

Induction de la précipitation phosphocalcique dans le perméat de lactosérum de fromagerie

Y Pouliot, J Landry, J Giasson

Centre STELA, Université Laval, Département de sciences et technologie des aliments,
Québec, G1K 7P4 Canada

(Reçu le 20 septembre 1990; accepté le 31 décembre 1990)

Résumé — La précipitation phosphocalcique a été induite de 2 façons dans le perméat de lactosérum de fromagerie : soit par alcalinisation simple, soit par effet combiné alcalinisation-ensemencement du milieu par des cristaux de phosphate dicalcique. L'alcalinisation simple s'est avérée inefficace, alors que l'ensemencement a provoqué une cristallisation intense, accompagnée d'une baisse de calcium et de phosphate solubles du perméat. Sur une zone de pH comprise entre 6,6 et 8,0, à 25 et 50 °C, il est apparu que les conditions pH 8,0 et 50 °C provoquaient la précipitation la plus complète, soit 61% du calcium et 32% du phosphate solubles. L'observation microscopique et la stoechiométrie du précipité obtenu dans ces conditions suggèrent qu'un précipité amorphe et plus alcalin que la phase de nucléation est formé.

perméat de lactosérum / phosphate de calcium / précipitation / nucléation

Summary — **Induction of calcium phosphate precipitation in sweet whey permeate.** *Calcium phosphate precipitation was induced in cheese whey permeate using 2 techniques: simple alkalization, and a combination of alkalization and of seeding of the permeate with dicalcium phosphate as nuclei. Simple alkalization did not give satisfactory results while the alkalization-seeding combination induced an extensive crystallization as shown by decreases in soluble calcium and phosphate in the media. Over a pH range between 6.6 and 8.0, at 25 and 50 °C, it was found that pH 8.0 and 50 °C induced the most extensive precipitation. Under these conditions, decreases of 61% in soluble calcium and 32% in soluble phosphate were found. The microscopical examination and calculated stoichiometry of the calcium phosphate precipitate indicated that a more alkaline form than the seeding material is produced using this technique.*

whey permeate / calcium phosphate / precipitation / nucleation

INTRODUCTION

L'utilisation grandissante de l'ultrafiltration comme technique de traitement du lactosérum de fromagerie a permis à l'industrie laitière de valoriser les protéines sériques du lait. Cependant, cette technologie conduit à l'obtention d'un sous-produit : le perméat de lactosérum.

Issu de l'ultrafiltration du lactosérum sur membrane dont le seuil de coupure est de l'ordre de 10 000 à 50 000 Da, le perméat présente une faible teneur en protéines (0,2–0,3%) et une teneur en lactose équivalente à celle du lactosérum, soit 5% (Modler, 1987). La valorisation du perméat de lactosérum porte essentiellement sur le lactose et peut se faire par voie biotechnologique (ex : fermentation, hydrolyse) ou chimique (ex : préparation de lactulose). Ces diverses conversions sont toutefois limitées par la sensibilité du perméat de lactosérum à la précipitation du phosphate de calcium, consécutive à une hausse de pH ou à un traitement thermique (ex : pour milieu de culture). Ces phénomènes peuvent être contournés par l'utilisation de séquestrants (citrate de sodium, EDTA), afin de diminuer la teneur en calcium ionique du perméat. Une approche alternative consisterait à induire la précipitation phosphocalcique dans le perméat, afin d'en diminuer simultanément la teneur en calcium et en phosphore.

En solution, le phosphate de calcium se retrouve généralement dans un état métastable, entre la forme soluble et le précipité, dépendant principalement du pH (Neuman et Neuman, 1953). Il existe ainsi des sels de phosphate de calcium plus acides, tel le dicalcique formé par précipitation à pH 6,2 et des sels plus alcalins, tel l'apatite (hydroxy- ou fluoro-) formé par recristallisation à partir de sels plus acides qui s'enrichissent alors en calcium. Boulet

et Marier (1961) ont démontré l'effet du pH sur la formation du phosphate de calcium en solution synthétique. Il a alors été observé que l'alcalinisation induit 2 types de précipité, le gélatineux et le granulaire. Le premier se formerait sans aucune apparence de sursaturation et son rapport Ca/P varie entre 1,33 et 1,67, en fonction de la concentration de l'ion CaOH^- dans le surnageant. Le phosphate de type granulaire se forme lentement, à la suite d'une période d'induction de quelques min à quelques h et son rapport Ca/P varie entre 2,00 et 1,40. Ce précipité serait formé par recristallisation du phosphate dicalcique (précurseur) en un phosphate plus alcalin, probablement le phosphate octacalcique. Le mode de formation caractérise de façon plus sûre que le rapport Ca/P, la nature du phosphate de calcium précipité.

