l'agroalimentaire et les biotechnologies, les tendances actuelles semblent aller dans trois directions :

- une amélioration du potentiel de séparation. Un très large effort est déployé pour développer des membranes dont les caractéristiques seraient plus proches d'une membrane "idéale". Parallèlement, des travaux portent sur la mise au point de technologies de caractérisation de plus en plus performantes. On peut aussi espérer beaucoup de la dernière génération de membranes, les membranes de nanofiltration, capables de séparer sélectivement de petites molécules ou des ions d'un solvant ;

- une réduction de la différence entre performances potentielles et réelles : il s'agit de proposer des solutions pour réduire l'effet de la polarisation et du colmatage ;

- une nouvelle conception de chaînes de séparation : les premières applications des procédés à membranes ont consisté à remplacer au coup par coup une séparation existante par un système à membranes réalisant la même opération. Cette substitution de première génération doit maintenant laisser la place à une démarche différente. La séquence et le fonctionnement de la chaîne de purification doivent être définis en tenant compte de toutes les possibilités offertes par les techniques à membranes.

II.3. Les Concentrés Protéiques de Lactosérum (CPL) :

Si l'on souhaite avoir une vue d'ensemble du fractionnement industriel du lactosérum, il est nécessaire d'évoquer les concentrés protéiques de lactosérum (CPL). Leurs teneurs en protéines exprimées en % de la matière sèche varient de 35 à 85%. Ils possèdent d'excellentes propriétés fonctionnelles et rentrent de plus en plus dans la formulation de nombreux produits.

II.3.1. Fabrication des CPL :

Les protéines qui se trouvent en faible proportion dans le lactosérum (4 à 6 $g.l^{-1}$) sont concentrées par ultrafiltration. Mais la présence de matière grasse résiduelle dans les lactosérums encrasse les membranes d'UF, et limite les hautes concentrations en protéines.

Maubois *et al.* (1987) remarquent que l'élimination des lipides résiduels augmentent par un facteur 1,8 les débits d'UF. De Wit (1984) constate, qu'en retirant les lipides, les propriétés fonctionnelles étaient accrues.

La première étape de la fabrication est donc l'élimination de la matière grasse résiduelle. Cette dernière est composée de lipides qui n'ont pas été éliminés au cours de l'écrémage du lactosérum. Ce sont principalement des phospholipides ou phospholipoprotéines (Fauquant *et al.*, 1985a et b) et des acides gras libres. Les premiers procédés pour les éliminer impliquaient des traitements thermiques, des ajustements de pH, la combinaison des deux ou bien l'addition d'adjuvants (Lee et Merson, 1976 ; Melachouris, 1977 ; Muller et Harper, 1979). L'équipe de l'INRA de Rennes (Fauquant *et al.*, 1985a et b ; Maubois *et al.*, 1987 ; Daufin *et al.*, 1993 ; Daufin *et al.*, 1994) propose le procédé de thermoclarification. Cette technique est basée sur l'agrégation des phospholipides en présence de calcium avec un traitement thermique ménagé. Le précipité obtenu est séparé par microfiltration tangentielle à l'aide de membranes de seuil de coupure de 0,2µm (Baumy *et al.*, 1990 ; Gésan *et al.*, 1993 ; Gésan et Daufin, 1995 ; Gésan *et al.*, 1995) ou par centrifugation (Wasen et Lehmann, 1989).

La séparation par microfiltration présente deux avantages (Maubois et Ollivier, 1992 ; Pierre *et al.*, 1994) :

- le premier est l'obtention de lactosérum totalement délipidé car les lipides, qui ne sont pas agrégés par le procédé de thermoclarification, se retrouvent également dans le rétentat de microfiltration avec le précipité ;

- le deuxième est la production de lactosérum "stérile". En effet, les membranes de MF 0,2µm retiennent les bactéries.

De récents travaux ont caractérisé la fraction lipidique de ce co-produit (rétentat de microfiltration) obtenu par le procédé de thermoclarification. Selon Ducruet *et al.* (1990), les phospholipides réprésentent 66% de cette fraction et se répartissent en sphingomyéline, phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine. Les 34 % restants sont des céramides hexosides. Dans le lactosérum, comme dans ce co-produit, les teneurs varient selon la méthode analytique d'extraction (Théodet et Gandemer, 1990). Toutefois, les proportions sont similaires aussi bien dans le sérum que dans le rétentat de microfiltration (Théodet et Gandemer, 1994). Il faut souligner que la composition en phospholipides du lactosérum est proche de celle du derme humain.

Une fois ce prétraitement de délipidation effectué, les protéines sont concentrées par ultrafiltration. Le lactosérum balaye tangentiellement la membrane, limitant ainsi le colmatage. Généralement la concentration en protéines dans le rétentat avoisine 40 $g.l^{-1}$. Ce dernier est concentré par évaporation sous-vide puis séché par atomisation. Les teneurs en protéines des CPL obtenus sont de l'ordre de 35 à 40%. Pour obtenir des CPL à taux protéiques plus importants, il est nécessaire d'ajouter une étape de diafiltration (ajout d'eau en continu ou en discontinu lors de l'UF). Après une concentration et un séchage, les CPL peuvent titrer jusqu'à 85% de protéines. Ajoutons que des CPL à hautes teneurs en protéines peuvent être obtenus par chromatographie d'affinité ou de filtration sur gel (Vuillemard *et al.*, 1989).



II.3.2. Utilisation des CPL :

Leurs excellentes propriétés fonctionnelles (solubilité, pouvoirs moussant, gélifiant et émulsifiant) et nutritionnelles leur confèrent de nombreuses applications. Elles sont étroitement dépendantes de leurs propriétés physico-chimiques (masse molaire, nature et distribution des acides aminés, charges nettes), de leur environnement (pH, température, force ionique, concentration) et du procédé qui leur a été appliqué (chauffage, pompage, séchage, modifications physiques, chimiques ou enzymatiques (Vuillemard *et al.*, 1989)).

Leurs bonnes solubilités leur permettent des utilisations dans les boissons (De Boer *et al.*, 1977), dans les formulations pour l'alimentation infantile, dans les produits carnés (Sanderson, 1988), etc ... . Toutefois la solubilité dépend du pH d'utilisation : elle est minimale au pHi. Certains auteurs (De Wit *et al.*, 1986 ; Liao et Mangino, 1987 ; Harper, 1992) donnent des valeurs de solubilité mais elles varient selon l'origine et l'obtention des CPL.

Les CPL possèdent de bonnes propriétés moussantes. Ils sont donc utilisés dans la fabrication des meringues (De Boer *et al.*, 1977 ; De Wit *et al.*, 1983), des pâtisseries, des quiches, des desserts, etc... . La présence de matière grasse résiduelle déprécie leur propriété moussante : il est donc nécessaire d'avoir une parfaite délipidation du lactosérum.

Ils rentrent dans les formulations des sauces, des crèmes glacées, et des blanchisseurs de café de par leurs propriétés émulsifiantes.

Leurs propriétés gélifiantes font qu'ils sont utilisés pour l'élaboration des viandes restructurées, des pâtisseries, etc... .

Mais de nombreux facteurs influencent leurs propriétés fonctionnelles (Marshall et Harper, 1988 ; Vuillemard *et al.*, 1989), à savoir : le type de lactosérum, son origine, son passé thermique, le procédé de préparation des CPL, la concentration et le séchage. Il est donc nécessaire que l'industriel producteur de CPL ait une parfaite maîtrise de la qualité de sa matière première et de sa technologie pour garantir à ses utilisateurs des propriétés fonctionnelles constantes.

La valorisation des lactosérums en CPL n'est complète que si l'on mentionne les utilisations possibles des deux co-produits générés par cette fabrication :

- le premier est le rétentat de microfiltration provenant du prétraitement de délipidation. Selon Maubois et Ollivier (1992), il pourrait être utilisé en industrie fromagère (fromages allégés), en charcuterie et en cosmétologie (produit de base pour les liposomes). De plus, la valeur nutritionnelle de ces phospholipides devrait leur assurer un débouché dans les prochaines années. Quant aux phosphoprotéines présentes dans ce rétentat, elles pourraient être utilisées en alimentation infantile, en industrie pharmaceutique, etc... .

- le second est le perméat d'ultrafiltration. Il est composé essentiellement de minéraux et de lactose. Après concentration et cristallisation, ce dernier peut être valorisé.

Le développement récent des CPL devrait encore s'accroître. De nouvelles utilisations industrielles à hautes valeurs ajoutées pointent telles que la purification de la β-lactoglobuline et de l'α-lactalbumine.

II.4. Autres voies de valorisations :

II.4.1. Séparation et purification de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline :

L'acidification à pH 2, 55°C, 30 min de CPL permet de polymériser l'α-lactalbumine qui s'agrège avec toutes les autres protéines sauf la β-lactoglobuline (Pearce, 1983). Une

microfiltration (0,2µm) ou une centrifugation permet de séparer le précipité du perméat enrichi en β-lactoglobuline. La concentration-purification par UF-diafiltration de cette protéine permet d'obtenir des produits ayant une remarquable aptitude à la gélification.

L'α-lactalbumine présente dans le rétentat de microfiltration est soumise à une série de traitement : solubilisation à pH neutre, UF et diafiltration (50 kDa). La purification de l'α-lactalbumine requiert sa séparation des composants contaminants, à savoir le caséinomacropeptide (CMP) et la sérumalbumine, ce qui peut être obtenu par la mise en oeuvre d'opérations d'ultrafiltration selon des paramètres qui restent encore à optimiser. La richesse en tryptophane de l'α-lactalbumine (4 résidus par mole) la rend intéressante pour ses peptides à propriétés physiologiques et pour la préparation de laits maternisés. Rappelons que le tryptophane est un précurseur de la sérotonine, neuromédiateur intervenant notamment dans la régulation du sommeil et de l'appétit.

II.4.2. Séparation de la lactoferrine (Lf) et de la lactoperoxydase (Lp) :

Ces deux protéines de pHi élevé (8,6 -9,2 pour la Lf ; 9,0-10,2 pour la Lp) sont adsorbées sur des résines échangeuses de cation puis extraites par élution par des solutions salines de force ionique croissante. La séparation sélective de ces deux protéines pourrait être envisagée en utilisant des interactions électriques avec des membranes fonctionalisées appropriées et un couplage champ électrique/champ de pression (Maynard *et al.*, 1989). La lactoferrine et la lactoperoxydase, ayant respectivement des propriétés bactériostatiques et bactéricides, sont déjà utilisées en médecine vétérinaire (diarrhée du jeune veau), dans les gouttes occulaires, les solutions pour bains de bouche, les chewing-gums et les aliments infantiles.

II.4.3. Séparation des immunoglobulines (Ig) et du caséinomacropeptide (CMP) :

Les CPL et surtout le colostrum sont des sources potentielles d' immunoglobulines (Ig) que l'on peut concentrer par UF sur des membranes de seuil de coupure élevé ($> 10^5$ Da).

Divers procédés à membranes ont été proposé pour séparer le caséinomacropeptide (CMP) : hydrolyse de caséinate par présure puis UF avec des membranes de seuil de coupure compris entre 20 kDa et 50 kDa (Brulé *et al.*, 1980). L'agrégation du CMP est obtenu à pH supérieur à 4 puis passage à la forme monomère à $3 < pH < 4$ (Tanimoto *et al.*, 1990). Le CMP

aurait des vertus : suppression de l'appétit, prévention des dépôts gras (chez le chien), empêchement de l'adhésion *d'Escherichia Coli* aux parois de l'intestin et de la plaque dentaire.

II.4.4. Conclusion :

Ces différents exemples montrent d'une part la diversité des technologies mises en oeuvre et d'autre part, les différentes utilisations du lactosérum. Des produits à façon tels que les CPL de haute pureté, la β-lactoglobuline, l'α-lactalbumine, la lactoferrine, la lactoperoxydase, ... représentent un marché mondial à très haute valeur ajoutée, étant donné leurs utilisations aussi bien en industries agroalimentaires qu'en industries pharmaceutiques. Ces exemples de valorisations définissent bien le lactosérum comme un **co-produit** de l'industrie laitière et non comme un sous-produit.

Cependant, des procédés de fractionnement industriels ne sont disponibles en UF-MF que pour les CPL et pour la séparation de la β-lactoglobuline et de l'α-lactalbumine.
Beaucoup reste donc à faire pour améliorer les procédés à membranes existants (notamment en terme de sélectivité et de colmatage), pour concevoir des procédés à membranes compétitifs et pour réduire les coûts de production.

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Notre objectif est de contribuer à la valorisation des lactosérums à l'aide des technologies de séparation sur membrane. L'étude bibliographique révèle que les besoins de valorisation sont réels et que ces technologies offrent de multiples possibilités. La meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu et la recherche de procédés spécifiques à tel ou tel constituant du lactosérum, même s'ils définissent une "niche", permettent d'aboutir à de nouvelles voies de valorisation.

Dans les procédés de séparation par membranes, les conditions physicochimiques (pH, force ionique, température, concentration) ainsi que les paramètres opératoires (pression transmembranaire, vitesse tangentielle de balayage) jouent un rôle déterminant dans l'efficacité de l'objectif à atteindre, que ce soit une séparation, une concentration ou encore une purification. Ainsi, dans une première partie, il s'agit d'étudier l'influence du pH sur le transfert des protéines majeures (β-lactoglobuline et α-lactalbumine) lors de l'ultrafiltration de lactosérum. Pour séparer ces deux protéines, des procédés industriels mettent à profit leurs différences de comportement en fonction du pH.

La fraction minérale des lactosérums est la fraction la moins bien valorisée. Or, cette fraction contient deux minéraux essentiels : du calcium et des phosphates. Dans une deuxième partie, un procédé d'extraction de phosphate de calcium à partir de lactosérum de fromagerie est mis au point. Une étape de microfiltration tangentielle a été optimisée et utilisée pour la purification de ce sel de phosphate.

Chapitre I

INFLUENCE DU pH SUR LE TRANSFERT DES PROTEINES MAJEURES LORS DE L'ULTRAFILTRATION DE LACTOSERUM DOUX

I. CONTEXTE ET OBJECTIF DE L'ETUDE

Comme nous l'avons vu, l'industrie laitière a considérablement contribué au développement des technologies de séparation sur membrane. Une grande partie des installations membranaires est dévolue au traitement du lactosérum. C'est sur la fraction protéique du lactosérum que se sont concentrés les premiers efforts de valorisation à partir des technologies à membranes (Rosenberg, 1995). Cette fraction protéique est constituée principalement, en concentration décroissante, de β-lactoglobuline (β-Lg), d'α-lactalbumine (α-La), de sérum albumine, d'immunoglobulines, de protéose-peptones et de lactoferrine.

Outre leur valeur biologique élevée (Forsum et Hambraeus, 1977), les protéines du lactosérum présentent des propriétés technofonctionnelles intéressantes (Cheftel et Lorient, 1982 ; Morr et Foegeding, 1990) : solubilité sur toute l'échelle de pH, capacité de rétention d'eau et propriétés émulsifiantes. En raison de son poids moléculaire élevé, la sérum albumine possède de faibles propriétés fonctionnelles (Vuillemard *et al.*, 1989). Par contre, la β-Lg et l'α-La présentent d'excellentes propriétés émulsifiantes (Reimerdes et Lorenzen, 1983 ; Slack *et al.*, 1986a ; Closs et Lorient, 1988 ; De Wit *et al.*, 1988). Selon Evans (1986), la fraction protéose-peptone possède une excellente capacité moussante. On mesure donc l'intérêt de séparer la fraction protéique des autres composants moins valorisables tels que le lactose, les lipides résiduels, les sels minéraux et d'isoler chacun des constituants protéiques compte tenu de leur valeur propre.

Parce qu'elles représentent environ 80% des protéines solubles (Marshall et Harper, 1988), de nombreux travaux portent sur la séparation de la β-Lg et de l'α-La par ultrafiltration tangentielle (UF) de lactosérum (Roger *et al.*, 1979, 1980 ; Pierre et Fauquant, 1986 ; Slack *et al.*, 1986b ; Maubois *et al.*, 1987 ; Pearce, 1987 ; Roger *et al.*, 1990), en vue d'utilisations et de valorisations différenciées. La plupart des protocoles, utilisant l'ultrafiltration sur membrane, mettent à profit les propriétés d'agrégation de la β-Lg et de l'α-La en fonction du pH et de la température (Lee et Merson, 1976 ; Pearce, 1983). Ainsi, Roger *et al.* (1979 ; 1980 ; 1990) obtiennent des fractions enrichies en α-La après ultrafiltration de lactosérum à pH 6,6, avec ou sans traitement thermique. Slack *et al.* (1986b) ajustent le pH à 4,65 sans traitement thermique. Dans leur procédé de séparation, Pierre et Fauquant (1986) et Maubois *et al.* (1987) appliquent un traitement thermique de 55°C pendant 30 minutes après avoir ajusté le pH à 3,8, dans le but de

favoriser la polymérisation de l'α-La. Un procédé analogue, consistant à chauffer le lactosérum à pH 4,0-4,5 pendant 5 minutes à 64°C, permet, après refroidissement et séparation, d'obtenir une fraction enrichie en α-La et une fraction enrichie en β-Lg (Pearce, 1987).

Avant d'envisager la séparation des deux protéines majeures du lactosérum (β-Lg et α-La) pour toute valorisation ultérieure, il est judicieux de connaître leurs potentialités de transfert à travers une membrane donnée en fonction du pH d'ultrafiltration. Les conditions de pH mais aussi la nature de la membrane choisie doivent prendre une grande importance dans l'efficacité de la séparation (Roger *et al.*, 1980).

Le but de ce travail est d'étudier, avec des membranes de nature et de seuil de coupure différents, l'effet du pH sur le transfert de la β-Lg et de l'α-La lors de l'ultrafiltration de lactosérum. Pour chaque membrane, l'influence du pH (de 3,8 à 7,0) est examinée à travers trois grandeurs caractéristiques :

- le flux de perméation J_p ;
- le niveau de colmatage de la membrane ;
- les taux de rétention en β-Lg et en α-La.

Pour aborder et comprendre les problèmes de colmatage en liaison avec le pH, une étude de la composition minérale des perméats et rétentats est réalisée. En effet, outre les protéines et les lipides résiduels, les sels de phosphates de calcium joueraient un rôle significatif dans le colmatage des membranes lors de l'ultrafiltration de lactosérum (Cheryan et Merin, 1981 ; Taddéi, 1986 ; Taddéi *et al.*, 1988 ; Labbé *et al.*, 1990 ; Daufin *et al.*, 1991, 1992a et b, 1993).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Boucle expérimentale d'UF et conditions opératoires :

La boucle de laboratoire (boucle JEL 1, Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France) comporte une pompe centrifuge d'alimentation multi-étagée (8 $m^3.h^{-1}$ à 4,6 bar), un débitmètre à flotteur (précision ± 1%) et un carter à quatre tubes séparés, chaque tube étant équipé d'une membrane. Trois manomètres (précision ± 1%) permettent de connaître la différence de pression transmembranaire PT (PT = (Pression Entrée Module + Pression Sortie Module)/2 - Pression côté perméat). Dans cette étude, la pression côté perméat est nulle.

Le pilote est utilisé en configuration simple "batch", avec recyclage du rétentat jusqu'à atteindre un FCV (Facteur de Concentration Volumique) de 1,5.

Deux types de membranes ont été utilisées :

- les membranes **Carbosep M1** (seuil de coupure de 150 kDa) et **M9** (seuil de coupure de 300 kDa) (Tech-Sep, Miribel, France). Le support est en carbone aggloméré et la couche filtrante en oxyde de zirconium. La surface mise en jeu pour chaque membrane est de 0,016 m^2.
- les membranes **CFCC** (Carbon Fiber Composite Carbon) **0,05µm** et **0,1µm** (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France). Ces membranes de microfiltration sont également de nature minérale, mais le support est en fibres de carbone polycristallin sur lequel est déposée une fine couche de carbone amorphe microporeux. La surface membranaire utilisée est également de 0,016 m^2.

Les conditions d'ultrafiltration pour les deux types de membranes sont les suivantes :

- pression transmembranaire (PT) : 3,5 bar ;
- vitesse tangentielle de circulation (V) : 4 $m.s^{-1}$.

Tous les essais sont conduits à la température (T) de 50°C (± 2°C) jusqu'à un Facteur de Concentration Volumique (FCV) de 1,5 ; pour chaque essai, le volume de lactosérum mis en oeuvre dans le bac de lancement est de 8 l.

II.2. Nature du lactosérum :

Le lactosérum utilisé est issu d'une fabrication industrielle de pâte pressée cuite type Emmental (S.A. Préval, Montauban de Bretagne, France). Il est filtré sur tamis 20 µm et écrémé à 50°C par centrifugation (Westfalia-Separator MSD 300, 9000g) à l'usine. Son pH est de 6,45 ± 0,05. Le tableau IV donne sa composition moyenne.

Dès sa réception au laboratoire, le lactosérum est refroidi à 2°C sur un échangeur thermique à plaques et additionné d'azide de sodium (à raison de 0,2 gramme par litre) pour prévenir toute prolifération bactérienne. Le pH est ajusté à la valeur désirée, soit à l'aide d'HCl 10 N (pour pH 3,8 et 4,6), soit à l'aide de NaOH 5 N (pour pH 7,0).

II.3. Caractérisation du transfert de matière :

II.3.1. Flux de perméation J :

La procédure de conditionnement et de nettoyage des membranes est la suivante :

- rinçage à l'eau distillée pendant 15 minutes ;
- lavage basique (NaOH 1% (v/v) avec 150 ppm de NaOCl) pendant 30 minutes à 75°C et 2 bar, sans recyclage du rétentat durant les 15 premières minutes ;
- rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité ;
- lavage acide (HNO_3 2% (v/v)) pendant 30 minutes à 50°C et 2 bar, sans recyclage du rétentat durant les 15 premières minutes ;
- rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

Après conditionnement ou nettoyage des membranes, les flux à l'eau (J_W, en $l.h^{-1}.m^{-2}$) sont mesurés à 50°C (± 2°C), sous une pression de 2 bar et une vitesse tangentielle de 4 $m.s^{-1}$. Les flux à l'eau pour chaque membrane étudiée sont donnés dans le tableau V.

Lors des essais d'UF, les flux de perméation (J_p, en $l.h^{-1}.m^{-2}$) sont mesurés à 50°C (± 2°C), sous une pression de 3,5 bar et une vitesse tangentielle de 4 $m.s^{-1}$.

Tableau IV. Composition moyenne du lactosérum doux utilisé. (...)* : p. 100 de EST.

	Nombre d'échantillons analysés	Moyenne ($g.kg^{-1}$)	Ecart type	Coefficient de variation (%)
EST [1]	20	63,45	2,17	3,42
MAT [2]	20	9,09 (14,32)*	0,21	2,31
MM [3]	14	5,15 (8,11)*	0,21	4,07
α-lactalbumine	16	0,82 (1,29)*	0,05	6,09
β-lactoglobuline	16	3,52 (5,54)*	0,20	5,68
Calcium	19	0,40 (0,63)*	0,03	7,50
Potassium	16	1,68 (2,64)*	0,14	8,33
Sodium	16	0,52 (0,82)*	0,04	7,69
Phosphate	20	0,88 (1,38)*	0,08	9,09

[1] Extrait sec total ; [2] Matières azotées totales ; [3] Cendres.

Tableau V. Perméabilité à l'eau (J_w) et valeurs des résistances hydrauliques initiales (Rm) des membranes Carbosep (M1 et M9) et CFCC (0,05µ et 0,1µ).

Membrane	J_w [1] ($l.h^{-1}.m^{-2}$)	Rm ($\times 10^{12}\ m^{-1}$)
Carbosep M1	310 ± 5	4,19 ± 0,06
Carbosep M9	660 ± 16	2,00 ± 0,05
CFCC 0,05µ	503 ± 8	2,60 ± 0,04
CFCC 0,1µ	1447 ± 48	0,90 ± 0,03

[1] : Flux à l'eau mesurés à 50°C, sous une pression de 2 bar et à 4 m.s-1.

II.3.2. Résistances hydrauliques des membranes propres (Rm) et résistances hydrauliques dues au colmatage total (Rf) :

La résistance hydraulique d'une membrane représente la résistance qui s'oppose au passage des solutés à travers la membrane.

Les résistances hydrauliques membranaires R (m^{-1}) (initiale : Rm ; de colmatage total : Rf) sont calculées selon Daufin *et al.* (1991).

Par application de la loi de Darcy, la résistance hydraulique de la membrane propre Rm (en m^{-1}) ou résistance hydraulique initiale est donnée par la relation :

$$Rm = \frac{PT}{\mu_w . J_w}$$

avec : PT = pression transmembranaire (Pa)

μ_W = viscosité dynamique de l'eau à 50° C (Pa.s)

J_W = densité de flux à l'eau à 50° C ($l.h^{-1}.m^{-2}$).

Après chaque essai d'UF, la résistance hydraulique causée par le colmatage total Rf (en m^{-1}) ou résistance hydraulique finale s'exprime :

$$Rf = \frac{PT}{\mu_p . J_p} - Rm$$

avec : PT = pression transmembranaire (Pa)

μ_p = viscosité dynamique du perméat à 50° C (Pa.s)

J_p = débit de perméat à 50° C ($l.h^{-1}.m^{-2}$)

Rm = résistance hydraulique initiale de la membrane (m^{-1}).

La viscosité des perméats à 50° C est assimilée à celle de l'eau à 50° C.

Les valeurs de Rm pour chaque membrane sont données dans le tableau V.

Lors des essais d'UF, Rf est calculé lorsqu'est atteint le FCV 1,5. Le niveau de colmatage de chaque membrane selon le pH d'UF est alors apprécié par le calcul de la résistance normée Rf/Rm.

II.3.3. Taux de Rétention (TR) :

Les Taux de Rétention (TR) en β-Lg et en α-La sont calculés selon Taddéi *et al.* (1986) :

$$TR\ (\%) = (1 - Cp_i/Cr_i) \times 100$$

avec Cp_i et Cr_i : concentration du constituant i respectivement dans le perméat global et le rétentat global.

II.4. Caractérisation biochimique des produits obtenus :

Les analyses portent sur le sérum de départ, les perméats globaux et rétentats globaux.

La matière azotée totale (MAT ; azote total x 6,38) est déterminée par la méthode de Kjeldahl à l'aide de l'équipement Técator (Humeau, Nantes, France).

Les extraits secs (EST) sont déterminés par dessiccation en étuve à 103°C pendant 7 heures, les cendres (MM) par incinération dans un four à 550°C selon la méthode de l'AOAC (1945).

Les teneurs en β-Lg et en α-La sont déterminées par HPLC selon le protocole de Jaubert et Martin (1992).

Le dosage des cations et des anions est effectué par électrophorèse capillaire (unité d'electrophorèse capillaire Quanta 4000, Waters, Milford, MA, USA). Le capillaire utilisé est en silice fondue, d'un diamètre interne de 75 µm et de 100 cm de longueur. Les standards utilisés proviennent de chez Analys SA (Manosque, France) : Calikit 1 pour les anions, Calikit 2 pour les cations.

La détermination des cations (K^+, Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}) a été réalisée selon Saulnier *et al.* (1992) et Schmitt *et al.* (1993). Les coefficients de variation sont compris entre 0,7 et 2,8%. L'électrolyte est composé de Tropolone (-2, 4, 6-cycloheptatriènenone) (Sigma, Saint-Louis,

USA) et d' UV CAT 2 (Waters, Milford, MA, USA). L'injection est réalisée en mode électrostatique durant 30 s (volume injecté de 10 nl) et la détection à 185 nm.

La détermination des anions (chlorure, sulfate, phosphate) a été réalisée selon Saulnier *et al.* (1992) et Loualeiche *et al.* (1993). Les coefficients de variation sont compris entre 0,5 et 4%. L'électrolyte est composé de chromate de sodium tetrahydraté (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) et d'OFM (Osmotic Flow Modifier) Anion BT ™ (Waters, Milford, MA, USA). Le mode d'injection est le même que celui des cations mais la détection se fait à 254 nm.

III. RESULTATS

III.1. Influence du pH sur la perméabilité des membranes :

Les courbes des flux de perméation J_p (figure 4) lors de l'UF de lactosérum doux présentent la même allure, quelque soit la nature de la membrane et le pH. La décroissance des flux est tout d'abord rapide (quelques minutes) puis elle ralentit pour devenir quasiment linéaire. Kuo et Cheryan (1983) ont observé une allure semblable lors de l'ultrafiltration de lactosérum acide sur membrane polymère ainsi que Taddéi *et al.* (1986) dans le cas de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur membrane minérale Carbosep M4 (20 kDa).

Les durées d'ultrafiltration pour atteindre le FCV de 1,5 sont très variables selon le pH (figure 4). A pH 7,0, la perméabilité de toutes les membranes est augmentée de façon significative par rapport à pH 4,6, valeur de pH pour laquelle les flux sont les plus faibles (tableau VI). Lorsque le pH passe de 7,0 à 4,6, les flux chutent de 70% dans le cas des membranes M1 et M9 et de 50% pour les membranes 0,05µm et 0,1µm. Ainsi, en fin de filtration, les flux sur M1 passent de 150 $l.h^{-1}.m^{-2}$ à pH 7,0 à 45 $l.h^{-1}.m^{-2}$ à pH 4,6. Pour la membrane 0,1µm, les flux chutent de 68 $l.h^{-1}.m^{-2}$ à pH 7,0 à 28 $l.h^{-1}.m^{-2}$ à pH 4,6. Pour toutes les membranes, la perméabilité à pH 3,8 est améliorée par rapport à pH 4,6. Pour les membranes Carbosep M1 et M9, les flux passent respectivement de 45 $l.h^{-1}.m^{-2}$ et 34 $l.h^{-1}.m^{-2}$ pour pH 4,6 à 101 $l.h^{-1}.m^{-2}$ et 94 $l.h^{-1}.m^{-2}$ pour pH 3,8. Pour les membranes CFCC, une telle augmentation des flux est également observée (tableau VI).

III.2. Influence du pH sur le niveau de colmatage total des membranes :

Le tableau VI présente les valeurs de Rf/Rm en fonction du pH pour les différentes membranes. Pour chaque membrane, le pH a la même influence sur la résistance normée de

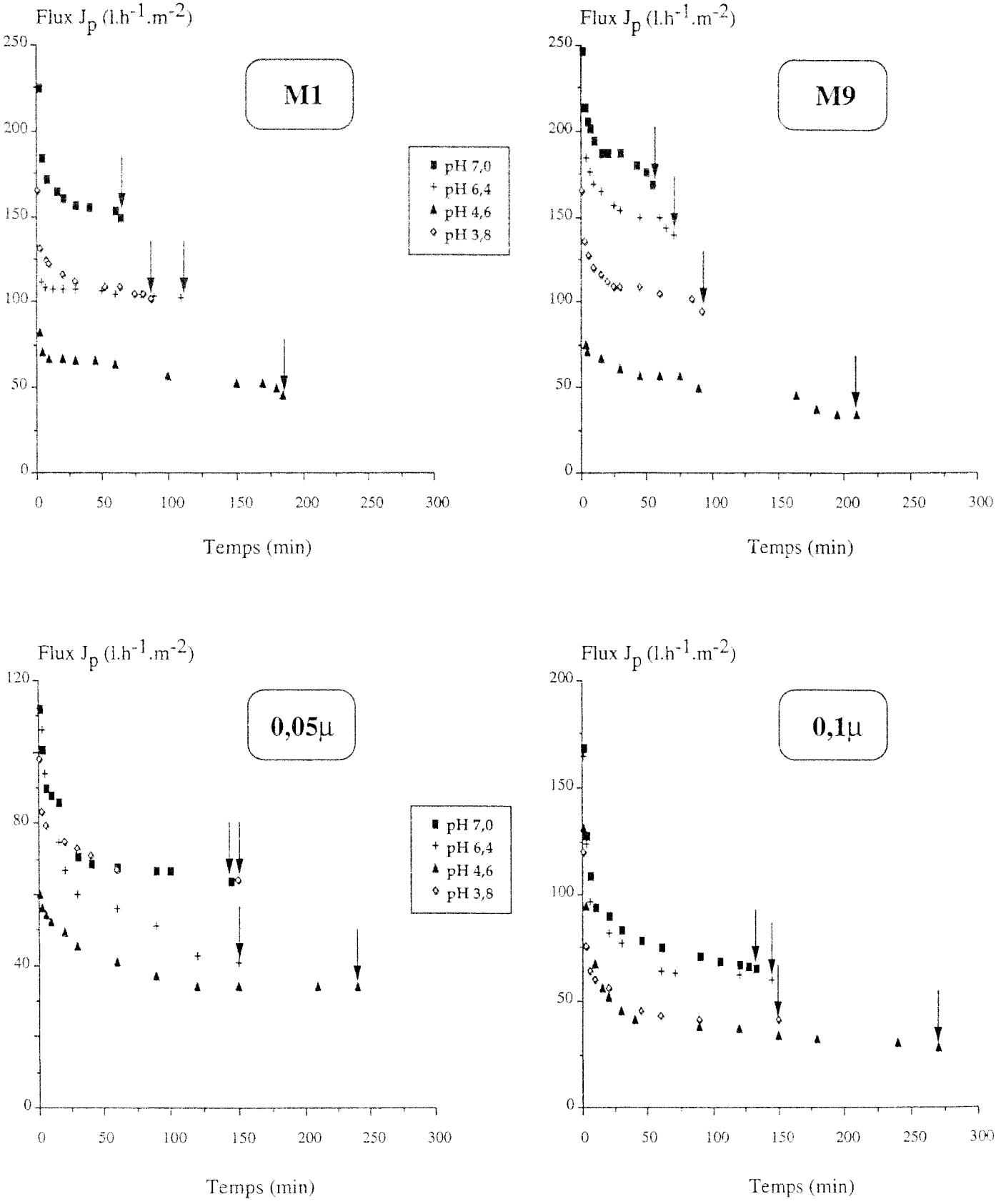


Figure 4 : Evolution du flux de perméation Jp en fonction du temps lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur les membranes Carbosep (M1 et M9) et CFCC (0,05µ et 0,1µ) à différents pH.
Lorsque le FCV 1,5 est atteint, l'ultrafiltration est stoppée (symbolisé par une flèche).
Conditions opératoires : PT = 3,5 bar ; V = 4 m.s-1 ; T = 50°C ; FCV = 1,5.

