

QUELQUES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE PRODUITS ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES FRUITS: ENZYMES

P. DUPAIGNE*

QUELQUES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE PRODUITS
ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES FRUITS:
ENZYMES

P. DUPAIGNE (IFAC)

Fruits, avril 1973, vol. 28, n°4, p. 305-318.

RESUME - Après avoir situé l'importance relative de la présence des enzymes dans les fruits, par rapport à d'autres parties des végétaux, un premier chapitre rappelle que, même dans le traitement des produits fabriqués à partir des fruits, les enzymes, naturels ou ajoutés, peuvent avoir leur utilité.

Le deuxième chapitre envisage le problème inverse, c'est-à-dire l'usage que l'on peut attendre de certains enzymes qui se trouvent naturellement dans les fruits; il s'agit avant tout des enzymes protéolytiques que l'on peut extraire soit d'un latex, soit de la sève ou même des parties constituantes du fruit.

Dans une première partie, on étudie les travaux qui mentionnent à la fois plusieurs usages ou plusieurs enzymes, sans les classer suivant un ordre logique car on constate que les usages évoluent rapidement. La deuxième partie détaille les articles plus spécifiques, en général plus intéressants, qui traitent uniquement des trois protéases bien connues: ficine, papaïne et bromélaïne, l'accent étant mis surtout sur la ficine et la bromélaïne qui n'ont pas fait l'objet d'études récentes comme la papaïne dans cette revue.

En résumé, on constate que la demande pour ce genre de produits ne fait que s'étendre, alors que la production rencontre des difficultés; mais il faut souligner que ces difficultés seront vite surmontées, grâce en particulier aux travaux de l'IFAC, si les prix atteignent des niveaux permettant de rentabiliser la culture, la récolte de la matière première et la production d'un extrait actif.

Bien que pondéralement presque insignifiants par rapport aux constituants majeurs des fruits, comme l'eau ou les hydrates de carbone, on sait que les enzymes ont un rôle extrêmement important dans l'évolution, la maturation et finalement la dégradation de ces constituants; il en est de même dans les produits animaux, et l'on sait que la plupart des enzymes se retrouvent à la fois chez l'animal et chez le végétal.

Ce sont des protéines, dont le poids moléculaire est très variable, mais dont l'action est très spécifique sur un

substrat déterminé; on a comparé cette action à une catalyse, pouvant induire ou accélérer des réactions chimiques, et leur nom vient en général du type de réaction qu'ils sont capables de produire, dans des conditions favorables.

Autrefois on admettait que les enzymes étaient des composés solubles provenant du liquide cytoplasmique, après une hypercentrifugation, ou au contraire restant dans la matière précipitée; depuis on a montré qu'ils pouvaient se trouver sur divers constituants de la cellule, le noyau, les chloroplastes, les mitochondries, les ribosomes ou la membrane, et éventuellement être libérés sous

* - Institut français de Recherches fruitières Outre-Mer (IFAC)
6, rue du Général Clergerie - 75116 PARIS

forme soluble.

Les enzymes des fruits, comme ceux des autres cellules, sont très nombreux ; certains ont une action rapide, presque spectaculaire, dès qu'ils sont libérés, ou solubilisés, par la destruction de la membrane et des divers organites internes ; d'autres agissent lentement, mais n'en sont pas moins dangereux pour la stabilité. Par exemple les invertases transforment rapidement le saccharose en sucres réducteurs, dès l'écrasement des fruits ; mais des traces de pectine-estérase subsistant après une inactivation incomplète par la chaleur provoquent des gélifications lentes et progressives de la pectine dans les concentrés d'orange.

En général, une fois que le fruit est mûr (grâce à l'action de beaucoup d'enzymes), on considère que l'ensemble des enzymes des fruits est plus nuisible qu'utile à sa conservation surtout s'il n'est plus intact puisque enzymes et substrats ont été mis en contact dans une même solution ; il existe des exceptions, lorsque certains enzymes peuvent être extraits des fruits et agir sur d'autres substrats, comme on va le voir.

Les enzymes des fruits, comme ceux des autres cellules végétales ou animales, sont extrêmement divers, bien que les fruits soient assez pauvres en protéines totales ; et naturellement leur importance dépend de l'espèce et de la variété. Leur rôle a été mis en évidence pour un certain nombre de fruits et leur extraction, à l'état plus ou moins purifié, a été effectuée dans un certain nombre de cas.

Un chapitre consacré aux enzymes dans l'ouvrage général sur la Biochimie des fruits de HULME, rédigé par D.R. DILLEY, passe en revue une série d'enzymes spécifiques ayant déjà fait l'objet de travaux sur les fruits les plus connus (35).

- Pectine-estérase : la plupart des fruits, dont bananes, papayes et agrumes.
- Polygalacturonase : tomates, pêches, poires, avocats, ananas, absence dans les agrumes.
- Cellulase : tomates, pêches, pommes, poires.
- Amylase, phosphorylase : bananes, mangues, pommes, poires.
- Invertase : bananes, pommes, raisin.
- Enzymes intervenant dans la synthèse de l'ARN : pommes, poires.
- Enzymes intervenant dans le cycle de glyoxylate : poires.
- Chlorophyllase : bananes, pommes, poires.
- Synthétase d'acide gras : avocats, pommes.
- Lipase : avocats, pommes.
- Lipoxydase : pommes, poires.
- Phosphatase : agrumes, pommes.
- Ribonucléase : agrumes, avocats, pommes.
- Ethylène synthétase : pommes, poires, bananes.
- Catalase : pommes, mangues.
- Péroxydase : mangues, tous les fruits tempérés.
- Phénolases diverses : pommes, tomates, bananes.
- Protéase : figues, ananas, papayes.
- Transaminase : poires.
- Aldolase : pommes, poires.

- Acide malique-décarboxylase : pommes, poires.
- Pyruvate décarboxylase : bananes, pommes, poires.
- O-méthyl-transférase : pommes.