Ces observations portant sur des solutions synthétiques n'ont pu être confirmées dans le lait et son ultrafiltrat. Il avait alors été proposé par Boulet (1966) que le lait contenait des inhibiteurs de 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 , un extrait protéique de lactosérum acide, et même la caséine entière inhibent la nucléation. Cette inhibition se produirait probablement par adsorption des résidus phosphoséryles des caséines sur le phosphate de calcium. Cette observation a été confirmée par Van Kemenade (1988) avec les fractions caséiniques α_s , β et κ .

La précipitation du 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 du phosphate de calcium a jusqu'à présent été étudiée indirectement par la

mesure du calcium et phosphate soluble du lait en cours de chauffage (Holt, 1985). Brulé *et al* (1978) ont démontré qu'il était possible d'induire la précipitation du phosphate de calcium dans le perméat 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.

Dans la présente étude, la précipitation phosphocalcique a été induite dans le perméat de lactosérum en utilisant 2 méthodes : l'alcalinisation simple et l'alcalinisation avec ensemencement de cristaux. L'effet de la température et du degré d'alcalinisation sur la stoechiométrie du précipité a aussi été étudié en effectuant la précipitation à 20 et 50 °C.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation du perméat

Le perméat de lactosérum a été préparé par ultrafiltration d'un lactosérum doux reconstitué à partir d'une poudre (6% P/V) à pH 5,90 (Agrinove, Sainte-Claire, Québec) sur membrane Romicon PM 50 (Romicon Inc, Woburn, MA) à 20 °C. Le perméat obtenu a été entreposé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

Préparation des cristaux pour l'ensemencement

Les cristaux de phosphate dicalcique ont été préparés à 20 °C en solution synthétique selon Boulet et Marier (1961). Une solution de départ contenant 6,2 mmol de calcium et 8,0 mmol de phosphore par litre a été amenée à pH 6,20 à l'aide de NaOH 0,2 N, pour un ratio équivalent base/mole P de 1,24. Les cristaux de phosphate de calcium ont ainsi été préparés et recueillis à l'aide d'un filtre Whatman # 1, après une cristallisation de 60 min.

Précipitation par alcalinisation simple

La précipitation a été induite par une montée du pH à une valeur plus alcaline. Cette valeur appelée pH_i (pH initial) a caractérisé chaque réaction de précipitation.

Le perméat de lactosérum a donc été alcalinisé à des pH compris entre 6,50 et 8,00 à l'aide de NaOH 0,2 N, sous agitation constante à température contrôlée (20 ou 50 °C). La formation du précipité débutait dès l'addition de la base et la baisse de pH de la solution, en cours de précipitation, a servi d'indice du degré d'avancement de la réaction.

Précipitation par effet combiné ensemencement-alcalinisation

Le perméat de lactosérum a tout d'abord été amené à la température de l'étude (20 ou 50 °C), les cristaux synthétiques ont été ajoutés (rapport g cristaux/kg perméat = 0,2), puis le pH du perméat a été ajusté à des valeurs de pH_i comprises entre 6,50 et 8,00 afin d'induire la précipitation.

Analyses

Des échantillons de solution en cours de précipitation ont été prélevés à t = 20, 40, 60 min, et centrifugés (IEC International Centrifuge) 10 min à 450 g. Les surnageants recueillis ont été analysés pour leur contenu en calcium par absorption atomique (Brooks *et al*, 1970) et en phosphore par méthode colorimétrique (Allen, 1940). Tous les essais ont été effectués en triple et les méthodes d'analyse présentaient un coefficient de variation de l'ordre de 1%.