Tableau VI. Résistances hydrauliques finales (Rf) et résistances normées (Rf/Rm) des membranes Carbosep (M1 et M9) et CFCC (0,05µ et 0,1µ) lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux à différents pH.

	Membrane			
Paramètre	M1	M9	0,05µ	0,1µ
J_P ($l.h^{-1}.m^{-2}$)				
pH 7,0	150	169	64	68
pH 6,4	105	139	41	60
pH 4,6	45	34	34	28
pH 3,8	101	94	64	41
Rf ($x\ 10^{12}\ m^{-1}$)				
pH 7,0	11,1	11,6	33,2	32,8
pH 6,4	17,6	14,5	53,3	37,3
pH 4,6	46,7	65,4	64,8	81,0
pH 3,8	18,5	22,4	33,2	55,0
Rf/Rm				
pH 7,0	2,6	5,8	12,8	36,4
pH 6,4	4,2	7,3	20,5	41,4
pH 4,6	11,1	32,7	24,9	90,0
pH 3,8	4,4	11,2	12,8	61,1

Conditions opératoires : PT = 3,5 bars ; V = 4 $m.s^{-1}$; T = 50°C ; FCV = 1,5.
J_P : flux de perméat mesuré à 50°C, à 3,5 bar et à FCV 1,5.

colmatage total. Rf/Rm prend la valeur la plus élevée à pH 4,6, traduisant ainsi une aggravation du colmatage total à ce pH mais aussi en fonction du temps de contact produit-membrane.

III.3. Incidence du pH sur la composition des rétentats et des perméats :

Dans les tableaux VII et VIII sont rapportés les taux de cendres, MAT, calcium et phosphate (exprimés en % de l'EST) des perméats et des rétentats obtenus aux différents pH d'UF.

Les teneurs en MAT et cendres des rétentats obtenus sur toutes les membranes ne varient pas de manière significative selon le pH d'UF. Il en est de même pour les teneurs en calcium et phosphate.

Par contre, au niveau des perméats, c'est au niveau de la fraction minérale (calcium et phosphate) que sont observés des changements de composition selon le pH d'UF. En effet, les teneurs en MAT des perméats ne varient pas de façon significative.

Les taux de cendres varient ainsi de façon significative selon le pH d'UF (jusqu'à 40% selon le pH et la membrane utilisée). Les taux de cendres (exprimés en % de l'EST) des ultrafiltrats obtenus aux pH acides sont toujours plus élevés que ceux obtenus à pH 6,4 et 7,0 (tableaux VII et VIII). Par exemple, pour la membrane M1, les cendres des ultrafiltrats à pH 7,0 , 6,4 , 4,6 et 3,8 sont respectivement de 8,6 , 8,9 , 10,5 et 10,2%.

Les taux en calcium et phosphate (exprimés en % de l'EST) des différents ultrafiltrats varient dans le même sens que les taux de cendres (tableaux VII et VIII).

III.4. Influence du pH sur la transmission des protéines sériques majeures :

Le transfert (ou transmission) des protéines sériques (α-La et β-Lg) est apprécié par le taux de rétention (TR). Un TR de 100% traduit une transmission nulle à travers la membrane.

Tableau VII. Composition des ultrafiltrats et rétentats obtenus sur membrane M1 et M9 à différents pH.
Conditions opératoires : PT = 3,5 bar ; V = 4 $m.s^{-1}$; T = 50°C ; FCV = 1,5.

	EST [1] ($g.kg^{-1}$)	MAT [2]	MM [3]	α-La [4]	β-Lg [5]	Calcium	Phosphate
				(% EST)			
P(UF $_{M1-7,0}$)	**53,40**	**5,24**	**8,61**	**0,46**	**1,01**	**0,54**	**1,40**
R(UF $_{M1-7,0}$)	68,50	16,93	8,03	1,62	7,30	0,69	1,56
P(UF $_{M1-6,4}$)	**48,30**	**5,23**	**8,90**	**0,21**	**0,39**	**0,66**	**1,49**
R(UF $_{M1-6,4}$)	66,30	15,99	8,30	1,40	5,73	0,54	1,09
P(UF $_{M1-4,6}$)	**32,50**	**4,76**	**10,46**	**$5,5.10^{-3}$**	**0,02**	**0,95**	**2,31**
R(UF $_{M1-4,6}$)	72,20	16,20	8,17	1,45	6,50	0,65	1,08
P(UF $_{M1-3,8}$)	**51,10**	**5,28**	**10,18**	**$5,9.10^{-3}$**	**0,20**	**0,84**	**1,94**
R(UF $_{M1-3,8}$)	67,40	17,21	8,31	1,60	7,27	0,70	1,23
P(UF $_{M9-7,0}$)	**52,00**	**5,00**	**8,85**	**0,40**	**0,96**	**0,62**	**1,23**
R(UF $_{M9-7,0}$)	69,20	17,05	7,80	1,82	8,19	0,61	1,07
P(UF $_{M9-6,4}$)	**52,70**	**4,74**	**8,73**	**0,21**	**0,32**	**0,55**	**1,52**
R(UF $_{M9-6,4}$)	66,30	17,50	7,69	1,67	6,82	0,63	1,52
P(UF $_{M9-4,6}$)	**44,90**	**4,45**	**9,35**	**0,02**	**0,04**	**0,78**	**1,78**
R(UF $_{M9-4,6}$)	69,20	17,05	7,66	1,55	6,76	0,61	1,26
P(UF $_{M9-3,8}$)	**48,20**	**5,19**	**9,75**	**0,02**	**0,25**	**0,81**	**1,64**
R(UF $_{M9-3,8}$)	68,40	17,11	7,46	1,49	7,72	0,72	1,11

[1] Extrait sec total ; [2] Matières azotées totales ; [3] Cendres ; [4] α-lactalbumine ; [5] β-lactoglobuline ;
Nomenclature : P = perméat, R = rétentat, UF = ultrafiltration, en indice : membrane-pH.

Tableau VIII. Composition des ultrafiltrats et rétentats obtenus sur membrane 0,05µ et 0,1µ à différents pH.
Conditions opératoires : PT = 3,5 bar ; V = 4 $m.s^{-1}$; T = 50°C ; FCV = 1,5.

	EST [1] ($g.kg^{-1}$)	MAT [2]	MM [3]	α-La [4]	β-Lg [5]	Calcium	Phosphate
				(% EST)			
$P(UF_{0,05\mu-7,0})$	**48,30**	**5,07**	-	**0,23**	**0,36**	**0,39**	**1,28**
$R(UF_{0,05\mu-7,0})$	66,20	17,82	-	1,36	6,36	0,65	1,36
$P(UF_{0,05\mu-6,4})$	**48,10**	**6,37**	-	**0,54**	**1,22**	**0,48**	**1,35**
$R(UF_{0,05\mu-6,4})$	65,20	17,33	-	1,92	6,13	0,60	1,33
$P(UF_{0,05\mu-4,6})$	**33,50**	**4,35**	**10,34**	**0,03**	**0,09**	**0,78**	**1,55**
$R(UF_{0,05\mu-4,6})$	63,80	17,87	8,15	1,68	6,55	0,64	1,25
$P(UF_{0,05\mu-3,8})$	**47,40**	**5,91**	**10,70**	**0,14**	**0,95**	**0,80**	**1,58**
$R(UF_{0,05\mu-3,8})$	66,00	17,27	7,88	1,55	6,77	0,56	1,33
$P(UF_{0,1\mu-7,0})$	**50,00**	**7,00**	**7,80**	**0,36**	**1,04**	**0,48**	**0,72**
$R(UF_{0,1\mu-7,0})$	63,60	17,61	8,18	1,18	4,98	0,64	1,46
$P(UF_{0,1\mu-6,4})$	**48,00**	**7,50**	**6,46**	**0,52**	**1,46**	**0,54**	**1,02**
$R(UF_{0,1\mu-6,4})$	60,80	18,26	9,05	1,22	5,15	0,64	1,37
$P(UF_{0,1\mu-4,6})$	**38,90**	**6,68**	**10,54**	**0,26**	**0,72**	**0,85**	**1,36**
$R(UF_{0,1\mu-4,6})$	65,70	16,44	8,37	1,23	5,26	0,73	1,19
$P(UF_{0,1\mu-3,8})$	**40,40**	**7,10**	**10,40**	**0,17**	**1,36**	**0,92**	**2,00**
$R(UF_{0,1\mu-3,8})$	63,90	15,18	8,45	1,11	4,60	0,70	1,28

[1] Extrait sec total ; [2] Matières azotées totales ; [3] Cendres ; [4] α-lactalbumine ; [5] β-lactoglobuline ;
Nomenclature : P = perméat, R = rétentat, UF = ultrafiltration, en indice : membrane-pH.

Le tableau IX présente, pour chaque membrane, les taux de rétention pour les deux protéines majeures (α-La et β-Lg) selon le pH d'UF. Les teneurs en α-La et en β-Lg (exprimées en % de l'EST) des différents perméats et rétentats sont données dans les tableaux VII et VIII.

Sans être égale à 100%, la rétention maximale pour les deux protéines est observée à pH 4,6, et ce quels que soient la nature et le seuil de coupure de la membrane.

Lorsque le pH d'UF est amené à 7,0, le transfert de l'α-La et de la β-Lg à travers les membranes Carbosep M1 et M9 tend à être amélioré. Par exemple, les taux de rétention en α-La et β-Lg sur membrane Carbosep M1 passent respectivement de 89% et 95% à pH 6,4 à 77,4% et 89,2% à pH 7,0. Par contre, pour les membranes CFCC 0,05µm et 0,1µm, l'augmentation du pH de 6,4 à 7,0 conduit à une augmentation de la rétention de ces protéines, soit donc une diminution de la transmission (tableau IX). Ainsi, sur membrane CFCC 0,1µm, les taux de rétention en α-La et β-Lg sont respectivement de 66,2% et 77,6% à pH 6,4 contre 76% et 83,6% à pH 7,0.

A pH 3,8 et pour toutes les membranes envisagées, le transfert de la β-Lg est privilégié par rapport à celui de l'α-La. Ainsi, par exemple, pour la membrane CFCC 0,1µm, le taux de rétention en α-La est de 90,1% à pH 3,8, alors que celui de la β-Lg n'est que de 81,3%.

Tableau IX. Taux de rétention (TR en %) de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline en fonction du pH d'ultrafiltration pour les membranes Carbosep (M1 et M9) et CFCC (0,05µ et 0,1µ).
Conditions opératoires : PT = 3,5 bar ; V = 4 $m.s^{-1}$; T = 50°C ; FCV = 1,5.

Membrane	TR[1] (α-lactalbumine)	TR[1] (β-lactoglobuline)
	(%)	
Carbosep M1		
pH 7,0	77,4	89,2
pH 6,4	89,0	95,0
pH 4,6	99,8	99,8
pH 3,8	99,7	97,9
Carbosep M9		
pH 7,0	83,3	91,1
pH 6,4	90,0	96,2
pH 4,6	99,1	99,5
pH 3,8	99,1	97,7
CFCC 0,05µ		
pH 7,0	87,6	95,8
pH 6,4	79,2	85,3
pH 4,6	99,1	99,3
pH 3,8	93,5	89,9
CFCC 0,1µ		
pH 7,0	76,0	83,6
pH 6,4	66,2	77,6
pH 4,6	87,6	91,9
pH 3,8	90,1	81,3

[1] : TR = Taux de Rétention (%). Voir Matériel et Méthodes.

IV. DISCUSSION

L'étude de la composition minérale des perméats d'UF montre que l'abaissement du pH (de 7,0 à 3,8) conduit à une meilleure perméation du calcium et du phosphate à travers les quatre membranes étudiées. Cette forte minéralisation des perméats acides est liée à une solubilisation, aux pH acides, du calcium et du phosphate (Le Graet et Brulé, 1993). En effet, à partir de pH 5,2, la totalité du phosphate minéral est solubilisé. Pour le calcium, il faut cependant atteindre une valeur de pH proche de 3,5 pour observer une totale solubilisation. Brulé *et al.* (1974) ont constaté effectivement un meilleur transfert de certains ions (calcium, magnésium, phosphore) lors de l'UF de lait à pH acide. Des travaux plus récents, portant sur l'UF de lactosérum clarifié de bufflesse sur membrane polysulfone (Jayaprakasha *et al.*, 1994), montrent également une meilleure perméation du calcium et du phosphore lorsque l'ultrafiltration est effectuée à des pH acides (de 3,0 à 4,5). Par contre, pour des pH proches de 7,0 et à 50°C, les sels de phosphate de calcium ont tendance à précipiter (Roger *et al.*, 1976 ; Merin et Cheryan, 1980 ; Madsen et Thorvardarson, 1984 ; Schmidt et Both, 1987 ; Schmidt *et al.*, 1987). Lors des essais d'UF réalisés à 50°C et à pH 6,4 ou 7,0, les teneurs en phosphate et en calcium des perméats sont plus faibles que celles des perméats acides (tableaux VII et VIII). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Daufin *et al.* (1994) lors de l'UF de lactosérum doux clarifié sur membrane M5 à différents pH.

Ainsi, le pH influe fortement sur l'état de solubilisation du phosphate et du calcium : à pH acide (3,8 et 4,6), ces minéraux ont tendance à se solubiliser et passent donc davantage à travers les membranes (Daufin *et al.*, 1991 ; 1992b) ; à pH 6,4-7,0 et à 50°C, les sels de phosphate de calcium précipitant avec d'autres constituants, notamment les phospholipides (Fauquant *et al.*, 1985a et b), moins de calcium et de phosphate libres seraient donc disponibles (Daufin *et al.*, 1992b), conduisant ainsi à une moindre perméation.

L'effet du pH d'UF sur le transfert des protéines lactosériques majeures varie avec la nature des matériaux membranaires. La surface filtrante des membranes minérales Carbosep est constituée d'oxydes métalliques (oxyde de zirconium ZrO_2 essentiellement), alors que celle des membranes CFCC est faite de carbone amorphe microporeux, le support étant en carbone pour les deux types de membranes. L'homogénéité carbone-carbone entre le support et la surface

filtrante confère aux membranes CFCC un caractère plus hydrophobe par rapport aux membranes Carbosep.

Pour les membranes Carbosep M1 et M9, l'augmentation du pH de 6,4 à 7,0 conduit à un meilleur transfert des lactoprotéines, surtout de l'α-La (14200 Da), comparativement à la β-Lg, car à ces pH, cette dernière existe sous forme de dimère (36800 Da) (Swaisgood, 1982 ; Pessen *et al.*, 1985 ; Hill, 1988). Les membranes d'UF Carbosep étant plutôt de nature hydrophile, l'amélioration du transfert de l'α-La et de la β-Lg peut s'expliquer par une accentuation de l'hydrophilie de ces protéines, lorsque le pH augmente (Nyström, 1989 ; Daufin *et al.*, 1991). Par contre, pour les membranes CFCC 0,05µm et 0,1µm de nature plus hydrophobe, l'augmentation du pH de 6,4 à 7,0 conduit à une diminution sensible du transfert de ces protéines (tableau IX). A pH 7,0, les protéines lactosériques sont pour la plupart chargées négativement et par conséquent plus hydratées et hydrophiles (Nyström, 1989). Compte tenu de cette hydratation plus importante à pH 7,0, le dépôt protéique, qui se forme lors de l'UF, sera davantage perméable à l'eau (Daufin *et al.*, 1994, Gésan *et al.*, 1995), et induira une différence de pression osmotique $\Delta\Pi$ plus faible ($\Delta\Pi$ intervient de manière négative dans la définition du flux J_p). Cette hypothèse pourrait justifier la meilleure perméabilité des membranes à pH 7,0 (figure 4) ainsi que les faibles valeurs de Rf/Rm (tableau VI).

A pH 4,6, quel que soit le type de membranes, des perméablités minimales ainsi qu'un colmatage total important sont observés. Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature. Fane *et al.* (1983) et Hanemaaijer *et al.* (1989) montrent que les flux de perméation sont les plus faibles pour des pH d'UF proches du point isoélectrique (pI) des protéines. A pH 4,6, l'α-La (pI compris entre 4,2 et 4,5) et la β-Lg (pI = 5,2) sont moins solubles et la répulsion entre protéines est minimale (Hayes *et al.*, 1974). La conséquence est alors la formation d'une couche de polarisation plus épaisse, plus dense (Taddéi *et al.*, 1986) et une élévation de la différence de pression osmotique $\Delta\Pi$. De plus, la solubilisation partielle du phosphate et du calcium pourrait également être responsable du colmatage important des membranes (Cheryan et Merin, 1981 ; Daufin *et al.*, 1991). D'où une chute des flux de perméation (figure 4) et des valeurs élevées pour Rf/Rm (tableau VI). Dans ces conditions, la rétention des protéines lactosériques est élevée, proche de 100% (tableau IX).

A pH 3,8, les flux sont améliorés par rapport à pH 4,6, puisque les protéines sont davantage solubles. Pour toutes les membranes, le transfert de la β-Lg à pH 3,8 (sous forme de dimère) est privilégié par rapport à celui de l'α-La, suggérant une modification conformationnelle

de cette dernière. Les taux de rétention de l'α-La sur toutes les membranes sont effectivement plus importants qu'aux pH 6,4 et 7,0 (tableau IX). A partir de pH 3,8, l'α-La subit des changements de structure avec une tendance à la polymérisation (Kronman *et al.*, 1964 ; Bramaud *et al.*, 1995). Ce changement de structure implique des résidus Asp qui, à la suite de la libération de l'ion Ca^{2+} constitutif, conduit à l'ouverture de la molécule par répulsions électrostatiques des groupements carboxyliques (Acharya *et al.*, 1989). Cette tendance à la polymérisation de l'α-La à pH 3,8 et à 50°C, décrite par Pearce (1983), a été mise à profit par Pierre et Fauquant (1986) pour le fractionnement des protéines du lactosérum.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude montre l'importance du pH lors de l'UF de lactosérum. Son effet sur la perméabilité, le colmatage total des membranes ainsi que sur le transfert des protéines sériques majeures peut s'interpréter notamment par des modifications de polymérisation, d'hydrophilie et de charge des protéines. L'étude de la composition minérale des perméats confirme le rôle significatif des phosphates de calcium dans le colmatage des membranes. Le lactosérum n'étant pas préalablement clarifié, il ne faut pas exclure les phospholipides, qui peuvent intervenir dans l'encrassement des membranes (Fauquant *et al.*, 1988 ; Taddéi *et al.*, 1988).

Les sélectivités des membranes sont différentes selon le pH d'UF, et cette étude permet de situer les différentes possibilités de séparation des protéines du lactosérum, en vue d'extraction et purification ultérieures. Ainsi, des dérives de pH, lors de l'UF de lactosérum, peuvent conduire non seulement à des performances membranaires différentes, mais aussi à des perméats qualitativement et quantitativement différents. D'où la nécessité, sur des installations industrielles, de bien maîtriser ce paramètre important.

Cette étude systématique du transfert des protéines sériques majeures (α-La et β-Lg) nous incite à cerner de façon plus approfondie l'influence d'autres paramètres physicochimiques (force ionique) et des paramètres opératoires (PT et V). Ainsi, pourra t-on davantage apprécier l'importance de tel ou tel paramètre, et en fonction des objectifs à atteindre, adopter la stratégie optimale c'est-à-dire celle résultant d'un compromis entre le choix de la membrane, le pH, la force ionique et les paramètres hydrodynamiques.

Pour les membranes Carbosep (M1 et M9), trois facteurs seront étudiés lors de prochains travaux : le pH, la concentration en NaCl, et la vitesse tangentielle de balayage. Pour les membranes CFCC (0,05µm et 0,1µm), un autre facteur est à rajouter : la pression transmembranaire, étant donné leurs seuils de coupure à la limite UF/MF. Mais en raison du nombre important de facteurs, un plan d'expérience doit être envisagé. La réponse au niveau des rétentions et du colmatage au facteur pH s'inscrivant dans un polynôme du second degré, le plan d'expérience choisi est celui utilisant les matrices de Doehlert. Ce plan d'expérience est optimum pour les réponses décrivant un polynôme du second degré, avec un minimum d'essais (Doehlert, 1970 ; Goupy, 1990). C'est la raison pour laquelle le polynôme du second degré avec utilisation des matrices de Doehlert nous semble le choix le plus judicieux.

Chapitre II

VALORISATION DE LA FRACTION MINERALE DE LACTOSERUM ACIDE : EXTRACTION DE PHOSPHATE DE CALCIUM ET PURIFICATION PAR MICROFILTRATION

I. INTRODUCTION



I.1. Les lactosérums acides :

I.1.1. Composition des lactosérums acides :

Les lactosérums acides renferment moins de lactose et plus de sels minéraux que les lactosérums doux (tableau I) (Webb, 1972 ; Hargrove *et al.*, 1976 ; Alais, 1984). Cependant, contrairement aux lactosérums doux, les lactosérums acides ont une composition trop variable pour que la détermination des teneurs moyennes en divers constituants présente un intérêt (Veisseyre, 1979 ; Saulnier *et al.*, 1995). Ces variabilités de la composition sont à relier avec le passé technologique des lactosérums (Saulnier *et al.*, 1995).

Le Tableau X donne la composition minérale moyenne (en % de la matière sèche) de deux types de lactosérums acides. Ce tableau souligne la grande hétérogénéité de la fraction minérale d'une technologie à une autre, mais aussi au sein d'une même technologie. En effet, pour un même fromage, les lactosérums peuvent différer selon l'usine (Saulnier *et al.*, 1995). Il est donc difficile de donner une composition minérale standard des lactosérums acides. Ainsi, de par sa faible teneur en lactose, en protéines, et sa forte minéralisation variable, les lactosérums acides sont moins bien valorisés que les lactosérums doux destinés à l'alimentation humaine et animale (Adrian et Bourlier, 1980).

I.1.2. Etude de la fraction minérale du lactosérum et des équilibres salins :

I.1.2.1. Généralités :

D'après la composition en cations et anions des lactosérums (Tableau X), les sels les plus communément présents sont des phosphates, des citrates, des chlorures et des carbonates de calcium, de magnésium, de sodium ou de potassium. Ces sels peuvent être sous différentes formes :

- entièrement solubles
- en partie insolubles s'ils sont à sursaturation.

Tableau X. Composition minérale moyenne (en % de la matière sèche) pour deux types de lactosérums acides.

	Lactosérum technologie pâte fraîche	Lactosérum technologie pâte molle
Potassium	2,83[b]	2,22[a] ; 3,27[b] ; 2,47[c]
Calcium	1,67[b] ; 1,90[d]	1,43[a] ; 0,88[b] ; 2,08[c]
Sodium	0,98[d]	0,66[a] ; 0,88[c]
Magnésium	0,15[b]	0,15[a] ; 0,15[b]
Chlorure	1,51[d]	2,11[a]
Phosphate	3,47[b] ; 3,40[d]	3,22[a] ; 3,40[b] ; 3,32[c]
Citrate		0,43[c]
Lactate	10,00[d]	12,58[c]

[a] : Hargrove *et al.*, 1976.
[b] : Adrian et Bourlier, 1980.
[c] : Moulin et Galzy, 1984.
[d] : Sottiez, 1985.

Les principaux équilibres salins dans les lactosérums sont résumés dans le schéma de la figure 5.

D'après la loi de dissociation électrolytique des sels en solution aqueuse, les sels solubles peuvent être totalement dissociés (générant par conséquent des anions et des cations libres) ou en partie non dissociés.

α (= nombre de molécules dissociées/nombre de molécules non dissociées) est le coefficient de dissociation.

D'après la loi d'action de masse, dans une solution aqueuse d'un sel à la concentration initiale c, il restera à l'équilibre $c(1-\alpha)$ molécules de sels non dissociés AB :

$$\begin{array}{ccccc} & & \mathbf{K} & & \\ AB & & <==> & A^+ + & B^- \\ c & & & & \\ c(1-\alpha) & & & c\alpha & c\alpha \end{array}$$

La constante d'équilibre K est alors égale à $c^2\alpha^2/c(1-\alpha)$.

Dans le cas d'électrolytes faibles, α est petit par rapport à l'unité, et $c(1-\alpha)$ est équivalent à c.

D'où $K = c\alpha^2$ soit $\alpha = \sqrt{K/c}$.

En considérant V, le volume molaire ($V = 1/c$), le coefficient de dissociation d'électrolytes faibles est égal à $\sqrt{V.K}$ (loi de dilution d'Ostwald).

Plus la concentration d'un électrolyte faible est petite, plus V son volume molaire augmente et plus la dissociation électrolytique est grande.

Dans le cas d'électrolytes forts, α est grand, proche de 1, et la dissociation est complète.

Dans les lactosérums, les chlorures, électrolytes forts, sont complètement dissociés. En revanche, les anions phosphates, citrates et carbonates sont des électrolytes faibles. Ils sont peu dissociés et sont présents sous différentes formes en fonction du pH du lactosérum et des constantes de dissociation de leurs fonctions acides (tableau XI et figure 6). Ainsi, dans les lactosérums acides, dont le pH est voisin de 5,0 (pH allant de 4,6 à 5,2), les citrates sont à 50% sous forme

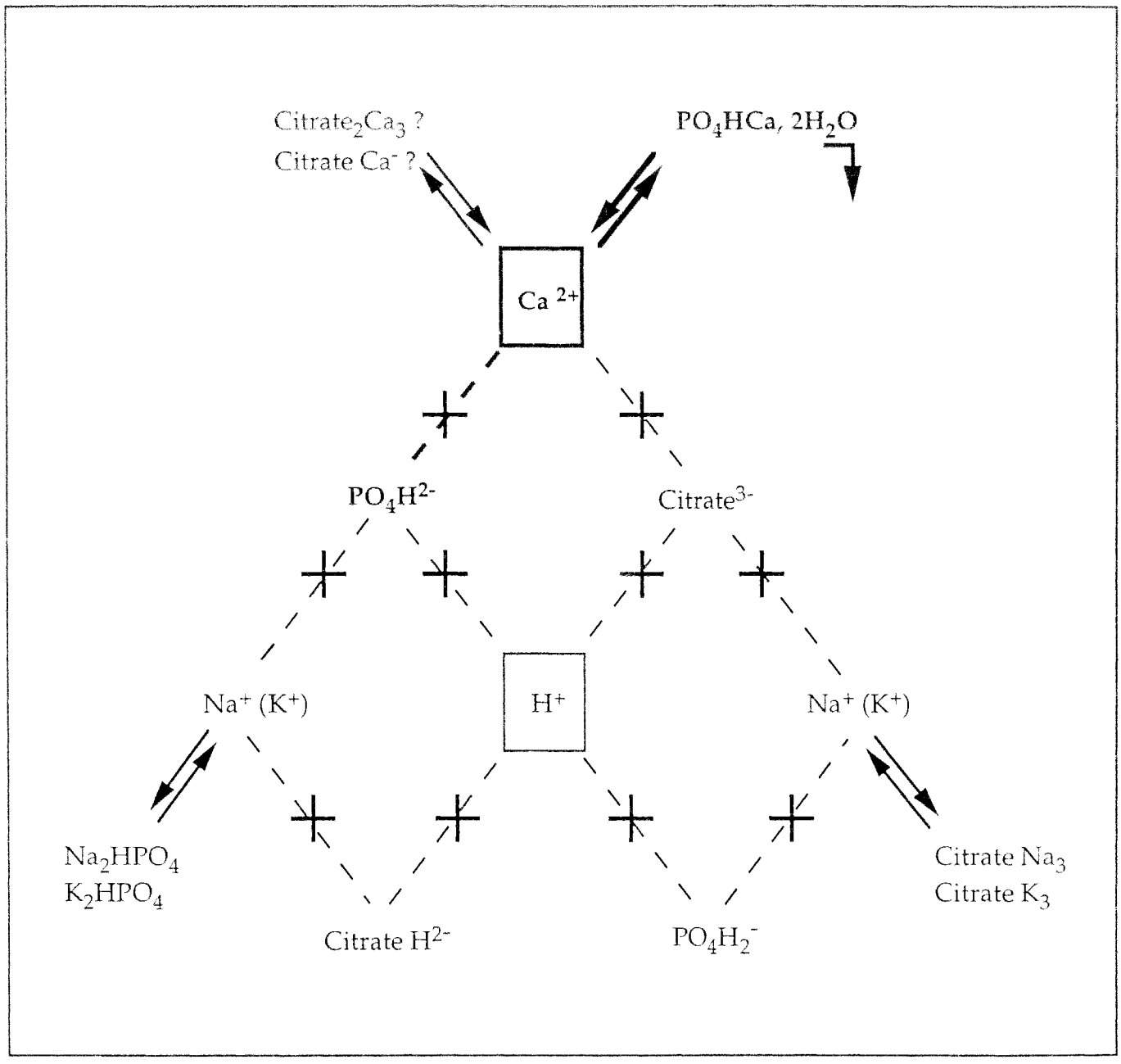


Figure 5: Equilibres salins du lactosérum (Ferrero, 1991).

Tableau XI. Constantes de dissociation des acides faibles à 25°C.

Acide	pK_1	pK_2	pK_3
Citrique	3,12	4,76	5,40
Phosphorique	2,14	7,09	12,31
Carbonique	6,37	10,25	-

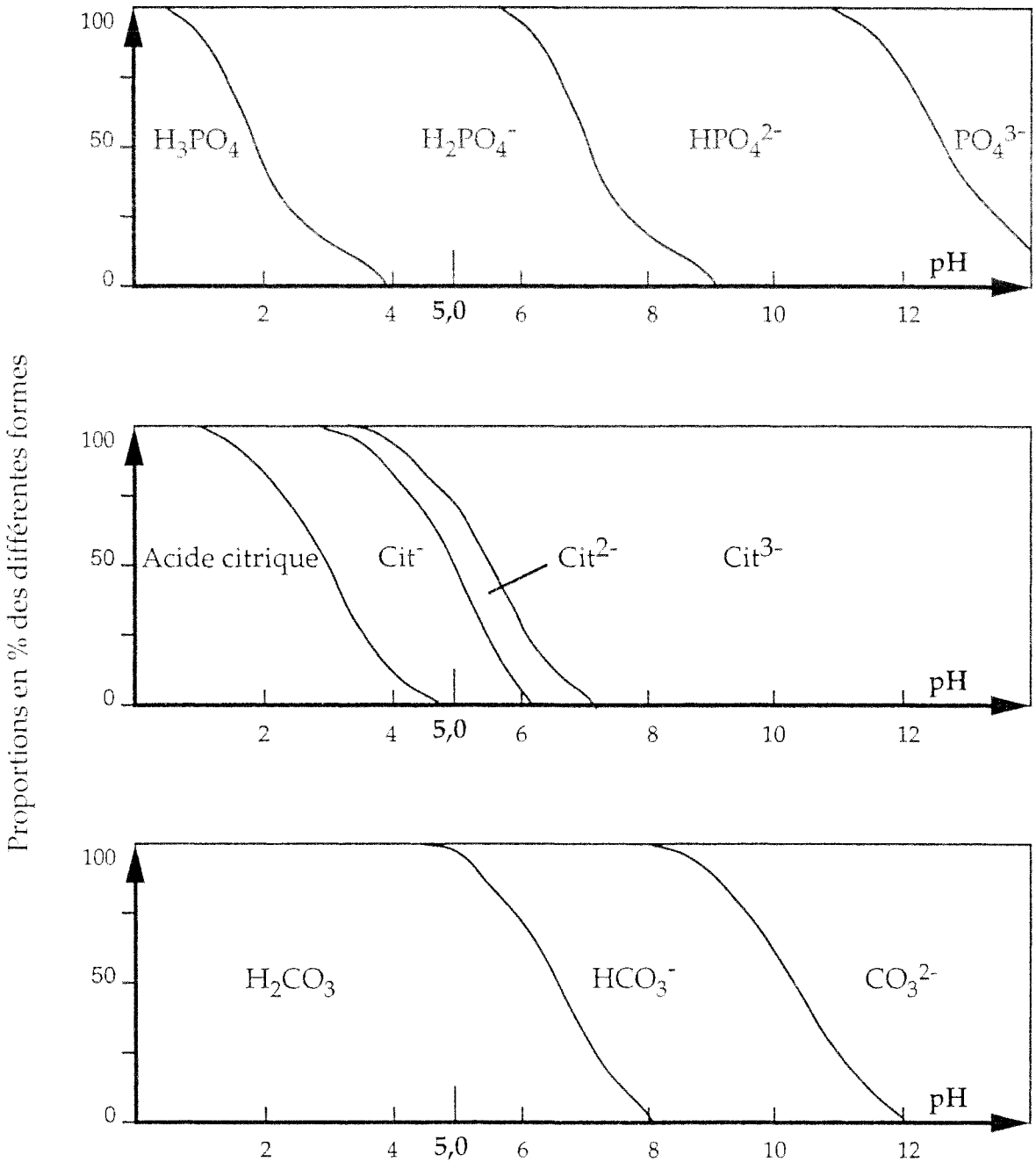


Figure 6 : Ionisation des acides faibles du lait en fonction du pH.