Mais la plupart des travaux cités concernent la physiologie du développement, puis de la sénescence du fruit intact.

Ce qui nous intéresse spécialement ici est l'usage que l'on peut faire de ces enzymes, après extraction et purification.

A vrai dire, cet usage est extrêmement restreint, soit parce que les sources d'enzymes dans la nature sont parfois mieux connues, ou plus économiques (présure de la caillette des bovidés, suc pancréatique, amylose du malt, produits innombrables de cultures microbiennes), soit parce qu'un catalyseur minéral, comme une mousse de nickel ou de platine, est d'un emploi plus facile, plus stable et facile à régénérer. Et pourtant les enzymes naturels sont capables de provoquer des réactions chimiques complexes, et de synthétiser ou de dégrader le nombre énorme des composants des végétaux et animaux. Si les applications industrielles des enzymes sont tellement limitées, c'est à notre avis par manque d'une connaissance précise des mécanismes de leur action ; mais à mesure que la science enzymologique progresse, on pourra découvrir des utilisations intéressantes autrement que par le hasard. Inversement, on saura mieux maîtriser leur action lorsqu'elle se révèle nuisible.

UTILISATION DES ENZYMES DANS L'INDUSTRIE FRUITIÈRE

Il convient ici de remarquer que, même pour les produits de fruits, l'industrie fait appel de plus en plus à des réactions enzymatiques contrôlées. Depuis longtemps, on connaissait l'importance des réductases en cidrerie, permettant d'atténuer les couleurs brunes dues aux polyphénoloxydases, par un cuvage à l'abri de l'air. D'autres, comme le groupe des enzymes pectiques, l'amylase, la cellulase, qui existent dans les fruits eux-mêmes, sont très couramment utilisés pour les opérations d'extraction ou de clarification des jus ou pulpes de fruits, mais l'origine industrielle de ces enzymes est une fermentation de moisissure ou de bactéries sur des milieux divers, et non une extraction à partir de la pulpe des fruits. On a montré que les produits aromatiques des fruits étaient souvent apparus à partir de précurseurs non volatils contenus dans la pulpe avant maturité, en particulier des acides aminés, sous une action enzymatique développée au cours de la maturation (2). Rappelons aussi que l'addition de complexes enzymatiques du commerce est capable de faire dégager de nouveaux arômes à une poudre de fruit qui, par suite du processus de dessiccation, a perdu ceux du fruit frais mais a conservé ses précurseurs et qu'inversement on peut modifier le goût des fruits par destruction de composés naturels amers sous une action enzymatique (41, 42). On a pu liquéfier entièrement, sans broyage, des fruits ou des légumes par action successive de cellulases puis de pectine-estérase (11, 108). ou au contraire séparer sélectivement les cellules des fruits

sans les détruire pour obtenir une purée stable (54).

Autre utilisation dans l'industrie des boissons de fruits : on sait combien elles sont sensibles aux traces d'oxygène, surtout lorsque la température dépasse 10°C et que le stockage se prolonge plusieurs mois ; or ces boissons, qu'elles soient emballées en boîtes de fer blanc ou en bouteilles et bocaux de verre, contiennent un peu d'air dissous, même si on les a désaérées, et surtout restent en contact dans le récipient avec de l'air, ou même un gaz inerte contenant des traces d'oxygène. Evidemment la première idée qui vient est de leur ajouter un corps qui s'oxydera en priorité (acide ascorbique, SO₂, chlorure stanneux) ; mais ces corps sont des additifs qui, une fois oxydés, resteront dans la boisson, ce qui n'est pas toujours souhaitable. Un procédé élégant consiste à introduire, au moment de l'emballage, une trace de glucose-oxydase qui va catalyser l'oxydation d'une faible quantité de glucose, toujours présent. De cette manière tout l'oxygène libre est combiné et n'a plus d'effet nuisible sur la couleur et le goût du fruit.

En ce qui concerne l'amélioration du rendement de l'extraction d'un moût à partir des fruits, nous laissons de côté les innombrables travaux sur l'emploi des enzymes pectinolytiques ; de même pour la clarification des jus de fruits destinés à être présentés limpides. Notons seulement un brevet récent sur un procédé de liquéfaction totale des fruits par l'emploi de cellulases, celles-ci étant rigoureusement débarrassées d'enzymes pectiques qui risquent de provoquer des précipitations (11).

PROTÉASES

Travaux traitant de plusieurs protéases.

Il est connu que les broyats de plantes, puisqu'ils réalisent la mise en solution partielle du contenu cytoplasmique, présentent parfois une activité enzymatique prédominante, dont on peut se servir pour l'expérimentation en chimie biologique ; de même le latex, excrétion des cellules laticifères, contiennent divers produits dont l'action ou l'utilisation sont connues : caoutchouc de l'hévéa et de quelques autres plantes, toxines de certaines Euphorbiacées.

Dans un travail de 1966, PANT (101) compare l'activité protéasique de quelques latex ; il a trouvé par des

tests simples de coagulation que le latex du figuier était le plus actif, suivi de celui de la papaye et enfin de celui de *Calotropis gigantea* (Asclépiadacée) qui est employé dans le sud-est asiatique pour ses propriétés particulières, comme dépilatoire par exemple.

Selon TORRES de CASTRO (130) le latex d'*Asclepias mexicana* est dans certaines conditions encore plus actif que la Ficine ; on peut rappeler aussi que la fleur de Cardon (*Cynara*) était utilisée en France pour faire cailler le lait dans certaines campagnes pour remplacer la présure animale.

Ces protéases, nous allons le voir, sont complexes ; elles ont pour effet de scinder progressivement les grosses molécules protéidiques en molécules de poids moléculaire plus faible, pour obtenir finalement, si leur action est poursuivie, des molécules plus légères, des polypeptides, des dipeptides et en dernier ressort des acides aminés libres.