Examen des précipités

Les précipités recueillis ont été observés en microscopie photonique à contraste de phase (40 x) sur un appareil de type Zeiss 63500. Une observation a aussi été effectuée en microscopie électronique à balayage (8000 x), sur un appareil de type Cambridge S-150.

RÉSULTATS

Précipitation par alcalinisation simple

L'induction de la précipitation phosphocalcique par alcalinisation simple s'est révélée inefficace. Les échantillons alcalinisés ont montré une faible turbidité, indiquant un faible degré de sursaturation. Des analyses préliminaires nous ont aussi donné que de très faibles variations en calcium et en phosphate solubles. Les observations qualitatives rapportées au tableau I montrent cependant qu'une hausse du pH et de la température permettent la production d'un précipité plus abondant. Il a aussi été noté qu'il était impossible d'obtenir un précipité granulaire à 20 °C. Étant donné les résultats obtenus, cette approche a été abandonnée au profit de la technique combinée alcalinisation–ensemencement.

Précipitation par effet combiné alcalinisation–ensemencement

La préparation des cristaux pour l'ensemencement a été réalisée à partir d'une solution synthétique. Tel que montré à la figure 1, la précipité s'est formé après une période d'induction de 40 min, au cours de laquelle aucune apparence de formation de cristaux n'était observable. Après 40 min, la formation d'un précipité apparent a été accompagnée par une baisse de pH. Nos résultats expérimentaux s'ajustent bien à la courbe de référence obtenue des travaux de Boulet et Marier (1961), bien que nos valeurs de pH soient légèrement supérieures à celles de ces auteurs. Une quantité approximative de 2 g de précipité a été produite par litre de solution synthétique.

La figure 2 montre l'évolution du pH des perméats après ensemencement et alcali-

Tableau I. Observations sur les précipités formés après 60 min d'alcalinisation simple dans le perméat de lactosérum. 1. – : aucun précipité, + : très léger précipité, ++ : léger précipité. 2. gel : précipité gélatineux; cristaux : précipité granulaire.

Observations on the precipitation induced by simple alkalization in whey permeate. 1. – : no precipitate; + : very light precipitate; ++ : light precipitate. 2. gel : gelatinous precipitate; crystals : granular precipitation.

pHi	Température (°C)	
	20	50
6,60	–	+ (cristaux + gel)
7,00	–	++ (cristaux + gel)
7,50	+ (gel)	++ (cristaux + gel)
8,00	++ (gel)	++ (cristaux + gel)

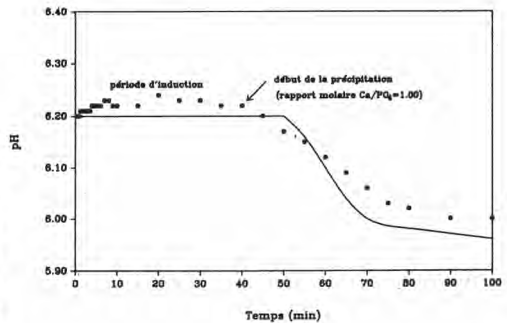


Fig 1. Variations du pH lors de la préparation de cristaux de phosphate dicalcique à partir d'une solution synthétique alcalinisée à pH 6,20. (—) courbe de référence. ¹ (Boulet et Marier, 1961), (●) : valeurs expérimentales. 1. 6,2 mmol.l⁻¹ CaCl₂, 8 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, 20 mmol.l⁻¹ KCl, 0,07 mmol.l⁻¹ K₂SO₄, pH 4,54, μ = 0,08. *pH variations during crystallization of dicalcium phosphate from a synthetic solution alkalized at pH 6.20.* (—) Reference curve. ¹ (Boulet and Marier, 1961); (●) experimental data. 1. 6.2 mM CaCl₂, 8 mmol.l⁻¹ KH₂PO₄, 20 mmol.l⁻¹ KCl, 0.07 mmol.l⁻¹ K₂SO₄, pH 4.54, μ = 0.08.