H_2 citrate$^-$, 25% sous forme H citrate^{2-} et 25% sous forme de citrate^{3-}. Les phosphates sont entièrement sous forme $H_2PO_4^-$ et les carbonates sous forme H_2CO_3.

Concernant les cations, il est admis que certains composants sont totalement ionisés, ainsi Na^+ et K^+ sont probablement non combinés à d'autres composants. En revanche, selon Pyne (1962), seulement 30% du calcium dissous et 20% du magnésium dissous sont sous forme ionisée, le reste étant sous forme de sels non dissociés ou de complexes non dissociés (complexes anioniques du type citrate$^-$ Ca et citrate$^-$ Mg).

I.1.2.2. Facteurs modifiant les équilibres salins :

I.1.2.2.1. Influence de la température :

Le refroidissement du lait et du lactosérum conduit à une augmentation des teneurs en calcium et phosphate inorganiques solubles (Schmitt *et al.*, 1993). Les phosphates de calcium sont plus solubles à froid qu'à chaud. Le calcium dissous augmente de 10% après 24 heures de maintien à 2°C (Brulé et Fauquant, 1981).

Le chauffage du lait conduit au transfert du calcium et du phosphore inorganique de la phase dissoute vers la phase colloïdale. Le phosphate de calcium est à saturation dans le lait et le lactosérum, et sa solubilité diminue quand la température augmente (Le Graet et Brulé, 1993 ; Saulnier *et al.*, 1995). Sa précipitation est favorisée sous forme de phosphate tricalcique avec libération d'ions H^+ et chute du pH (Schmitt *et al.*, 1993). Pouliot *et al.* (1989a et b) montrent en effet que le phosphate et le calcium mais aussi le citrate et le magnésium précipitent par chauffage entre 20 et 90°C.

I.1.2.2.2. Influence du pH :

Tout changement de pH entraîne une modification importante du degré de dissociation des sels à l'état soluble et des changements dans les équilibres entre formes salines solubles et colloïdales (Evenhuis et De Vries, 1957) (tableau XI et figure 6). Selon Brulé (1981), si la concentration en ions H^+ augmente, les équilibres salins sont déplacés vers les formes $H_2PO_4^-$ et H_2 citrate$^-$ avec consommation de HPO_4^{2-} et de citrate^{3-}. Ainsi, lors de l'acidification du lait, du PO_4HCa et du citrate-Ca se dissocient et entraînent la dissociation des micelles avec augmentation de la quantité de calcium soluble.

Le Graet et Brulé (1993) confirment ces données : la totalité du phosphate minéral est solubilisée à pH 5,2, alors qu'il faut atteindre un pH de 3,5 pour que tout le calcium et le magnésium le soient. Toutefois, la totalité du phosphate et du calcium n'est jamais sous forme soluble dans les lactosérums acides, compte-tenu de leur fort pouvoir tampon. En effet, en assimilant le pouvoir tampon du lactosérum à celui du lait (Lucey *et al.*, 1993a,b et c)), tout le calcium et le phosphate de la caséine ne se solubiliseraient pas.

I.1.2.3. Nature de l'insoluble minéral :

Dans les lactosérums acides (pH proche de 5,0), en raison de leur ionisation (figure 6), l'insolubilité du citrate et du phosphate reste cependant difficile à expliquer. En effet, Schmidt et Both (1987) mettent en évidence une précipitation de phosphate de calcium dans une solution aqueuse à légère sursaturation entre pH 5,3 et 7,5. La nature cristalline du phosphate de calcium fait l'objet de nombreuses controverses. Il s'agit pour Evenhuis et De Vries (1957) de phosphate de calcium sous forme apatite ou, d'après Pyne et Mac Gann (1960), de phosphocitrate de calcium sous forme apatite également, ou encore, selon Rose (1965) d'un complexe apatite-citrate. Lyster (1972) a même proposé une structure de type hydroxyapatite. Plus récemment, Saulnier *et al.* (1995), sur des lactosérums acides préconcentrés, mettent en évidence la présence de brushite (ou monohydrogénophosphate de calcium dihydraté) de formule $CaHPO_4$, $2H_2O$, ainsi que de citrate de calcium. La nature exacte de ce citrate n'a cependant pas pu être élucidée pour l'heure.

I.2. Les différentes formes de phosphates calciques :

I.2.1. Nature chimique des principaux phosphates de calcium :

Les formes le plus souvent mises en évidence sont les orthophosphates mono, di et tricalciques.

I.2.1.1. Orthophosphate monocalcique :

De formule chimique $Ca(H_2PO_4)_2$, ce sel de phosphate peut se trouver sous forme anhydre ou monohydraté. La poudre a un aspect granuleux, délisquescent et de couleur blanchâtre. Ce sel est soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool.

I.2.1.2. Orthophosphate dicalcique :

Ce sel peut se trouver sous forme anhydre et hydraté. Lorsqu'il est dihydraté, on parle alors de brushite ou monohydrogénophosphate de calcium dihydraté ($CaHPO_4$, $2H_2O$). La brushite se présente sous forme de poudre blanche impalpable. Ce sel est pratiquement insoluble dans l'eau et l'alcool, mais est soluble dans les acides nitrique et chlorhydrique dilués.

I.2.1.3. Orthophosphate tricalcique :

Les formes observées sont le diorthophosphate tricalcique ou whitlockite ($Ca_3(PO4)_2$) ainsi que l'hydroxyapatite ($Ca_5(PO_4)_3OH$). La poudre est blanche et impalpable. Ces sels sont insolubles dans l'eau et l'alcool, mais solubles dans les acides nitrique et chlorhydrique dilués.

I.2.2. Etude cristalline de la brushite :

I.2.2.1. Rappels sur les systèmes cristallins :

L'état cristallin est caractérisé par la distribution des atomes selon un schéma régulier et périodique dans les trois dimensions de l'espace.

I.2.2.1.1. Notion de maille élémentaire :

Soit un atome quelconque O. Cet atome peut être repéré dans l'espace au sein d' un parallèlipipède selon trois axes (Ox), (Oy), et (Oz). Les côtés de ce parallèlipipède sur les axes (Ox), (Oy), et (Oz) sont respectivement appelés a, b, et c (figure 7). Ce motif est encore appelé maille élémentaire.

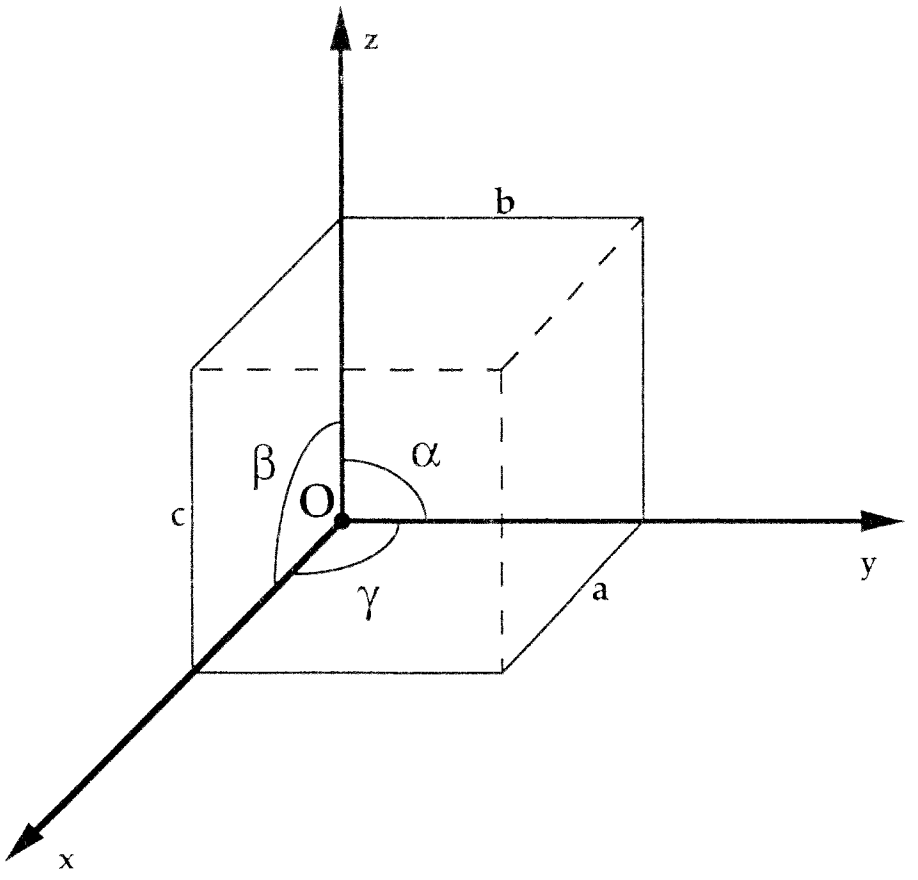


Figure 7 : Notion de maille élémentaire.

La forme et la taille de cette maille élémentaire sont définies par six paramètres :

- les côtés a, b et c ;
- α : angle entre l'axe (Oy) et (Oz) ;
- β : angle entre l'axe (Ox) et (Oz) ;
- γ : angle entre l'axe (Ox) et (Oy).

La taille de cette maille est de l'ordre de quelques dixièmes de nm. La répétition dans les trois dimensions de l'espace, par simple translation, d'une maille élémentaire donne alors le réseau ou système cristallin.

I.2.2.1.2. Les sept systèmes cristallins :

Il existe sept mailles élémentaires qui définissent ainsi sept systèmes cristallins (figure 8). A titre d'exemple, le sel gemme cristallise dans le système cubique ; le quartz dans le système rhomboédrique ; le gypse dans le système monoclinique.

I.2.2.2. Structure cristalline de la brushite :

La structure cristalline de la brushite a été résolue à 0,03 Å (Beevers, 1958). La brushite cristallise dans le système monoclinique (groupe I 2/a) avec les paramètres suivants : a = 5,812 ± 0,002, b = 15,180 ± 0,003, c = 6,239 ± 0,002 Å ; $\alpha = \gamma = 90°$, $\beta = 116°25' \pm 2'$. La maille élémentaire a un volume de 492,9 $Å^3$ avec une densité de 2,318 $g.cm^{-3}$ (Bragg, 1937). Il y a 4 molécules de $CaHPO_4, 2H_2O$ par maille.

La brushite est isotype du gypse ($CaSO_4, 2H_2O$) avec lequel il peut entrer en solution solide (Hill et Hendricks, 1936 ; Smith *et al.*, 1955). En effet, le gypse cristallise dans le système monoclinique avec les paramètres suivants (Onorato, 1929) : a = 5,700, b = 15,17, c = 6,502 Å ; $\alpha = \gamma = 90°$, $\beta = 118°23'$.

La figure 9 donne un possible arrangement des différents atomes constitutifs (Beevers, 1958) ainsi que les distances entre atomes. Les atomes de Ca et de P, reliés par les atomes O du tétrahèdre phosphate, s'organisent en chaînes continues formant ainsi des feuillets. Les molécules d'H_2O interagissent avec les oxygènes du tétrahèdre phosphate, mais aussi avec l'atome Ca et H du phosphate.

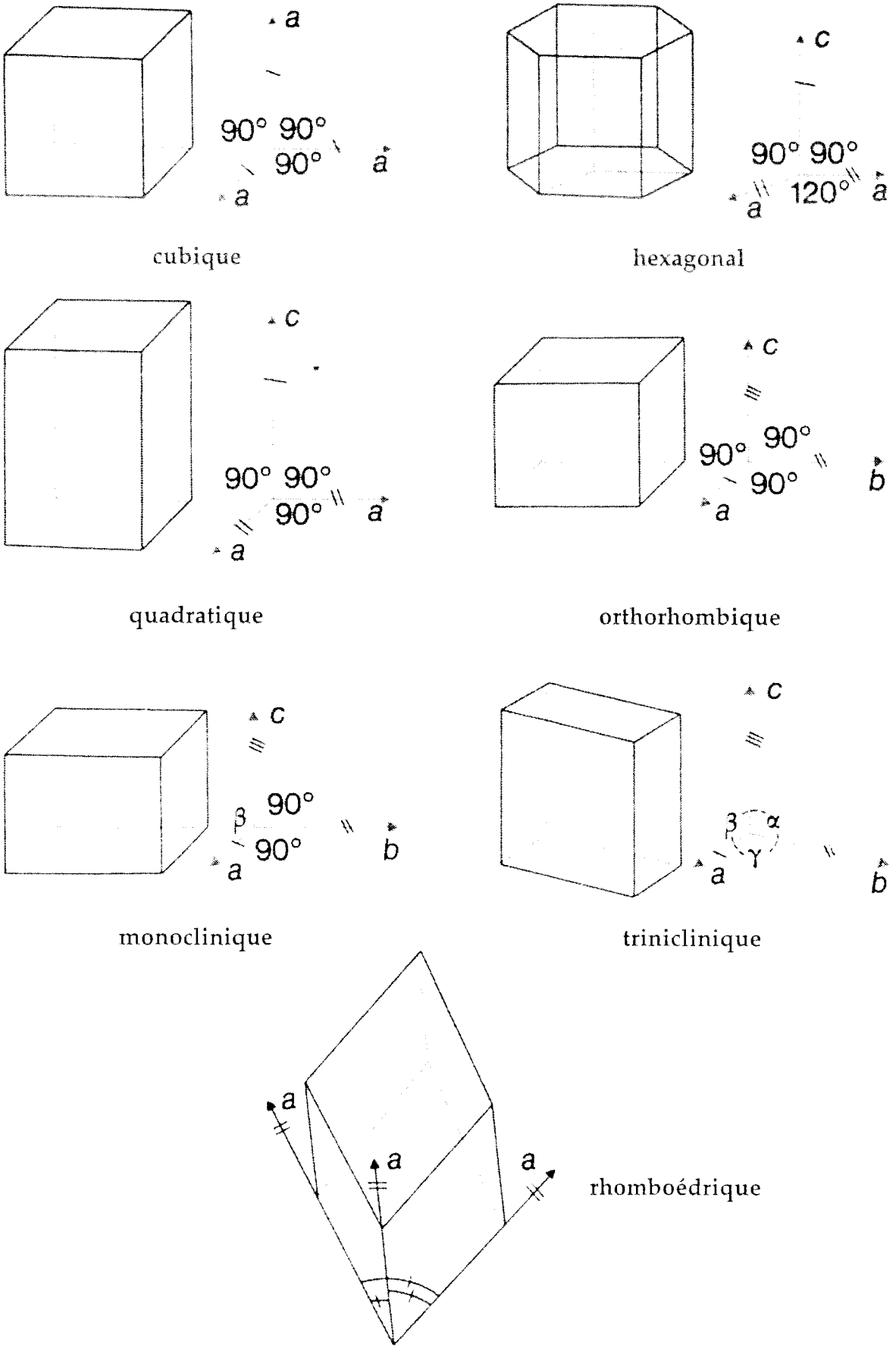


Figure 8: Les sept systèmes cristallins.

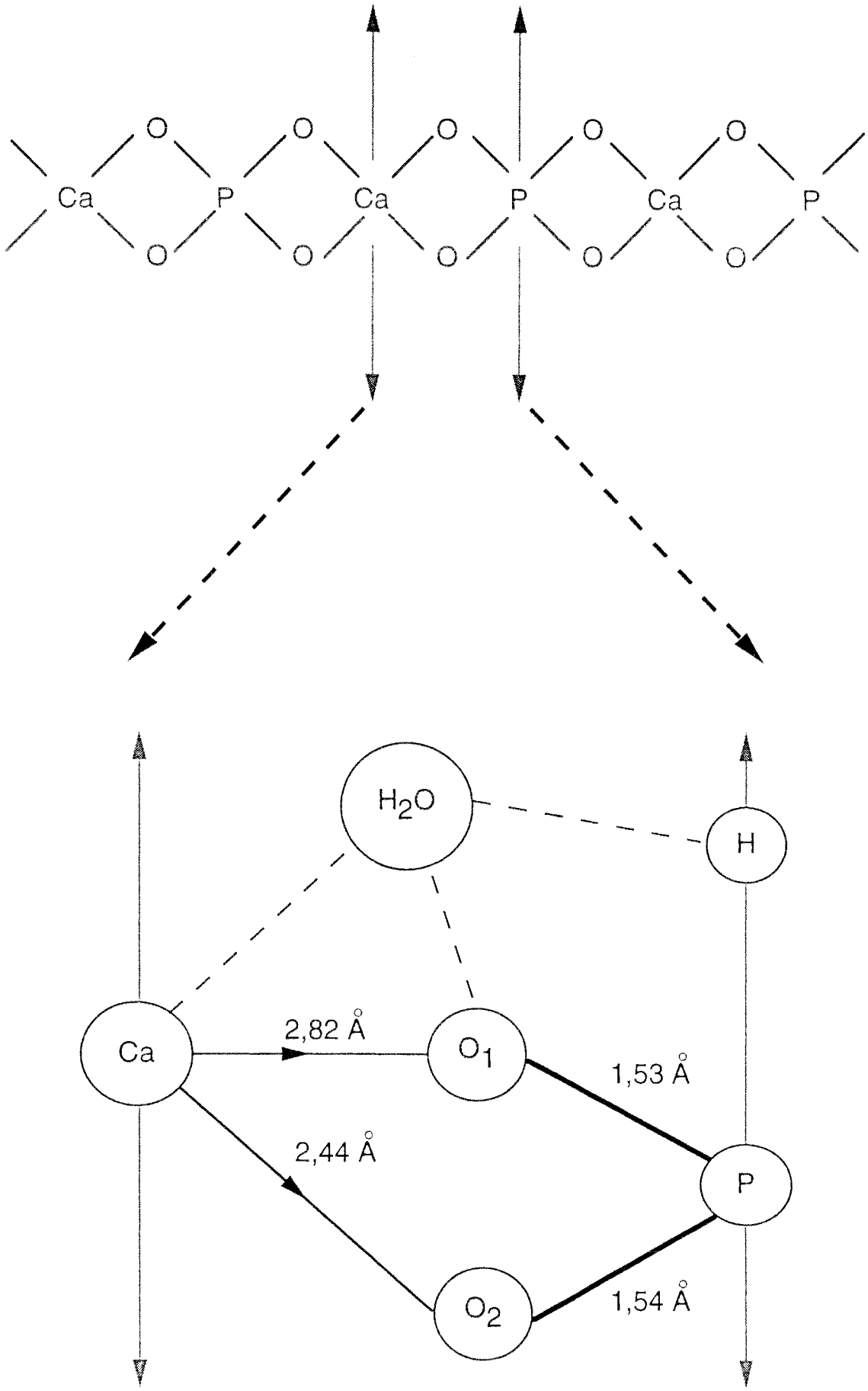


Figure 9 : Interactions et distances entre les différents atomes dans la structure cristalline de la brushite ($CaHPO_4$, $2H_2O$) (selon Beevers, 1958).

I.2.3. Quelques utilisations des phosphates calciques :

Les phosphates mono, di et tricalciques sont utilisés en industrie agroalimentaire comme additifs (E 341 I, II, III respectivement). Aussi, leur application est très diversifiée :

- **dans les sels alimentaires** sous forme de phosphate tricalcique afin de rendre le sel de cuisine moins hygroscopique. La législation (circulaire du 2 mai 1952) impose des doses maximales de 2%.

- **dans les boissons non alcoolisées aux fruits**, comme agent anti-agglomérant (doses maximales : 0,6% du produit pulvérulent, article 1er, A du 28 mai 1979).

- **en panification**, sous forme acide, pour remédier aux inconvénients du développement de *Bacillus mesentericus*. Le développement de cette bactérie conduit à un pain dont la mie est visqueuse et par conséquent impropre à la consommation.

- **dans les poudres à lever**, sous forme monocalcique.

- **dans les hydromels** (boisson de miel pétillante sans adjonction de CO_2). L'addition de phosphate bicalcique permet d'avoir une fermentation régulière (loi du 1er août 1985).

- **en diététique** :

. comme agents anti-agglomérants : phosphates mono, di et tricalcique (doses maximales : 2%).

. substances d'apport minéral : phosphates neutres de calcium et glycérophosphate de calcium (article 4, alinéa 2.1.3.A du 4 août 1986 modifié par l'article du 14 décembre 1988).

- **en alimentation animale** :

. comme agent liant, anti-mottant, anti-coagulant (doses maximales : 30 000 ppm).

. comme régulateur d'acidité.

. en correction minérale des rations animales.

I.3. Objectif de l'étude :

L'objectif à atteindre est la mise au point d'un procédé d'extraction-purification, extrapolable à l'échelle industrielle, de phosphate de calcium à partir de lactosérum acide de fromagerie.

Ce projet trouve son origine par les relations très anciennes entre le Laboratoire des Biosciences de l'Aliment (Nancy, France) et la société Lacto Sérum France (Verdun, France). La collaboration entre ces deux partenaires, à travers 9 programmes, a conduit à mieux maîtriser la qualité de la fraction minéralo-protéique du lactosérum, principal co-produit de la filière laitière. Lacto Sérum France produit 70 à 75 000 tonnes de poudre de lactosérum par an. Ce co-produit contient en moyenne 10 $g.l^{-1}$ de matières minérales dont environ 2,5 $g.l^{-1}$ de phosphore et de calcium. Or, ces minéraux "encrassent" les concentrateurs alors qu'avec une méthode d'extraction performante et peu onéreuse, ils peuvent être utilisés entre autre par les entreprises de travaux publics. C'est ainsi que cette étude a été décidée suite à la demande d'une société, produisant du béton, de poudre de phosphate de calcium d'origine "biologique". En effet, la brushite, ajoutée au béton, diminue les temps de prise et en augmente l'effet. Le "cahier des charges", imposé par cette société, fixe une poudre à 70% de pureté en phosphate de calcium et moins de 8% de matières organiques.

En raison de sa forte minéralisation par rapport aux lactosérums doux (Adrian et Bourlier, 1980), le lactosérum acide s'impose.

Ainsi, dans un premier temps, il s'agit de définir les valeurs optimales de pH et de température favorisant la co-précipitation du phosphate et du calcium, tout en limitant les pertes en protéines et l'augmentation du taux de cendres dans le lactosérum ainsi clarifié. Le phosphate de calcium doit par conséquent se retouver sous forme insoluble dans une phase plus dense que le sérum lui-même, donc facilement récupérable par simple décantation.

Puis, une étape de microfiltration tangentielle de la fraction ainsi précipitée, sur membrane minérale 0,2µm (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France), est envisagée afin d'accroître la pureté en phosphate de calcium.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Méthodes analytiques courantes :

II.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche :

- Prise d'échantillon de 5 ml pesés dans une coupelle contenant du sable de Fontainebleau.
- Etuvage 7 heures à 103°C ± 2°C dans une étuve ventilée.
- Refroidissement 30 minutes dans un dessiccateur.
- Pesée du résidu sec obtenu.

Précision de la méthode : ± 1%.

II.1.2. Détermination de la limpidité des lactosérums :

- Appréciation de la limpidité des lactosérums par mesure de la Densité Optique (DO) dans une plage du spectre visible entre 550 et 800 nm.
- Choix de la longueur d'onde d'émission à 600 nm (Fauquant *et al.*, 1985a et b).

II.1.3. Détermination de la fraction protéique :

II.1.3.1. Détermination de la Matière Azotée Totale (MAT) :

Utilisation de la méthode de Kjeldhal.
- Minéralisation pendant 2 heures 30 minutes dans un matras de 600 ml.
- Distillation et titration directe dans un matras avec un appareil automatisé Vapodest Gerhardt.

Précision de la méthode : ± 1%.

II.1.3.2. Dosage des protéines lactosériques majeures :

Les teneurs en α-lactalbumine et en β-lactoglobuline sont déterminées par HPLC (chaîne HPLC Merck 6200 L) avec une colonne C4 Delta Pak (150 cm x 3,9 mm, 5 µm) (précision de la méthode : 3%). L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées à l'aide du logiciel Millennium 2010 (Millipore, Waters, Milford, MA, USA). L'élution des protéines est réalisée en gradient d'acétonitrile 0-80% et en présence de 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique. Le débit est de 0,7 $ml.min^{-1}$ et la détection des protéines est réalisée à 280 nm.

II.1.4. Détermination du lactose :

Le dosage du lactose est effectué par électrophorèse capillaire (unité d'électrophorèse capillaire Quanta 4000, Waters, Milford, MA, USA). Le capillaire utilisé est en silice fondue, d'un diamètre interne de 50 µm et de 90 cm de longueur.

La méthode utilisée est adaptée de Vorndran *et al.* (1992), qui ont dosé différents types de glucides dans les jus d'orange. L'électrolyte est composé d'acide sorbique 7 mM, dont le pH est ajusté à 12,0 à l'aide de NaOH 0,5 N. L'injection est réalisée en mode hydrostatique durant 20 secondes (volume injecté de 10 nl), et la détection se fait à 254 nm.

II.2. Méthodes d'analyse de la fraction minérale :

II.2.1. Détermination du taux de cendres :

Selon la méthode de référence AOAC (1945, Standard 559) :

- Prise d'échantillon (2 ml pesés).
- Calcination au four à 550°C pendant 8 heures.
- Refroidissement 30 minutes au dessiccateur.
- Pesée du résidu obtenu.

Précision de la méthode : ± 1%.

II.2.2. Dosage des minéraux :

Le dosage des cations et anions s'effectue par électrophorèse capillaire. L'électrophorèse capillaire est le modèle Quanta 4000 (Waters, Milford, MA, USA). Le capillaire utilisé est en silice fondue, d'un diamètre interne de 75 µm et de 100 cm de longueur. L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées à l'aide du logiciel Maxima 820 (Waters, Milford, MA, USA).

II.2.2.1. Dosage des cations :

La détermination des cations (K^+, Ca^{2+}, Na^+, Mg^{2+}) a été optimisée par Saulnier *et al.* (1992) puis par Schmitt *et al.* (1993). Les coefficients de variation sont compris entre 0,7 et 2,8%. L'électrolyte est composé de Tropolone (-2, 4, 6-Cycloheptatriènenone), de 18-Crown-6 (1, 4, 7, 10, 13, 16 Hexa Oxacyclo-Octadécane) (Sigma, Saint-Louis, USA) et de UV CAT 2 (Waters, Milford, MA, USA). L'injection est réalisée en mode électrostatique durant 30 secondes (volume injecté de 10 nl). La détection se fait à 185 nm.

II.2.2.2. Dosage des anions et des acides organiques :

La détermination des anions (Cl^-, SO_4^{2-}, phosphate minéral) et acides organiques (acétate et lactate) a été optimisée par Jandik *et al.* (1992), Saulnier *et al.* (1992) puis par Louaileche *et al.* (1993). Les coefficients de variation sont compris entre 0,5 et 4%. L'électrolyte est composé de chromate de sodium tétrahydraté (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) et d'OFM Anion BT ^{TM} (Waters, Milford, MA, USA). Le mode d'injection est le même que celui des cations mais la détection est réalisée à 254 nm.

Il est à noter que l'électrophorèse capillaire permet de doser les phosphates inorganiques alors que les autres techniques classiques ne différencient pas le phosphate minéral du phosphate organique. Un facteur correctif de 1,25 est utilisé pour tenir compte de l'ensemble du phosphate.

II.2.3. Méthodes de détermination de la nature des structures cristallines :

II.2.3.1. Diffraction des rayons X :

II.2.3.1.1. Principe :

Les rayons X sont diffusés sans perte d'énergie par les particules chargées électriquement de la matière, et principalement par les électrons. De ce fait, les solides peuvent être considérés comme la seule répartition de densités électroniques. Si les objets diffusants sont disposés de façon périodique, ce qui est le cas des nuages électroniques dans les espèces cristallines, la quantité de rayonnement diffusé n'est grande que dans certaines directions pour lesquelles les rayonnements diffusés sont en phase. Ce type particulier de diffusion est appelé diffraction. L'observation d'un rayonnement diffracté est donc soumise à des conditions qui peuvent s'exprimer de différentes façons, parmi lesquelles la loi de Bragg : $2d.\sin\theta = K.\lambda$. Elle permet de déterminer, pour un rayonnement d'incidence θ et de longueur d'onde λ, la distance "d" entre des plans diffractants. Dans la formule, le nombre "K" est appelé "ordre de diffraction". Dans la pratique, les grandeurs d/K sont déterminées à partir d'un enregistrement donnant les quantités de rayonnement diffracté en fonction de l'angle d'incidence.

II.2.3.1.2. Mode opératoire :

Les diagrammes de diffraction sont réalisés selon la méthode Seeman-Bohlin sous la radiation Kα du cobalt. Du silicium est mélangé en quantité convenable à chaque poudre lyophilisée, ses raies servant d'étalon. Les spectres de diffraction des rayons X sont réalisés pour des angles d'incidence θ de 0 à 35°. La longueur d'onde du rayonnement incident (raie Kα du cobalt) est de 1,78892 Å. Afin d'obtenir une bonne précision sur les valeurs mesurées des distances réticulaires, les diagrammes sont lus sur lecteur de film "Line Scanner LS-20" (Kej Instruments, Tâby, Suède).

II.2.3.2. Microscopie électronique à balayage (M.E.B.) :

II.2.3.2.1. Principe :

Dans le microscope à balayage, un faisceau primaire d'électrons, d'une extrême finesse, explore toute la surface de l'objet. Chaque point de l'objet ainsi "illuminé" émet des électrons qui,

après passage à travers un multiplicateur, un scintillateur et un amplificateur, modulent le faisceau cathodique d'un récepteur de télévision.

Le microscope électronique à balayage se prête, en dehors de la simple vision, à d'intéressantes applications dans le domaine de l'analyse chimique d'échantillons microscopiques. Car le bombardement électronique d'un point de l'échantillon induit un rayonnement X aux raies caractéristiques des éléments chimiques qu'il contient.

II.2.3.2.2. Préparation des échantillons :

L'examen au M.E.B. nécessite une préparation préalable des poudres qui sont électriquement isolantes. Elle consiste à déposer sur leur surface une couche de carbone par évoparation sous vide de 10^{-6} atm. Ce carbone conducteur "écoule" les électrons du faisceau, ce qui évite des effets de charge qui défocaliseraient le faisceau et modifieraient l'énergie d'excitation reçue par l'échantillon.

II.3. Origine et composition du lactosérum utilisé :

Le lactosérum utilisé est un lactosérum acide de fin d'égouttage à 6% d'extrait sec (Besnier, Rosnes, France), provenant d'une fabrication fromagère de type pâte molle.

Après collecte des tables d'égouttage, le lactosérum est refroidi à 2-4°C et additionné d'azide de sodium (à raison de 0,2 $g.l^{-1}$) pour prévenir de toute prolifération bactérienne. Son pH est de $5,07 \pm 0,11$. Le tableau XII donne sa composition moyenne.

L'étude de la composition de ce lactosérum montre d'importants coefficients de variation concernant entre autre la fraction minérale (lactate et phosphate notamment). Les causes de la variation de la composition minérale sont en premier lieu à rattacher aux variations qualitatives des laits -sous les effets combinés de l'alimentation, des facteurs climatiques et du stade de lactation- et en second lieu, aux technologies fromagères diversifiées (Roeper, 1971 ; Matthews, 1978 ; Huffman, 1988 ; Saulnier *et al.*, 1995). Notons enfin qu'en fonction du volume demandé, le lactosérum utilisé pouvait être un "mélange" de milieu et de fin d'égouttage, accentuant ainsi la variabilité de la matière première.

Tableau XII,Composition moyenne du lactosérum utilisé (en g pour 100 g d'extrait sec).

	Moyenne*	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
pH	5,07	0,11	2,16
Extrait sec ($g.kg^{-1}$)	67,30	3,00	4,45
M.A.T(1)	17,33	0,93	5,36
Cendres	17,00	1,46	8,58
Potassium	2,77	0,25	9,02
Calcium	4,70	0,38	8,08
Sodium	1,05	0,10	9,52
Magnésium	0,14	0,01	7,14
Chlorure	1,82	0,17	9,34
Sulfate	0,15	0,01	6,66
Phosphate	3,43	0,38	11,07
Lactate	16,18	1,83	11,31

* : *moyenne de quinze analyses.*
(1) : *Matières azotées totales.*

II.4. Traitement du lactosérum :

Il s'agit d'abord de définir les valeurs optimales de pH et de température favorisant la co-précipitation du phosphate et du calcium, tout en limitant les pertes en protéines et l'augmentation du taux de cendres dans le lactosérum ainsi clarifié, c'est-à-dire dans le surnageant de décantation statique (figure 10).