Mais chaque enzyme naturel (qui est en réalité un complexe enzymatique) exerce son action dans des conditions différentes de pH et de température, et sur des matières premières dont la constitution des protéines n'est pas toujours identique ; il en est exactement de même pour les enzymes extraits de tissus animaux ou de fermentations ; le choix devra donc être guidé par deux impératifs : la qualité du produit désiré et le coût de l'opération.

Quelles sont les utilisations possibles et d'autre part pratiques des protéases de fruits ? Il est difficile d'en faire le compte exact. Quelques articles généraux ne donnent qu'une idée partielle de ce qui était la réalité du moment, mais elle varie selon les conditions économiques (20, 23, 25, 126, 139).

Produits lessiviels.

C'est dans la fabrication des produits de nettoyage du linge que l'on a pensé voir se créer un débouché important pour les enzymes de toutes sortes. On sait que, vers l'année 1968, quelques grandes marques de produits lessiviels ont annoncé à grand renfort de publicité la présence d'enzymes, ayant pour effet de faire disparaître les taches, d'origine organique, sur le linge. Le mot enzyme avait un effet publicitaire, sans qu'il soit besoin de préciser la nature et les effets de chacun, si bien que la plupart des marques concurrentes ont dû suivre le courant, et la Répression des Fraudes a mis au point des méthodes permettant de

Propriétés de quelques protéases végétales (130).

Nom de la plante		Partie de la plante	Conditions optimales d'action	Pouvoir protéolytique relatif
Ficine	<i>Ficus carica</i>	latex	à pH 2	7
Papaïne	<i>Carica papaya</i>	latex du fruit vert	entre pH 2,5 et pH 12	7,5
Bromélaïne	<i>Ananas comosus</i>	fruit, feuille, tige	stable à pH 2-3	6
Pinguinaïne	<i>Bromelia pinguin</i>	fruit	-	3 (lait)
Asclepaïne	<i>Asclepias speciosa</i>	latex, racines, feuilles	instable en milieu acide ou alcalin	5,5 (gélatine)
Euphorbaïne	<i>Euphorbia cerifera</i>	latex	-	6
Solanaïne	<i>Solanum eleagnifolium</i>	fruit	stable à pH élevé	8,5
Pomirine	<i>Maclura pomifera</i>	fruit	-	6,5 (gélatine)
Mexicaïne	<i>Pileus mexicanus</i>	fruit, feuilles	stable à pH 5,8	-

prouver le bien-fondé de la publicité, sans jamais exiger qu'une liste de composants ou que des quantités minima à respecter soit obligatoirement portées à la connaissance du public.

Par contre-coup, la plupart des machines à laver automatiques ont été munies d'un programme de lavage «biologique», c'est-à-dire évitant un chauffage excessif afin de ne pas inactiver les enzymes des produits lessiviels.

Depuis peu de temps, il semble que les grandes marques se sont mises d'accord, pour ne plus faire porter leur publicité sur les enzymes, tout en continuant à en utiliser.

Un argument publicitaire encore peu exploité serait basé sur le fait que les enzymes sont bio-dégradables et très rapidement ; c'est une notion d'actualité qui ne peut que prendre de l'importance.

Les protéases ont évidemment un rôle à jouer dans le lavage des textiles, mais comme on l'a vu, celles des fruits sont surtout intéressantes car elles ont une action progressive sur les protéines, sans aller jusqu'à la destruction des acides aminés ; il semble plus important pour nettoyer du linge taché de faire disparaître d'abord toute couleur étrangère (anthocyanes des fruits, carotènes du jaune d'oeuf, chlorophylle des végétaux, hémoglobine du sang), ce qu'on peut obtenir par oxydation ménagée, en évitant la production d'autres couleurs apparues par les produits de la décomposition (12).

Les protéases des fruits ne sont employées qu'épisodiquement dans ces lessives qui peuvent utiliser aussi des polyphénols-oxydases, des peroxydases, des catalases, des chlorophyllases, des lipases ; les protéases à large spectre d'action sont la plupart du temps obtenues par culture de souches sélectionnées de *Bacillus subtilis* ; elles sont enrobées dans les grains de lessive comprenant des détergents chimiques habituels : polyphosphates, perborates, azurants, qui permettent de compléter l'élimination des salissures (3, 12, 63, 123).

Traitements des résidus et boues des effluents.

Dans certaines industries alimentaires, la destruction des boues des effluents, afin de pouvoir rejeter une eau propre, pose des problèmes difficiles, ou simplement onéreux. Lorsqu'il s'agit de résidus riches en protéines, la digestion bactérienne est parfois longue ou provoque l'émission d'odeurs de putréfaction. L'emploi de protéases, lorsqu'il s'avère économique, permet de solubiliser rapidement la totalité des matières protéiques ; là aussi nous voyons un débouché possible pour des quantités notables de protéases de fruits.

Industries alimentaires.

L'utilisation en fromagerie, qui utilise 1.300 tonnes de présure rien qu'en France serait une possibilité, à condition que l'enzyme soit bien adapté aux produits laitiers et d'un prix compétitif avec la présure (49) ; pour la maturation accélérée des fromages, l'addition d'une papaïne, par exemple, amorce le processus de dégradation des protéines, et, selon un brevet récent, les goûts étrangers apparus au

cours de cette dégradation peuvent être éliminés par lavage (79).

Une autre utilisation potentielle est la solubilisation partielle des protéines qui ont tendance à précipiter dans les bières en formant un trouble peu agréable pour le consommateur moderne qui exige une boisson parfaitement limpide ; c'est pourquoi on peut employer ces enzymes en brasserie pour la clarification (92, 114, 115, 138).