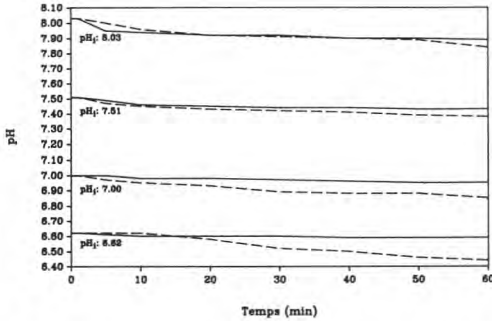


Fig 2. Évolution du pH en cours de précipitation à 20 °C (—) et à 50 °C (---) dans le perméat de lactosérum ensemençé et alcalinisé.

Variations in pH during precipitation at 20 °C (—) and 50 °C (---) in alkalized-seeded whey permeate.

nisation. Lorsque la précipitation est effectuée à 50 °C, la baisse de pH a été supérieure de 0,05 unités à pH_i 8,00 et de 0,20 unités à pH_i 6,60. Dans tous les cas, il est difficile de déterminer la durée de la pé-

riode d'induction de façon précise, puisque les variations de pH étaient faibles (environ 0,03 unités/10 min). Il semble cependant que plus le pH est élevé, plus la période d'induction est courte. Aussi, on peut noter une tendance à la diminution de la période d'induction lorsque le pH_i passe de 6,60 à 8,00.

L'évolution de la teneur en calcium et en phosphate des perméats en cours de précipitation est rapportée au tableau II. Dans tous les cas, la teneur en calcium et en phosphate a diminué (10 à 60%) en fonction du temps. Les faibles écarts observés entre les valeurs à 20 et 60 min indiquent que la précipitation était pratiquement complète à 20 min. Les baisses en calcium ont toujours été supérieures à celles en phosphate et cet effet était plus prononcé lorsque la température de précipitation était de 50 °C. Aux 2 températures de l'étude, la teneur en calcium et en phosphate du perméat a diminué avec l'augmentation du pH_i .

Tableau II. Teneurs en calcium et en phosphate dans le perméat de lactosérum ensemençé, en cours de précipitation à 20 et 50 °C.

Calcium and phosphate content of whey permeates during precipitation of alkalized-seeded samples at 20 and 50 °C.

T (°C)	Temps (min)	$pH_i = 6,60$		$pH_i = 7,00$		$pH_i = 7,50$		$pH_i = 8,00$	
		Ca	PO ₄	Ca	PO ₄	Ca	PO ₄	Ca	PO ₄
		mmol.l ⁻¹		mmol.l ⁻¹		mmol.l ⁻¹		mmol.l ⁻¹	
20	0	8,75	11,55	8,75	11,55	8,75	11,55	8,75	11,55
	20	7,33	10,42	8,00	9,20	5,33	8,38	4,25	7,76
	40	7,50	10,62	7,42	9,82	5,58	8,61	4,75	7,19
	60	7,67	10,43	—	—	5,92	8,77	4,75	6,99
50	0	8,75	11,55	8,75	11,55	8,75	11,55	8,75	11,55
	20	7,00	11,04	6,67	10,48	4,92	9,09	4,42	7,44
	40	6,42	10,85	5,75	10,87	5,25	8,63	3,58	7,85
	60	6,17	10,29	5,58	9,70	4,25	8,27	3,58	7,88

À partir des valeurs du tableau II, la quantité de calcium et de phosphate précipitée après 60 min a été estimée en soustrayant les valeurs aux temps 60 min, de la valeur initiale ($t = 0$). Le rapport molaire Ca/PO_4 a, par la suite, été calculé et les valeurs sont présentées au tableau III. La température a eu un effet déterminant sur la nature du précipité formé après 60 min. À 20 °C, les précipités présentent un ratio Ca/PO_4 voisin de 1,00 alors qu'à 50 °C, les valeurs sont supérieures à 1,30. Il est à noter que le pH_i d'alcalinisation n'a pas eu d'effet marqué sur le ratio Ca/PO_4 à 20 °C, alors qu'il tend à diminuer en fonction du niveau croissant de pH_i lorsque la précipitation est effectuée à 50 °C.

