



HAL
open science

Devenir des lipides au cours de la clarification du lactosérum

C Théodet, G Gandemer

► **To cite this version:**

C Théodet, G Gandemer. Devenir des lipides au cours de la clarification du lactosérum. *Le Lait*, 1994, 74 (4), pp.281-295. hal-00929397

HAL Id: hal-00929397

<https://hal.science/hal-00929397>

Submitted on 11 May 2020

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.

Devenir des lipides au cours de la clarification du lactosérum

C Théodet, G Gandemer*

Laboratoire d'étude des interactions des molécules alimentaires, INRA,
BP 527, 44026 Nantes Cedex 03, France

(Reçu le 6 janvier 1994; accepté le 11 avril 1994)

Résumé — Cette étude a pour objet de caractériser les lipides du lactosérum et de 2 coproduits issus de sa délipidation par agrégation thermocalcique des lipoprotéines. À partir d'un lactosérum contenant 0,7% de lipides, il est possible d'obtenir un microfiltrat pratiquement dépourvu de lipides (0,07%) et un précipité enrichi en lipides (2,9%). Les extraits lipidiques du lactosérum et de ces 2 coproduits présentent des caractéristiques très voisines (rapport triglycérides/phospholipides, compositions en acides gras des triglycérides et des phospholipides). Ces résultats indiquent que le procédé n'est pas sélectif vis-à-vis des lipides. Les phospholipides du lactosérum comportent 34% de phosphatidyl-éthanolamine, 31% de phosphatidyl-choline et 15% de sphingomyéline, 12% de phosphatidyl-inositol et 8% de phosphatidyl-sérine. Ces phospholipides sont pauvres en acides gras polyinsaturés quelle que soit la classe considérée (3 à 17%).

lipide / phospholipide / lactosérum / coproduit / délipidation

Summary — *Fate of lipids during whey defatting process.* The aim of the study was to investigate the lipid composition of a whey and two byproducts from its defatting by thermocalcic aggregation of lipoproteins. From a whey containing 0.7% of lipids, two fractions were separated: a microfiltrate with very low lipid content (0.07%) and a precipitate containing 2.9% of lipids. The lipid extracts of these whey fractions show similar lipid composition (triglyceride /phospholipid ratio, triglyceride and phospholipid fatty acid composition). These results indicate that the process exhibits no selective effect on lipid. The whey phospholipids contain 34% of phosphatidyl-ethanolamine, 31% of phosphatidyl-choline and 15% of sphingomyelin, 12% of phosphatidyl-inositol and 8% of phosphatidyl-serine. Whatever the phospholipid class, the polyunsaturated fatty acid proportion is low (3 to 17%).

lipid / phospholipid / whey / byproduct / defatting

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Les lipides ne constituent qu'une faible proportion de la matière sèche des lactosérums (Cerbulis *et al*, 1972 ; Fauquant *et al*, 1985 b). Toutefois, leur présence s'avère préjudiciable à la valorisation des protéines (Maubois *et al*, 1987). En effet, ils se concentrent avec les protéines et s'adsorbent sur les membranes de microfiltration et sur les résines échangeuses d'ions altérant leurs performances. Leur élimination est donc un préalable indispensable à la production de concentrés à haute teneur en protéines et au fractionnement des protéines du lactosérum. C'est pourquoi Fauquant *et al* (1985 a et b) ont développé un procédé industriel qui permet de précipiter les lipides en provoquant leur agrégation avec les protéines en présence de calcium à pH 7,3 sous l'action d'un léger traitement thermique. Par microfiltration, il est possible de séparer un microfiltrat pratiquement exempt de lipides et un rétentat enrichi en lipides appelé concentré lipoprotéique. Cependant, ce procédé reste largement empirique. Au moment où nous avons entrepris cette étude, aucun travail ne permettait de connaître la nature des lipides du lactosérum et leur devenir au cours de la clarification. Très récemment, Baomy *et al* (1990) ont établi que les extraits lipidiques totaux des lactosérums et des concentrés lipoprotéiques contiennent environ un tiers de phospholipides et deux tiers de triglycérides. Toutefois, la caractérisation de la fraction lipidique du lactosérum et de ses coproduits n'était pas assez précise pour qu'il soit possible de se prononcer sur les mécanismes mis en jeu lors de la précipitation des lipides. Pour leur part, Ducruet *et al* (1990) ont déterminé en détail la composition lipidique d'un concentré lipoprotéique. Leurs résultats plaident en faveur d'une nette discrimination des lipides au cours du procédé. En effet, ces auteurs indiquent

que plus de 30% de lipides polaires du concentré lipoprotéique seraient des céramides alors que ces composés sont peu abondants dans le lait (3 à 7% des lipides polaires) (Morrison, 1970 ; Christie *et al*, 1987). À l'inverse, la phosphatidyl-éthanolamine serait peu abondante dans le concentré alors que ce phospholipide est un constituant majeur des lipides polaires du lait (8 à 9% contre 25 à 30%) (Jensen, 1973 ; Christie *et al*, 1987). Malheureusement, l'absence totale de données sur la composition lipidique du lactosérum utilisé pour produire le concentré interdit de conclure de manière définitive à une sélectivité du procédé de clarification du lactosérum vis-à-vis des lipides.

Cette étude a pour objet de suivre le devenir des lipides du lactosérum au cours de la clarification pour tenter d'en comprendre le mécanisme en comparant la composition lipidique d'un lactosérum et des 2 coproduits issus de sa clarification suivant le procédé de Fauquant *et al* (1985 a et b). Ce travail a été complété par une caractérisation précise des phospholipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique pour en évaluer les possibilités de valorisation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des matières premières

Un lactosérum issu de la fabrication d'emmental a subi une clarification par précipitation thermocalcique des « phospholipoprotéines » selon le procédé de Fauquant *et al* (1985 a,b). Une microfiltration tangentielle a permis la séparation du précipité (concentré lipoprotéique) de la fraction soluble (microfiltrat); 25 l de lactosérum, de concentré lipoprotéique et de microfiltrat ont été collectés. Les 3 fractions n'ont été ni déminéralisées ni délactosées. Pour permettre leur conservation, elles ont été additionnées d'azide de

sodium (0,02%) et lyophilisées dans un appareil de laboratoire Virtis. Les lyophilisats sont conservés dans des flacons opaques à 4°C.