Un brevet français propose la fabrication de boissons de fruits à haute teneur en protéines par addition d'une protéine étrangère au jus de fruit, puis solubilisation de celle-ci par une protéase, et enfin de l'inactivation de cet enzyme pour obtenir finalement une boisson limpide (10) ; un autre brevet couvre l'emploi d'un ou plusieurs enzymes dans les gommés à mâcher et les dentifrices, afin de nettoyer plus facilement la bouche (9).

Voici encore un brevet, déposé en mai 1972 qui pourrait intéresser aussi bien les gommés à mâcher que les confiseries et les boissons : il s'agit de l'extraction et de la purification, à l'aide d'enzymes, d'un édulcorant naturel contenu dans la pulpe d'une petite baie tropicale, *Dioscoreophyllum cumensii* (15 bis). Cet édulcorant possède une structure polypeptidique pure ; ce n'est pas une gluco-protéine et si l'on arrive à l'utiliser commercialement il pourra constituer un édulcorant non glucidique et non calorique idéal pour donner le goût sucré aux aliments pour diabétiques ou pléthoriques ; en effet il suffit d'en utiliser une quantité infime puisque son pouvoir sucrant est de l'ordre de 3.000 fois celui du saccharose.

La pulpe des baies est traitée d'abord avec une pectinase, puis le liquide est fractionné et concentré ; ensuite après dessiccation et reprise dans un tampon à pH 4,6, le résidu est soumis à une protéolyse partielle par de la bromélaïne à 0,2 p. mille, pendant 16 heures à 25°C, encore fractionné sur colonne et enfin traité par de la papaïne pendant un jour à 27°C. Le polypeptide ainsi purifié peut avoir un poids moléculaire ne dépassant pas 6.000, avec le plus grand pouvoir sucrant ; il comprend 17 acides aminés.

Une grande industrie alimentaire est celle, pratiquée surtout en Extrême-Orient, des sauces à base de poisson ; nous y reviendrons à propos de l'utilisation de la papaïne. En 1962, MURAYEMA a comparé divers produits protéolytiques du commerce utilisables dans cette branche (96). Pour les sauces à base de viande (ou plutôt de débris de viande comestibles mais d'un usage difficile), c'est MIYADA, dès 1956, qui a comparé plusieurs protéases commerciales (91) : la papaïne et la ficine capables d'hydrolyser l'élastine du muscle, la broméline, la ficine, la trypsine, la papaïne et le Rozyne P 11 ayant, dans l'ordre de leur efficacité, le pouvoir de solubiliser le collagène. En définitive il serait utile d'employer simultanément plusieurs de ces enzymes.

L'utilisation de déchets, en bon état de fraîcheur, de poisson ou de viande permet de préparer des aliments riches en protéines, à condition d'arrêter à temps l'hydrolyse (46).

Pour l'instant, ces aliments sont réservés à l'alimentation

du bétail ; mais comme l'emploi des protéases permet d'éviter les moyens brutaux d'hydrolyse, les liquides extraits peuvent être dégraissés et désodorisés et conviendraient parfaitement à l'alimentation humaine à condition d'être présentés sous une forme attrayante (par structuration, c'est-à-dire reconstitution d'une apparence fibreuse assez ferme). Dans la solubilisation de 60 p. cent des protéines de poisson, un enzyme expérimenté par M.B. HALE (55) est une protéine produite par *Streptomyces griseus*, en somme sous-produit de la fabrication de la streptomycine qui malheureusement reste prohibitif ; par contre la ficine a prouvé qu'elle possédait la plus grande activité à court terme, puis viennent la pepsine, la broméline, la papaïne et quelques autres.

De même la solubilisation des déchets de poisson est plus complète avec la pepsine que la broméline (82). Dans l'industrie de la gélatine, obtenue à partir des os frais concassés, la présence des graisses et des débris de viande est par contre un inconvénient ; on peut les solubiliser pour les récupérer à part, par un chauffage léger et une adjonction de protéases (13).

Attendrissement de la viande.

Ce n'est pas à proprement parler une industrie alimentaire, mais seulement une pratique, faisant appel aux enzymes protéolytiques, aussi bien avant l'abattage que dans les boucheries ou même la cuisine, puisqu'il existe des poudres toutes prêtes pour attendrir soi-même une tranche de viande avant cuisson (62, 110). Comme d'habitude, toutes les protéases n'ont pas la même activité. D'après un article récent sur l'attendrissement des viandes, pour un poids égal, la ficine semble supérieure à la broméline et la papaïne, et afin d'obtenir un effet complet on peut ajouter de la Subtilisine et de la Pronase, tirée d'une culture de *Streptomyces* (1).

Un autre article anonyme se contente de décrire un procédé possible : on commence par injecter de l'azote par les vaisseaux des quartiers de viande fraîche pour faciliter le passage, dans un deuxième temps, de la solution de protéases ; ainsi, on évite toute oxydation et changement de couleur de l'hémoglobine restante (4).

Mc ANELLY (81) a breveté en 1969 un procédé permettant d'injecter une solution de papaïne dans la veine jugulaire des animaux avant leur abattage : en effet, il faut éviter que cette solution entraîne des troubles dans la circulation sanguine, car on observerait rapidement des œdèmes et un ramollissement exagéré du foie et des glandes. On arrive à diminuer ces inconvénients par une oxydation de la papaïne à un pH convenable. Un procédé d'attendrissement des viandes par la papaïne, la broméline ou la ficine est décrit par un brevet de BEUK (24) : on utilise environ 1 mg d'enzymes commercial par kg de viande. Un autre brevet de CAYLE (31) montre que ces enzymes peuvent être relativement stabilisés dans une solution de glycérine ou de collagène.

Celui de UNDERKOFLE (132) associe des protéases d'origine fongique à la broméline, et précise les quantités à utiliser dans un sirop de sucre injectable : 48 et 5 g

respectivement.