La figure 3 illustre la nature morphologique des précipités obtenus. Les cristaux préparés en solution synthétique et utilisés pour l'ensemencement du perméat (3A,C) présentent une forme triangulaire régulière et bien définie. Le précipité total obtenu après ensemencement présente aussi ces cristaux de forme triangulaire, mais recouverts d'un dépôt plutôt amorphe. Les planches 3B et 3D montrent bien la nature hétérogène du précipité total.

Tableau III. Rapport molaire Ca/PO_4 calculé pour les précipités formés après 60 min par ensemencement à 20 et 50 °C.

Ca/PO₄ molar ratio as calculated for the precipitates formed at 60 min in alkalized-seeded whey permeates at 20 and 50 °C.

pH_i	Ratio Ca/PO_4	
	$T = 20\text{ °C}$	$T = 50\text{ °C}$
6,60	0,96	2,13
7,00	0,76*	1,71
7,50	1,01	1,37
8,00	0,88	1,41

* Après 40 min

DISCUSSION

Les résultats obtenus par alcalinisation simple mettent en évidence le rôle des protéines ou matières azotées du perméat de lactosérum dans l'inhibition de la nucléation du phosphate de calcium. Cette suggestion, déjà avancée par Brulé *et al* (1978), était basée sur une teneur minimale de 0,7% de protéines sériques, au-dessus de laquelle l'effet inhibiteur n'était pas observé. Dans notre cas la teneur en protéines était de 0,2%, mais la température n'a pas dépassé 50 °C, alors que ces auteurs ont observé le phénomène à 80 °C. Il est alors possible qu'une plus grande teneur en matière azotée ait été nécessaire en raison de la dénaturation thermique des protéines du sérum.

L'introduction d'une phase de nucléation, *ie* de cristaux de phosphate dicalcique, a donné lieu à une précipitation plus extensive. Cette observation peut être expliquée de 2 manières. Premièrement, du point de vue thermodynamique, l'introduction d'une phase solide dans un tel système augmente le niveau d'énergie libre (ΔG) et accélère d'autant l'étape de nucléation (Adamson, 1982). Deuxièmement, comme la phase solide est constituée de phosphate dicalcique, il est possible que cette phase ait servi de site d'adsorption pour les inhibiteurs de nucléation, laissant alors libre cours à la précipitation phosphocalcique des éléments alors en solution. L'observation de la nature du précipité formé, différente de la phase de nucléation (dicalcique), suggère que la cristallisation puisse procéder *via* l'adsorption de phosphate de calcium sur la phase solide existante. Ainsi, les facteurs tels le pH et la température joueraient un rôle déterminant sur la nature du précipité formé. Ceci est bien reflété par les différences dans les ratios Ca/PO_4 entre 20 et 50 °C. Des travaux antérieurs (Pouliot *et al*, 1989)