L'étude porte sur cinq valeurs de pH (6,0 - 6,2 - 6,4 - 6,6 - 6,8) et trois températures (50, 55 et 60°C). Cette étude est réalisée à l'échelle laboratoire. 500 ml de lactosérum acide de fin d'égouttage sont refroidis à 2°C, additionnés d'azide de sodium (à raison de 0,2 $g.l^{-1}$) et ajustés au pH choisi à cette température à l'aide de NaOH 5N (figure 10). L'échantillon est alors chauffé sur agitateur chauffant. Dès que la température souhaitée est atteinte, le lactosérum ainsi traité est versé dans une éprouvette graduée et placé au froid à 4°C. La décantation dure une journée ; après cette période, le volume de décantat obtenu est relevé. Le décantat statique est alors soumis à trois centrifugations successives (2000 g, pendant 15 minutes) entre lesquelles le culot est lavé à l'eau ultrapure, afin d'éliminer les protéines et les phospholipides se retrouvant dans le décantat. Le dernier culot de centrifugation est alors resolubilisé puis lyophilisé (figure 10). La composition du surnageant et du lyophilisat est alors analysée. Cinq essais ont été réalisés pour un couple de température et de pH donné.

Une fois les valeurs de pH et de température définies, nous sommes passés à l'échelle "pilote" afin d'échantillonner la société de travaux publics en poudre de phosphate de calcium (figure 11). Partant d'un volume de 1000 litres de lactosérum acide à 6% d'extrait sec, la précipitation à pH 6,2 et à 50°C induit la décantation de deux phases. Outre le surnageant, se forme un dépôt minéral blanchâtre et plombant (le décantat), au-dessus duquel apparaît une couche plus gélatineuse et jaunâtre. Le surnageant et cette couche gélatineuse sont soutirés. Le décantat est lavé plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Le décantat "lavé" additionné d'eau déminéralisée (ou décantat minéral) est alors microfiltré sur membrane minérale CFCC 0,2µm (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France). Le rétentat se sépare en deux phases au bout de quelques heures, dont un dépôt très dense et de couleur grisâtre. Le dépôt du rétentat de microfiltration et le décantat "lavé" sont alors lyophilisés puis soumis aux analyses.

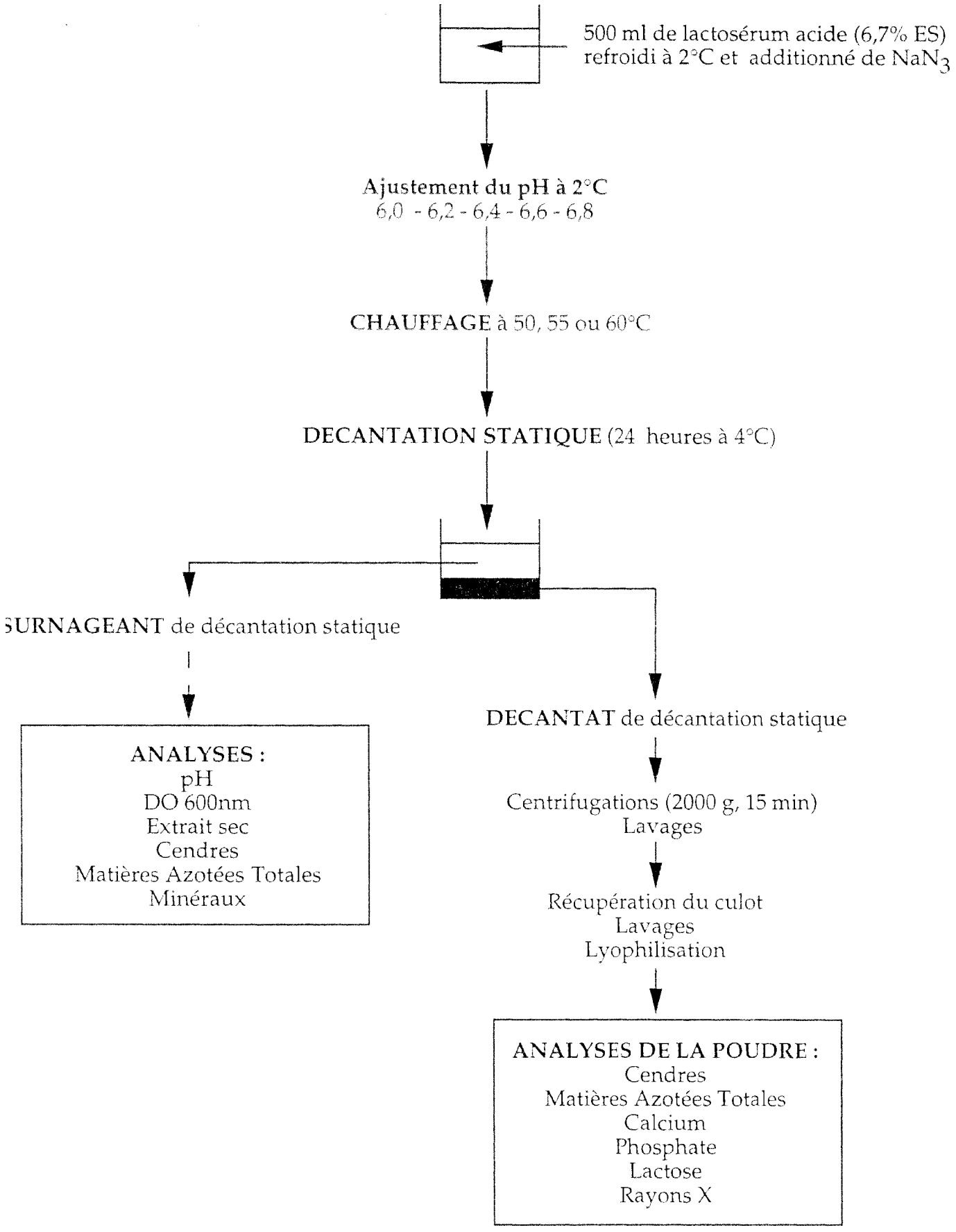


Figure 10 : Protocole de traitement du lactosérum acide pour l'étude de l'influence du pH et de la température sur la co-précipitation de phosphate et de calcium.

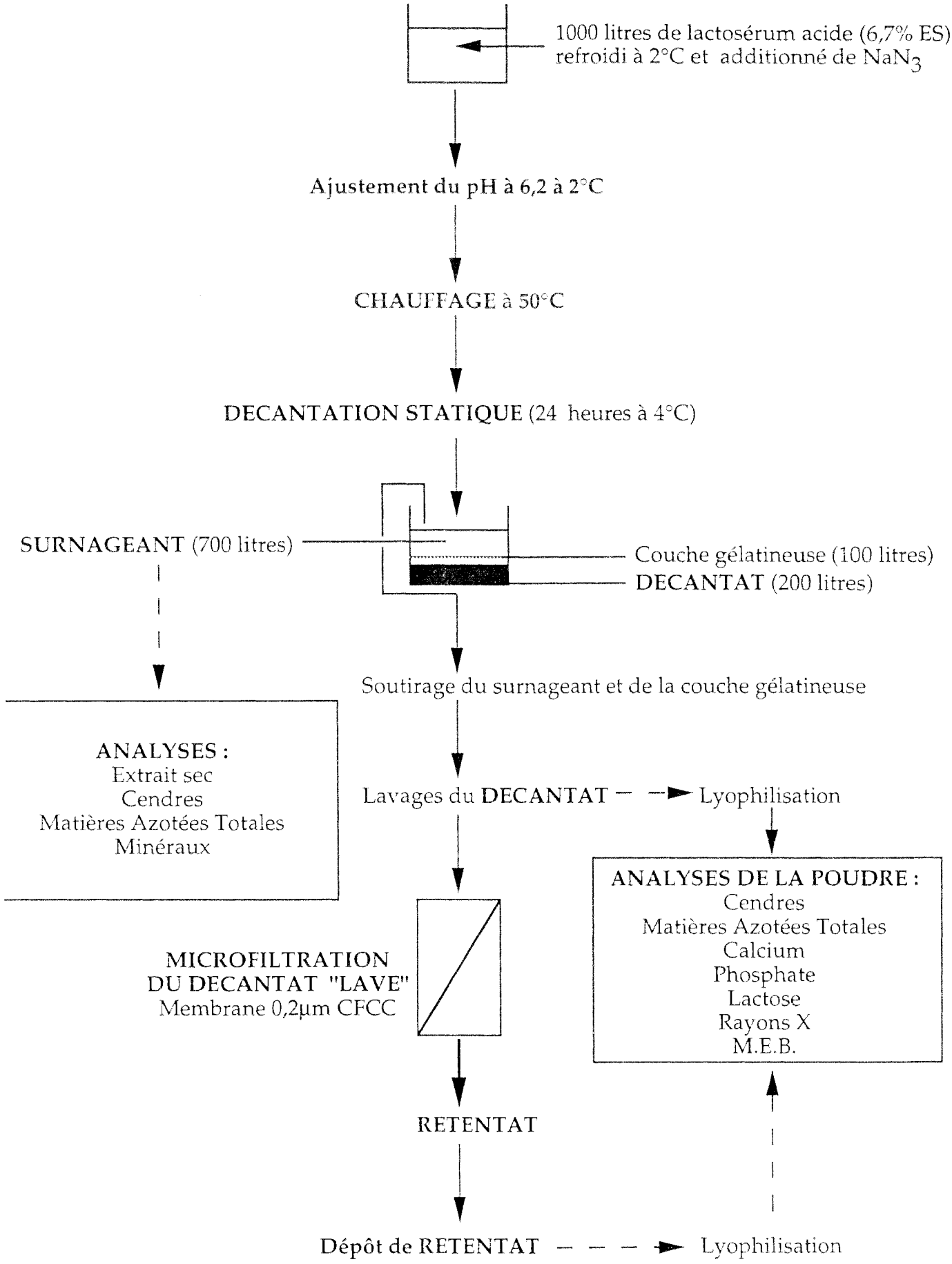


Figure 11 : Protocole de traitement du lactosérum acide pour l'extraction-purification à l'échelle "pilote" de monohydrogénophosphate de calcium.

II.5. Microfiltration tangentielle du décantat minéral :

II.5.1. Description de la boucle de MF tangentielle :

La boucle de MF utilisée est l'unité pilote KARIN 2 (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France). Ce pilote est utilisé en boucle semi-fermée, avec recyclage du rétentat dans le réservoir d'alimentation.

II.5.1.1. Description des équipements :

Le pilote est assemblé dans un rack (L : 1080 mm ; l : 450 mm ; H : 600 mm). Sur ce rack, on trouve (figure 12) :

- une pompe d'alimentation et de circulation (P 001) (Jabsco Pumps ITT, Hoddesdon, Angleterre). Il s'agit d'une pompe à lobes (débit : 3 $m^3.h^{-1}$ à 5 bar).

- un réservoir antipulsatoire (T 001) (volume : 270 cm^3). Ce réservoir est nécessaire pour assurer un flux régulier et protéger la pompe des prises d'air.

- un système de décolmatage (T 002). Le décolmatage est assuré de façon automatique par retour de perméat sous pression. La pression maximale d'air comprimé pour le décolmatage est de 6 bar.

- un module de MF à 7 tubes (M 001), chaque tube faisant 120 cm de longueur et 6 mm de diamètre interne, soit une surface membranaire totale de 0,158 m^2.

- 3 manomètres de contrôle de pression (Bourdon, Montreuil, France) (précision : ± 1%) :

  . pression entrée module (PI 001) ;

  . pression sortie module (PI 002) ;

  . pression côté perméat (PI 003).

La pression transmembranaire (PT) est donnée par la formule (en bar) :

$$PT = \left(\frac{P1 \text{ (lue sur PI 001)} + P2 \text{ (lue sur PI 002)}}{2} \right) - P3 \text{ (lue sur PI 003)}$$

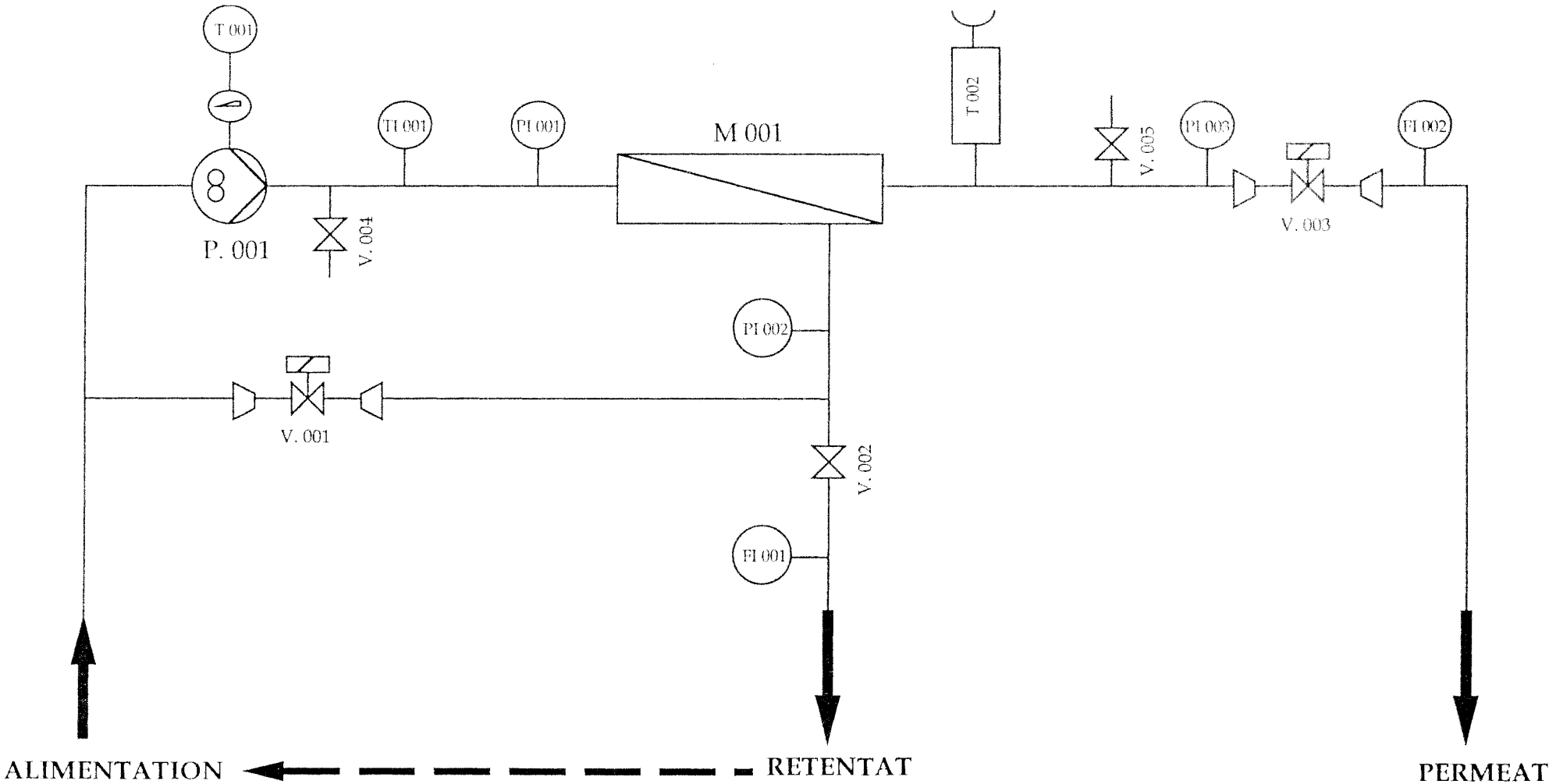


Figure12: Schéma de procédé de la boucle de MFT "KARIN 2".

P. 001 : Pompe d'alimentation et de circulation.
T 001 : Réservoir antipulsatoire.
T 002 : Système de décolmatage.
M 001 : Module de MFT à 7 tubes.
PI 001, PI 002, PI 003 : Manomètres de contrôle.
TI 001 : Indicateur de température.
FI 001 : Rotamètre de débit de rétentat.
FI 002 : Rotamètre de débit de perméat.
V. 001 à V. 005 : Vannes.

P3 est en général égal à 0.

- un indicateur de température du fluide en circulation (TI 001) (de 0 à 120°C).

- un rotamètre indiquant le débit de rétentat dans la boucle (FI 001) (gradué de 0,4 à 4 $m^3.h^{-1}$). La lecture du débit de rétentat permet d'accéder à la vitesse d'écoulement à la sortie des tubes à l'aide de la formule :

$$VT\ (m/s) = \frac{\text{Débit lu au rotamètre FI 001 } (m^3/h)}{3600 \times \text{section de passage des tubes } (m^2)}$$

Pour le module 7 tubes de la boucle KARIN 2, on a :

$$VT\ (m.s^{-1}) = \text{Débit lu au rotamètre FI 001 } (m^3.h^{-1}) \times 1,4.$$

- un rotamètre indiquant le débit de perméat (FI 002) (gradué de 15 à 60 $l.h^{-1}$).
- un jeu de vannes :
  - . 2 vannes pneumatiques V 001 et V 003, commandées électriquement ;
  - . 1 vanne manuelle V 002 permettant de régler la pression dans la boucle ;
  - . 2 vannes manuelles V 004 et V 005 de purge.

II.5.1.2. Avantages du pilote KARIN 2 :

Le pilote KARIN 2 présente les avantages suivants :

- facilité de mise en oeuvre ;
- portabilité ;
- robustesse et simplicité ;
- utilisation d'un module de filtration de configuration industrielle (et non à tube unique).

II.5.2. Nature des membranes utilisées :

Les membranes utilisées sont des membranes minérales CFCC, de taille de pores 0,2 µm, en composite carbone-fibres de carbone (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France). Le

support de ces membranes de microfiltration est en fibres de carbone polycristallin sur lequel est déposée une fine couche de carbone amorphe microporeux.

Cette homogénéité carbone-carbone confère à ces membranes les avantages suivants :

- résistance chimique et résistance à la corrosion dues à l'inertie chimique du carbone, qui permet l'utilisation des membranes dans des conditions extrêmes de pH (de 0 à 14) et de milieu.

- résistance mécanique exceptionnelle des fibres de carbone autorisant la filtration à une pression transmembranaire élevée (limite supérieure de pression : 10 bar).

- résistance à la température (120°C en qualité alimentaire et 165°C en qualité chimique).

La configuration de la membrane (asymétrique, mince, grande porosité, faible dispersion du spectre de pore) permet d'obtenir des flux élevés tout en conservant une bonne sélectivité.

II.5.3. Conditions opératoires :

Tous les essais sont conduits à la température de 50°C (± 2°C), afin de minimiser le développement bactérien.

Le volume mis en oeuvre est de 50 litres (25 litres de décantat "lavé" + 25 litres d'eau déminéralisée). Le bac de lancement utilisé est un tank à lait de 200 litres. La température est maintenue à 50°C à l'aide d'une thermorésistance. La microfiltration est poussée jusqu'à un facteur de concentration volumique (FCV = V_i/V_r) de 5,5.

La pression transmembranaire appliquée est de 1,25 bar (1,5 bar entrée module et 1,0 bar sortie module).

La vitesse d'écoulement tangentielle est fixée à 5 $m.s^{-1}$ (soit un débit de rétentat de 3,6 $m^3.h^{-1}$). La vitesse d'écoulement est en effet choisie suffisament grande pour obtenir des forces de cisaillement empêchant ou contrôlant le dépôt des particules au niveau du support.

II.5.4. Procédure de nettoyage des membranes :

Après chaque essai de microfiltration, les membranes colmatées sont nettoyées selon la procédure suivante :

- rinçage à l'eau distillée pendant 15 minutes ;

- lavage basique (NaOH 1% (v/v) avec 150 ppm de NaOCl) pendant 30 minutes à 75°C et 2 bar, sans recyclage du rétentat ;

- rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité ;

- lavage acide (HNO_3 2% (v/v)) pendant 30 minutes à 50°C et 2 bar, sans recyclage du rétentat ;

- rinçage à l'eau distillée jusqu'à neutralité.

Les débits à l'eau (J_W), mesurés à 50°C, 5 $m.s^{-1}$, et à 2 bar, permettent de vérifier l'efficacité du nettoyage et sont un indice de la "propreté" des membranes.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Influence du pH et de la température sur la co-précipitation de phosphate et de calcium :

III.1.1. Rappel du "cahier des charges" :

Il s'agit de définir les valeurs optimales de pH et de température afin de :

- favoriser la co-précipitation du phosphate et du calcium. La poudre de phosphate de calcium ainsi obtenue devra atteindre un indice de pureté au minimum de 70%, avec des traces de lactose et autres matières organiques (< à 8%).

- limiter les pertes en protéines dans le sérum clarifié.

- limiter l'augmentation du taux de cendres dans le sérum clarifié, de façon à se rapprocher de la composition d'un lactosérum doux (11%/ES en protéines au minimum, 9%/ES en cendres au maximum).

III.1.2. Choix des températures et des pH :

La cristallisation de phosphate de calcium a fait l'objet de nombreuses recherches. En effet, en industrie laitière, la précipitation de phosphate de calcium à partir de lait ou de lactosérum a été observée lors de procédés technologiques tels que la pasteurisation et la stérilisation. De tels dépôts ont lieu sur les plaques des échangeurs thermiques, ce qui conduit à une diminution du transfert de chaleur et une baisse d'efficacité (Burton, 1968). De même, de telles précipitations sont observées lors de l'ultrafiltration de lait ou de lactosérum à 50°C et à des valeurs de pH élevées (6,0 à 7,0) (Fauquant *et al.*, 1985a ; Daufin *et al.*, 1991) ; ces dépôts entraînent une diminution des flux de perméation, suite à un encrassement des pores.

Madsen et Thorvardarson (1984) ont étudié la précipitation de phosphate de calcium, à partir de solutions de nitrates de calcium et de phosphates d'ammonium, dans une large gamme de pH (3,5 à 6,5) et pour des températures allant de 40 à 60°C. Ces auteurs montrent que pour des pH supérieurs à 6,0, la forme majoritaire stable est le phosphate octacalcique

($Ca_4H(PO_4)_3$, $21/2H_2O$), dont le précurseur serait la brushite. L'obtention de brushite pure n'est observée que pour des températures supérieures ou égales à 50°C, et pour des valeurs de pH proches de 6,0 ou inférieures. Schmidt et Both (1987) montrent, à partir de solutions aqueuses à légère sursaturation, une précipitation de brushite à 50°C pour des pH allant de 6,5 à 6,8, brushite qui est alors convertie en phosphate octacalcique cristallisant sous forme de sphérulites. Cependant, à 50°C et pour des pH inférieurs à 6,1, une telle conversion de la brushite n'est pas observée. Ces données sont établies à partir de solutions aqueuses. Il est bien entendu que sur un liquide biologique complexe comme le lactosérum, quelques différences (concernant le couple pH-température notamment) peuvent être observées.

En effet, aux pH acides (à partir de 5,2), la solubilité des phosphates et du calcium dans le lactosérum est accentuée (Le Graet et Brulé, 1993). Par contre, à pH 7,0 et à 50°C, les phosphates de calcium ont tendance à précipiter (Merin et Cheryan, 1980) avec d'autres constituants. Cette propriété est mise à profit par Fauquant *et al.* (1985a) pour la thermoclarification des lactosérums acides de caséinerie. Ainsi, après ajustement du pH à 7,2 et chauffage à 45°C, les phosphates de calcium co-précipitent avec les phospholipoprotéines à l'état de sels de calcium.

Ces résultats nous ont donc contraints à chercher un compromis : éviter d'une part les pH acides, qui ne sont pas des conditions favorisant la précipitation des phosphates et du calcium du lactosérum, et d'autre part, éviter le pH 7,2, qui conduit à une co-précipitation importante phosphate de calcium-phospholipoprotéines. Par conséquent, diverses températures (50, 55 et 60°C) et différentes valeurs de pH (6,0 - 6,2 - 6,4 - 6,6 - 6,8) sont envisagées afin de définir les conditions optimales de co-précipitation de phosphate et de calcium, en adéquation avec le cahier des charges.

III.1.3. Résultats :

III.1.3.1. Influence du pH :

III.1.3.1.1. Volume de décantat obtenu :

Pour les trois températures étudiées, l'évolution du volume de décantat obtenu (en % du volume de lactosérum mis en oeuvre) en fonction du pH est présenté sur la figure 13 (moyenne des cinq essais réalisés pour une température et un pH donné). Les coefficients de variation sont

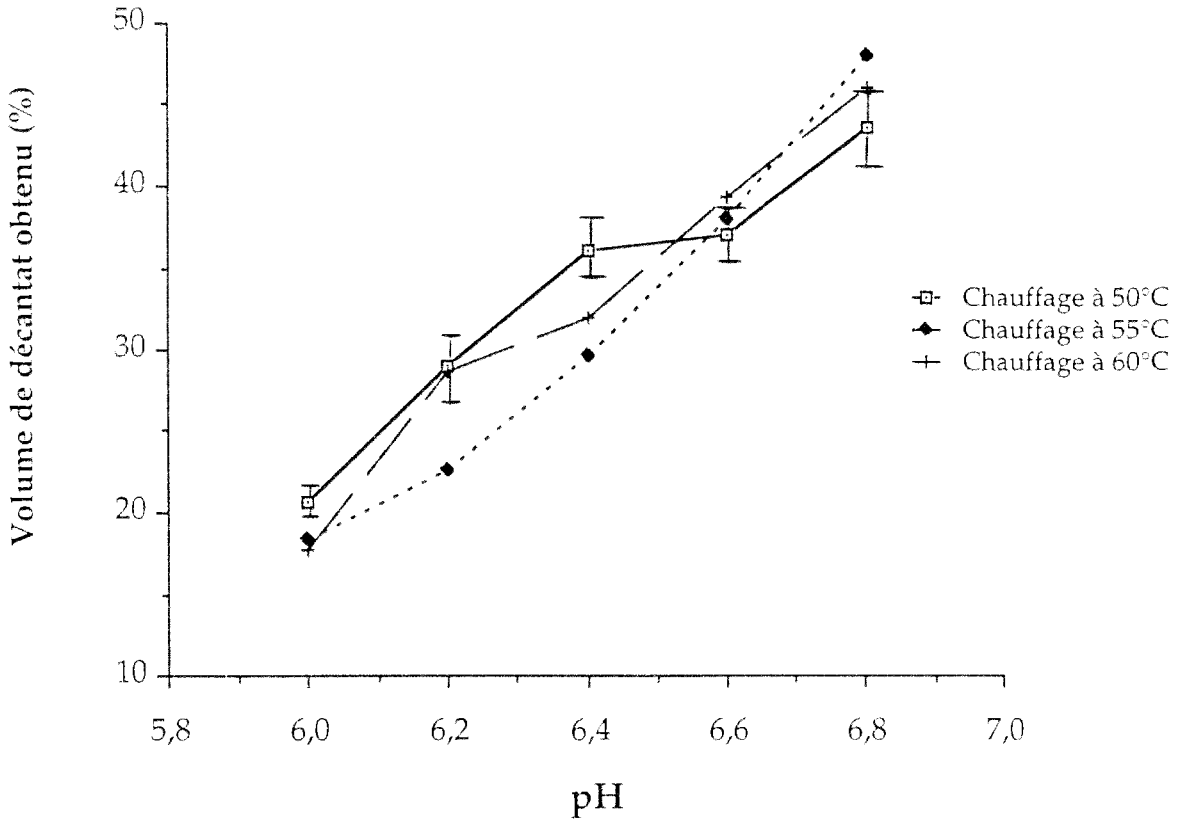


Figure 13: Volume de décantat obtenu (en % du volume de lactosérum mis en oeuvre) en fonction du pH et de la température.

compris entre 5,3 et 10%. Pour tous les essais réalisés, le volume de décantat augmente avec le pH. Il représente 18 à 30% du volume mis en oeuvre à des pH de 6,0-6,2 et est voisin de 40 à 50% pour des pH de 6,6-6,8.

Tous les surnageants de décantation statique sont limpides, de couleur jaune verdâtre, alors que les décantats présentent un aspect floconneux et sont de couleur blanchâtre.

III.1.3.1.2. Densité optique à 600nm :

Comprise entre 0,6 et 0,8 sur le lactosérum acide de départ, la DO chute à moins de 0,06 à toutes les valeurs de pH, ce qui traduit une clarification satisfaisante (figure 14). Les coefficients de variation pour toutes les séries d'essais sont compris entre 10 et 28%.

La DO chute d'autant plus que le pH de précipitation est élevé. Ces résultats confirment ceux de Fauquant *et al.* (1985a), qui montrent une meilleure clarification des lactosérums acides de caséinerie lorsque le pH passe de 6,0 à 7,0.

III.1.3.1.3. pH du surnageant après précipitation :

La figure 15 présente la diminution du pH des surnageants après précipitation à un pH donné. Chaque point est la résultante des cinq essais. Les coefficients de variation pour toutes les séries d'essais sont compris entre 0,6 et 5,2%.

Le pH du surnageant de décantation statique chute d'autant plus que le pH ayant servi à la précipitation est élevé. Ainsi, à 50°C, le pH du surnageant, après précipitation à pH 6,0, est de 5,50 soit une chute de pH de 0,5 unités, alors que pour le surnageant après précipitation à pH 6,8, une baisse de pH de 0,73 unités est observée. Ces résultats témoignent par conséquent d'une augmentation de la précipitation de phosphate de calcium, lorsque le pH passe de 6,0 à 6,8.

III.1.3.1.4. Extrait sec du surnageant de décantation :

La figure 16 présente la variation de l'extrait sec du surnageant (en %) en fonction du pH et pour les trois températures étudiées. Les coefficients de variation pour toutes les séries d'essais sont compris entre 0,3 et 1,6%.

L'augmentation de pH conduit à une baisse quasiment régulière de l'extrait sec du surnageant de décantation. Partant d'un lactosérum acide à 6,7% d'extrait sec, toutes les valeurs d'extrait sec des surnageants sont comprises entre 6,0 et 6,4%, soit une diminution de 5 à 10%.

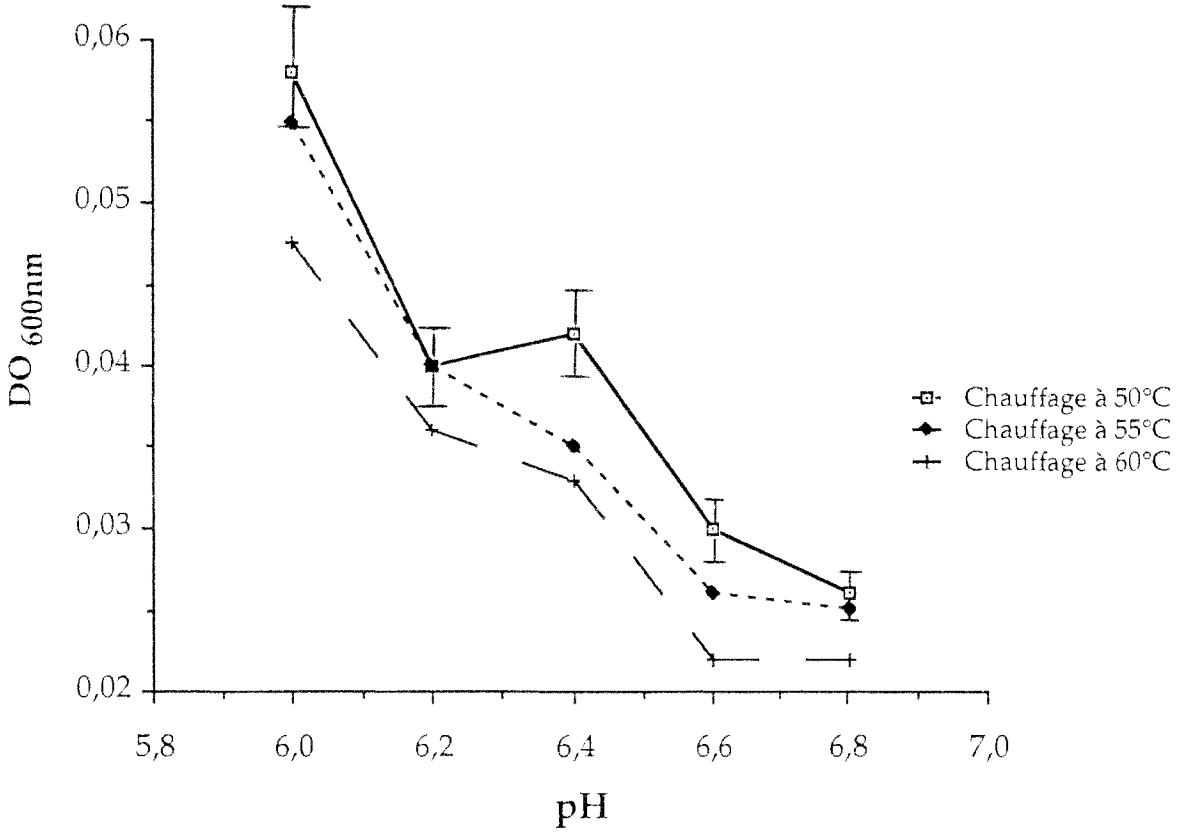


Figure14: Variation de la densité optique à 600nm du surnageant de décantation statique en fonction du pH et de la température.