Enfin deux articles signés WANG (136) montrent que l'attendrissement des viandes par voie enzymatique peut faire appel à des protéases d'origines diverses : végétale, fongique et pancréatique surtout ; WITAKER (137) remarque que ce traitement, appliqué aux viandes de porc, laisse parfois un goût amer ; c'est un inconvénient qui est dû sans doute à une dégradation trop poussée des protéines, libérant certains acides aminés.

Comme on va le voir pour chaque fruit, l'utilisation des enzymes de fruits pour l'attendrissement des viandes a été pendant longtemps le seul débouché commercial relativement important, nécessitant une petite industrie d'extraction et de séchage et surtout de nombreuses études agronomiques pour la sélection des variétés les plus riches, leur culture et leur multiplication.

Produits pharmaceutiques.

La plupart du temps les produits contenant des enzymes de fruits utilisent simplement leur pouvoir protéolytique ménagé, en association par exemple avec d'autres molécules actives. Parfois l'enzyme est employé car il peut présenter des effets bénéfiques d'un autre ordre, que nous verrons au fur et à mesure de cette étude ; les cas de contre-indication sont rares, mais pas inexistantes ; une toxicité à proprement parler est peu vraisemblable ; mais nous devons au passage noter la toxicité possible de certains alcaloïdes qui pourraient se trouver dans les fruits et être extraits ou concentrés en même temps que les enzymes.

Articles spécifiques

Dans cette partie, nous envisageons les travaux qui traitent d'une façon plus précise un des trois principaux groupes de protéases de fruits classés selon leur origine botanique : figue, papaye et ananas. Pour éviter une discrimination entre les valeurs relatives des articles, on citera d'abord ceux qui ne portent pas de signature, dans l'ordre de leur parution, puis les travaux signés, désignés seulement par le nom du premier auteur et classés selon l'objet de l'étude.

Tous les travaux qui concernent la nature exacte de l'enzyme, son action, les méthodes d'évaluation de son activité, ne sont pas relevées, à part quelques études modernes de base, afin de réunir une bibliographie homogène concernant surtout les applications pratiques du produit : extraction, purification, stabilisation, réactivation, conditions d'utilisation, effets attendus sur divers substrats protéiniques.

Nous avons constaté une énorme différence entre le nombre des travaux consacrés à la ficine, malgré l'activité parfois plus importante de cet enzyme, et ceux qui concernent la papaïne ; ces derniers étant trop nombreux, nous renverrons le lecteur aux articles de la revue FRUITS (78), sur la papaye et la papaïne pour étudier surtout les derniers parus ; par contre comme les bromélines n'ont pas fait l'objet d'une étude comparable dans la Revue, nous tenterons de fournir plus de renseignements.

Ficine.

Sur le latex des figuiers et les protéases connues sous le nom générique de ficine, peu de travaux sont parvenus à notre connaissance ; d'ailleurs parfois nous n'y avons eu accès qu'indirectement en raison de la langue des auteurs.

Selon BUTENKO (28), l'effet d'un trempage ou d'une injection de ficine sur la viande, à raison de 0,05 à 0,2 p. cent du poids de viande, en diminue la dureté ; par contre en dépassant ce pourcentage, on obtient non une liquéfaction, mais au contraire un durcissement de la viande, par une coagulation de parties solubles.

En 1967, KRAMER (74, 75) a résumé les propriétés protéolytiques de la ficine ; de même LIENER (79), mais en décembre 1970 ; MAKHRADZE (83) a étudié rapidement ses propriétés physicochimiques et biologiques.

Parmi les plantes poussant en Hongrie et donnant des sucs, dont l'effet peut être protéolytique, le genre *Ficus* tient évidemment la première place, selon POSZAR (103).

La ficine est considérée par THEODORE (129) pour ses effets protéolytiques, comme précédemment dans l'article de KRAMER. Quant aux espèces voisines de *Ficus carica*, elles ont été étudiées de ce point de vue par WILLIAMS (140). Rappelons qu'il existe environ 1.800 espèces dans le genre *Ficus* et 700 variétés dans la seule espèce *Ficus carica*, mais peu ont présenté un pouvoir protéolytique, d'ailleurs localisé dans le latex ; ni les fruits, ni les feuilles, ni les tiges n'ont jamais pu présenter un pouvoir du même genre. WILLIAMS souligne que le genre *Ficus* appartient à la famille des Moracées, parmi laquelle on a trouvé quelques autres plantes dont le latex ou la sève ont des propriétés protéolytiques : le fruit de *Maclura*, le genre *Morus*, dans lequel se trouve le murier, le genre *Broussonetia*, le *Brosimum alicastrum* (arbre à pain). Quant à BOITEAU, connu pour ses travaux sur la flore malgache, il voit dans un *Ficus* de Madagascar, *Ficus cocculoides*, une source possible de protéase pouvant pallier le déficit en présure destinée à la fabrication des fromages.

Enfin WINNICK (141), dès 1944, s'est attaché à étudier les moyens d'activer l'action protéolytique de la ficine, comme on le fait couramment pour la papaïne.

Papaïne.

Comme il a été expliqué plus haut, les enzymes protéolytiques groupés sous le nom de papaïne, et renfermés dans le latex récolté aussitôt après incision des papayes, sont connues depuis longtemps, tout au moins par leurs effets sinon par la constitution exacte de leurs molécules, et le plus simple est de renvoyer le lecteur à l'étude détaillée qu'a fait A. LASSOUDIÈRE (78) par une série d'articles parus de 1968 à 1969 dans la présente revue, sur l'arbre, le fruit et ses productions. Cette étude ne comporte pas moins de 13 pages de références.

C'est pourquoi nous nous contenterons de citer ici des travaux non examinés par l'étude, en général très récents ; comme on pourra le constater, il s'agit principalement des effets, bénéfiques ou non, de la papaïne utilisée dans les préparations médicamenteuses, ainsi des solutions moins purifiées utilisées pour traiter les viandes.

Examinons donc successivement ces articles, classés en quelques grandes catégories.

Extraction du latex, purification, structure, propriétés principales.