Dosage des constituants non lipidiques

Cendres

La teneur en cendres est déterminée par minéralisation de 6 g de matière sèche à 600°C pendant une nuit. Elle est exprimée en g/100 g de matière sèche.

Azote

L'azote total est quantifié selon la méthode Kjeldahl. La teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote par 6,38. Elle est exprimée en g/100 g de matière sèche.

Lactose et oses libres

Les oses ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés acétates d'alditol. Ces dérivés sont préparés suivant la méthode de Blakeney *et al* (1983). Le mode opératoire a été appliqué directement aux échantillons pour quantifier les oses libres. Une seconde opération a été effectuée sur les échantillons préalablement hydrolysés pendant 2 h à 100°C par l'acide sulfurique 2N pour quantifier les oses totaux. La proportion de lactose est calculée par différence entre ces 2 mesures. L'analyse est réalisée sur une colonne remplie (0,22 cm x 180 cm) contenant une phase stationnaire polaire (SP-2340). Elle est placée dans un chromatographe Girdel muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur. La température du four est maintenue constante à 225°C et celles de l'injecteur et du détecteur à 250°C. La pression du gaz vecteur (azote) est de 1,8 bar. L'intégration des pics est réalisée à l'aide d'un intégrateur Shimadzu (CR3A). Les oses sont quantifiés par rapport à l'inositol ajouté comme étalon interne. Les résultats sont exprimés en g/100 g de matière sèche.

Caractérisation de la fraction lipidique

Extraction des lipides

Elle est réalisée suivant la méthode de Clark *et al* (1982). Les avantages de cette méthode ont été décrits dans un travail précédent, qui avait permis de comparer 5 méthodes d'extraction des lipides du lactosérum et d'un concentré lipoprotéique (Théodet et Gandemer, 1991)

Cinq à 10 g de lyophilisat de lactosérum, de microfiltrat ou de concentré lipoprotéique sont préalablement réhydratés pour permettre l'extraction quantitative des lipides. Cette opération est réalisée en ajoutant 20 ml d'eau à 10 g de lyophilisat, puis en agitant le mélange pendant environ 2 h, à l'aide d'un agitateur magnétique. Les échantillons sont transvasés dans une ampoule à décanter et additionnés du mélange solvant dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v) à raison de 9 volumes de solvant pour un volume d'échantillon. Après une nuit de décantation à 4°C, la phase inférieure est soutirée. La phase supérieure est reprise par du mélange dichlorométhane/méthanol (4/1, v/v) à raison de 8 volumes de solvant pour un volume d'échantillon. Après décantation, la phase inférieure est soutirée. Les 2 phases inférieures sont regroupées et lavées avec une solution saline à 0,6% de NaCl (1 volume de solution saline pour 5 volumes de solvant). La phase inférieure est filtrée sur sulfate de sodium anhydre. Les solvants sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis sous un léger courant d'azote. Les extractions sont effectuées en double. La teneur en lipides est déterminée par pesée et exprimée en g/100 g de matière sèche.

Fractionnement de l'extrait lipidique total en lipides neutres et polaires

L'extrait lipidique est fractionné en lipides neutres et polaires sur cartouche de silice (Sep-pack, Waters SA) selon la méthode de Juaneda et Rocquelin (1985). Les lipides neutres sont élués par du chloroforme, puis sont quantifiés par pesée. Les phospholipides sont élués par le méthanol ; ils sont quantifiés par dosage du phosphore directement dans l'extrait lipidique total selon la méthode de Bartlett (1959). La teneur en phospholipides est calculée en multi-

pliant le taux de phosphore lipidique par le coefficient 25.

Les teneurs en lipides neutres et phospholipides sont exprimées en g/100 g de matière sèche.

Fractionnement des phospholipides en classes

Le fractionnement en classes des phospholipides est réalisé par chromatographie liquide haute pression. L'appareil comprend 2 pompes, un amortisseur de pulsation, une chambre de mélange et une vanne d'injection rhéodyne équipée d'une boucle de 20 μ l. Il est piloté par un Apple IIe. Les colonnes sont en acier et remplies de silice (Lichrospher, 5 μ m). Les phospholipides sont détectés à l'aide d'un détecteur à diffusion de lumière (DDL 10, Cunow) relié à un système d'intégration Nelson. Les conditions optimales de fonctionnement du détecteur pour la quantification des phospholipides ont été déterminées antérieurement (Leseigneur *et al*, 1989). Elles sont les suivantes : pression du gaz de nébulisation, 2,2 bars ; pression du gaz auxiliaire, 0,5 bar ; température de nébulisation du solvant 40°C. Dans ces conditions opératoires, la réponse du détecteur est une fonction linéaire de la concentration dans une gamme comprise entre 5 et 200 μ g de phospholipides par pic.

L'élution des phospholipides fait appel à un gradient de solvants. Les phases mobiles A et B sont composées respectivement de chloroforme pur et du mélange méthanol/eau/ammoniaque/chloroforme (92:5:2:1, v/v/v/v).

La détermination de la composition en phospholipides est réalisée avec une colonne analytique en acier de 25 cm de long et de 0,4 mm de diamètre interne contenant de la silice (Superspher, SI-60, 5 μ m). L'élution des phospholipides est complète en 20 min. La proportion de solvant B passe de 0% à 20% en 10 min puis de 20% à 100% en 10 min. Le débit de la phase mobile est de 1,5 ml/min. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la surface des phospholipides totaux ou en mg/100 g de matière sèche.