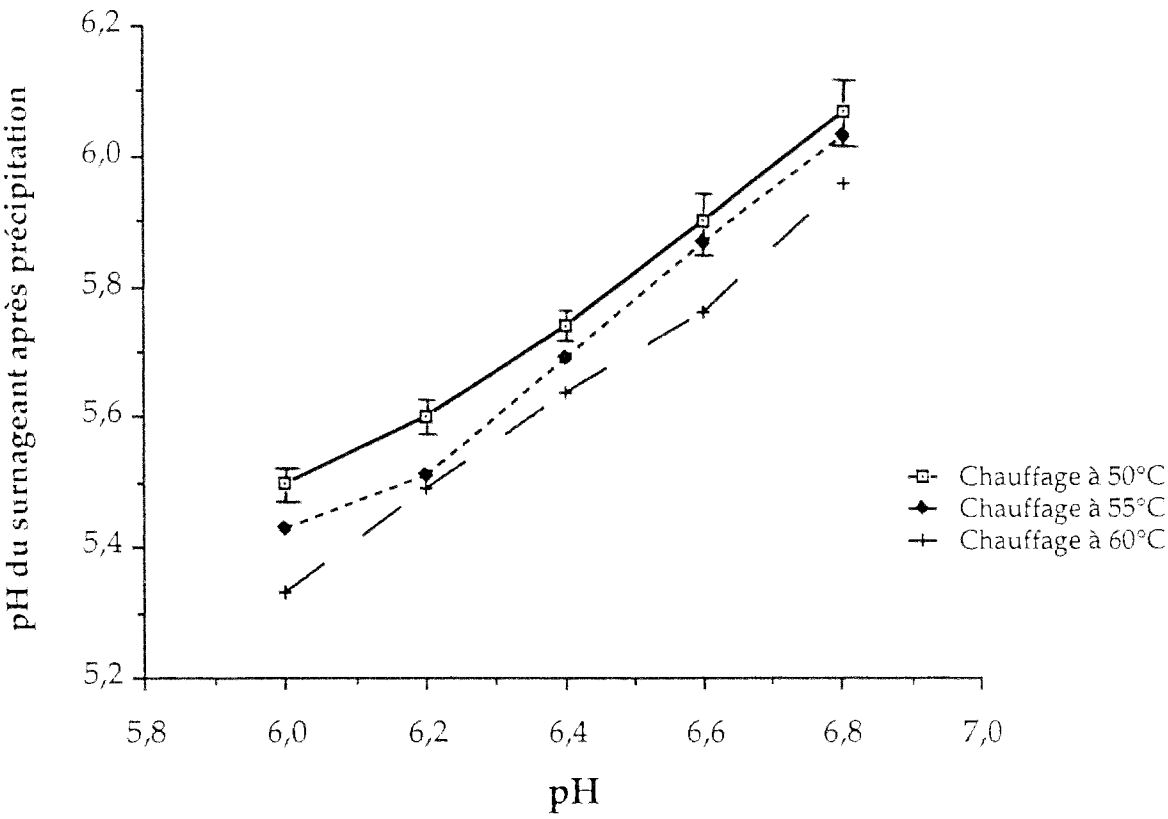


Figure 15 : Evolution du pH du surnageant mesuré après précipitation suivant le pH ajusté et la température.

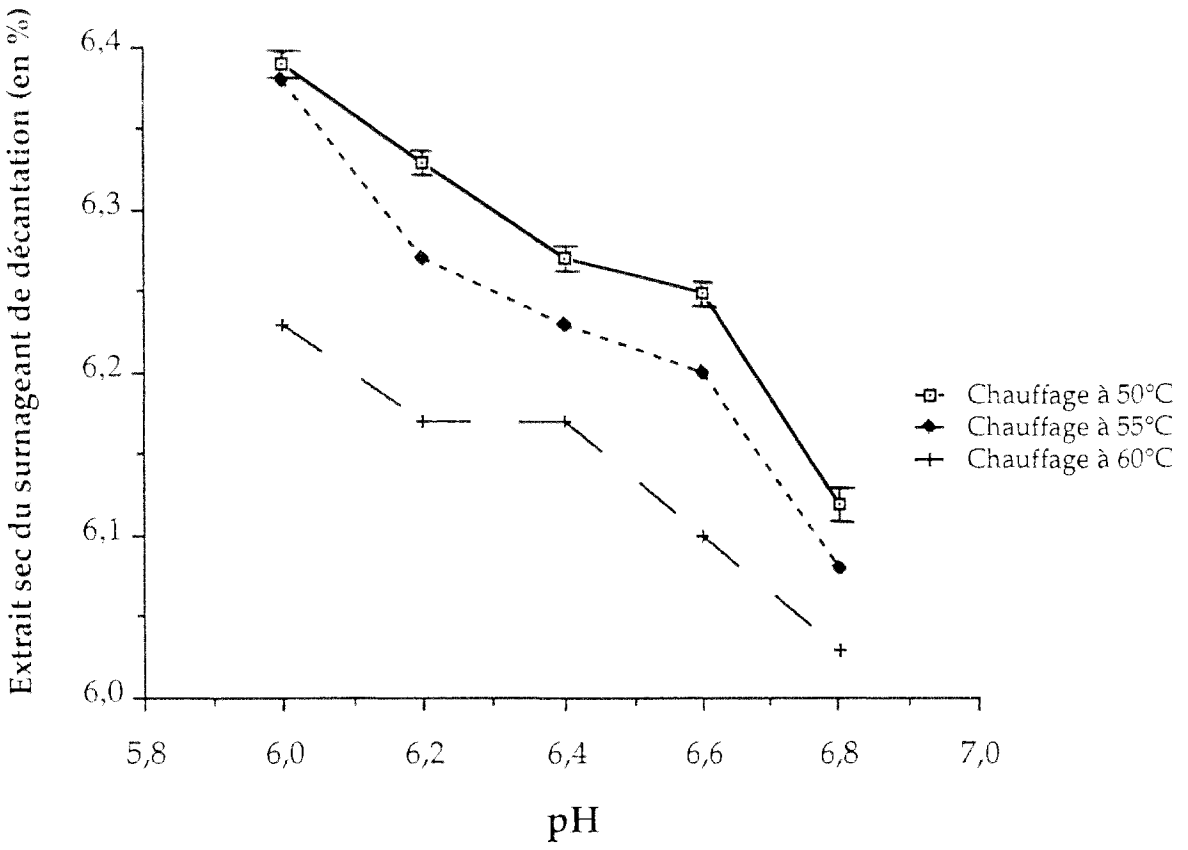


Figure 16 : Variation de l'extrait sec (en%) du surnageant de décantation statique en fonction du pH et de la température.

Fauquant *et al.* (1985a) observent également une baisse de l'extrait sec du sérum ainsi clarifié, de l'ordre de 4%.

III.1.3.1.5. Pourcentage de calcium précipité :

Pour apprécier l'influence du pH et de la température sur la précipitation de calcium, le pourcentage de calcium précipité est calculé de la façon suivante :

$$\%\ \text{de calcium précipité} = \left[1 - \frac{(Ca^{2+}/ES)_{\text{surnageant}}}{(Ca^{2+}/ES)_{\text{lactosérum de départ}}}\right] x100$$

avec ES : extrait sec.

La figure 17 présente le pourcentage de calcium précipité en fonction du pH pour les trois températures étudiées. Les coefficients de variation sont de l'ordre de 7 à 10%.

De façon globale, le pourcentage de calcium précipité augmente avec le pH. A pH 6,0, environ 40% du calcium sont précipités, alors qu'à pH 6,8, environ 70% du calcium précipitent. Ces résultats sont tout à fait similaires à ceux de Fauquant *et al.* (1985a), qui précipitent 80% du calcium d'un lactosérum acide de caséinerie, après avoir ajusté le pH à 7,2 à 2°C et réchauffé à 45°C.

III.1.3.1.6. Pourcentage de phosphate précipité :

Le pourcentage de phosphate précipité est calculé de la même façon que le calcium :

$$\%\ \text{de phosphate précipité} = \left[1 - \frac{(\text{Phosphate}/ES)_{\text{surnageant}}}{(\text{Phosphate}/ES)_{\text{lactosérum de départ}}}\right] x100$$

avec ES : extrait sec.

Sur la figure 18 est présentée l'évolution du pourcentage de phosphate précipité en fonction du pH de précipitation. Les coefficients de variation sur ce pourcentage sont compris entre 8 et 12%. Ces coefficients de variation élevés sont à corréler avec les forts coefficients de variation concernant la composition en phosphate du lactosérum de départ.

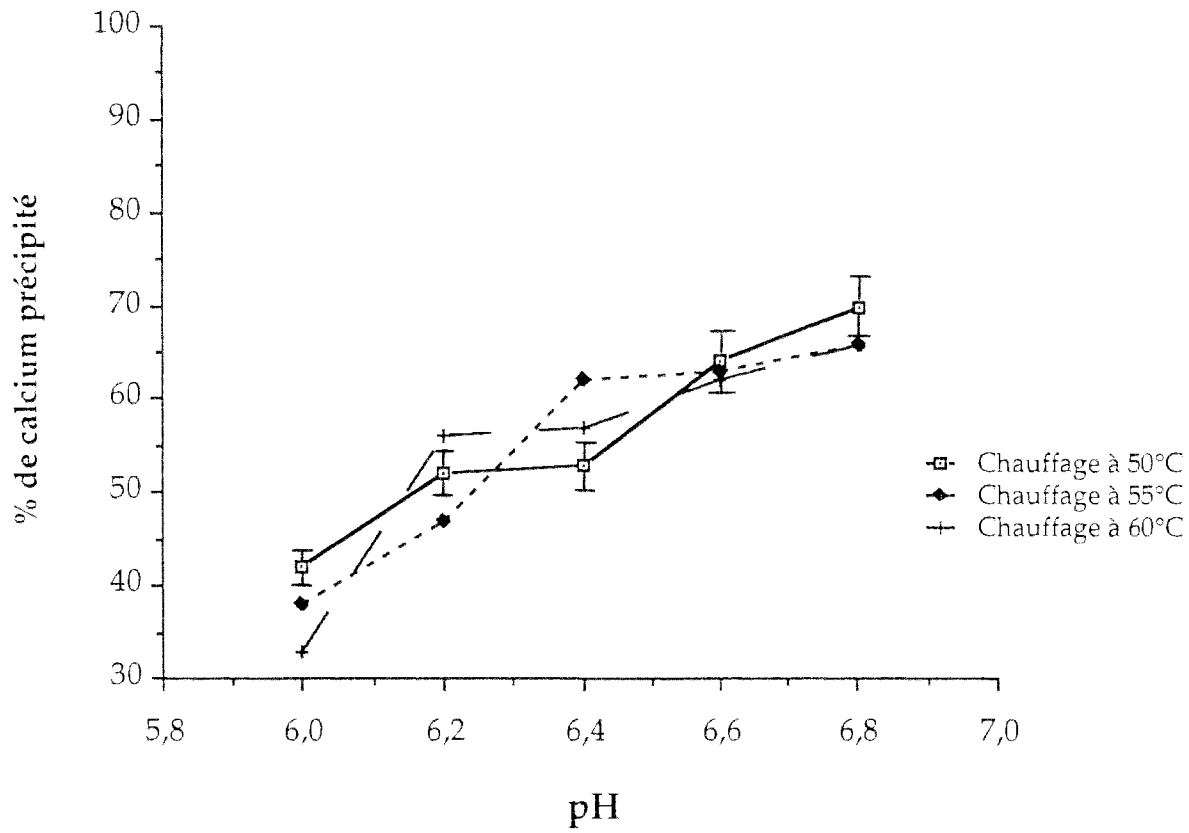


Figure 17 : Pourcentage de calcium précipité en fonction du pH et de la température.

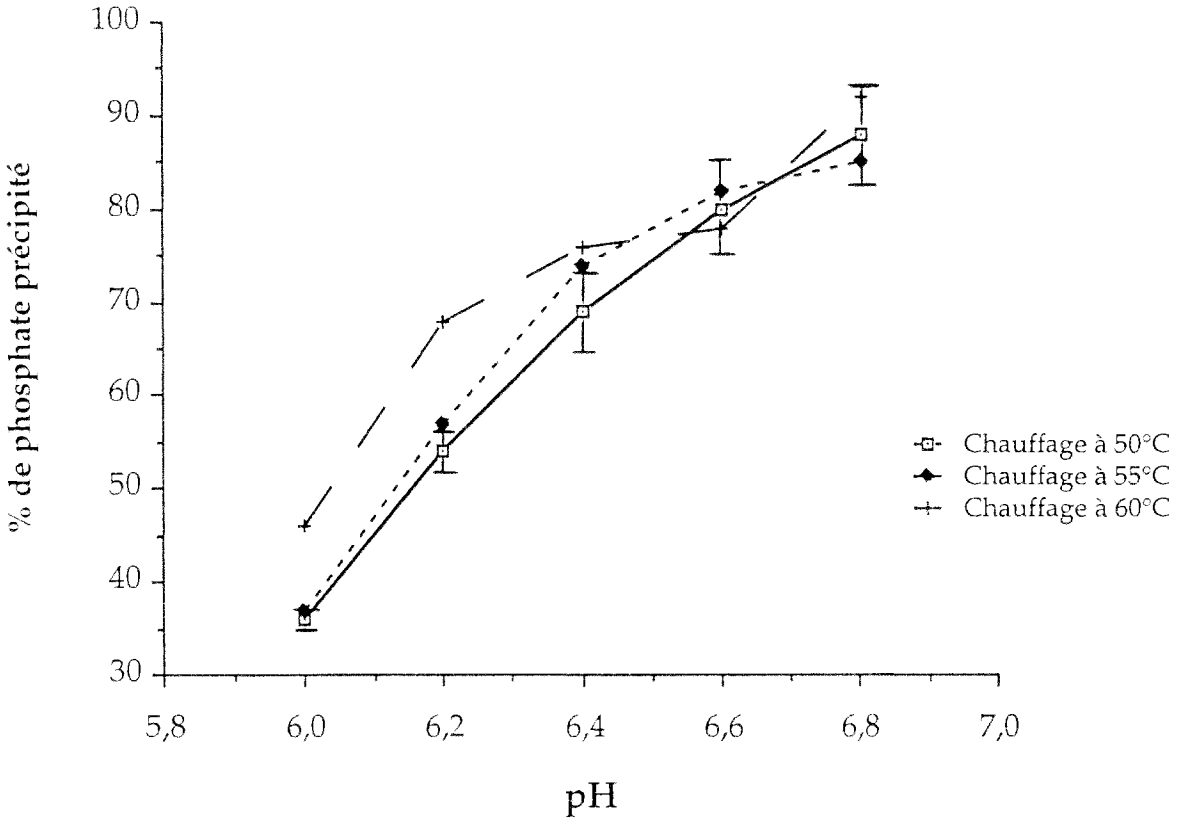


Figure 18 : Pourcentage de phosphate précipité en fonction du pH et de la température.

Pour les trois températures envisagées, l'augmentation du pH conduit à un meilleur rendement d'extraction du phosphate. Ainsi, à pH 6,0, 30 à 40% du phosphate est précipité contre 80 à 90% à pH 6,8. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux de Fauquant *et al.* (1985a).

III.1.3.1.7. Pourcentage de pertes en Matières Azotées Totales :

Rappelons qu'il nous faut optimiser le couple pH-température conduisant à un rendement acceptable d'extraction du calcium et du phosphate, mais qu'il nous faut également limiter les pertes en protéines (estimées en MAT) dans le sérum ainsi clarifié, pour une meilleure valorisation ultérieure de cette fraction. Les pertes en MAT sont calculées de la façon suivante :

$$\% \text{ de pertes en MAT} = \left[1 - \frac{(\text{MAT} / \text{ES})_{\text{surnageant}}}{(\text{MAT} / \text{ES})_{\text{lactosérum de départ}}} \right] x100$$

avec ES : extrait sec et MAT : Matières Azotées Totales.

Les coefficients de variation sur ce pourcentage pour tous les essais sont compris entre 5 et 8%.

Entre 9 et 14% selon la température à pH 6,0, les pertes en MAT augmentent avec le pH pour atteindre 14 à 19% à pH 6,6-6,8 (figure 19). Fauquant *et al.* (1985a) observent une perte en MAT de l'ordre de 10% lors de la clarification de lactosérum acide de caséinerie.

III.1.3.1.8. Augmentation du taux de cendres :

Conjointement à la limitation des pertes en MAT, l'augmentation du taux de cendres dans le surnageant doit être minimisée. En effet, une augmentation excessive du taux de cendres dans le surnageant pourrait constituer un frein pour le retraitement de cette phase. L'augmentation du taux de cendres dans la phase surnageante est estimée de la façon suivante :

Augmentation du taux de cendres (en%) =

$$\left[\frac{(\text{taux de cendres} / \text{ES})_{\text{surnageant}} - (\text{taux de cendres} / \text{ES})_{\text{lactosérum de départ}}}{(\text{taux de cendres} / \text{ES})_{\text{lactosérum de départ}}} \right] x100$$

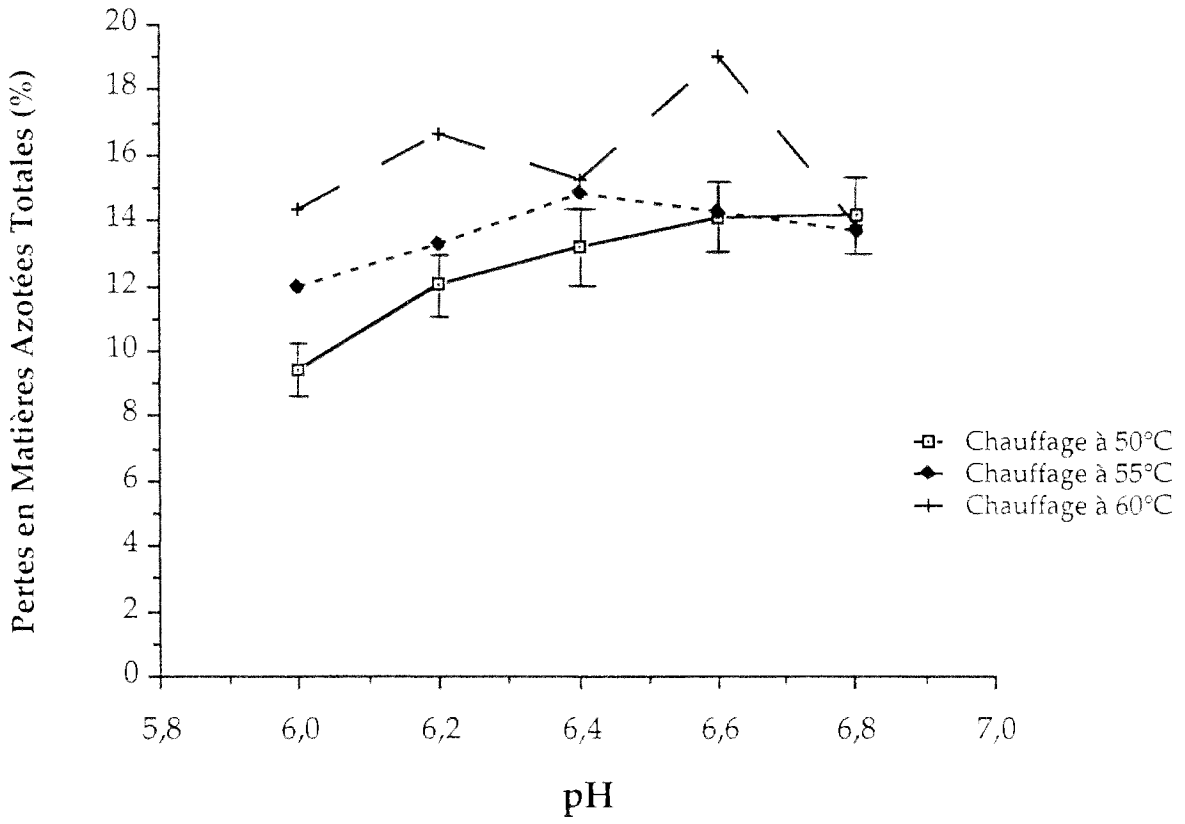


Figure 19 : Pertes en Matières Azotées Totales dans le surnageant (en %) en fonction du pH et de la température.

avec ES : extrait sec.

Les coefficients de variation sur ce pourcentage pour tous les essais réalisés sont compris entre 8 et 20%.

La figure 20 montre cette augmentation en fonction du pH et de la température. Aux pH 6,0 et 6,2, l'augmentation du taux de cendres reste faible (environ 5%), et acceptable à l'egard du cahier des charges. Par contre, à partir de pH 6,4, une forte élévation du taux de cendres dans la phase surnageante est observée (de 20 à 65%), et ce, pour toutes les températures envisagées.

III.1.3.1.9. **Conclusion** :

Dans l'objectif d'approcher la composition de la fraction surnageante de celle d'un lactosérum doux, un compromis doit être envisagé. Les rendements d'extraction du phosphate et du calcium doivent rester acceptables tout en limitant l'augmentation du taux de cendres et les pertes en protéines.

Bien qu'aux pH élevés (6,6 à 6,8), la précipitation du phosphate et du calcium soit maximale (respectivement 90 et 70% en moyenne), les pertes en protéines (pouvant atteindre 19%) et l'augmentation du taux de cendres (jusqu'à 65%) sont trop importantes pour pouvoir choisir ces valeurs de pH. A travers cette étude, il semblerait donc que le meilleur compromis se situe à des valeurs de pH proches de 6,2, valeurs pour lesquelles 50% du calcium et 60% du phosphate précipitent. Dans ces conditions, les pertes en MAT ne sont plus que de 10% environ et l'augmentation du taux de cendres réduite à 5%.

III.1.3.2. Influence de la température :

Trois températures de chauffage ont été étudiées : 50, 55 et 60°C. Il a été déjà signalé, en introduction, que les phosphates de calcium dans le lait sont plus solubles à froid qu'à chaud (Pouliot *et al.*, 1989a et b ; Le Graet et Brulé, 1993).

III.1.3.2.1. Volume de décantat obtenu :

La température ne semble pas influer sur le volume de décantat obtenu. En effet, pour un pH donné (figure 13), les volumes de décantat ne varient que de 10% en moyenne en fonction de la température.

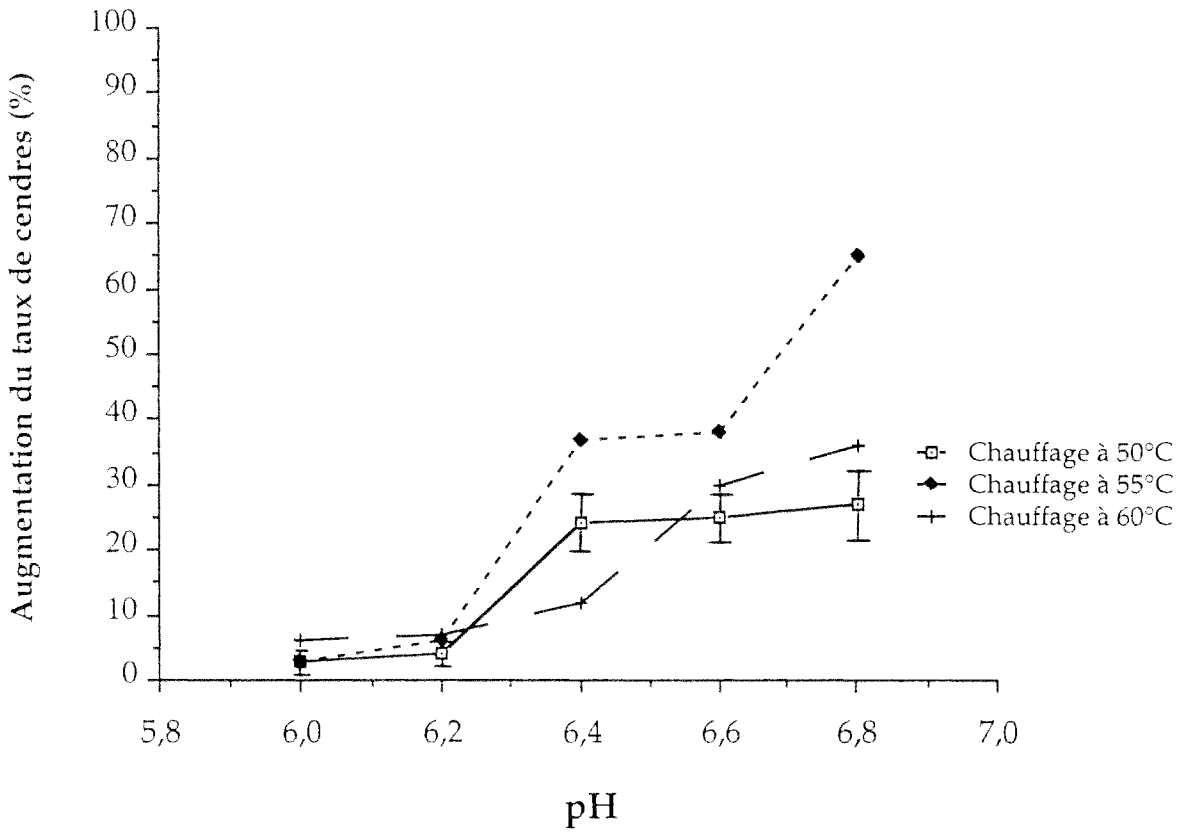


Figure 20 : Augmentation du taux de cendres dans le surnageant (en%) en fonction du pH et de la température.

III.1.3.2.2. Densité optique à 600nm :

La figure 14 montre qu'une augmentation de température conduit à une chute de la DO pour un pH donné. Cette baisse de DO peut atteindre jusqu'à 25% lorsque la température passe de 50 à 60°C à pH 6,6.

Une température plus élevée permet par conséquent une meilleure efficacité de la clarification. Ces résultats corroborent les travaux de Fauquant *et al.* (1985a), qui montrent en effet l'efficacité de l'augmentation de température sur la clarification pour des pH compris entre 6,0 et 7,0.

III.1.3.2.3. pH du surnageant après précipitation :

L'accroissement de la température conduit, pour un pH donné, à une augmentation (de l'ordre de 15%) de la différence entre le pH ayant servi à la précipitation et le pH du surnageant mesuré après précipitation (figure 15). Cette différence de pH, accentuée par la température, doit être le signe d'une précipitation légèrement plus importante de sels dans le décantat.

III.1.3.2.4. Extrait sec du surnageant de décantation :

Pour un pH donné, les extraits secs des surnageants sont toujours plus faibles à 60°C (figure 16). Par contre, 50 et 55°C n'engendrent que de faibles variations des extraits secs (environ 0,6%).

III.1.3.2.5. Pourcentage de calcium et de phosphate précipité :

A partir des pH 6,2-6,4, la température, dans la gamme choisie, influence peu la précipitation du calcium et du phosphate (figures 17 et 18). Ces résultats sont en accord avec ceux de Fauquant *et al.* (1985a), qui montrent que la quantité de phosphate de calcium précipité n'est pas significativement différente pour les trois températures que ces auteurs ont utilisées (40, 45 et 50°C).

III.1.3.2.6. Pourcentage de pertes en Matières Azotées Totales :

La figure 19 montre que, dans la zone de pH 6,0-6,2, le passage de 50 à 60°C augmente considérablement les pertes en MAT dans le surnageant. En effet, à pH 6,0, celles-ci passent de 9% à 50°C à 14% à 60°C, soit une augmentation de 55% du pourcentage de pertes en MAT. A

pH 6,2, une augmentation de 40% du pourcentage de pertes est observée quand la température passe de 50 à 60°C.

III.1.3.2.7. Augmentation du taux de cendres :

L'augmentation du taux de cendres est peu marquée par la température entre pH 6,0 et 6,2 (figure 20). Par contre, à partir de pH 6,4, de fortes dispersions des résultats apparaissent selon la température.

III.1.3.2.8. **Conclusion** :

A travers cette étude, il semblerait que la température de chauffage, dans la gamme choisie, n'influe que très peu sur la co-précipitation du phosphate et du calcium contrairement au pH. Ainsi, pour limiter les pertes en protéines dans le surnageant (trop importantes à 60°C) et parce que la précipitation du phosphate et du calcium n'est pas fondamentalement augmentée à 55 et 60°C, la température de chauffage à 50°C a été retenue.

Cette étude préliminaire a permis de définir les valeurs de pH et de température optimales de co-précipitation de phosphate et de calcium, en adéquation avec le cahier des charges (limiter les pertes en MAT et l'augmentation du taux de cendres). Ainsi, en fixant le pH de précipitation à une valeur proche de 6,2 et la température de chauffage à 50°C, environ 50% du calcium initial et 60% du phosphate initial précipitent, avec des pertes en MAT de l'ordre de 10% et une augmentation du taux de cendres réduite à 5% dans le surnageant. Tous ces pourcentages ont été calculés à partir du sérum clarifié et du sérum initial. En effet, sur le décantat se posent des problèmes d'homogénéisation de l'échantillon (étant donné son insolubilité et sa densité), multipliant ainsi les incertitudes au niveau des dosages.

III.1.4. Discussion :

III.1.4.1. Influence du pH :

L'influence du pH sur la co-précipitation de phosphate et de calcium a déjà été étudiée non seulement sur des solutions synthétiques (Neuman et Neuman, 1953 ; Boulet et Marier, 1961) mais aussi sur le lait, les lactosérums et les perméats de lactosérum (Fauquant *et al.*, 1985a et b ;

Schmidt et Both, 1987 ; Schmidt *et al.*, 1987 ; Pouliot *et al.*, 1991). Toutefois, la précipitation phosphocalcique n'a pas lieu spontanément dans le lait et les lactosérums. Elle doit être provoquée soit par un ajustement du pH, soit par un traitement thermique, soit des deux à la fois (Grindstaff, 1975 ; Lee et Merson, 1976 ; Brulé *et al.*, 1978 ; de Wit *et al.*, 1978 ; Holt, 1985 ; Fauquant *et al.*, 1985a et b). Boulet (1966) a suggéré que le lait contenait sans doute des inhibiteurs de la nucléation du phosphate de calcium. Des travaux plus récents (Schmidt et Both, 1987 ; Schmidt *et al.*, 1987) ont démontré l'effet inhibiteur de certains résidus protéiques sur la croissance du phosphate de calcium. Selon ces auteurs, les fragments 1-105 de la caséine β (également retrouvés dans les lactosérums acides), et même la caséine entière, inhibent la nucléation. Cette inhibition se produirait probablement par adsorption des résidus phosphosériles des caséines sur le phosphate de calcium. Cette observation a été confirmée par Van Kemenade (1988) avec les fractions caséiniques αs, β et κ.

L'influence du pH peut, en premier lieu, s'expliquer par la nature des équilibres salins existant dans le lactosérum (figures 5 et 6). A pH 5,0 (pH moyen des lactosérums acides), les phosphates sont entièrement sous forme $H_2PO_4^-$. La remontée du pH à 6,2 tend à déplacer l'équilibre $H_2PO_4^- <==> HPO_4^{2-} + H^+$ vers la formation de HPO_4^{2-} avec libération d'ions H^+ (Brulé, 1981). A pH 6,2 (pH correspondant à la valeur choisie pour la précipitation), cette transformation n'est pas totale puisque le pK_2 de l'acide phosphorique est de 7,09 (tableau XI). Aussi, plus le pH sera élevé, plus la proportion d'ions HPO_4^{2-} sera importante. Les ions HPO_4^{2-} avec les ions Ca^{2+} libres vont alors se complexer pour donner du phosphate calcique $CaHPO_4$ (figure 5). Conjointement, une élévation de température diminue la solubilité du phosphate de calcium et favorise son insolubilisation. Finalement, une précipitation rapide de phosphate dicalcique dihydraté et de phosphate tricalcique peuvent se produire (Ferrero, 1991). Ces explications peuvent servir de base pour interpréter l'influence du pH sur le pourcentage de phosphate et de calcium précipité, ainsi que sur le pH du surnageant après décantation (figures 15, 17 et 18). La différence entre le pH ayant servi à la précipitation et le pH du surnageant après précipitation sera d'autant plus grande que l'équilibre $H_2PO_4^- <==> HPO_4^{2-} + H^+$ sera déplacé vers la formation de HPO_4^{2-} avec libération d'ions H^+, "acidifiant" ainsi le surnageant de décantation. Ceci est effectivement observé lorsque le pH de précipitation passe de 6,0 à 6,8 (figure 15). Autrement dit, la valeur du pH du surnageant diminue en fonction de la quantité de

phosphate de calcium précipitée, et cette baisse est d'autant plus grande que le pH ayant servi à la précipitation est élevé.

Le pH peut intervenir également sur d'autres équilibres existant dans les lactosérums (figure 5). En effet, à pH 5,0, les citrates sont à 50% sous forme H_2 citrate$^-$, 25% sous forme H citrate^{2-} et 25% sous forme citrate^{3-} (figure 6). Entre pH 6,0 et 6,8, l'équilibre H citrate^{2-} <==> citrate^{3-} + H^+ (pK_3 = 5,40) tend à se déplacer fortement vers la forme citrate^{3-} avec libération d'ions H^+. Il n'est pas exclu qu'intervienne alors une précipitation de citrate de calcium (Ferrero, 1991 ; Saulnier *et al.*, 1995), par complexation des citrates^{3-} avec les ions Ca^{2+} libres, sous forme de citrate Ca$^-$ ou citrate$_2$ Ca_3 (figure 5). Quelles que soient les modifications engendrées au niveau des équilibres salins, il est observé, pour la gamme de pH choisie (6,0 à 6,8), une augmentation de la précipitation de phosphate et de calcium. Il est bien entendu que la complexité "biologique" des lactosérums laisse présager que d'autres phénomènes doivent intervenir lors de la modification du pH.