En avril 1972, FOYET (48) a rédigé une note sur les procédés d'extraction du latex, dans notre Station de Nyombé ; elle complète les acquisitions de l'IFAC dans ce domaine, qui ont commencé sans doute avec la publication de PATRON en 1952 dans cette même revue.

Rappelons un travail indien de KRISNAMURTHY (76), en 1960, sur les procédés de préparation de la papaïne brute ; mais beaucoup ont été publiés depuis ; une revue complète sur un des enzymes de la papaye, la chymopapaïne, a été faite en 1970 par KUNIMITSU (77) dans les *Methods of Enzymology* dont nous avons eu déjà l'occasion de parler. En Allemagne, MANECKE a décrit la préparation d'une papaïne insoluble.

Auparavant nous avons lu un travail sommaire sur l'extraction du latex, à la Station de Campinas de TEXEIRA (127), montrant que la production peut intéresser le Brésil, puis une étude de ZOCH (144) sur la richesse en protéase des papayes plus ou moins purifiées vendues dans le commerce.

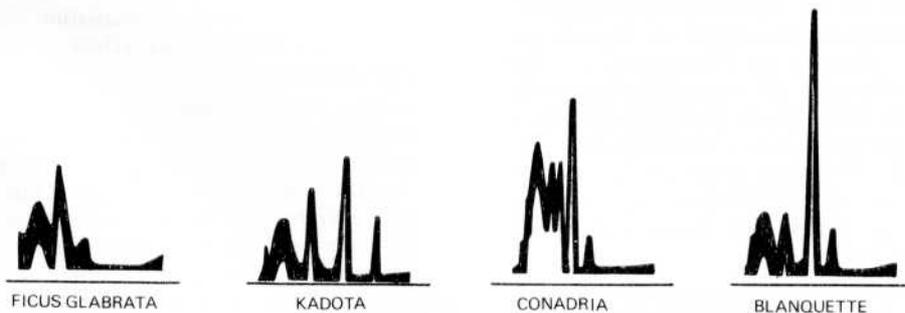


FIGURE 1 • Electrophorèses montrant la différence considérable de composition des protéines du latex de quelques variétés de *Ficus*, (d'après réf. 14).

En 1971, DRENTH, poursuivant la série de ses mises au point sur la papaïne déjà citées par LASSOUDIÈRE, a publié un article documenté dans une revue de chimie des protéines sur la structure physico-chimique de l'enzyme, tenant compte des acquisitions précédentes.

D'un tout autre genre est l'étude comparative des variétés consanguines de papayer, en fonction du rendement en papaïne (FAZBULLAH) (44) ; les rendements sont d'ailleurs différents suivant la variété et les conditions de culture ; le même auteur avait été cité pour des travaux analogues par LASSOUDIÈRE, mais trois ans avant dans une autre revue.

Enfin nous avons trouvé sous la signature de SKELTON (121) une enquête rapide sur le rendement du latex de papaye en protéases et la mesure de l'activité enzymatique du produit.

Attendrissement de la viande, préparation d'hydrolysats.

Nous avons déjà envisagé plus haut l'attendrissement de la viande de boeuf ; maintenant il s'agit de celle des volailles, qu'on peut traiter de même par une solution de papaïne brute (HALEM) (56) ; sans doute une papaïne purifiée serait-elle trop onéreuse et provoquerait non un attendrissement mais une liquéfaction de surface.

Une méthode s'appliquant à toutes les viandes a été décrite par JOSEPH : c'est simplement par l'ingestion de papaïne oxygénée que l'animal, avant abattage, acquiert une meilleure qualité commerciale ; un travail récent de SMITH arrive à la même conclusion, après expérience sur de jeunes taureaux (121 bis).

Deux travaux sont à ajouter à notre chapitre sur les industries alimentaires de transformation ; il s'agit de l'emploi de la papaïne dans la fabrication des hydrolysats

de poisson ; le premier (111), indique comment préparer la papaïne, le second (116), explique la cinétique de la dégradation des protéines et fournit les conditions d'une meilleure utilisation. Entre les deux se présente un article sur la préparation du produit actif en vue d'une utilisation pour la clarification de la bière (112). Dans un domaine différent, un Japonais, TUTTYA (131) a montré qu'on peut utiliser la papaïne pour nettoyer la fibre de soie naturelle, ce qui était une utilisation inédite.

Utilisation des propriétés de la papaïne en pharmacologie.

Le premier auteur, dans l'ordre alphabétique, est un Américain ARNOLD (16), qui a montré récemment que les piqûres d'insectes peuvent être rendues indolores et sans conséquence par un traitement local immédiat avec le latex.

Il convient de citer ici la mise au point d'ARNOLD (17) dans la revue spéciale *Methods in enzymology* qui a traité non seulement des propriétés et usages de la papaïne, mais de la structure, de ses activateurs et de ses inhibiteurs.

CALDWELL (29) en 1971, rappelant que l'enzyme pouvait provoquer dans certains cas un oedème du poumon, en a étudié les effets physiologiques et anatomiques sur le poumon du lapin.

Avec l'article de COLOMBETTI (32), on peut se rendre compte pourquoi la pulpe de papaye, est capable de guérir ou d'améliorer des ulcères dans les pays tropicaux : cette pulpe nettoie en quelque sorte la blessure, en solubilisant les débris de tissus morts, ce qui évite une gangrène locale et facilite l'action d'autres médicaments, si l'on en possède. C'est encore l'emphysème du poumon, provoqué artificiellement par la papaïne chez le rat, dont l'évolution a été suivie par JOHANSON (68) ; d'un autre côté, PUSHPAKOM (106) a étudié le développement de cet emphysème expérimental induit par la papaïne chez le chien.

Les poussières d'oxyde de titane sont dangereuses car elles se fixent dans les alvéoles pulmonaires ; FERIN (45) est arrivé à les éliminer en provoquant un emphysème pulmonaire par la papaïne, ce qui est une solution inattendue.