Pour déterminer la composition en acides gras de chaque classe de phospholipides, il est nécessaire de disposer d'au moins 0,1 mg de lipides. C'est pourquoi nous avons eu recours à une colonne semi-préparative de 30 cm de long

et de 7,5 mm de diamètre interne contenant de la silice (Lichrospher, SI-60- 5 μ m). Les quantités de phospholipides injectés variaient de 2 à 5 mg. Le débit de la phase mobile est de 3,5 ml/min. Les phospholipides sont élués en 60 min. Une vanne placée en sortie de colonne permet de diviser le flux et de collecter environ les trois quarts des phospholipides injectés.

Composition en acides gras

La composition en acides gras des fractions est déterminée par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters isopropyliques ou méthyliques.

Les esters isopropyliques sont préparés selon la méthode de Wolff et Fabien (1989). Cette méthode a été utilisée pour déterminer la composition en acides gras des lipides totaux, neutres et polaires. En effet, ces esters présentent l'avantage de faciliter la quantification des acides gras à chaîne courte puisque ces esters présentent des coefficients de réponse proches de 1 quelle que soit leur longueur de chaîne.

Les phospholipides ne contenant que des acides gras à 10 atomes de carbone et plus, la détermination de leur composition en acides gras ne nécessite pas la préparation d'esters isopropyliques. C'est pourquoi la composition en acides gras des principales classes de phospholipides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques, technique classiquement utilisée au laboratoire. Les esters méthyliques sont préparés par transestérification des phospholipides dans le méthanol / BF₃ à 14% suivant la technique de Morrison et Smith (1964).

La chromatographie des esters est réalisée à l'aide d'un chromatographe DANI 6500 (Stang Instruments, France) équipé d'un injecteur PTV et d'un détecteur à ionisation de flamme. Il est connecté à un intégrateur ENICA 21 (Delsi Instrument, France). Une colonne capillaire en silice fondue de 30 m de longueur et 0,32 mm de diamètre interne contenant une phase stationnaire polaire (polyéthylène glycol) a été utilisée (Superox II, Alltech). L'injection est réalisée en mode division (1/50^e). La température du four est maintenue 4 min à 150°C, puis programmée à 5°C/min jusqu'à 180°C où elle est stabilisée jusqu'à la fin de l'analyse. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 250°C. La pres-

sion du gaz vecteur en tête de colonne (hydrogène) est de 0,6 bar.

Les esters ont été identifiés par couplage spectrométrie de masse-chromatographie en phase gazeuse (HP 5971A-HP 5890II, Hewlett-Packard). Les conditions opératoires sont les suivantes : ionisation par impact électronique à 70 eV, vitesse d'acquisition des spectres de 1,5 scan/s sur une gamme de masse de 33 à 400 uma. La composition en acides gras est exprimée en pourcentage des surfaces des esters injectés.

Dosage du cholestérol

La teneur en cholestérol total est déterminée par chromatographie en phase gazeuse de son dérivé TMS. La technique utilisée s'inspire directement de celle de Mordret *et al* (1984). Les modifications apportées ont trait à la quantité de lipides mis en oeuvre (réduction à moins de 30 mg) et au choix de l'étalon interne (cholestane au lieu du cholestanol). La chromatographie est menée à l'aide d'un chromatographe GIRDEL 300C muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur diviseur (split/splitless). L'analyse est pratiquée sur une colonne capillaire de silice fondue de 10 m de longueur et 0,32 mm de diamètre interne contenant une phase stationnaire peu polaire (SE 52, Chrompack). La température du four est maintenue constante à 290°C, les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 300°C. La pression du gaz vecteur (hydrogène) est de 0,7 bar. Le coefficient de réponse du cholestérol par rapport au cholestanol a été évalué à 1,1. La teneur en cholestérol est

exprimée en mg/100 g de matière sèche ou en pourcentage des lipides totaux.

RÉSULTATS

Comparaison de la composition chimique du lactosérum et de ses 2 coproduits

Les oses représentent au moins la moitié de l'extrait sec (52-75%), quelle que soit la fraction considérée (tableau I). Ce résultat est logique puisque les échantillons ne sont pas délactosés. La recherche d'oses libres n'a pas permis de révéler leur présence dans le lactosérum. En revanche, dans le concentré lipoprotéique, ils représentent 13% de l'extrait sec. Ce sont du galactose (8%), du glucose (5%) et de l'arabinose (traces). Leur origine est difficile à expliquer. En effet, le rapport galactose/glucose est de 1,6. Par conséquent, ces oses ne peuvent pas provenir de la seule hydrolyse du lactose. Ils pourraient provenir en partie de l'hydrolyse des glycoprotéines ou des glycolipides.

Les minéraux représentent 8,2 et 10,7% de la matière sèche du lactosérum et du microfiltrat, respectivement. Le concentré lipoprotéique en contient une proportion

Tableau I. Composition chimique du lactosérum, du microfiltrat et du concentré lipoprotéique (en g/100 g de matière sèche).

Chemical composition of whey, microfiltrate and lipoprotein precipitate (in g/100 g of dry matter).

	Lactosérum	Microfiltrat	Concentré lipoprotéique
Oses	74	75	52
Protéines (N x 6,38)	16,4	13,7	21,8
Minéraux	8,2	10,7	22,4
Lipides	0,7	0,1	2,9
Protéines/lipides	23	137	8

nettement plus élevée (22,4%). Ce résultat est la conséquence de l'ajout du CaCl_2 , mais également de la coprécipitation d'une partie des ions phosphate lors du procédé de clarification.

Le taux de protéines du lactosérum (16,4%) est intermédiaire entre celui du microfiltrat (13,7%) et celui du concentré lipoprotéique (21,8%).