En second lieu, on peut supposer qu'en augmentant le pH, les agents inhibant la nucléation (ou croissance) du phosphate de calcium deviennent inactifs, suite à des changements conformationnels ou à des modifications de charge, limitant ainsi l'adsorption des résidus phosphosériles sur le phosphate de calcium. Cette diminution de l'effet inhibiteur de la caséine entière et du fragment 1-105 de la caséine β est effectivement soulignée par Schmidt *et al.* (1987). En effet, ces auteurs constatent qu'à 50°C l'inhibition de la caséine entière et du fragment 1-105 de la caséine β est plus forte à pH 5,6, alors qu'elle est fortement réduite pour des pH allant de 6,1 à 6,8. Les auteurs ne donnent cependant aucune explication à ces phénomènes.

Concernant la chute de DO à 600nm, la diminution de l'extrait sec et les pertes en matières azotées totales, les résultats présentés ici sont globalement en accord avec ceux de Fauquant *et al.* (1985a). L'opalescence des lactosérums est essentiellement attribuable à la fraction lipoprotéique, qui comprend à la fois des globules gras de très petite taille et des fragments membranaires riches en phospholipides (sphingomyéline, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, phosphatidylcholine) (Pitot, 1984). La chute de DO, la diminution de l'extrait sec et les pertes en matières azotées peuvent ainsi s'expliquer par le fait que, sous l'effet combiné d'un ajustement du pH à une valeur proche de la neutralité et d'un traitement thermique, les phospholipides s'agrègent et précipitent avec les protéines qui leur sont associées

(Fauquant *et al.*, 1985a et b ; Baumy *et al.*, 1990). La sérumalbumine bovine et les immunoglobulines, étant donné leur affinité vis-à-vis des constituants lipidiques (Stadhouders et Hup, 1970), joueraient un rôle déterminant dans la formation et l'agrégation des complexes lipoprotéiques (Fauquant *et al.*, 1985b). Aussi faut-il ajouter que le calcium joue également un rôle essentiel dans ce phénomène d'agrégation, d'autant plus que le lactosérum utilisé est riche en calcium (4,70% de l'extrait sec). Les phospholipides auraient effectivement une très grande affinité vis-à-vis du calcium (Pitot, 1984). Ainsi, en augmentant le pH de 6,0 à 6,8, ces phénomènes sont accentués, ce qui est observé lors de nos essais.

Quant à l'augmentation du taux de cendres dans le surnageant, les interprétations sont beaucoup plus délicates. En effet, pour des pH allant de 6,0 à 6,2, l'augmentation du taux de cendres est limitée à environ 5% (figure 20). Par contre, à partir de pH 6,4, une brutale augmentation du taux de cendres est observée, pour atteindre à pH 6,8 des valeurs proches de 30% et plus. Fauquant *et al.* (1985a), lors de la thermoclarification de lactosérum acide de caséinerie, observent une faible augmentation du taux de cendres dans le surnageant (de l'ordre de 4,5%, en raisonnant par rapport aux extraits secs). Les auteurs expliquent cette faible augmentation par le fait que l'apport de soude (pour remonter le pH à 7,0-7,2) compense globalement le phosphate et le calcium précipités. Aussi, sommes-nous tentés d'avancer, qu'à partir d'un pH de précipitation de 6,4, l'apport de soude devient trop important par rapport à la quantité de phosphate et de calcium précipitée, alors que cette même quantité augmente avec le pH (figures 17 et 18). Une hypothèse, qui irait dans ce sens, consiste à supposer, qu'à partir de pH 6,4, le pouvoir tampon du lactosérum est exacerbé, exigeant un apport plus conséquent de soude, qui ne s'équilibrerait plus avec la quantité de phosphate de calcium précipitée.

III.1.4.2. Influence de la température :

La précipitation de phosphate de calcium peut aussi être induite par la chaleur. Ce phénomène a pu être observé directement en solution synthétique (Schmidt *et al.*, 1987). Cependant, dans le lait, la précipitation phosphocalcique a jusqu'à présent été étudiée indirectement par la mesure du calcium et du phosphate soluble du lait en cours de chauffage (Holt, 1985 ; Pouliot *et al.*, 1989a et b ; Schmitt *et al.*, 1993). Brulé *et al.* (1978) ont démontré qu'il était possible d'induire la précipitation du phosphate de calcium dans des perméats de lactosérum par simple chauffage entre 30 et 90°C. Les auteurs ont aussi noté une relation directe

entre le pH avant chauffage et la quantité de précipité formé. Comme pour le pH, la température aurait un effet sur les inhibiteurs de la nucléation du phosphate de calcium (Schmidt *et al.*, 1987). En effet, à 25°C, l'inhibition de la caséine entière et du fragment 1-105 de la caséine β est la plus forte pour une valeur de pH de 6,7, alors qu'à 50°C, l'inhibition est considérablement réduite pour des valeurs de pH allant de 6,1 à 6,8.

Lors de la clarification de lactosérum acide de caséinerie, Fauquant *et al.* (1985a), après avoir ajusté le pH à 7,2 à 2°C, étudient l'influence de la température de réchauffage (de 15 à 50 °C). Ces auteurs concluent que la clarification est d'autant meilleure que la température de traitement est élevée. Les phosphates de calcium sont plus solubles à froid qu'à chaud (Ferrero, 1991). A partir de 40°C, Fauquant *et al.* (1985a) constatent que l'effet d'une augmentation de la température sur la clarification est faible. Nos résultats sont globalement en accord avec ceux de Fauquant *et al.* (1985a), puisque, dans la gamme choisie (de 50 à 60°C), l'augmentation de température n'engendre que de très faibles effets sur la clarification et la quantité de phosphate de calcium précipitée. Aussi, pour pouvoir davantage apprécier l'effet de la température sur la co-précipitation de phosphate et de calcium, aurions-nous dû choisir une plus large gamme de température. Mais en optant pour de plus faibles températures (de 25 à 40°C, par exemple), la clarification et la quantité de phosphate de calcium précipitée auraient été moindres (Fauquant *et al.*, 1985a ; Pouliot *et al.*, 1991). Quant à choisir des températures supérieures à 60°C, il se poserait des problèmes de dénaturation thermique des protéines sériques (Ruegg *et al.*, 1977 ; Hegg, 1980 ; de Wit et Klarenbeek, 1984). Bien entendu, il est intéressant de retrouver dans le sérum clarifié les protéines sériques (α-lactalbuline et β-lactoglobuline) à l'état non dénaturé, en vue d'une éventuelle valorisation de cette fraction. De plus, dans une optique d'extrapolation à l'échelle "pilote" de ce procédé, la température de 50°C est relativement facile à mettre en oeuvre.

Plus délicates sont les interprétations concernant les pertes en matières azotées totales et l'augmentation du taux de cendres (figures 19 et 20), lorsque la température de chauffage passe de 50 à 60°C. Une des explications possibles réside dans le phénomène de dénaturation thermique des protéines sériques solubles.

Concernant la β-lactoglobuline, à un pH supérieur à son point isoélectrique (5,1-5,2), l'étape primaire de la dénaturation, qui correspond au déplissement de la molécule, débuterait dès 40°C (Dupont, 1965). Il y aurait exposition de résidus apolaires et cassure de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes, avec perte des structures tertiaire et secondaire. Sawyer *et al.* (1971) parlent de déplissement des hélices α en structures β avec démasquage de groupements thiols.

L'α-lactalbumine présenterait une plus grande stabilité thermique à pH neutre que la β-lactoglobuline. En effet, la dénaturation thermique de l'α-lactalbumine à 65°C et à pH 6,7 est réversible par refroidissement (Ruegg *et al.*, 1977). La dénaturation à 62-63°C et à pH 6,5 est suivie d'une renaturation de 90% après refroidissement à ce pH (de Wit *et al.*, 1983). Cette forte renaturation est responsable de la stabilité thermique apparente de l'α-lactalbumine.

Quant à la sérumalbumine bovine, Macritchie (1973) montre que cette protéine accuse une sévère précipitation lorsqu'elle est chauffée à 40-45°C. Lin et Koening (1976) observent un déplissement partiellement réversible entre 42 et 50°C. A partir de 40°C, l'exposition accrue de résidus hydrophobes conduit à une agrégation par interactions hydrophobes.

Ainsi, l'augmentation des pertes en matières azotées totales entre 50 et 60°C (figure 19) pourrait notamment s'expliquer par une dénaturation thermique de ces protéines, conduisant ainsi à leur précipitation dans le décantat.

III.1.5. Composition des produits obtenus :

III.1.5.1. Surnageant de décantation statique :

La composition de la phase surnageante, obtenue après précipitation à pH 6,2 et chauffage à 50°C de lactosérum acide de fromagerie, est donnée dans le tableau XIII.

Les résultats mentionnés sont la moyenne des cinq essais réalisés.

	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
DO 600nm	0,04	0,001	2,50
pH	5,60	0,30	5,35
Extrait sec ($g.kg^{-1}$)	63,0	0,9	1,43
MAT	15,32	1,18	7,70
Cendres	18,00	1,86	10,33
Potassium	2,31	0,21	9,09
Calcium	2,18	0,18	8,25
Sodium	1,97	0,16	8,12
Magnésium	0,14	0,01	7,14
Chlorure	2,02	0,22	10,89
Sulfate	0,16	0,01	6,25
Phosphate	1,50	0,17	11,33
Lactate	18,55	1,98	10,67

Tableau XIII. Composition moyenne du surnageant de décantation statique obtenu à pH 6,2 et à 50°C (en g pour 100 g d'extrait sec).

Du fait de sa limpidité et de son pH, le lactosérum ainsi clarifié pourrait constituer une nouvelle matière première apte à la préparation de boissons aromatisées ou pour la préparation d'une base pâtissière à pouvoir moussant très élevé. En effet, le surnageant contient environ 90% de la matière azotée totale du lactosérum initial, cette matère azotée totale renfermant des protéines telles que l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline aux propriétes nutritionelles et technofonctionnelles intéressantes (Forsum, 1974 ; Kinsella, 1976 ; Cheftel et Lorient, 1982 ; Morr et Foegeding, 1990). De plus, sa teneur en calcium et en phosphate est beaucoup plus faible que celle du lactosérum initial et la teneur en phosphate de ce surnageant (1,50% de l'extrait sec) se rapproche de celle d'un lactosérum doux (1,80% de l'extrait sec, selon Alais (1984), Moulin et Galzy (1984)). D'autres débouchés de ce surnageant peuvent être envisagés (alimentation animale (Fauquant *et al.*, 1985b),...).

III.1.5.2. Poudre de décantat "lavé":

III.1.5.2.1. Composition biochimique :

Le décantat de décantation statique est centrifugé trois fois (2000g pendant 15 minutes) et lavé. Le dernier culot de centrifugation est resolubilisé dans de l'eau ultrapure puis lyophilisé (figure 10). La composition de la poudre de décantat "lavé" figure dans le tableau XIV.

Cendres	Calcium	Phosphate	MAT	Lactose
68	**28**	**42**	**6(1)**	**absence**
		Total : **70**		

(1) : l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline sont trouvées à l'état de traces (dosées par HPLC)

Tableau XIV. Composition moyenne de la poudre de décantat "lavé", obtenu à pH 6,2 et à 50°C (en g pour 100 g de poudre).

La poudre de décantat est beaucoup moins riche en MAT que le sérum de départ et est dépourvu de lactose. Les centrifugations et lavages successifs ont donc permis d'éliminer une part importante des phospholipoprotéines et la quasi-totalité du lactose.

Pour pouvoir apprécier la quantité de brushite dans la poudre, il faut tenir compte que les molécules d'eau dans la formule ($CaHPO_4$, $2H_2O$) représentent 21% de la masse molaire totale. Ainsi, pour 70 g de phosphate et de calcium, la quantité de brushite est de 85 g. Par conséquent, la pureté en brushite de la poudre de décantat "lavé" est de 85%.

III.1.5.2.2. Analyse de la poudre aux rayons X :

La spectroscopie de diffraction des rayons X, sensible aux caractères cristallins des solides, révèle sans ambiguité dans la poudre de décantat "lavé" (figure 21) une phase minérale pure dont le spectre est caractéristique de l'hydrogénophosphate de calcium dihydraté ($CaHPO_4$, $2H_2O$) parfaitement cristallisé : la brushite. En effet, en comparant les distances réticulaires mesurées à celles de la fiche A.S.T.M. n° 9-77 de la brushite ($CaHPO_4$, $2H_2O$), on constate un quasi parfait accord.



III.1.6. Conclusion :

Cette étude a permis de définir les conditions optimales de pH et de température conduisant à un pourcentage de précipitation acceptable de phosphate de calcium. Le traitement appliqué entraîne la formation de phosphate de calcium insoluble, constitué de phosphate minéral et de phosphate organique entraînant des fractions protéiques et lipidiques. Bien que les pertes en matières azotées et l'augmentation du taux de cendres soient limitées dans les conditions optimisées (ajustement du pH à 6,2 à 2°C suivi d'un chauffage à 50°C), l'objectif d'approcher, pour le surnageant, la composition d'un lactosérum doux n'est pas pleinement atteint. En effet, les matières azotées totales représentent 15% de l'extrait sec, et les cendres 18% de l'extrait sec (contre 9% de l'extrait sec en moyenne pour un lactosérum doux). Mais le lactosérum acide utilisé constitue pour notre objectif la matière première idéale, compte tenu de sa forte teneur en calcium (4,7% de l'extrait sec) et en phosphate (3,4% de l'extrait sec). Il est donc difficile, partant d'un sérum fortement minéralisé, d'aboutir à un sérum clarifié beaucoup moins minéralisé. Il pourrait alors être envisagé en aval une étape d'électrodialyse pour déminéraliser partiellement le sérum ainsi clarifié.

La poudre de décantat "lavé" atteint un indice de pureté en phosphate de calcium de l'ordre de 85%, avec 6% de matières azotées totales. Les 9% restant peuvent être représentés par des traces résiduelles d'ions ou d'acides organiques (lactate et chlorure notamment). La présence de citrates de calcium insolubles n'est pas exclue (Saulnier *et al.*, 1995).

Afin d'échantillonner la société de travaux publics (environ 1 kg de poudre à fournir), la méthodologie mise au point a été reprise sur de plus gros volumes (figure 11).

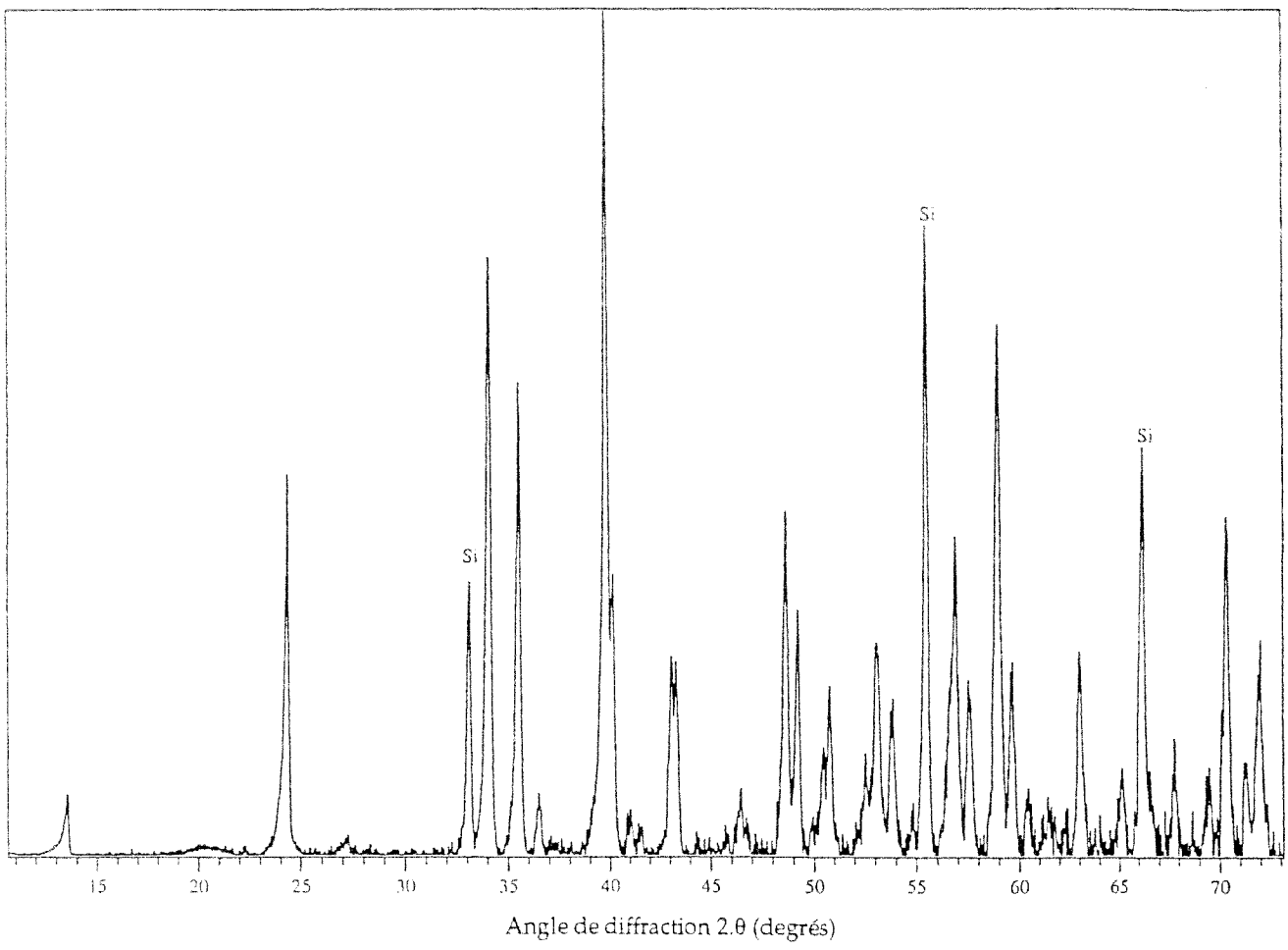


Figure 21 : Spectre de diffraction des rayons X de la poudre de décantat "lavé", obtenue après précipitation à pH 6,2 et chauffage à 50°C de lactosérum acide de fromagerie.
Si : raies du silicium servant d'étalon.

III.2. Extraction et purification de phosphate de calcium à l'échelle "pilote" :

III.2.1. Traitement du lactosérum :

Le protocole a été modifié par rapport à l'étude précédente afin de se placer davantage dans un contexte "industriel" (figure 11). 1000 litres de lactosérum ont été traités. Après refroidissement à 2°C et ajout d'azide de sodium (0,2 $g.l^{-1}$), le pH est ajusté en cuve à 6,2 à cette température. Puis, par passage sur un échangeur thermique à plaques, le lactosérum est chauffé à 50°C. La décantation a lieu en tank à 4°C et est effective au bout de 24 heures. Toutes ces étapes ont été menées à l'usine Lacto Sérum France (Verdun, France).

Le décantat obtenu représente environ 20% du volume de lactosérum mis en oeuvre, soit 200 litres. Toutefois, il est observé au-dessus de ce décantat une couche de couleur jaunâtre, plus gélatineuse et opalescente que le surnageant (environ 100 litres). Ces deux phases sont alors soutirées. Le décantat, quant à lui, présente un aspect plombant et est de couleur blanchâtre. Ce décantat est alors lavé plusieurs fois à l'eau déminéralisée.

Il a été démontré lors d'essais antérieurs que l'effet colmatant du phosphate de calcium rend sa séparation par voie centrifuge, au niveau industriel, difficile et délicate (centrifugeuse Westfalia à évacuation continue utilisée à 45°C et à 10 000 tr/min). Nous avons donc envisagé l'utilisation de plusieurs techniques de filtration particulaire, afin d'augmenter la pureté du sel précipité.

III.2.2. Essais de filtration particulaire sur le décantat "lavé" :

III.2.2.1. Essais préliminaires :

III.2.2.1.1. Essais sur filtres-presses à bandes presseuses :

La filtration assurée par ce type d'appareil est du type séparation solide/liquide en continu et automatique. Les toiles utilisées pour la filtration ont une taille de pores allant de 200 à 600 microns.

Un échantillon de décantat "lavé" d'une vingtaine de litres a été envoyé à la société Filtres Philippe S.A. (Carrières-sous-Poissy, France), qui dispose de pilotes filtres-presses au sein de leur laboratoire (Le Mêle-sur-Sarthe, France). Les essais réalisés n'ont pas permis d'atteindre une

siccité du "gâteau" très poussée, en raison du phénomène de colmatage. Par contre, la récupération des boues liquides concentrées est possible et une étape de séchage en aval est envisageable.

III.2.2.1.2. Essais de microfiltration :

Parallèlement aux essais de filtres-presses, la société Filtres Philippe a réalisé des essais de microfiltration du décantat "lavé" sur pilote ENKA A.G., équipé de membranes organiques de porosité 0,2µm. La microfiltration est poussée à un facteur de concentration volumique de 5, avec une vitesse de balayage de 1 $m.s^{-1}$, sous une pression transmembranaire de 1 bar, et à la température de 40°C. Les débits observés sont très faibles (15 $l.h^{-1}.m^{-2}$), suite à l'effet colmatant du phosphate de calcium. Le rétentat est laissé décanter quelques heures en chambre froide. Deux phases sont alors observées : une phase surnageante liquide et blanchâtre, en dessous de laquelle apparaît un dépôt très dense et grisâtre. Après séchage de ce dépôt de rétentat, la poudre minérale obtenue contient 28% de calcium et 64% de phosphate, avec 5% de matières azotées. D'autres matières organiques non identifiées sont présentes dans des proportions de l'ordre de 3%. Après analyses aux rayons X, il s'avére que le sel cristallisé présente toutes les caractéristiques de la brushite.

Ces essais encourageants nous ont donc conduits à opter pour ce type de technique de filtration. Nous avons donc repris ces essais sur pilote KARIN 2 (Le Carbone Lorraine, Pagny-sur-Moselle, France), équipé de membranes minérales CFCC 0,2µm provenant de la même société, en modifiant quelque peu les conditions opératoires utilisées par la société Filtres Philippe.

III.2.2.2. Microfiltration en flux tangentiel du décantat "lavé" :

III.2.2.2.1. Rôle et choix des paramètres opératoires :

Avant tout essai de microfiltration, le décantat "lavé" est additionné d'eau déminéralisée (en proportion 50-50% (v/v)), afin de resolubiliser parfaitement le précipité formé et d'en diminuer la viscosité apparente. Les lavages successifs du décantat ont pour but d'éliminer les fractions lipoprotéiques.

Les flux de perméat augmentent avec la vitesse tangentielle de balayage (Henry, 1972 ; Perry et Green, 1984 ; Chiang et Cheryan, 1987 ; Kishihara *et al.*, 1989 ; Van Der Horst, 1989 ;

Merin et Daufin, 1990). Cet effet positif est le plus souvent expliqué par la diminution de l'épaisseur de la couche de polarisation et du gel formé au bord de la membrane, suite à un meilleur "balayage" de la surface membranaire. C'est la raison pour laquelle il a été adopté une vitesse tangentielle de balayage beaucoup plus élevée que celle utilisée lors des essais préliminaires par la société Filtres Philippe. Ainsi, en fixant celle-ci à 5 $m.s^{-1}$, le colmatage risque d'être moindre.

En microfiltration, il faut être à une pression la plus basse possible pour ne pas favoriser le colmatage (Dornier et Petermann, 1993). Abulnour *et al.* (1988) soulignent que la pression transmembranaire joue non seulement sur le flux stabilisé mais également sur l'importance de la chute de flux au départ. Pour nos essais, une pression transmembranaire de 1,25 bar est appliquée afin de limiter ces phénomènes.

En règle générale, le flux de perméat augmente avec la température (Cheryan, 1986). L'action de la température s'explique par des variations de viscosité, de diffusivité et de masse volumique qu'elle engendre. De plus, la température de 50°C a été choisie car elle permet de minimiser le développement bactérien et parce qu'elle est couramment utilisée en industries utilisatrices de ces technologies (Merin et Daufin, 1990 ; Pouliot *et al.*, 1995).

L'augmentation de la concentration du produit à filtrer tend à faire chuter les flux. Cheryan (1986) attribue ce phénomène à l'augmentation de la viscosité et de la pression osmotique au bord de la membrane. Ainsi, le FCV n'est poussé que jusqu'à 5,5 (pour 50 litres de produit à filtrer, 41 litres de perméat et 9 litres de rétentat sont obtenus).

Le pH du décantat "lavé" additionné d'eau déminéralisée (= 5,7) n'est pas modifié. En effet, la modification du pH pourrait engendrer des perturbations au niveau du précipité formé, et sans doute davantage d'interactions avec la surface de la membrane.

III.2.2.2.2. Influence du mode de démarrage :

Deux modes de démarrage sont définis :

- Mode de démarrage brusque :

La vitesse tangentielle est réglée à sa valeur de consigne et le pilote est mis sous pression avant le début de la filtration. Ainsi, la pression transmembranaire s'établit brusquement et rapidement, dès les premières minutes.

- Mode de démarrage lent :

Ce mode de démarrage est caractérisé par un établissement plus progressif de la pression transmembranaire et de la vitesse tangentielle. Il est préférable d'envisager une augmentation prioritaire de la vitesse tangentielle par rapport à la pression transmembranaire, afin d'assurer une contrainte de cisaillement la plus élevée possible à la paroi lors de la montée en pression. Ainsi, le démarrage se fait en deux phases. Durant la première, la vitesse tangentielle est tout d'abord augmentée jusqu'à sa valeur de consigne et la pression transmembranaire maintenue la plus faible possible. La vitesse tangentielle de consigne étant atteinte, la pression transmembranaire est alors portée progressivement à sa valeur de consigne durant la deuxième phase. Dornier et Petermann (1993) ont montré qu'un démarrage lent était préférable à un démarrage rapide, car le phénomène de colmatage était moindre.

Compte tenu du produit à filtrer, ce mode de démarrage est utilisé lors de nos essais.

III.2.2.2.3. Cinétique du flux de perméat :

Trois essais de microfiltration ont été réalisés, mettant chacun en oeuvre 25 litres de décantat "lavé" additionné de 25 litres d'eau déminéralisée. L'évolution du flux de perméat (ou filtrat) est identique pour les trois essais.

La figure 22 montre que le flux de filtrat (Jp en $l.h^{-1}.m^{-2}$) chute très rapidement dans les premiers instants de la microfiltration (en moins de 3 minutes, phase I). Cette chute brutale est due à la "couche de polarisation" (Choe *et al.*, 1986 ; Vetier *et al.*, 1986). Il s'agit d'un gradient de concentration en macromolécules et/ou particules qui s'établit à la surface de la membrane, du fait de deux phénomènes qui s'équilibrent : d'une part, un transport convectif vers la membrane se produit avec une accumulation des molécules retenues à la surface de celle-ci, et d'autre part un transport diffusionnel vers le centre est provoqué par le gradient de concentration. La durée de cette chute brutale du flux est très courte. Elle est d'une minute selon certains auteurs, mais ne serait que de quelques secondes d'après d'autres.

Après cette chute brutale, le flux de perméat (Jp) continue à décroître, mais beaucoup plus lentement (phase II de la figure 22). Ce phénomène est dû au colmatage de la membrane par dépôt à la surface ou à l'intérieur des pores, colmatage masqué durant la formation de la couche de polarisation (Bennasar, 1984). Dans le même temps, il y a structuration et compaction de la couche de polarisation. Ces phénomènes conduisent à la formation d'un gel à la surface de la membrane. Ce gel intervient alors comme une résistance supplémentaire (Bennasar, 1984 ;

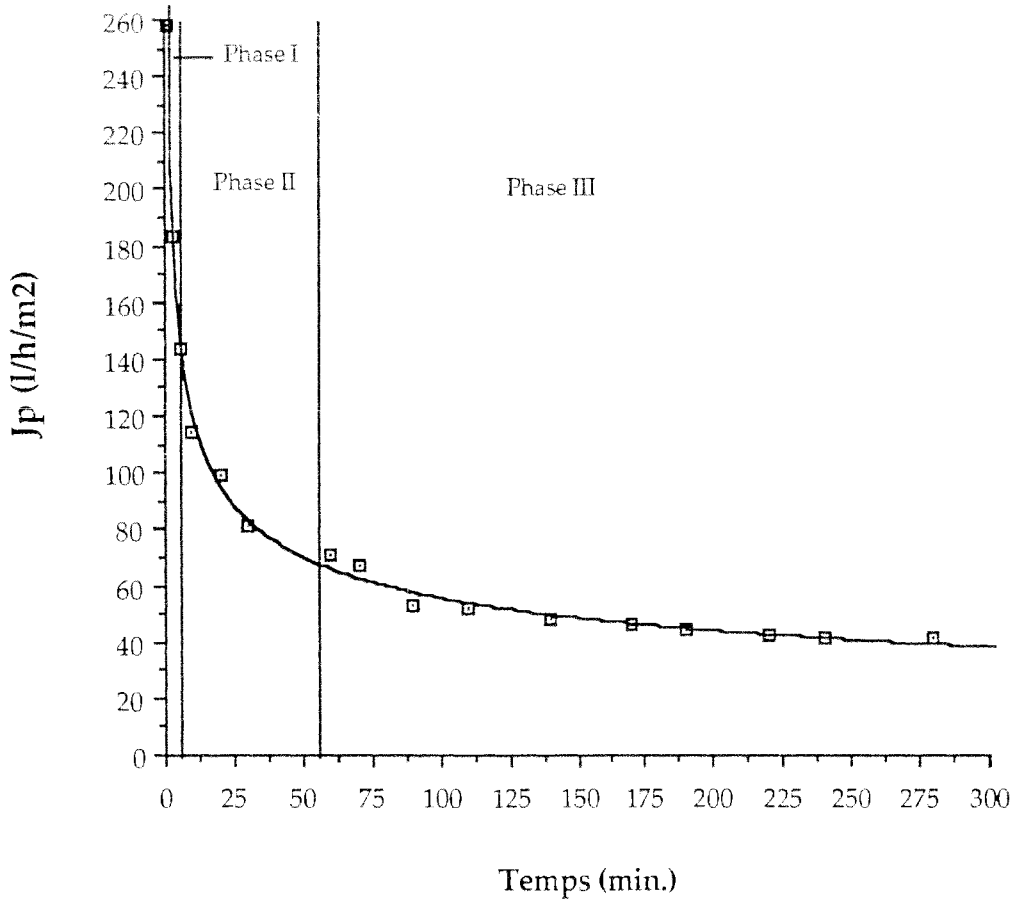


Figure 22 : Evolution du flux de perméat Jp au cour du temps, lors de la microfiltration du décantat "lavé" sur membrane CFCC 0,2µm.

Conditions opératoires :
PT = 1,25 bar
VT = 5 m/s
Température = 50°C
pH = 5,7
FCV = 5,5
Surface membranaire = 0,158 m^2.

Vetier *et al.*, 1986). Cette phase de diminution modérée du flux durerait entre une et plusieurs dizaines de minutes. Lors de nos essais, la durée de cette phase est environ d'une heure.

Enfin, la décroissance du flux devient très faible et quasiment linéaire (phase III de la figure 22). Le phénomène de colmatage se poursuit lentement (Taddéi *et al.*, 1986).

En terme de flux, les performances sont nettement améliorées par rapport aux essais préliminaires. En effet, les flux observés en fin de filtration sont de l'ordre de 45 $l.h^{-1}.m^{-2}$, soit trois fois supérieurs à ceux obtenus par la société Filtres Philippe. Cette différence est sans doute attribuable à la nature différente des membranes utilisées (organique/minérale en composite carbone-fibres de carbone), mais aussi aux modifications des conditions opératoires.

III.2.2.2.4. Taux de rétention en calcium et phosphate :

Le passage d'un soluté à travers la membrane est caractérisé par le taux de rétention (ou taux de rejet) noté TR, et est calculé de la façon suivante (Taddéi *et al.*, 1986) :

$$TR\ (\%) = (1 - Cp_i/Cr_i) \times 100$$

avec Cp_i et Cr_i concentration du constituant i respectivement dans le perméat et le rétentat.

Les teneurs en calcium et en phosphate dans le perméat total sont respectivement de 1,50 $g.l^{-1}$ et 0,70 $g.l^{-1}$; dans le rétentat total, ces teneurs sont respectivement de 28 $g.l^{-1}$ et 62 $g.l^{-1}$. Ainsi, les taux de rétention en calcium et en phosphate sont respectivement de 95% et 99%.

III.2.2.2.5. Traitement du rétentat et obtention de poudre de phosphate de calcium :

Le rétentat de microfiltration est mis à décanter plusieurs heures en chambre froide. Il se forme alors une phase surnageante liquide et blanchâtre (4/5 du volume du rétentat initial), ainsi qu'un dépôt extrêmement compact et grisâtre (1/5 du volume du rétentat initial). La phase surnageante doit correspondre aux fractions lipoprotéiques qui n'ont pas été éliminées lors des lavages précédents. Le dépôt, quant à lui, est lyophilisé et la poudre minérale ainsi obtenue est soumise aux différentes analyses.