Le travail d'une équipe de cancérologie de Villejuif, présenté par Mme COUDERT (33) est arrivé à la conclusion que les cellules tumorales de la souris leucémique traitées par de la papaïne brute acquièrent un pouvoir immunogène et une résistance à la transplantation des cellules cancéreuses, inhibant plus vite leur croissance que si elles étaient traitées par la neuraminidase du vibron cholérique ; c'est une acquisition qui ouvrira peut-être de nouvelles voies à la connaissance du mode d'action de l'enzyme.

Le problème assez particulier des anti-enzymes a été évoqué pour les protéases par METAIS (87, 88) en 1971 ; en réalité ces protéines de constitutions chimiques diverses sont appelées inhibiteurs parce qu'elles arrivent à bloquer complètement le pouvoir enzymatique par une transformation des sites actifs de la protéase en se fixant d'une

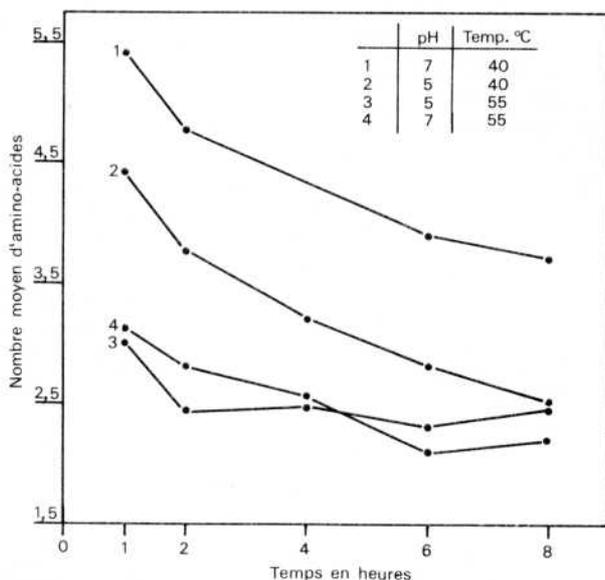


FIGURE 2 • Influence du pH et de la température sur l'hydrolyse de la chair de poisson par la papaïne. (d'après réf. 116).

manière irréversible sur la molécule. Quelques-unes ont été isolées ; elles n'agissent que sur un enzyme bien déterminé ; on en a extrait du soja, des pommes de terre ou de la farine, et METAIS a rappelé que le sérum sanguin possède une forte capacité d'inhibition protéasique, ce qui empêche toute coagulation en cas de passage éventuel des protéases digestives dans le sang ; en 1964, OKADA (98) a montré qu'il existait une protéine antagoniste de l'action protéolytique de la papaïne. La papaïne entre parfois dans la composition de certaines spécialités indiquées pour améliorer la cicatrisation de plaies ou traumatismes de faible étendue, ou les affections oculaires (108).

SHIVPURI (120) a attiré l'attention sur un problème bien connu depuis longtemps chez les arboriculteurs, les producteurs de fruits frais comme les récolteurs de latex : un certain nombre de personnes sont ou deviennent allergiques au contact d'une partie quelconque du papayer branches, feuilles ou fruits ; dans quelques cas, l'allergie peut prendre une forme très grave. Or il ne s'agit pas, vraisemblablement, d'une action de la papaïne (qui peut provoquer un oedème du poumon), puisque l'enzyme n'existe pas, ou en quantités minimales, ailleurs que dans le latex du fruit ; pour l'instant le produit n'a pas été isolé.

Pour montrer que la papaïne est utilisable simplement pour améliorer le bien-être de l'homme, PARODI (102) a observé le syndrome de l'indigestion, évitable par l'absorption préliminaire ou immédiate d'un mélange d'enzymes. Enfin VAISHWANA (133) a publié un travail expérimental sur l'action de la papaïne employée comme médicament, sur le foie des animaux engraisés expérimentalement.

Bromélines

Sous cette appellation générique, on entend l'ensemble des protéases produites par les végétaux de l'espèce des **Broméliacées** ; l'appellation plus restrictive de Bromélaïne s'applique aux protéases retirées de l'espèce comestible la plus cultivée, *Ananas comosus*, parmi laquelle on ne produit plus guère qu'une variété, le Cayenne Lisse, tout au moins pour la transformation en conserves et, de plus en plus, pour la consommation directe ; d'autres variétés peuvent avoir beaucoup d'avantages, mais leurs feuilles ne sont pas inermes, ce qui est un inconvénient majeur. Cette fois, ces protéines sont contenues non dans un latex (comme la ficine et la papaïne), mais dans la sève, qui imprègne toutes les parties de la plante ; autrement dit, on en trouve aussi bien dans la pulpe du fruit que dans son écorce, la tige centrale, les feuilles, les racines ; cependant on a constaté qu'il en existe plus dans la partie supérieure de la plante et l'extrémité des feuilles. On a constaté que la pulpe d'ananas et la feuille écrasée étaient utilisées pour ses propriétés - et l'est toujours - par la médecine indigène des Indiens d'Amérique du sud, et leurs propriétés protéolytiques ont été mises en évidence dès la fin du siècle dernier. Après les premiers succès de l'emploi de la papaïne pour l'attendrissement des viandes et pour la clarification de la bière, on a pensé pouvoir utiliser également les bromélines dans ce but (7) ; cependant la première usine d'extraction a été montée aux Hawaï, comme annexe d'une grande