À l'aide des données relatives aux volumes de concentré lipoprotéique et de microfiltrat obtenus lors de la clarification de 100 l de lactosérum, nous avons pu effectuer le bilan matière pour chaque constituant (tableau II). 100 l de lactosérum conduisent à la production de 84 l de microfiltrat (6/7 du volume initial) et de 16 l de concentré lipoprotéique (1/7). Le bilan matière montre que le lactose initialement contenu dans le lactosérum se retrouve essentiellement dans le microfiltrat (85%), alors que seulement 13% de ce composé sont retenus dans le concentré lipoprotéique. En effet, le lactose est une molécule à très faible poids moléculaire qui franchit les pores des membranes de microfiltration. Les pertes en lactose au cours du procédé sont minimales (2%). La quantité de protéines précipitées dans le concentré lipoprotéique représente environ 24% des protéines initialement contenues dans le lactosérum, la

majorité des protéines se retrouvant dans le microfiltrat (70%). La perte globale en protéines est évaluée à 6%.

Les lipides représentent respectivement 0,7%, 0,07% et 2,9% de la matière sèche du lactosérum, du microfiltrat et du concentré lipoprotéique. Le rapport protéines/lipides très élevé (137) dans le microfiltrat montre clairement que le procédé de clarification élimine une grande partie des lipides du lactosérum (tableau I); 74% des lipides du lactosérum se retrouvent dans le concentré lipoprotéique qui présente un rapport protéines/lipides 3 fois moins élevé que celui observé dans le lactosérum (8 au lieu de 23). Il faut souligner que 18% des lipides sont perdus au cours de la clarification.

Les proportions relatives de lipides neutres et de phospholipides dans les extraits lipidiques du lactosérum, du concentré lipoprotéique et du microfiltrat sont très voisines. Les lipides neutres représentent de 58 à 62% de l'extrait lipidique et les phospholipides de 38 à 42% (tableau III).

La teneur en cholestérol du lactosérum est de 18 mg/100 g de matière sèche alors que celle du concentré lipoprotéique est de 71 mg/100 g. Toutefois, exprimée en g/100 g de lipides totaux, la proportion de

Tableau II. Devenir des principaux constituants du lactosérum au cours du procédé de clarification.
The fate of the main whey components during whey defatting process.

	Lactosérum (100 l)	Microfiltrat (84 l)	Concentré lipoprotéique (16 l)
Matière sèche (g)	6620	5564	1190
Oses (g)	4899	4173	619
Protéines (N x 6,38) (g)	1086	762	260
Minéraux (g)	543	595	266
Lipides (g)	46,3	4,0	34,5

cholestérol dans l'extrait lipidique est comparable dans les deux fractions (2,5%) (tableau III). La faible quantité de lipides extraits du microfiltrat n'a pas permis de mesurer le taux de cholestérol de cette fraction.

Les compositions en acides gras de l'extrait lipidique total du lactosérum, du concentré lipoprotéique et du microfiltrat sont comparables (tableau IV). La proportion d'acides gras saturés est élevée (69,7–72,1%). Les acides gras à chaîne courte (4:0 à 8:0) représentent 2,4–3,2%, ceux à chaîne moyenne (10:0 à 15:0) 17,8 à 19,6% et ceux à chaîne longue (16:0 à 24:0) 46,2 à 46,9%. Les acides gras saturés majeurs sont l'acide palmitique (29,1–32,2%) et l'acide stéarique (11,6–14,3%). Il faut souligner la présence de 1,7 à 2,9% d'acides gras saturés à très longue chaîne (22, 23, et 24 atomes de carbone). Les acides gras ramifiés caractéristiques des lipides des ruminants sont présents à des taux de 2,4–3,1%. Ce sont principalement les iso et anteiso 15 (0,7–1,1%) et les iso et anteiso 17 (1,2–1,7%), les iso 16 et iso 18 sont présents à des teneurs inférieures à 0,6%. Le taux d'acides gras monoinsaturés

est de 24,1–25,3%. L'acide oléique est l'acide gras monoinsaturé le plus abondant (18,8–19,5). Il est accompagné de 2,1 à 2,2% d'acide cis-vaccénique, de 0,6–0,8% d'acide myristoléique (14:1) et de 0,9 à 1,6% d'acide palmitoléique (16:1 n–7). Les acides gras polyinsaturés sont en quantité faible (3,8–5,0%). Ce sont essentiellement de l'acide linoléique (3,0–4,1%) et de l'acide linoléique (0,8–1,0%). L'acide arachidonique est présent à l'état de traces.

Cette composition en acides gras de l'extrait lipidique total du lactosérum et de ses deux co-produits est voisine de celle des triglycérides (tableau V).

Phospholipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique

Dans le lactosérum et le concentré lipoprotéique, les lipides polaires représentent environ un tiers de l'extrait lipidique total. Ce sont essentiellement des phospholipides. Les céramides ne sont présents qu'en très faible proportion (< 1%). Les proportions relatives des principales classes de phospholipides sont similaires dans le lactosérum et le concentré lipoprotéique (tableau

Tableau III. Composition lipidique du lactosérum, du microfiltrat et du concentré lipoprotéique.
Lipid composition of whey, microfiltrate and lipoprotein precipitate.

	Lactosérum	Microfiltrat	Concentré lipoprotéique
Lipides totaux ¹	730	70	2900
Lipides neutres (LN) ¹	400	40	1800
Lipides polaires (LP) ¹	330	30	1100
LN/LP ²	1,2	1,2	1,5
Cholestérol ²			
1	18	—	71
2	2,5	—	2,5

1: mg/100 g de matière sèche; 2: pourcentage de l'extrait lipidique total.