III.2.3. Caractérisation biochimique des différents produits obtenus au cours du process :

III.2.3.1. Surnageant de décantation statique :

Les compositions du surnageant de décantation statique et du sérum initial sont données dans le tableau XV.

Lors du process envisagé, le volume de surnageant représente environ 700 litres. Sa composition ne diffère pas de celle du surnageant obtenue lors de l'étude de l'optimisation du couple pH-température (tableaux XIII et XV). Les pourcentages de calcium et de phosphate précipités, les pertes en MAT et l'augmentation du taux de cendres sont calculés de la même manière que précédemment, c'est-à-dire à partir des résultats obtenus sur le sérum de départ et le surnageant. Ainsi, 48% du calcium et 67% du phosphate initial sont précipités. Les pertes en MAT et l'augmentation du taux de cendres dans le sérum clarifié ne sont respectivement que de 8% et 4% (tableau XV). Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus lors de l'étude préliminaire d'optimisation du couple pH-température.

Par conséquent, la faisabilité du procédé mis au point est démontrée à l'échelle "pilote".

III.2.3.2. Poudre de décantat "lavé" :

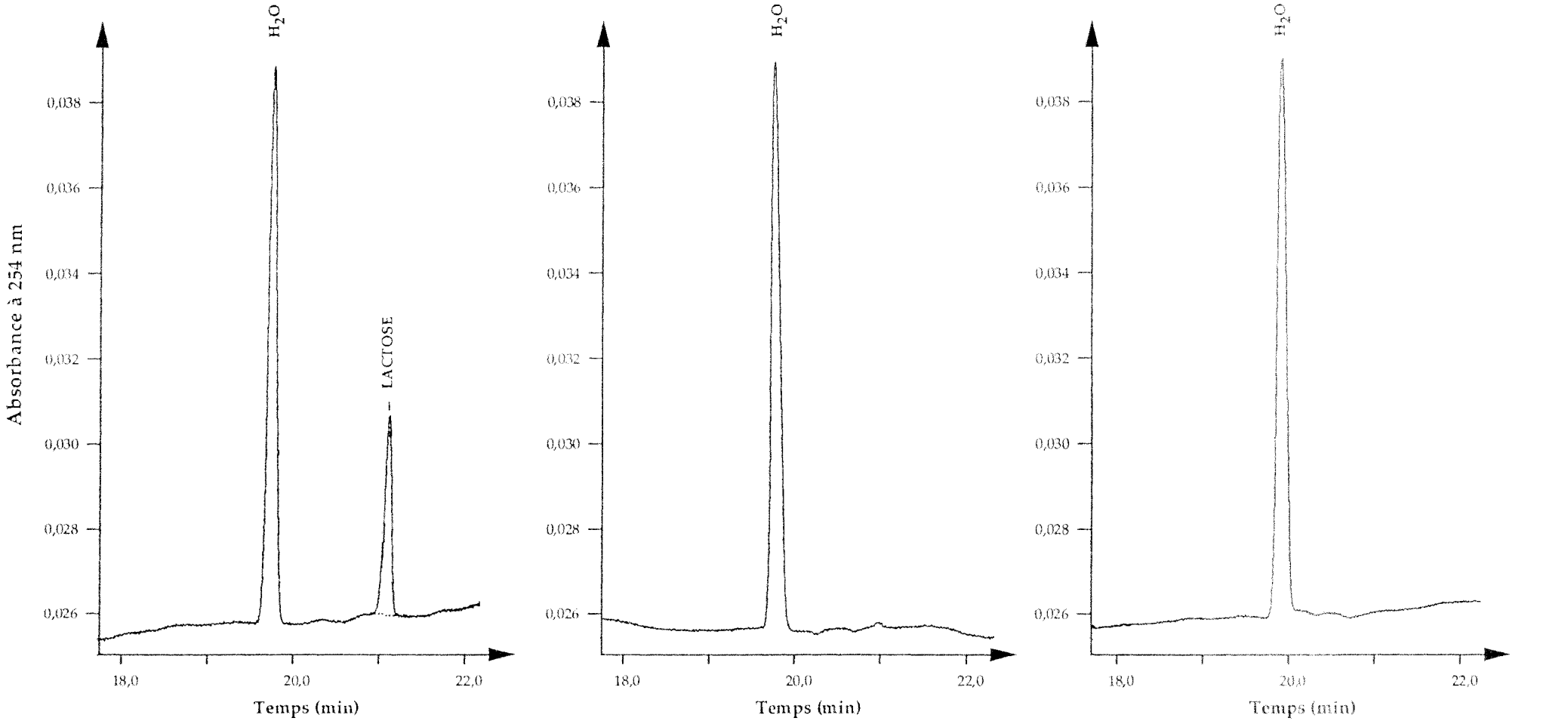
L'analyse de cette poudre minérale révèle l'absence de lactose, qui doit être éliminé lors de la décantation et des lavages (figure 23, a et b), ainsi que la présence de MAT en faible proportion (environ 6%). Cette faible teneur en MAT témoigne de l'élimination en partie des fractions lipoprotéiques au cours des différents lavages (tableau XVI). Cependant, il est décelé la présence d'α-lactalbumine (0,28 g) et de β-lactoglobuline (0,67 g), protéines qui n'étaient pas présentes dans la poudre obtenue lors de l'étude préliminaire. Ces résultats peuvent s'expliquer par une efficacité moindre des lavages par rapport à la centrifugation. Fauquant *et al.* (1985a), lors du traitement technologique de lactosérum acide de caséinerie, observent également une perte, certes très faible (de l'ordre de 5%), de ces deux protéines sériques.

La quantité de phosphate de calcium est estimée à 70 g pour 100 g de poudre, soit, en tenant compte des molécules d'eau, 85 g de brushite pour 100 g de poudre (tableau XVI). Il reste

Tableau XV. Composition du surnageant de décantation statique, obtenu après précipitation à pH 6,2 et chauffage à 50°C de lactosérum acide de fromagerie (en g pour 100g d'extrait sec).
MAT : Matières Azotées Totales.

	Extrait sec ($g.kg^{-1}$)	MAT	Cendres	Potassium	Calcium	Sodium	Magnésium	Chlorure	Sulfate	Phosphate	Lactate
Lactosérum	68,70	16,43	16,36	2,80	**4,75**	0,91	0,14	1,67	0,14	**3,66**	18,92
Surnageant	64,20	15,17	17,03	2,75	**2,49**	2,14	0,14	1,80	0,14	**1,20**	19,78

Pourcentage de calcium précipité : **48%**
Pourcentage de phosphate précipité : **67%**
Pertes en Matières Azotées Totales : **8%**
Augmentation du taux de cendres : **4%**



(a) : Lactosérum de départ

(b) : Poudre de décantat "lavé"

(c) : Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration

Figure 23 : Détection du lactose par électrophorèse capillaire dans le lactosérum acide de départ **(a)**, dans la poudre de décantat "lavé" **(b)** et dans la poudre du dépôt de rétentat de microfiltration **(c)**.
Electrolyte : acide sorbique 7 mM, pH 12,0. Voltage : 10 kV. Durée de l'injection : 20 sec. Détection en UV inverse à 254 nm. Capillaire en silice fondue : 50 µm de diamètre interne et 90 cm de longueur.

Tableau XVI. Composition des différentes poudres de phosphate de calcium fournies à la société de travaux publics (en g pour 100g de poudre).

	Cendres	Calcium	Phosphate	**Brushite**	MAT[1]	Lactose	Impuretés
Poudre de décantat "lavé"	68	28	42	**85**	6,0[a]	absence	9,0
			70				
Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration	70	24	50	**90**	6,2[b]	absence	3,8
			74				

[1] : Matières Azotées Totales.
[a] : dont 0,28g d'α-lactalbumine et 0,67g de β-lactoglobuline.
[b] : l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline sont trouvées à l'état de traces.

donc 9 g d'impuretés, qui peuvent être des traces d'ions et d'acides organiques (chlorure, lactate notamment).

III.2.3.3. Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration :

La poudre minérale, issue de la microfiltration du décantat "lavé" et de la décantation du rétentat, est également dépourvue de lactose (tableau XVI et figure 23 c). Elle renferme un peu plus de MAT (6,2%), ce qui peut s'expliquer par le phénomène de concentration lors de la microfiltration. Toutefois, elle est quasiment dépourvue des protéines sériques majeures (α-lactalbumine et β-lactoglobuline). Aussi peut-on supposer que, lors de la décantation du rétentat de microfiltration, ces protéines avec sans doute d'autres lipoprotéines se retrouvent dans la phase surnageante.

La poudre du dépôt de rétentat présente une pureté en brushite de l'ordre de 90% (tableau XVI). Il est à noter que, si la quantité de phosphate dans cette poudre est plus importante (compte tenu de la totale rétention du phosphate par la membrane 0,2µm), la quantité de calcium est légèrement diminuée par rapport à celle de la poudre de décantat "lavé" (24 g de calcium contre 28 g, pour 100 g de poudre). Une interprétation possible peut être faite en considérant que le calcium n'est pas totalement retenu par la membrane 0,2µm (Taux de Rétention du calcium : 95%). Les impuretés, hormis les MAT, ne représentent que 4%. La microfiltration et la décantation du rétentat ont donc permis en partie l'élimination des ions et acides organiques contaminants.

III.2.3.4. Conclusion :

Le traitement technologique mis au point permet, à partir de lactosérum acide de fromagerie à 6% d'extrait sec, de précipiter 48% du calcium et 67% du phosphate initial, tout en limitant les pertes en MAT et l'augmentation du taux de cendres. Même si les rendements d'extraction peuvent être améliorés, l'application de ce procédé au stade industriel semble peu coûteuse et ne nécessite presqu'aucun investissement (l'utilisation des cuves en place à Lacto Sérum France étant possible), hormis éventuellement une installation de microfiltration.

Les poudres fournies à la société de travaux publics atteignent une pureté allant de 85 à 90%, le cahier des charges en fixant 70%. Celui-ci exigeait 8% au maximum de matières

organiques, condition qui est également satisfaite. L'étape de microfiltration, technologie "douce" parfaitement extrapolable à l'échelle industrielle, améliore la pureté en brushite de 5%.

III.2.4. Analyses des poudres aux rayons X et au microscope électronique à balayage :

En collaboration avec le laboratoire de Chimie du Solide Minéral (Université Henri Poincaré, Nancy, France), les deux poudres fournies à la société de travaux publics ont été analysées par diffraction des rayons X (R.X) et par microscopie électronique à balayage (M.E.B.). Deux types d'informations sont recueillis :

- l'un concerne le nombre de phases présentes et leur morphologie, par l'observation des images données par les électrons secondaires d'énergie de 50 à 500 eV (noté S.E. par la suite) ;
- l'autre concerne la composition élémentaire de chaque phase, qui est déterminée par l'analyse de l'énergie des photons X reémis grâce à un spectromètre dispersif d'énergie couplé à l'appareil. Le volume de matière analysé en mode ponctuel est de l'ordre de quelques mm^3.

III.2.4.1. Résultats des rayons X :

III.2.4.1.1. Cas de la poudre de décantat "lavé" :

La diffraction des R.X révèle un produit bien cristallisé (diagramme identique à celui de la figure 21). En comparant les distances réticulaires mesurées à celles de la fiche A.S.T.M. n° 9-77 de la brushite ($CaHPO_4$, $2H_2O$), on constate un excellent accord. Toutes les raies et rien que les raies de la brushite sont présentes. La poudre de décantat "lavé" ne contient que cette seule phase comme phase cristallisée.

III.2.4.1.2. Cas de la poudre du dépôt de rétentat de microfiltration:

Les clichés photographiques sont identiques à celui de la poudre précédente. La conclusion est la même : brushite comme seule phase cristallisée. Il a été vérifié qu'il n'y a pas de variation des paramètres entre les deux poudres.

III.2.4.2. Résultats de la M.E.B. :

III.2.4.2.1. Poudre de décantat "lavé" :

La figure 24 représente les images S.E. de la poudre déposée sur papier adhésif, aux grossissements de 300 et 3000. De sa morphologie globale, on constate qu'elle est monophasée. Pour s'en assurer, nous avons réalisé plusieurs analyses élémentaires en des points différents de la préparation qui conduisent au même résultat. Trois éléments sont détectés : Ca, P, O ; le rapport atomique Ca/P valant 1 à la précision de la mesure (Ca : 51,97 ; P : 48,03). On confirme ainsi la formule $CaHPO_4$, $2H_2O$ (H est trop léger pour être détecté, O est trop léger pour être mesuré avec une précision satisfaisante). La figure 25 représente l'image S.E. d'un grain d'une préparation obtenue par mise en suspension de la poudre dans de l'éthanol sous agitation par ultrasons. Une goutte de solution est récupérée, déposée sur carbone vitreux poli. Après séchage et métallisation, on effectue l'observation. Ce mode de préparation permet de dégager d'éventuelles phases minoritaires qui auraient pu être cachées dans de gros agrégats. Dans le cas présent, il n'est pas observé de phase autre que la brushite, dont la morphologie feuilletée des cristaux est particulièrement bien révélée ici (figure 25).

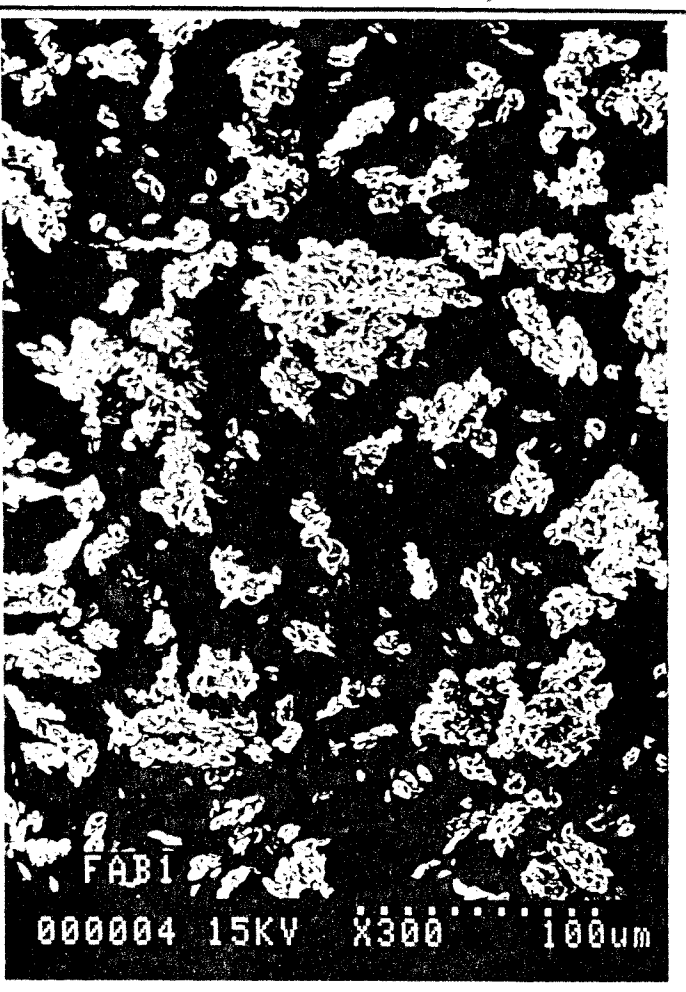
III.2.4.2.2. Poudre du dépôt de rétentat de microfiltration :

La figure 26 représente les images S.E. de la poudre déposée sur papier adhésif, aux grossissements de 300 et 3000. Les analyses élémentaires en des points différents de la préparation montrent la présence des trois éléments : Ca, P, O. Le rapport atomique Ca/P est de 1 à la précision de la mesure (Ca : 51,21 ; P : 48,79), indiquant par conséquent la présence de monophosphate de calcium.

III.2.4.2.3. Conclusion :

Les deux poudres analysées sont constituées uniquement de brushite très bien cristallisée et pure de formule $CaHPO_4$, $2H_2O$.

(a)



(b)

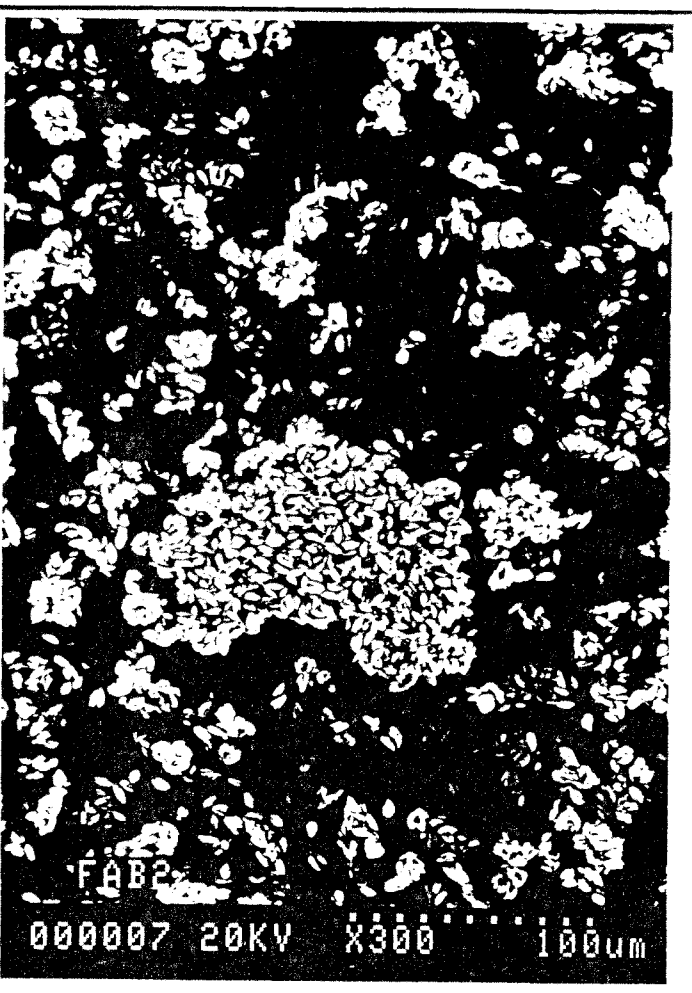


Figure 24 : Microscopie électronique à balayage de la poudre de décantat "lavé" (images S.E.).
(a) : Grossissement de 300 ; **(b)** : Grossissement de 3000.



Figure 25 : Microscopie électronique à balayage de la poudre de décantat "lavé" (image S.E. obtenue après mise en suspension de la poudre dans de l'éthanol). Grossissement de 2500.

(a)



(b)



Figure 26 : Microscopie électronique à balayage de la poudre du dépôt de rétentat de microfiltration (images S.E.). **(a)** : Grossissement de 300 ; **(b)** : Grossissement de 3000.

III.2.5. Rendements d'extraction :

* *Rendement théorique d'extraction :*

Il s'agit d'estimer le rendement d'extraction moyen en phosphate de calcium, à partir du volume de sérum mis en oeuvre et du volume du surnageant obtenu, ainsi que le volume de sérum nécessaire pour produire 1 kg de poudre de décantat.

Le lactosérum utilisé a une teneur en calcium de 3,26 $g.l^{-1}$ et de 2,51 $g.l^{-1}$ en phosphate (voir tableau XV pour l'expression du calcium et du phosphate en $g.l^{-1}$). Celles du surnageant sont respectivement de 1,59 $g.l^{-1}$ et 0,77 $g.l^{-1}$. Le bilan est effectué à partir de 1000 litres de lactosérum.

Quantité de phosphate de calcium initialement présente :

Calcium : 1000 x 3,26 = 3260 g

Phosphate : 1000 x 2,51 = 2510 g

soit au total **5770 g**.

Quantité de phosphate présente dans le surnageant :

Le surnageant, avec la couche gélatineuse, représente 80% du volume mis en oeuvre.

Calcium : 1000 x 1,59 x 0,8 = 1272 g

Phosphate : 1000 x 0,77 x 0,8 = 616 g

soit au total **1888 g**.

Quantité de phosphate de calcium précipitée :

Calcium : 3260 - 1272 = 1988 g

Phosphate : 2510 - 616 = 1894 g

soit au total **3882 g**.

Le rendement d'extraction théorique en phosphate de calcium est donc de **67%**.

La pureté de la poudre de décantat "lavé" étant de 85%, il faut donc (1000x0,85x1000/3882) = **220 litres** de lactosérum à 6% d'extrait sec pour produire 1 kg de poudre de décantat "lavé".

* *Rendement réel d'extraction :*

Le rendement d'extraction théorique est surestimé, étant donné que la composition de la couche gélatineuse doit être probablement plus proche de celle du décantat que celle du surnageant. En fait, le rendement d'extraction réel serait plutôt de **60%**.

De même, concernant le volume de sérum nécessaire à la production de 1 kg de poudre à 85%, nous n'avons pas pris en compte les différents lavages. En fait, il a été déterminé que **650 litres** de sérum sont nécessaires pour produire 1 kg de poudre.

III.2.6. Conclusion :

Cette étude a permis la mise au point d'un procédé d'extraction de phosphate de calcium à partir de lactosérum acide de technologie pâte molle. Même si le rendement d'extraction reste encore à améliorer, la qualité de la poudre obtenue est tout à fait satisfaisante au regard du cahier des charges.

Selon la pureté souhaitée, il est bien entendu que l'étape de microfiltration en aval de la décantation ne s'imposera pas forcément. La microfiltration permet d'accroître la pureté en brushite de 5%. Ce gain peut paraître faible, mais n'oublions pas que le décantat "lavé" à microfiltrer a déjà une pureté de 85% et que la pureté proche de 100% ne se justifie pas pour toutes les utilisations. Les produits obtenus lors de ce process peuvent être destinés à de diverses applications (figure 27).

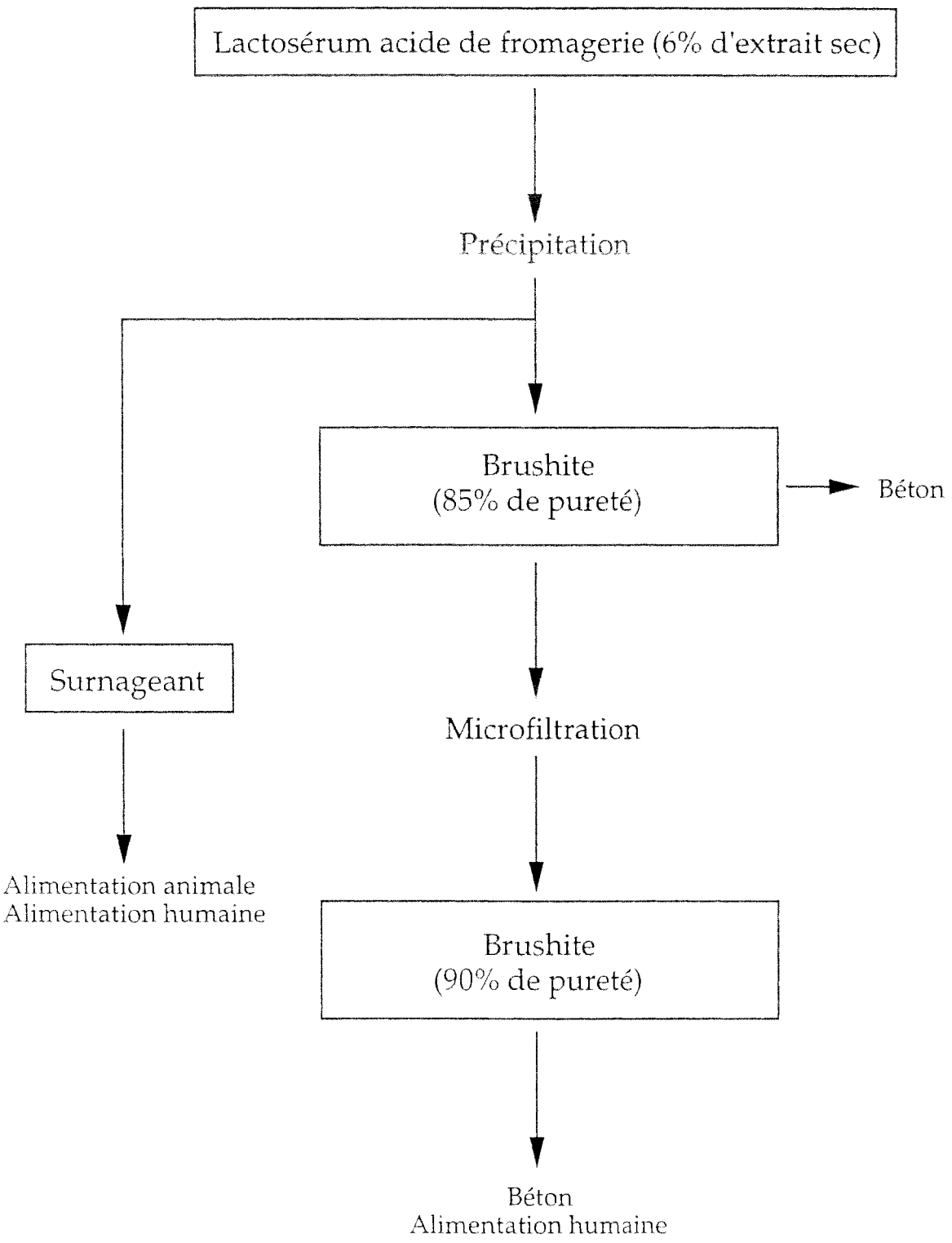


Figure 27 : Applications potentielles des produits issus de la clarification de lactosérum acide de fromagerie.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude montre qu'en appliquant un protocole simple (ajustement du pH et chauffage), peu onéreux et transposable à l'échelle industrielle, il est possible de produire du phosphate de calcium à partir de lactosérum acide.

Les poudres fournies à la société de travaux publics, répondant tout à fait au cahier des charges, atteignent une pureté allant de 85 à 90%. Ces poudres, d'origine "biologique", permettent effectivement de diminuer le temps de prise des bétons. Ces résultats ont été confirmés par le laboratoire de Recherche et Développement de la société de travaux publics.

Ces travaux répondent parfaitement au souci et à la nécessité de valorisation du lactosérum, principal co-produit de la filière lait. En effet, ses différents composants sont pour l'essentiel bien valorisés à l'exception de la fraction minérale. Cette étude comble en partie cette lacune. L'enjeu économique semble évident. La brushite représente un élément gênant pour Lacto Sérum France et un ingrédient intéressant pour la société de travaux publics. L'économie réalisée à l'achat a été estimée à 10 F/kg au minimum. D'autres marchés peuvent certainement s'offrir à un tel produit.

Cependant, l'application immédiate du procédé mis au point ne semble pas pour l'instant possible à l'échelle industrielle. En effet, la spécificité du sérum utilisé (lactosérum acide de fin d'égouttage, issu de technologie pâte molle) rend les volumes traitables faibles et les rendements d'extraction, qui sont encore à optimiser, ne permettent pas de combler ce manque.

Aussi, la suite de ce projet serait d'adapter ces résultats à des sérums acides préconcentrés de "grand mélange" (à 30% d'extrait sec), qui sont quotidiennement réceptionnés à l'usine Lacto Sérum France ; l'objectif étant de diminuer les coûts de transport et surtout les volumes nécessaires à l'extraction de ce sel de phosphate.

Une redéfinition des différents paramètres doit être établie. Des essais préliminaires sur des sérums acides de diverses provenances à 27% d'extrait sec ont été menés et semblent encourageants. Lors de ces essais, il a été montré que l'ensemencement à l'aide de cristaux de phosphate de calcium était préférable au chauffage, qui entraîne trop souvent une gélification de la matière première (Ferrero, 1991). L'ensemencement à l'aide de cristaux de brushite paraît être effectivement une solution pour "stimuler" la précipitation phospho-calcique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La valorisation des co-produits laitiers s'est imposé dès le début de l'industrialisation du secteur pour des raisons économiques et par souci de protection de l'environnement. En effet, les co-produits de la beurrerie (lait écrémé - babeurre) et de la fromagerie (lactosérum) contiennent environ 45 % de la matière sèche de l'ensemble du lait collecté. Constitués de protéines, lactose et minéraux, ces dérivés du lait ont d'abord été utilisés en alimentation animale en l'état, mais le plus souvent, en mélange avec d'autres nutriments, soit sous forme concentrés, soit sous forme anhydres.

Contraints de rechercher de meilleures valorisations, les industriels ont su exploiter l'ensemble des possibilités qu'offrent les procédés de précipitation des protéines et les techniques de séparation sur membrane et échangeurs ioniques.

Ainsi grâce à l'acquis des connaissances dans le domaine de la physicochimie des protéines et à l'essor des technologies de fractionnement, est née une industrie de première transformation laitière, qui offre une large gamme de bases protéiques destinées à l'industrie alimentaire et exploitées soit pour leurs propriétés nutritionnelles, soit pour leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, une part de plus en plus importante des protéines laitières est destinée à l'alimentation humaine. La maîtrise des procédés de fractionnement et l'évolution des connaissances relatives aux propriétés physicochimiques et physiologiques des protéines laitières ouvrent de nouvelles perspectives de valorisation aussi bien dans le secteur agroalimentaire que dans le secteur de la cosmétologie et de la parapharmacie.

Nous avons montré, dans ce travail, l'importance d'un paramètre physicochimique (le pH) lors de l'ultrafiltration de lactosérum sur différents types de membranes. La valeur du pH modifie de manière significative les performances des membranes, ainsi que la composition qualitative et quantitative des perméats, notamment en protéines. Il est évident que d'autres paramètres sont également déterminants au niveau des performances et de la composition des produits obtenus. De plus , en amont de cette technologie, l'industriel transformateur de ce co-produit réceptionnne une matière première dont les caractéristiques sont très fluctuantes. Or, il lui

faut pouvoir proposer un produit fini à qualité constante tout au long de l'année. Ainsi, une meilleure connaissance des phénomènes mis en jeu dans les procédés de séparation sur membrane permet de mieux maîtriser la technologie et la qualité des produits.

L'hétérogénéité et l'importante minéralisation des lactosérums acides est un frein à leur valorisation. L'extraction du phosphate de calcium par précipitation et sa purification par microfiltration, décrites dans ce travail, peuvent contribuer à une meilleure valorisation des lactosérums acides. Ce "phosphate de calcium biologique" pourrait être utilisé notamment, en fromagerie pour obtenir une véritable standardisation minérale des laits. Nous avons démontré la faisabilité de cette extraction-purification au stade "pilote", mais il reste encore à optimiser son extraction industrielle.

Ainsi, la valorisation des lactosérums, à l'aide des technologies membranaires, concerne non seulement la fraction protéique mais aussi la fraction minérale de ce co-produit de la filière lait.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

Abulnour A.G., Talaet H.A., Sorour M.H. & Tewfik S.R. **(1988)**
Parametric evaluation of flux decline during ultrafiltration of protein solutions.
Desalination, **68**, 35-44.

Acharya K.R., Stuart D.I., Walker N.P.C., Lewis M. & Phillips D.C. **(1989)**
Refined structure of baboon α-lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with C-type lyzozyme.
J. Mol. Biol., **208**, 99-127.

Adrian J. & Bourlier G. **(1980)**
Composition minérale du lactosérum.
Lait, **60**, 447-457.

Alais C. **(1981)**
La valorisation du lactosérum, les bases et les problèmes
La Technique Laitière, **952**, 7-10.

Alais C. **(1984)**
Science du lait. Principes des Techniques Laitières. 4ème édition. Ed. Sepaic, Paris, France.

AOAC **(1945)**
Standard 559.

Baert A., Oroz M. & Blanc C. **(1976)**
Serological studies on heat induced interactions of α-lactalbumin and milk proteins.
J. Dairy Res., **43**, 419-432.

Baumy J.J. & Brulé G. **(1988)**
Binding of bivalent cations to β-lactoglobulin : effect of pH and ionic strength.
Lait, **68**, 33-48.

Baumy J.J., Gestin L., Fauquant J., Boyaval E. & Maubois J.L. **(1990)**
Technologies de purification des phospholipides du lactosérum.
Process, **1047**, 29-33.

Baumy J.J., Guenot P., Sinbaudhit S. & Brulé G. **(1989)**
Study of calcium binding to phosphoserine residue of β-casein and its phosphopeptide (1-25) by ^{31}PNMR.
J. Dairy Res., **56**, 403-409.

Beevers C.A. **(1958)**
The crystal structure of dicalcium phosphate dihydrate.
Acta Cryst., **11**, 273-277.

Bennasar M. **(1984)**
Etude de l'ultrafiltration sur membranes minérales. Applications au lait.
Thèse de Doctorat d'Etat, Montpellier, France.

Bernal V & Jelen P. **(1984)**
Thermal stability of whey proteins. A calorimetric study.
J. Dairy Sci., **68**, 2847-2852.

Bonneau D., Brinkman G.E. & Guibaud J. **(1991)**
In : *Inorganic Membranes ICIM2-91*, Key Engineering Materials, **61 & 62**, 313-318.

Boulet M. **(1966)**
Formation du phosphate de calcium dans le lait et son ultrafiltrat.
XVIIème Congr. Int. Lait., Munich, Allemagne, 111-118.

Boulet M. & Marier J.R. **(1961)**
Precipitation of calcium phosphates from solutions at near physiological concentrations.
Arch. Biochem. Biophys., **93**, 157-165.