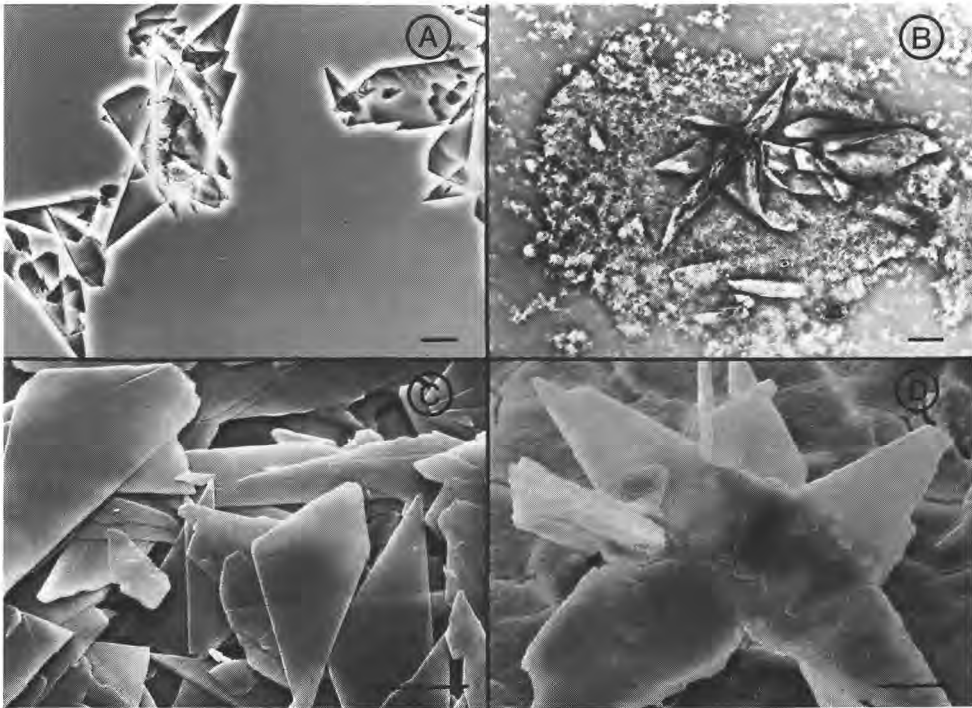


Fig 3. Morphologie des cristaux préparés en solution synthétique [A (40 x), C (8 000 x)] et du précipité obtenu après alcalination à pH 8,00, à 50 °C [B (40 x), D (8 000 x)]. Barre = 10 µm.

Morphology of crystals prepared from synthetic solution [A: (40 x), C: (8 000 x)] and of the precipitate crystallization in whey permeate at pH 8.00 and 50 °C [B: (40 x), D: (8 000 x)]. Bar = 10 µm.

avaient démontré que la précipitation phosphocalcique dans le lait se faisait à un ratio approximatif de 1,00 à 85 °C, soit celui du phosphate dicalcique. Les ratios apparents supérieurs à 1,30 obtenus à 50 °C indiqueraient la formation de phosphate de calcium plus alcalins tels le phosphates tricalcique et octacalcique obtenus directement ou, encore, par reconversion rapide du dicalcique formé initialement. Il faut par ailleurs considérer que la zone de pH se situant entre 6,5 et 8,0 est favorable à la formation de ces phosphates alcalins.

La technique de précipitation présentée ici offre un potentiel technologique en ce

sens qu'une simple combinaison pH-température-ensemencement permet de précipiter jusqu'à 61% du calcium et 32% du phosphate présents dans le perméat de lactosérum. L'utilisation de la microfiltration en aval de ce procédé de précipitation permettrait de clarifier le perméat et d'en faire un substrat adéquat pour la bioconversion du lactose.

REMERCIEMENTS

Les auteurs désirent remercier O Desbiens et A Goulet pour leur aide technique concernant la microscopie de nos échantillons.

RÉFÉRENCES

- Adamson AW (1982) The formation of a new phase – nucleation and crystal growth. *In: Physical Chemistry of Surfaces*, 4th ed, John Wiley & Sons, New York, 319-331
- Allen RJ (1940) Determination of phosphorus. *Biochem J* 34, 858-865
- Boulet M (1966) Formation du phosphate de calcium dans le lait et son ultrafiltrat. 17^e Congr Int Lait Munich B, 111-118
- Boulet M, Marier JR (1961) Precipitation of calcium phosphates from solutions at near physiological concentrations. *Arch Biochem Biophys* 93, 157-165
- Brooks IB, Luster GA, Easterly DG (1970) A procedure for the rapid determination of the major cations by atomic absorption spectrophotometry. *At Absorpt News* 9, 93-94
- 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
- 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, 3, 143-181
- Modler HW (1987) The use of whey as animal feed and fertilizer. *Int Dairy Fed Bull* 212, 111-124
- Neuman WF, Neuman MW (1953) The nature of the mineral phase of bone. *Chem Rev* 53, 1-29
- Pouliot Y, Boulet M, Paquin P (1989) Experiments on the heat-induced salt balance changes in cow's milk. *J Dairy Res* 56, 513-519
- Schmidt DG, Both P (1987) Studies on the precipitation of calcium phosphate. I. 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 DG, Both P, Visser S, Slangen KJ, Van Rooijen PJ (1987) Studies on the precipitation of calcium phosphate. II. Experiments in the pH range 7.3 to 5.8 in the presence of additives. *Neth Milk Dairy J* 41, 121-136
- Van Kemenade MJJM (1988) Influence of casein on precipitation of calcium phosphates. Thèse de doctorat, Université d'Utrecht, The Netherlands (no 1276 2054)