Tableau IV. Composition en acides gras des lipides totaux du lactosérum, du microfiltrat et du concentré lipoprotéique (en % des esters isopropyliques).*Fatty acid composition of total lipid extract of whey, microfiltrate and lipoprotein precipitate (in % of isopropyl esters).*

Acides gras	Lactosérum	Microfiltrat	Concentré lipoprotéique
4:0	0,9	1,0	1,0
6:0	0,7	0,6	0,4
8:0	1,0	1,6	1,0
10:0	2,2	2,8	3,1
12:0	3,3	3,8	3,4
14:0	10,8	11,4	10,6
15:0	1,5	1,6	1,3
16:0	29,3	32,2	29,1
17:0	0,8	1,2	0,8
18:0	12,8	11,6	14,3
20:0	0,4	0,2	0,3
22:0	1,1	0,6	1,0
23:0	1,0	0,6	1,2
24:0	0,8	0,5	0,6
Saturés linéaires	66,6	69,7	68,1
iso 15	0,5	0,3	0,4
ante iso 15	0,7	0,4	0,6
iso 16	0,4	—	0,4
iso 17	0,7	0,7	0,6
ante iso 17	0,7	1,0	0,6
iso 18	0,1	—	0,2
Saturés ramifiés	3,1	2,4	2,8
Saturés totaux (S)	69,7	72,1	70,9
14:1	0,8	0,8	0,6
16:1 n-9	1,4	1,0	1,4
16:1 n-7	1,3	0,9	1,0
17:1	0,1	—	0,2
18:1 n-9	19,5	19,3	18,8
18:1 n-7	2,2	2,1	2,2
Mono-insaturés	25,3	24,1	24,2
18:2 n-6	4,0	3,0	4,1
18:3 n-3	1,0	0,8	0,8
Polyinsaturés (P)	5,0	3,8	4,9
P/S	0,07	0,05	0,07

Tableau V. Composition en acides gras des triglycérides et des phospholipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique (en % des esters isopropyliques).
Fatty acid composition of triglycerides and phospholipids of whey and lipoprotein precipitate (in % of isopropyl esters).

Acides gras	Lactosérum		Concentré lipoprotéique	
	Triglycérides	Phospholipides	Triglycérides	Phospholipides
4:0	1,1	—	1,0	—
6:0	0,6	—	0,7	—
8:0	1,3	—	1,6	—
10:0	4,4	0,5	4,7	0,6
12:0	5,4	1,2	5,3	1,3
14:0	15,4	6,5	14,5	6,6
15:0	1,7	1,2	1,6	1,4
16:0	32,5	24,5	33,0	25,0
17:0	0,7	0,6	0,8	0,7
18:0	11,0	12,8	11,3	13,0
20:0	—	0,4	—	0,3
22:0	—	2,5	—	2,1
23:0	—	2,7	—	2,5
24:0	—	1,8	—	1,2
Saturés linéaires	74,1	54,7	74,5	54,7
iso 15	0,6	0,3	0,6	0,4
ante iso 15	0,8	0,5	0,7	0,5
iso 17	0,7	0,5	0,8	0,6
ante iso 17	0,6	0,5	0,7	0,6
Saturés ramifiés	2,7	1,8	2,8	2,1
Saturés totaux (S)	76,8	56,5	77,3	56,8
14:1	1,1	1,1	1,0	0,6
16:1 n-9	1,5	1,3	1,5	1,4
16:1 n-7	1,3	0,5	1,2	1,4
17:1	0,2	—	0,5	0,4
18:1 n-9	14,4	28,9	13,5	28,7
18:1 n-7	2,2	2,1	2,3	2,1
Mono-insaturés	20,7	34,0	20,0	34,6
18:2 n-6	1,9	7,1	2,0	6,2
18:3 n-3	0,6	0,7	0,7	1,2
20:3 n-6	—	0,9	—	0,6
20:4 n-6	—	0,8	—	0,6
Polyinsaturés (P)	2,5	9,5	2,7	8,6
P/S	0,03	0,17	0,03	0,15

VI). Les phospholipides les plus importants sont la phosphatidyl-éthanolamine (PE) (31–34% des phospholipides totaux), la phosphatidyl-choline (PC) (30–31%), la sphingomyéline (15–18%), le phosphatidyl-inositol (PI) (12%) et la phosphatidyl-sérine (PS) (8–9%). Les cardiolipides sont absents.

Comparativement à l'extrait lipidique total, les phospholipides présentent une proportion d'acides gras saturés moins élevée (56,5–56,8%). Ils sont exempts d'acides gras à courte chaîne et contiennent peu d'acides gras à chaîne moyenne. Par contre, les acides gras saturés à longue chaîne (22:0, 23:0 et 24:0) représentent 5,8–7,0%. Le taux d'acides gras ramifiés est d'environ 2%. Les acides gras mono-insaturés (34,0–34,6%) sont essentiellement représentés par l'acide oléique (31,0–30,8%). La teneur en acides gras

polyinsaturés est de 8,6 à 9,5%, soit 4 fois plus élevée que dans les triglycérides. L'acide gras polyinsaturé majeur est l'acide linoléique (6,2–7,1%). L'acide linoléique (18:3 n-3), l'acide eicosatrienoïque (20:3 n-6) et l'acide arachidonique (20:4 n-6) sont peu abondants (0,6 à 1,2%) (tableau V).

Les classes de phospholipides issues du lactosérum et du concentré lipoprotéique ont des compositions en acides gras voisines (tableau VII). La PE apparaît comme le phospholipide le plus insaturé. Le taux d'acides gras saturés est inférieur à 30%. Les acides gras mono-insaturés, essentiellement l'acide oléique, représentent environ 56%. La teneur en acides gras polyinsaturés est de 14,5 à 17,4% suivant la fraction considérée. L'acide linoléique est l'acide gras polyinsaturé majeur (10,9 à 13,7%) alors que l'acide linoléique représente de 2,1 à 2,4%, le 20:3 n-6 de 0,6 à 0,7% et

Tableau VI. Composition en phospholipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique. *Phospholipid distribution in whey and lipoprotein precipitate.*

	Lactosérum	Concentré lipoprotéique
en mg/100g de matière sèche		
PE	112	341
PI	40	134
PS	26	97
PC	102	330
SPH	50	198
Pourcentage des phospholipides totaux		
PE	34	31
PI	12	12
PS	8	9
PC	31	30
SPH	15	18

PE : phosphatidyl-éthanolamine; PI : phosphatidyl-inositol; PS : phosphatidyl-sérine; PC : phosphatidyl-choline; SPH : sphingomyéline.