Bragg W.L. **(1937)**
Atomic structure of minerals, 130, Ithaca : Cornell University Press.

Bramaud C., Aimar P. & Daufin G. **(1995)**
Thermal isoelectric precipitation of α-lactalbumin from a whey protein concentrate : influence of protein calcium complexation.
Biotechnol. Bioeng., **47**, 121-130.

Brulé G. **(1981)**
Les minéraux du lait.
Rev. Lait. Fr., **400**, 61-65.

Brulé G. & Fauquant J. **(1981)**
Mineral balance in skim-milk and milk retentates : effect of physicochemical characteristics of the aqueous phase.
J. Dairy Res., **48**, 91-97.

Brulé G., Maubois J.L. & Fauquant J. **(1974)**
Etude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane.
Lait, **54**, 600-615.

Brulé G., Real del Sol E., Fauquant J. & Fiaud C. **(1978)**
Mineral salts stability in aqueous phase of milk : influence of heat treatments.
J. Dairy Sci., **61**, 1225-1232.

Brulé G., Roger L., Fauquant J. & Piot M. **(1980)**
Brevet FR 8002280.

Brun J.P. **(1989)**
Ultrafiltration.
In : *Procédés de séparation par membranes. Transport, techniques membranaires, applications*. Ed. Masson, Paris, France.

Bryant D.T.W. & Andrews P. **(1984)**
High affinity binding of calcium to bovine α-lactalbumin in the absence or presence of EDTA.
Biochem. J., **220**, 617-629.

Buma T. & Van der Veen H. **(1974)**
Accurate specific optical rotations of lactose and their dependance of temperature.
Nederland Melk en Zviveltijdschrift, **28**, 175-183.

Burton H. **(1968)**
Reviews of the progress of Dairy Science. Section G. Deposits from whole milk in heat treatment plant. A review and discussion.
J. Dairy Res., **35**, 317-330.

Chaplin L.C. & Lyster R.L.J. **(1986)**
Irreversible heat denaturation of bovine α-lactalbumin.
J. Dairy Res., **53**, 249-258.

Cheftel J.C. & Lorient D. **(1982)**
Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration.
Lait, **62**, 435-483.

Cheryan M. **(1986)**
Modelling of ultrafiltration processes.
In : Handbook of Ultrafiltration, 73-125.

Cheryan M. & Merin U. **(1981)**
The effect of protein mineral-membrane interactions on the fouling of ultrafiltration membranes.
*In : Fouling and Cleaning in Food Processing (*B Hallstrom, DB Lund & C Tragardh, eds). Lund, SuËde.

Chiang B.H. & Cheryan M. **(1987)**
Modelling of hollow-fibre ultrafiltration of skim-milk under mass transfer limiting conditions.
J. Food Eng., **6**, 241-255.

Choe T.B., Masse P. & Verdier A. **(1986)**
Flux decline in batch ultrafiltration : concentration polarization and cake formation.
J. Membrane Sci., **26**, 1-15.

Closs B. & Lorient D. **(1988)**
Surface properties of whey proteins influencing factors and methods of improvement.
Hannah Research Institute Casein Conference, Ayr, Scotland.

Cohen-Maurel E. **(1990)**
L'utilisation de la microfiltration tangentielle dans le traitement des liquides alimentaires.
Process, **1054**, 42-49.

Daufin G, Labbé J.P., Quemarais A. & Michel F. **(1991)**
Fouling of an inorganic membrane during ultrafiltration of defatted whey protein concentrates.
Neth. Milk Dairy J., **45**, 259-272.

Daufin G., Labbé J.P., Quémerais A., Michel F. & Merin U. **(1994)**
Optimizing clarified whey ultrafiltration : influence of pH.
J. Dairy Res., **61**, 355-363.

Daufin G., Michel F., Labbé J.P., Quémerais A. & Grangeon A. **(1993)**
Ultrafiltration of defatted whey : improving performance by limiting membrane fouling.
J. Dairy Res., **60**, 79-88.

Daufin G., Michel F. & Merin U. **(1992a)**
Ultrafiltration of defatted whey proteins concentrates (WPC) withdrawn from an industrial plant.
Lait, **72**, 185-199.

Daufin G., Michel F. & Merin U. **(1992b)**
Study of ultrafiltration of defatted whey : influence of some physicochemical characteristics.
Austr. J. Dairy Technol., **47**, 7-13.

De Boer R., De Wit J.N. & Hiddink J. **(1977)**
Processing of whey by means of membranes and some applications of whey protein concentrate.
J. Soc. Dairy Technol., **30**, 112-120.

De Wit J.N. **(1981)**
Structural and functional behaviour of whey proteins.
Neth. Milk Dairy J., **35**, 47-64.

De Wit J.N. **(1984)**
Functional properties of whey proteins in food systems.
Neth. Milk Dairy J., **38**, 71-89.

De Wit J.N., Hontelez-Backx E. & Adamse M. **(1988)**
Evaluation of functional properties of whey isolates. 3. Functional properties in aqueous solution.
Neth. Milk Dairy J., **42**, 155-172.

De Wit J.N. & Klarenbeek G. **(1981)**
A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperature up to 160°C.
J. Dairy Sci., **48**, 293-302.

De Wit J.N. & Klarenbeek G. **(1984)**
Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins.
J. Dairy Sci., **67(11)**, 2701-2710.

De Wit J.N., Klarenbeek G. & Adame M. **(1986)**
Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2.Effects of processing history and composition.
Neth. Milk Dairy J., **40**, 41-56.

De Wit J.N., Klarenbeek G. & De Boer R. **(1978)**
Une méthode simple pour la clarification du lactosérum.
XXème Congr. Int. Lait., Paris, France, 935-937.

De Wit J.N., Klarenbeek G. & Hontelez-Backx E. **(1983)**
Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 1. Isolation and characterization.
Neth. Milk Dairy J., **37**,37-49.

Doehlert D.H. **(1970)**
Uniform shell design.
Applied Statistic, **19**, 231-239.

Dornier M. & Petermann R. **(1993)**
Optimisation de la microfitration de refontes de sucre roux de cannes : influence du mode de démarrage et filtration à faible pression transmembranaire.
Rapport interne, ENSIAA, Massy, France.

Ducret V., Degas C. & Lamberet G. **(1990)**
Composition lipidique d'un sous produit de lactosérum de caséinerie.
Lait, **70**, 117-126.

Dupont M. **(1965)**
Comparaison de la thermodénaturation des β-lactoglobulines A et B à pH 6,85.
Biochim. Biophys. Acta, **94**, 573-575.

Escudier J.L., Montaigne E. & Moutounet M. **(1988)**
La technologie des membranes.
Biofutur, 27-32.

Evans E.W. **(1986)**
Interactions of milk components in food systems.
In : Interactions of Food Components. (GG Birch et MG Lindley, eds) Elsevier Applied Science Publishers, Londres et New-York, 241-275.

Evenhuis N. & De Vries Th. R. **(1957)**
The condition of calcium phosphate in milk.
Neth. Milk Dairy J., **11(2)**, 111-121.

Fane A.G., Fell C.J.D. & Suki A. **(1983)**
The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes.
J. Membrane Sci., **16**, 195-210.

Fauquant J., Maubois J.L. & Pierre A. **(1988)**
Microfiltration du lait sur membrane minérale.
La Technique Laitière, **1028**, 21-23.

Fauquant J., Pierre A. & Brulé G. **(1985a)**
Clarification du lactosérum acide de caséinerie.
La Technique Laitière, **1003**, 37-39.

Fauquant J., Vieco E., Brulé G. & Maubois J.L. **(1985b)**
Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle.
Lait, **65**, 1-20.

Ferrero F. **(1991)**
La qualité physicochimique des lactosérums réceptionnés à l'usine de transformation et ses répercussions sur les technologies avales.
Thèse de doctorat, Université de Nancy I, n° 422, France.

Forsum E. **(1974)**
Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions.
J. Dairy Sci., **57(6)**, 665-669.

Forsum E. & Hambraeus L. **(1977)**
Nutritional and biochemical studies of whey products.
J. Dairy Sci., **60**, 370-377.

Gaucheron F., Le Graet Y., Sinbaudhit S., Guenot P. & Brulé G. **(1995)**
Binding of calcium to β-casein in the presence of inorganic phosphate.
Sci. Aliments, **15**, 481-489.

Gésan G. & Daufin G **(1995)**
Microfiltration tangentielle de lactosérum doux prétraité : mécanisme de colmatage et conduite opératoire.
I.A.A., **112**, 633-641.

Gésan G., Daufin G., Merin U., Labbé J.P. & Quémarais A. **(1995)**
Microfiltration performance : physicochemical aspects of whey pretreatment.
J. Dairy Res., **62**, 269-279.

Gésan G., Merin U., Daufin G. & Maugas J.J. **(1993)**
Performance of an industrial cross-flow microfiltration plant for clarifying rennet whey.
Neth. Milk Dairy J., **47**, 121-135.

Goupy J.L. **(1990)**
Etude comparative de divers plans d'expérience.
Rev. Statistique Appliquée, **38 (4)**, 5-44.

Grindstaff D. **(1975)**
Process for pretreating raw whey.
US Pat., 3.864.506.

Gumpen S., Hegg P.O. & Martens M. **(1979)**
Thermal stability of fatty acid serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry.
Biochim. Biophys. Acta., **574**, 189-196.

Gungerich C.H. & Huston G. **(1996)**
Demineralization of whey and whey products.
Bulletin FIL, **311**, 11-13.

Hanemaaijer J.H., Robbertsen T., Van Den Boomgaard T.H. & Gunnink J.W. **(1989)**
Fouling of ultrafiltration membranes. The role of protein adsorption and salt precipitation.
J. Membrane Sci., **40**, 199-217.

Hargrove R.E., Mac Donough F.E., Lacroix D.E. & Alford J.A. **(1976)**
Production and properties of deproteinized whey powder.
J. Dairy Sci., **59**, 25-33.

Harper D. **(1992)**
Functional properties of whey protein concentrates and their relationship to ultrafiltration.
Bulletin FIL, **9201**, 77-108.

Harwalkar V.R. **(1980)**
Kinetics of thermal denaturation of β-lactoglobulin at pH 2,5.
J. Dairy Sci., **63**, 1052-1057.

Hayes J.F., Dunkerley J.A., Muller L.L. & Griffin A.T. **(1974)**
Studies on whey processing by UF. II. Improving permeation rates by preventing fouling.
Aust. J. Dairy Technol., **24**, 132-140.

Hedrick T.I. **(1984)**
Reverse osmosis and ultrafiltration in food industry : a review.
Drying Technology, **2 (3)**, 329-352.

Hegg P.O. **(1980)**
Thermal stability of β-lactoglobulin as a function of pH and the relative concentration of dodecylsulfate.
Acta Agric. Scand., **30**, 401-404.

Henry J.D. **(1972)**
Cross flow filtration.
In : *Recent Developments in Separation Science*, Chem. Rubber Co., U.S.A.

Hill A.R. **(1988)**
Thermal precipitation of whey proteins.
Milchwiss., **43**, 565-567.

Hill W.L. & Hendricks S.B. **(1936)**
Composition and properties of superphosphate.
Industr. Eng. Chem., **28(4)**, 440-447.

Hillier R.M & Lyster R.L.J **(1979)**
Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey.
J. Dairy Res., **46**, 103-120.

Hillier R.M., Lyster R.L.J. & Cheeseman G.C. **(1979)**
Thermal denaturation of α-lactalbumin and β-lactoglobulin in cheese whey : effect of total solids content and pH..
J. Dairy Res., **46**, 103-120.

Holt C. **(1985)**
The milk salts : their secretion, concentrations and physical chemistry.
In : *Developments in Dairy Chemistry.* 3. (Fox PF, ed.), Applied Science Publishers, London, Great Britain, **3**, 143-181.

Holt C., Van Kemenade M.J.J.M., Nelson L.S., Sawyer L., Harries J.E., Bailley R.T. & Hukins D.W.L. **(1989)**
Composition and structure of micellar calcium phosphate.
J. Dairy Res., **56**, 411-416.

Huffman L.M. **(1988)**
Effect of heat treatment on the composition of whey protein concentrates.
New Zealand J. Dairy Sci. and Technol., **23**, 337-344.

Jandik P., Jones W.R., Weston A., Brown P.R. **(1992)**
Electrophoretic Capillary Ion Analysis : origins, principles, and applications.
LC-GC Intl 5, 20-27.

Jaubert A. & Martin P. **(1992)**
Reverse phase HPLC analysis of goat caseins : identification of α-s_1 and α-s_2 genetic variants.
Lait, **72**, 235-247.

Jayaprakasha H.M., Patel R.S. & Renner E. **(1994)**
Permeation behaviour of buffalo milk cheddar cheese whey during ultrafiltration.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **198**, 234-238.

Kinsella J.E. **(1976)**
Functional properties of protein in foods : a survey.
CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **4**, 219-280.

Kishihara S., Tamaki H., Fujii S. & Komoto M. **(1989)**
Clarification of technical sugar solutions through a dynamic membrane formed on a porous ceramic tube.
J. Membrane Sci., **41**, 103-114.

Kronman M.J. **(1981)**
Characteristics of binding of calcium and other divalent metal ions to the bovine α-lactalbumin.
J. Biol. Chem., **256**, 8582-8587.

Kronman M.J., Andreotti R. & Vitols R. **(1964)**
Inter- and intramolecular interactions of α-lactalbumin. Aggregation reactions at acid pH.
Biochem., **3**, 1152-1160.

Kuo K.P. & Cheryan M. **(1983)**
Ultrafiltration of acid whey in a spiral wound unit. Effect of operating parameters on membrane fouling.
J. Food Sci., **48**, 1113-1117.

Labbé J.P., Quémerais A., Michel F. & Daufin G. **(1990)**
Fouling of inorganic membranes during whey ultrafiltration : analytical methodology.
J. Membrane Sci., **51**, 293-307.

Lee D.N. & Merson R.L. **(1976)**
Chemical treatments of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes.
J. Food Sci., **41**, 778-786.

Lee D.N. & Merson R.L. **(1976)**
Prefiltration of cottage cheese whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes.
J. Food Sci., **41**, 403-410.

Le Graet Y. & Brulé G. **(1993)**
Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique.
Lait, **73**, 51-60.

Liao S.Y. & Mangino M.E. **(1987)**
Characterization of the composition, physicochemical and functional properties of acid whey protein concentrates.
J. Food Sci., **52**, 1033-1037.

Lin V.J.C & Koening J.L. **(1976)**
Raman studies of bovine serumalbumin.
Biopolymers, 15-23.

Louaileche H., Bracquart P., Saulnier F., Desmazeaud M. & Linden G. **(1993)**
Carbon dioxide effects on growth and metabolites of morphological variants of *Streptococcus thermophilus*.
J. Dairy Sci., **76**, 3683-3689.

Lucey J.A., Gorry C. & Fox P.F. **(1993a)**
Changes in acid-base buffering curves during the ripening of Emmental cheese.
Milchwiss., **48**, 183-186.

Lucey J.A., Gorry C. & Fox P.F. **(1993b)**
The acid-base buffering properties of heated milk.
Milchwiss., **48**, 438-441.

Lucey J.A., Hauth C., Gorry C. & Fox P.F. **(1993c)**
The acid-base buffering properties of milk.
Milchwiss., **48**, 268-272.

Lyster R.L.J. **(1970)**
The denaturation of α-lactalbumin in heated milk.
J. Dairy Res., **37**, 233-243.

Lyster R.L.J. **(1972)**
Reviews of the progress of dairy science. Section C. Chemistry of milk proteins.
J. Dairy Res., **39**, 279-318.

Macritchie F. **(1973)**
Effects of temperature on dissolution and precipitation of proteins and polyamino acids.
J. Colloid Interface Sci., **45(2)**, 235-241.

Madsen H.E. & Thorvardarson G. **(1984)**
Precipitation of calcium phosphate from moderately acid solution.
J. Cryst. Growth, **66**, 369-376.

Marshall K.R. & Harper W.S. **(1988)**
Whey protein concentrates.
Int. Dairy Fed. Bull., **233**, 21-32.

Matthews M.E. **(1978)**
Compositions of rennet, sulphuric and lactic casein wheys and of sulphuric and lactic whey protein concentrates.
New Zealand J. Dairy Sci. and Technol., **13**, 149-156.

Maubois J.L. & Brulé G. **(1982)**
Utilisation des techniques à membrane pour la séparation, la purification et la fragmentation des protéines laitières.
Lait, **62**, 484-510.

Maubois J.L. & Ollivier G. **(1992)**
Milk protein fractionnation.
Bulletin FIL, **9201**, 15-22.

Maubois J.L., Pierre A., Fauquant J. & Piot M. **(1987)**
Industrial fractionation of main whey proteins. Trends in whey utilization.
Int. Dairy Fed. Bull., **212**, 154-159.

Maugas J.J. & Le Magnen C. **(1992)**
Procédé de séparation de protéines de lactosérum et produits obtenus.
Brevet FR 9100035

Maynard F., Pierre A. & Maubois J.L. **(1989)**
Préparation de lactoferrine et d'α-lactalbumine humaines par utilisation de techniques à membranes.
Lait, **69**, 59-69.

Meireles M., Aimar P. & Sanchez V. **(1992)**
Les techniques à membranes : micro et ultrafiltration.
Le Technoscope de Biofutur, **111**, 3-18.

Melachouris N. **(1977)**
Process for recovery of whey protein having improved solution clarity using polyphosphates.
Brevet US.4043990.

Melo T.S. & Hansen A.P. **(1978)**
effect of ultra high temperature steam injection on model systems of α-lactalbumin and β-lactoglobulin.
J. Dairy Sci., **61**, 710-713.

Méréo M. **(1971)**
Les utilisations industrielles du sérum de fromagerie.
Industr. Agric. Alim., **88**, 817-823.

Merin U & Cheryan M. **(1980)**
Factors affecting the mechanism of flux decline during ultrafiltration of cottage cheese whey.
J. Food Process. Preserv., **4**, 183-198.

Merin U & Daufin G. **(1989)**
Proc. 1st Inter. Conf. Inorganic Membranes, 271-282, Montpellier, France.

Merin U & Daufin G. **(1990)**
Cross flow microfiltration in the dairy industry : state of the art.
Lait, **70**, 281-291.

Morr C.V. & Foegeding E.A. **(1990)**
Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates : a status report.
Food Technol., **44(4)**, 100-112.

Moulin G. & Galzy P. **(1984)**
Whey : a potential substrate for biotechnology.
Biotechn. Gen. Eng. Reviews, **1**, 347-374.

Muller L.L. & Harper W.J. **(1979)**
Effects on membrane processing of pretreatments of whey.
J. Agric. Food Chem., **27**, 662-670.

Mulvihill D.M. & Donovan M. **(1987)**
Whey proteins and their thermal denaturation. A review.
Irish J. Food Sci. Technol., **11**, 43-75.

Neuman W.F. & Neuman M.W. **(1953)**
The nature of the mineral phase of bone.
Chem. Rev., **53**, 1-29.

Nyström M. **(1989)**
Fouling of unmodified and modified polysulfone ultrafiltration membranes by ovalbumin.
J. Membrane Sci., **44**, 183-196.

Onorato E. **(1929)**
Uber den Feinbau des Gipses.
Zeitschr. f. Kristallographie, **71**, 277-325.

Park K.H. & Lund D.B. **(1984)**
Calorimetric study of thermal denaturation of β-lactoglobulin.
J. Dairy Sci., **67**, 1699-1706.

Pearce R.J. **(1983)**
Thermal separation of β-lactoglobulin and α-lactalbumin in bovine cheddar cheese whey.
Aust. J. Dairy Technol., **38**, 144-149.

Pearce R.J. **(1987)**
Fractionation of whey proteins.
Int. Dairy Fed. Bull., **212**, 150-153.

Perry R.H. & Green D. **(1984)**
In : *Chemical Engineers Handbook*, 6th Ed., Mac Graw-Hill Book, New-York, U.S.A.

Pessen H., Purcell J.M. & Farrel H.M. **(1985)**
Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β-lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetics variants of a self-associating globular protein.
Biochim. Biophys. Acta, **828**, 1-12.

Pierre A., Brulé G. & Fauquant J. **(1983)**
Etude de la mobilité du calcium dans le lait à l'aide du calcium^{45}.
Lait, **63**, 473-489.

Pierre A. & Fauquant J. **(1986)**
Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines du lactosérum.
Lait, **66**, 405-419.

Pierre A., Le Graet Y., Daufin G., Michel F. & Gésan G. **(1994)**
Whey microfiltration performance : influence of protein concentration by ultrafiltration and physiological pretreatment.
Lait, **74**, 65-77.

Piot M., Vachot J.C., Veaux M., Maubois J.L. & Brinkman G.E. **(1987)**
Ecrémage et épuration bactérienne du lait entier cru par microfiltration sur membrane en flux tangentiel.
La Technique Laitière, **1016**, 42-46.

Pitot P. **(1984)**
Incorporation de lipides de sérum dans des crèmes de consommation : influence sur leurs propriétés fonctionnelles.
Mémoire de fin d'études, ENSFA, Rennes, France.

Pontalier P.Y., Ismail A. & Ghoul M. **(1995)**
Etude de l'influence des conditions opératoires sur la séparation sélective des ions par des membranes de nanofiltration.
I.A.A., **112**, 642-646.

Pouliot Y. & Boulet M. **(1995)**
Observations on the seasonal variations in the salt balance of concentrated milk.
Int. Dairy J., **5**, 75-85.

Pouliot Y., Boulet M. & Paquin P. **(1989a)**
Observations on the heat-induced salt balance changes in milk. 1. Effect of heating time between 40°C and 90°C.
J. Dairy Res., **56(2)**, 185-192.

Pouliot Y., Boulet M. & Paquin P. **(1989b)**
Observations on the heat-induced salt balance changes in milk. 2. Reversibilty on cooling.
J. Dairy Res., **56(2)**, 193-200.

Pouliot Y., Landry J. & Giasson J. **(1991)**
Induction de la précipitation phosphocalcique dans le perméat de lactosérum de fromagerie.
Lait, **71**, 313-320.

Pouliot M., Pouliot Y., Britten M. & Rodrigue N. **(1995)**
Microfiltration de lactosérum doux sur membranes d'alumine : influence des conditions hydrodynamiques sur le colmatage.
Lait, **75**, 117-131.

Pyne G.T. **(1962)**
Reviews of the progress of dairy science. Section C. Dairy chemistry. Some aspects of the physical chemistry of the salts of milk.
J. Dairy Res., **29**, 101-130.

Pyne G.T. & Mac Gann T.C.A. **(1960)**
The colloidal phosphate of milk. II. Influence of citrate.
J. Dairy Res., **27**, 9-17.

Reimerdes E.H. & Lorenzen P.C. **(1983)**
New results about milk emulsifiers.
In : Proceedings of IDF Symposium : Physico-chemical Aspects of Dehydrated Protein-rich Milk Products, Helsingor, Denmark, 70-93.

Roeper J. **(1971)**
Seasonal changes in composition of rennet and acid wheys.
New Zealand J. Dairy Sci. and Technol., **6**, 112-114.

Roetman K. & Buma T.J. **(1974)**
Temperature dependance of equilibrium β/α ration of lactose in aqueuos solution.
Neth. Milk Dairy J., **28**, 155-165.

Roger L., Maubois J.L., Brulé G. & Piot M. **(1979)**
Procédé pour l'obtention à partir de lactosérum d'un produit enrichi en α-lactalbumine et application dudit produit.
Brevet FR 7916482.

Roger L., Maubois J.L., Brulé G. & Piot M. **(1980)**
Produit enrichi en α-lactalbumine, obtention à partir de lactosérum et applications dudit produit.
Brevet EP 80400945.

Roger L., Maubois J.L., Brulé G. & Piot M. **(1990)**
Produit enrichi en α-lactalbumine, obtention à partir de lactosérum et applications dudit produit.
Brevet EP 0022696 B2.

Roger L., Thapon J.L., Maubois J.L. & Brulé G. **(1976)**
Hydrolyse du lactose contenu dans l'ultrafiltrat de lait ou de lactosérum en réacteur enzymatique à membrane.
Lait, **56**, 56-75.

Rolet A. **(1920)**
Les industries annexes de la laiterie, utilisation des sous produits et résidus.
Editions J.B. Baillière, Paris, France, 216-227.

Rose D. **(1965)**
Protein stability problems.
J. Dairy Sci., **48**, 139-146.

Rosenberg M. **(1995)**
Current and future applications for membrane processes in the dairy industry.
Trends Food Sci. Technol., **6**, 12-19.

Ruegg M., Moor V. & Blanc B. **(1977)**
A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate.
J. Dairy Res., **44(3)**, 509-520.

Sanderson W.B. **(1988)**
Utilisation des ingrédients laitiers dans les charcuteries.
Colloque national : "nouvelles utilisations du lait", Quebec, Canada.

Saulnier F., Ferrero F., Bottero J.Y. & Linden G. **(1995)**
Variations de composition et nature de la fraction insoluble des lactosérums industriels.
Lait, **75**, 93-100.

Saulnier F., Schmitt M. & Linden G. **(1992)**
Monitoring of temperature induced shifts of ionic equilibria in milk.
International Ion Chromatography Symposium, Linz, Autriche.

Sawyer W.H., Norton R.S., Nichol L.W. & Mac Kenzie G.H. **(1971)**
Thermodenaturation of bovine β-lactoglobulin-kinetics and the introduction of β-structure.
Biochim. Biophys. Acta, **243**, 19-30.

Schmidt D.G. & Both P. **(1987)**
Studies on the precipitation of calcium phosphate. 1. Experiments in the pH range 5.3 to 6.8 at 25°C and 50°C in the absence of additives.
Neth. Milk Dairy J., **41**, 105-120.

Schmidt D.G., Both P., Visser S., Slangen K.J., Van Rooijen P.J. **(1987)**
Studies on the precipitation of calcium phosphate. 2. Experiments in the pH range 7.3 to 5.8 at 25°C and 50°C in the presence of additives.
Neth. Milk Dairy J., **41**, 121-136.

Schmitt M., Saulnier F., Malhautier L. & Linden G. **(1993)**
Effect of temperature on the salt balance of milk studied by capillary ion electrophoresis.
J. Chrom., **640**, 419-424.

Slack A.W., Amundson C.H. & Hill C.G. **(1986a)**
Foaming and emulsifying characteristics of fractionated whey protein.
J. Food Proces. Preserv., **10**, 81-88.

Slack A.W., Amundson C.H. & Hill C.G. **(1986b)**
Production of enriched α-lactalbumin whey protein fractions.
J. Food Proces. Preserv., **10**, 19-30.

Smith J.P., Lehr J.R. & Brown W.E. **(1955)**
Crystallography of monocalcium and dicalcium phosphates.
Amer. Min., **40**, 893-899.

Sottiez P. **(1985)**
Laits et produits laitiers.
Techn. et Doc. Lavoisier, vol. II, 362-372.

Spector A.A. **(1975)**
Fatty acid binding to plasma albumin.
J. Lipid Res., **169**, 165-179.

Stadhouders J. & Hup G. **(1970)**
Complexity and specificity of euglobulin in relation to inhibition of bacteria and to cream rising.
Neth. Milk Dairy J., **24**, 79-95.

Swaisgood H.E. **(1982)**
Chemistry of milk proteins.
In : Developments in Dairy Chemistry (Fox PF ed). Elsevier Appl Sci Publ, London.

Taddéi C. **(1986)**
Mécanismes influençant le transfert de matière lors de l'ultrafiltration de lactosérum.
Thèse, Univ. Toulouse, France.

Taddéi C., Aimar P., Daufin G. & Sanchez V. **(1986)**
Etude du transfert de matière lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur membrane minérale.
Lait, **66(4)**, 371-390.

Taddéi C., Aimar P., Daufin G. & Sanchez V. **(1988)**
Factors affecting fouling of an inorganic membrane during whey sweet ultrafiltration.
Lait, **68**, 157-176.

Tanimoto M., Kawasaki Y.V.N., Shinmoto H., Dosako S. & Tomizawa A. **(1990)**
Brevet EP 0393850A2

Théodet C. & Gandemer G. **(1990)**
Comparaison de 5 méthodes pour extraire les lipides du lactosérum et de ses dérivés.
Lait, **70**, 41-54.

Théodet C. & Gandemer G. **(1994)**
Devenir des lipides au cours de la clarification du lactosérum.
Lait, **74**, 281-295.

Van Der Horst H.C. **(1989)**
Microfiltration in whey processing.
First International Conference on Inorganic Membrane, Montpellier, France.

Van Der Horst H.C. **(1995)**
Fouling of inorganic membranes during ultrafiltration and reverse osmosis of dairy liquids.
I.D.F. Special issue, **9504**, 36-52.

Van Der Horst H.C. & Hanemaaijer J.H. **(1989)**
Membrane Technology Symposium, 12-14 juin 1989, Tysoland, Suède.

Van Kemenade M.J.J.M. **(1988)**
Influence of casein on precipitation of calcium phosphate.
Thèse de doctorat, Université d'Utrecht, n° 12762054, The Netherlands.

Veisseyre R. **(1979)**
Technologie du lait, 3ème édition, La Maison Rustique, Paris.

Vetier C., Bennasar M. & Tarodo de la Fuente B. **(1986)**
Etude des interactions entre constituants du lait et membranes minérales de microfiltration.
Lait, **66(3)**, 269-287.

Vorndran A.E., Oefner P.J., Schez H. & Bonn G.K. **(1992)**
Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis.
Chromatographia, **33(3/4)**, 163-168.

Vuillemard J.C., Gauthier S. & Paquin P. **(1989)**
Les ingrédients à base de protéines laitières : obtention, propriétés et utilisations.
Lait, **69**, 323-351.

Wasen I. & Lehmann H. **(1989)**
Procédé de déphospholipidation du petit lait.
Brevet FR. 2625649A1.

Webb B.H. **(1972)**
Recycling whey for profitable uses.
American Dairy Review, **34**, 32A-32D.

Wennar V. **(1982)**
L'utilisation des protéines du lait à des fins diéthétiques et thérapeutiques en alimentation humaine.
Lait, **62**, 539-565.

Une partie de ces travaux a fait l'objet des publications suivantes :

Saulnier F., Calco M., Humbert G. & Linden G. (1996)

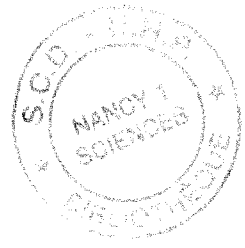
Composition minérale et organique de différents lactosérums acides industriels, analysée par électrophorèse capillaire.

Lait, 76, 423-432.

Calco M., Saulnier F., Linden G. & Maubois J.-L. (1997)

Ultrafiltration de lactosérum industriel : effet du pH sur le transfert des protéines majeures à travers différentes membranes.

Accepté, Lait.



Université HENRI POINCARÉ NANCY 1

FACULTÉ DES SCIENCES

Monsieur **CALCO Michel**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en BIOCHIMIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le - 2 FÉV 1998 n° 123

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I
LE PRÉSIDENT
J.P. FINANCE

3C-F9

RESUME

Les techniques de séparation par membranes sont de plus en plus utilisées pour valoriser les constituants des lactosérums, co-produits de la filière laitière. Une meilleure connaissance de ces techniques de fractionnement, ainsi que le développement de procédés spécifiques à chacun des constituants des lactosérums, contribuent à la recherche de nouvelles voies de valorisations.

Dans cet optique, l'effet d'un paramètre physicochimique important, le pH, a été étudié lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux non clarifié. Les flux de perméation, les niveaux de colmatage et le transfert des protéines majeures (β-lactoglobuline et α-lactalbumine) à travers différentes membranes varient de manière significative selon le pH d'ultrafiltration, mais aussi selon la nature de la membrane. Les différences observées, selon le pH d'ultrafiltration, peuvent notamment s'expliquer par des changements d'hydrophilie, de charge et de polymérisation des protéines, mais aussi par des modifications de solubilisation des sels de phosphate de calcium. Le pH joue par conséquent un rôle déterminant sur les performances des membranes et sur la composition chimique des perméats.

Si la fraction protéique des lactosérums est bien valorisée, peu de travaux portent sur la valorisation de la fraction minérale. Or, les lactosérums acides de fromagerie sont particulièrement riches en calcium et en phosphate, minéraux utilisés notamment dans le secteur des Travaux Publics. Le traitement technologique, mis au point dans cette étude à partir de lactosérum acide de fromagerie à 6% d'extrait sec, permet de précipiter 48% du calcium et 67% du phosphate initial, tout en limitant les pertes en matières azotées et l'augmentation du taux de cendres. La poudre de "phosphate de calcium biologique" obtenue est constituée uniquement de brushite cristallisée ($CaHPO_4$, $2H_2O$), avec une pureté de 85%. Une étape de microfiltration, optimisée à l'échelle "pilote", permet d'accroître cette pureté à 90%. Même s'il reste encore à optimiser l'extraction industrielle de ce sel de phosphate, ces travaux répondent parfaitement au souci et à la nécessité de valorisation de la fraction minérale des lactosérums.

MOTS CLES : Lactosérums industriels / Techniques de séparation sur membrane / Valorisation / Protéines sériques majeures / Transfert / pH / Brushite.