Tableau VII. Composition en acides gras des principales classes de phospholipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique (en % des esters méthylliques).*Fatty acid composition of the main phospholipid classes of whey and lipoprotein precipitate (in % of isopropyl esters).*

Acides gras	PE	PI	PS	PC	SPH
<i>Lactosérum</i>					
14:0	1,5	1,0	—	3,1	1,7
15:0	0,4	0,5	—	1,2	0,9
16:0	13,4	24,1	10,7	35,6	47,1
17:0	0,8	0,9	—	0,9	—
18:0	13,0	22,4	21,1	13,2	10,7
20:0	—	—	—	—	—
22:0	—	—	—	—	8,4
23:0	—	—	—	—	7,9
24:0	—	—	—	—	3,2
Saturés	29,1	48,9	31,8	54,0	79,9
16:1	2,4	1,9	—	2,1	1,0
17:1	0,3	1,0	—	—	—
18:1	53,7	36,9	54,6	34,5	15,4
Mono-insaturés	56,4	38,8	54,6	36,4	16,4
18:2 n-6	10,9	9,3	11,8	7,6	2,9
18:3 n-3	2,1	0,6	1,8	1,3	0,8
20:3 n-6	0,7	—	—	—	—
20:4 n-6	0,8	—	—	—	—
Polyinsaturés	14,5	11,2	13,6	8,9	3,7
<i>Concentré lipoprotéique</i>					
14:0	0,9	2,2	—	3,8	1,5
15:0	0,3	—	—	1,5	0,7
16:0	12,7	22,4	7,5	42,0	46,7
17:0	0,8	1,0	1,0	0,8	1,3
18:0	12,4	24,4	24,8	12,6	10,4
20:0	—	—	—	—	1,0
22:0	—	—	—	—	11,1
23:0	—	—	—	—	9,5
24:0	—	—	—	—	3,0
Saturés	27,1	50,0	33,3	60,7	85,2
16:1	1,8	2,6	1,5	1,7	1,4
17:1	0,5	—	—	0,7	—
18:1	53,2	41,9	53,3	30,5	10,8
Mono-insaturés	55,5	44,5	54,8	33,1	12,2
18:2 n-6	13,7	5,5	9,9	5,3	2,3
18:3 n-3	2,4	—	1,9	1,1	0,3
20:3 n-6	0,6	—	—	—	—
20:4 n-6	1,0	—	—	—	—
Polyinsaturés	17,4	5,5	11,8	6,4	2,6

PE: phosphatidyl-éthanolamine; PI: phosphatidyl-inositol; PS phosphatidyl-sérine; PC: phosphatidyl-choline; SPH: sphingomyéline.

l'acide arachidonique atteint pratiquement 1%. La PC est peu insaturée. Elle possède une forte proportion d'acides gras saturés (54,0 à 60,7%). Le taux d'acides gras mono-insaturés est de 33,1 à 36,4%. Les acides gras polyinsaturés représentent de 6,4 à 8,9%. Ce sont le 18:2 n-6 (5-7%) et le 18:3 n-3 (1,1-1,3%). La sphingomyéline est le plus saturé des phospholipides. Les acides gras saturés représentent de 79,9 à 85,2%. L'acide gras saturé majeur est le 16:0 (46,7-47,1%). On note la présence d'acides gras à chaîne longue en 22:0, 23:0 et 24:0 en quantité importante. Le 22:0 représente de 8,4 à 11,1%, le 23:0 de 7,9 à 9,5% et le 24:0 3,0-3,2%. Les taux d'acides gras mono-insaturés et d'acides gras polyinsaturés sont respectivement de 12,2 à 16,4% et de 2,6 à 3,7%.

La PS apparaît un peu plus insaturée que le PI. Le PI contient 48,9-50,0% d'acides gras saturés, 38,8-44,5% d'acides gras mono-insaturés et 5,5-11,2% d'acides gras polyinsaturés. La PS contient 31,8-33,3% d'acides gras saturés, 54,6-54,8% d'acides gras mono-insaturés et 11,8-13,6% d'acides gras polyinsaturés.

DISCUSSION

Devenir des lipides au cours de la clarification du lactosérum

Les compositions chimiques du lactosérum et de ses dérivés (concentré lipoprotéique et microfiltrat) sont comparables à celles rapportées antérieurement par Fauquant *et al* (1985a et b) et Baomy *et al* (1990). Ces résultats confirment que le procédé de clarification proposé par Fauquant *et al* (1985a et b) élimine une grande partie des lipides du lactosérum puisque les trois quarts des lipides initialement présents dans le lactosérum se retrouvent dans le concentré lipo-

protéique et que seulement 8% restent dans le microfiltrat. Cependant, si le concentré est une fraction très enrichie en lipides, elle contient 7 fois plus de protéines que de lipides confirmant les travaux de Baomy *et al* (1990) ; 18% des lipides du lactosérum sont perdus au cours du procédé. Baomy *et al* (1990) soulignent qu'une partie des lipides est éliminée lors de l'épuration bactérienne qui précède la clarification. Le reste des lipides se fixerait sur la membrane lors de la séparation microfiltrat / concentré lipoprotéique. Cette adsorption des lipides sur la membrane serait une des causes possibles de la réduction du débit de perméat lors de la microfiltration.

Nos résultats montrent que les lipides du lactosérum et du concentré lipoprotéique se composent d'environ deux tiers de triglycérides et un tiers de lipides polaires confirmant les données publiées par Baomy *et al* (1990) sur le lactosérum et plusieurs de ses coproduits et par Ducruet *et al* (1990) sur un concentré lipoprotéique. Les compositions des fractions phospholipidiques du lactosérum et du concentré lipoprotéique rapportées dans ce travail sont voisines de celles publiées par ces mêmes auteurs. Toutefois, selon nos résultats, ces lipides polaires sont pratiquement exclusivement composés de phospholipides, les céramides n'étant présents qu'en très faible proportion (moins de 2% de lipides polaires). Si Baomy *et al* (1990) ne signalent pas la présence de céramides dans la fraction lipides polaires, Ducruet *et al* (1990) indiquent qu'ils représentent plus d'un tiers des lipides polaires du concentré lipoprotéique. C'est pourquoi nous avons recherché de façon plus spécifique la présence de céramides dans nos échantillons. En procédant à une extraction des lipides selon la méthode de Marmer et Maxwell (1981) comme l'avaient fait Ducruet *et al* (1990) et en déterminant les temps d'élution du lactosyl-céramide et du glucosyl-céramide dans

nos conditions chromatographiques à l'aide de standards, nous n'avons observé que des pics mineurs au temps d'élution de ces composés. Par conséquent, l'explication de l'importante différence entre nos résultats et ceux de Ducruet *et al* (1990) est à rechercher dans les difficultés de séparation et d'identification des classes de lipides polaires en couche mince. En effet, parallèlement à cette forte proportion de céramides mono et dihexosides (34%), Ducruet *et al* (1990) n'ont mis en évidence qu'une faible proportion de PE (9% de lipides polaires). Or, tous les travaux publiés à ce jour donnent des proportions inverses dans les produits laitiers (30 à 35% de PE et 1 à 8% de céramides) (Morrison, 1970; Jensen, 1973 ; Christie *et al*, 1987). Par ailleurs, Ducruet *et al* (1990) indiquent que les spots de PE et de céramides di-hexosides sont inversés sur la plaque par rapport aux positions décrites dans les travaux de Morrison *et al* (1965), qui avaient pourtant utilisé le même système de solvant. Cet ensemble d'observations nous conduit à penser que les céramides sont peu abondants dans le lactosérum et ses dérivés.

Sur la base des paramètres lipidiques considérés dans cette étude, il est possible de conclure que les compositions lipidiques du lactosérum et du concentré lipoprotéique sont similaires et, par conséquent que le procédé de clarification du lactosérum par agrégation thermocalcique n'exerce aucune ségrégation au sein de la fraction lipidique.

Bien que cette étude ne fournisse pas d'information directe sur les mécanismes de la clarification, elle permet de formuler l'hypothèse que la clarification du lactosérum résulterait d'une simple agrégation des globules gras de petites tailles avec les protéines sériques en présence du calcium et sous l'effet du traitement thermique. Le premier élément qui supporte cette hypothèse est la valeur comparable du rapport triglycérides / phospholipides des extraits lipidiques

du concentré lipoprotéique et du lactosérum dont il est issu (deux tiers de triglycérides, un tiers de phospholipides). Le second réside dans le fait que ce ratio est proche de celui observé dans le lait écrémé et le lactosérum (Huang et Kuksis, 1967) dans lesquels les lipides se trouvent sous forme de petites vésicules (petits globules gras et/ou fragments membranaires) (Patton et Jensen, 1975 ; Pitot, 1984).

Phospholipides du lactosérum

Outre la clarification du lactosérum, le procédé développé par Fauquant *et al* (1985a, b) permet l'obtention d'une fraction enrichie en lipides. Si le concentré lipoprotéique contient peu de lipides (3% de la matière sèche), il serait possible d'accroître la teneur en lipides de façon très simple en éliminant les minéraux et le lactose par diafiltration. Un tel procédé a déjà été utilisé et permet d'obtenir des concentrés lipoprotéiques contenant jusqu'à 25% de lipides (Baumy *et al*, 1990). La mise en œuvre d'une telle technologie suppose que les concentrés trouvent une valorisation originale.

Les phospholipides du lactosérum et du concentré se composent principalement de phosphatidyl-éthanolamine (30-34%), de phosphatidyl-choline (30-31%), de sphingomyéline (15-18%), de phosphatidyl-inositol (12%) et de phosphatidyl-sérine (8-9%). Cette répartition en classes des phospholipides est typique des produits laitiers (Jensen, 1973 ; Christie *et al*, 1987). Toutefois, la proportion de sphingomyéline dans le lactosérum et le concentré lipoprotéique de cette étude est légèrement inférieure à celle mesurée par d'autres auteurs dans des produits comparables (Baumy *et al*, 1990 ; Ducruet *et al*, 1990) ou dans le lait (Jensen, 1973 ; Christie *et al*, 1987) (15-18% au lieu de 25-35%).

La composition en acides gras des phospholipides se caractérise par l'absence d'acides gras à chaîne courte et une teneur faible en acides gras polyinsaturés (8 à 9%). Ces phospholipides ne contiennent pratiquement pas d'acides gras polyinsaturés à chaîne longue. La PE est le phospholipide le plus insaturé alors que la sphingomyéline est très saturée (80 à 85% des acides gras totaux). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés antérieurement sur les phospholipides du lait (Morrison, 1970 ; Jensen, 1973) et des concentrés lipoprotéiques (Ducruet *et al*, 1990). Cependant, comparativement à nos résultats, Ducruet *et al* (1990) ont mis en évidence une proportion beaucoup plus élevée d'acides gras saturés à chaîne longue dans la sphingomyéline du concentré lipoprotéique. Cette différence pourrait être la conséquence d'une méthylation incomplète de ces acides gras dans nos conditions opératoires (1 h à 100°C). En effet, Ducruet *et al* (1990) ont procédé à une méthylation de 14 h à 90°C en présence de méthanol / BF₃.

Comparativement aux autres sources de phospholipides disponibles sur le marché, les phospholipides du lait tirent leur originalité de la présence d'une proportion importante de sphingomyéline et de leur faible proportion en acides gras polyinsaturés.

Si ce faible taux d'acides gras polyinsaturés peut nuire à l'image nutritionnelle de ces lipides, il constitue un atout dans le domaine technologique dans la mesure où ces phospholipides seront peu sensibles à l'oxydation. À notre connaissance, les propriétés fonctionnelles de la sphingomyéline n'ont pas été étudiées de sorte qu'il est impossible de se prononcer sur l'intérêt technologique de ce phospholipide. Cependant, cette composition phospholipidique des lipides du lait est voisine de celle des cellules de l'épiderme humain (Ziboh et Chapkin, 1988). Bien que la signification biologique de la présence d'une forte pro-

portion de sphingomyéline dans les lipides de la peau ne soit pas établie, la cosmétologie pourrait constituer un débouché possible pour les phospholipides du lactosérum.

CONCLUSION

Cette étude montre que le procédé de clarification du lactosérum par agrégation thermocalcique des lipides développée par Fauquant *et al* (1985 a,b) permet un apurement presque total des lipides du lactosérum.

Quel que soit le coproduit considéré, la fraction lipidique se compose d'environ un tiers de phospholipides et de 2 tiers de triglycérides. Cette composition suggère que le procédé de clarification provoque l'agrégation des vésicules lipoprotéiques du lactosérum avec les protéines sériques sous l'effet de l'ajout de calcium et du traitement thermique.

L'originalité de la fraction lipidique du lactosérum réside dans sa composition phospholipidique. Les phospholipides du lactosérum et de ses dérivés se caractérisent par une faible teneur en acides gras polyinsaturés et par leur richesse en sphingomyéline.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les chercheurs du laboratoire de technologie laitière de l'INRA de Rennes qui ont été à l'origine de ces travaux et la coopérative laitière de la région nantaise (Colarena, Herbignac) qui nous a fourni gracieusement les échantillons.

REFERENCES

- Bartlett G (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234, 466-468

- Baomy JJ, Gestin L, Fauquant J, Boyaval E, Maubois JL (1990) Technologies de purification des phospholipides du lactosérum. *Process* 1047, 29-33
- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Res* 113, 291-299
- Cerbulis J, Woychik JH, Wondolowski MV (1972) Composition of commercial wheys. *J Agric Food Chem* 20, 1057-1059
- Christie WW, Noble RC, Davies G (1987) Phospholipids in milk and dairy products. *J Soc Dairy Technol* 40, 10-12
- Clark RM, Ferris AM, Fey M, Brown PB, Hundrieser KE, Jensen RG (1982) Changes in the lipids of human milk from 2 to 16 weeks postpartum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1, 311-315
- Ducruet V, Degas C, Lamberet C (1990) Composition lipidique d'un sous produit de lactosérum de caséinerie. *Lait* 70, 117-126
- Fauquant J, Pierre A, Brulé G (1985a) Clarification du lactosérum acide de caséinerie. *Tech Lait* 1003, 37-41
- Fauquant J, Vieco E, Brulé G, Maubois JL (1985b) Clarification des lactosérums doux par agrégation thermocalcique de la matière grasse résiduelle. *Lait* 65, 1-20
- Huang TC, Kuksis A (1967) A comparative study of the lipids of globule membrane and fat core and of the milk serum of cows. *Lipids* 2, 453-460
- Jensen RG (1973) Composition of bovine milk lipids. *J Am Oil Chem Soc* 50, 186-192
- Juaneda P, Rocquelin G (1985) Rapid and convenient separation of phospholipids and no phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 20, 40-41
- Leseigneur A, Gandemer G, Marion D (1989) Fractionnement en classes des lipides alimentaires par HPLC à l'aide d'un détecteur à diffusion de lumière. In: *Actes du Congrès International Chevreul pour l'Etude des Corps Gras*, édité par ETIG, Tome 1, 311-318
- Mamer WN, Maxwell RJ (1981) Dry column method for quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. *Lipids* 16, 365-371
- Maubois JL, Pierre A, Fauquant J, Piot M (1987) Industrial fractionation of main whey proteins. *Bull Int Dairy Fed* 212, 154-159
- Mordret F, Coustille JL, Taconne L (1984) Dosage rapide du cholestérol dans les margarines. *Rev Fr Corps Gras* 31, 503-507
- Morrison WR (1970) Milk Lipids. In: *Topics in lipid chemistry*, Vol 1, (Gunstone FD, ed) Logos Press, London, 51-106
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron-fluoride methanol. *J Lipid Res* 5, 600-608
- Morrison WR, Jack EL, Smith LM (1965) Fatty acids of bovine milk glycolipids and phospholipids and their specific distribution in the diacylglycerophospholipids. *J Am Oil Chem Soc* 42, 1142-1147
- Patton S, Jensen RG (1975) Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. In: *Progress in chemistry of fats and other lipids*, vol 14 (Holman RT, ed), Pergamon Press Inc, London, 163-277
- Pitot P (1984) Incorporation de lipides de sérum dans les crèmes de consommation : influence sur leurs propriétés fonctionnelles. Mémoire de fin d'étude ENSFA Rennes
- Théodet C, Gandemer G (1991) Comparaison de 5 méthodes pour extraire les lipides du lactosérum et de ses dérivés. *Lait* 71, 41-54
- Wolff RL, Fabien RJ (1989) Utilisation de l'isopropanol pour l'extraction de la matière grasse de produits laitiers et pour l'estérification subséquente des acides gras. *Lait* 69, 33-46
- Ziboh VA, Chapkin RS (1988) Metabolism and function of skin lipids. *Prog Lipid Res* 27, 81-105