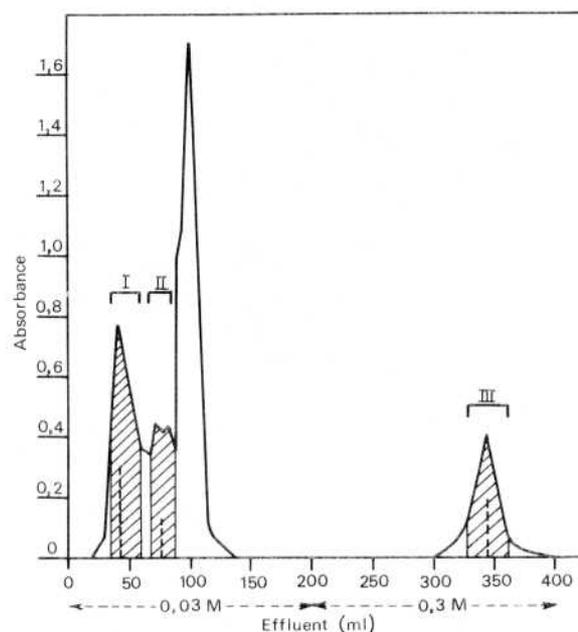


FIGURE 3 • Protéases des bromélines de tige d'ananas. Trois parmi 4 pics séparés par électrophorèse. (d'après réf. 99).

conserverie, dans un but différent : celui de produire à partir du jus frais des déchets une bromélaïne purifiée à usage pharmaceutique (8) ; c'est en effet dans ce dernier domaine que les principaux débouchés de la bromélaïne ont été trouvés ; plusieurs spécialités ont été préparées à partir de cet enzyme aussi bien en France qu'à l'étranger et, comme on va le voir, les travaux sont nombreux sur ce sujet.

Articles de portée générale sur les bromélines.

En dehors des chapitres spéciaux des ouvrages sur l'ananas, que nous n'examinerons pas ici (COLLINS, PY), on peut citer, dans l'ordre alphabétique : HENNRICH (60) qui nous a rappelé récemment les procédés d'extraction et les utilisations des protéases d'ananas, MURACHI (93) qui a fait une mise au point sur la structure et l'activité de ces enzymes et TORRES DE CASTRO (130) dont la revue bibliographique est abondante. L'étude la plus intéressante, du point de vue des applications biologiques, est certainement celle qu'a fait paraître le Bulletin de Madagascar en 1968 (6), étude anonyme mais à laquelle ont certainement participé MM. RATSIMAMANGA et BOITEAU.

Un brevet de YOUNG (142) décrit l'obtention d'un produit purifié, à partir d'un liquide de pressurage des ananas, destiné à l'attendrissement de la viande.

Les bromélines du fruit lui-même étant déjà assez connues, nous avons trouvé surtout des études récentes sur d'autres bromélines qui semblaient avoir des rendements ou des propriétés légèrement différentes : la pinguinnaïne, protéase de l'espèce *Bromelia pinguin* et les pro-

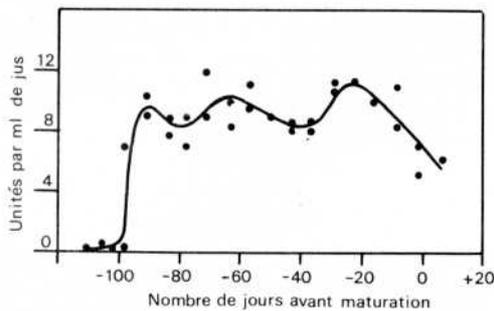


FIGURE 4 • Activité des protéases de lots d'ananas pendant leur développement (par coagulation du lait), (d'après réf. 58).

téases produites par la tige et les feuilles de l'ananas commercial, dites bromélaïnes de tige.

Pinguinaïne.

Cette protéase a été trouvée dans le fruit et les feuilles d'une broméliacée sauvage et son activité semble proche de celle des bromélaïnes d'ananas. GOYO (52) a même entrepris sa purification sur gel de silice et la détermination du nombre des protéines actives ; pour l'instant aucune extraction commerciale ne paraît avoir été lancée pour exploiter ce produit.

Bromélaïnes de tige et feuilles d'ananas.

Comme il s'agit là d'une simple valorisation de sous-produits existant en grande quantité et ne nécessitant aucune culture spéciale, les parties non desséchées des feuilles et tiges après la récolte des fruits, ces protéases font actuellement l'objet d'études ayant pour but de définir leur constitution, leur qualité, le rendement de leur extraction, leur stabilité. Leur intérêt a été souligné par HEINICKE (57, 58), en 1957 et 1958, par MURACHI (94) en 1960, par OTA (100) en 1964, qui a donné aussi des indications sur les procédés d'extraction et les propriétés chimiques. En 1959, SCOCCA (113) a pu élucider la structure des glucides contenus dans ces bromélaïnes, et la séparation des protéases constitutives étudiée par EL GHARBAWI (50) ; après purification, on ne trouve que deux protéases actives (MINAMI) (89), mais la bromélaïne brute, telle que celle qu'on peut précipiter dans un jus déjà clarifié, contient beaucoup d'impuretés et d'autres enzymes (HWANG) (64) ; récemment SUZUKI (125) vient de montrer que ces produits contiennent, outre les protéases, au moins quatre cellulases ; c'est pourquoi en définitive ce genre de bromélaïne pourrait rendre des services dans la dégradation ménagée d'un grand nombre de sous-produits, contenant une série de composants différents des pures protéines.

Extraction, rendement, purification.

Nous trouvons déjà beaucoup de renseignements dans les ouvrages généraux ou les articles déjà cités traitant de plusieurs groupes d'enzymes de fruits ; des brevets ont été pris, dont nous parlerons par la suite. Néanmoins on doit citer BALLS (20, 21) pour les États-Unis et DE SOUZA (122) pour le Brésil, sans oublier les auteurs qui viennent

d'être examinés pour les pinguinaïnes et les bromélaïnes obtenues de la plante et non du fruit.

Traitement de la viande et du poisson.

Ce problème a déjà été envisagé dans les chapitres précédents, et surtout comme application, déjà ancienne, de la papaine.

La production de sous-produits solubles, riches en protéines dégradées à partir des déchets ou excédents de harengs, a pu utiliser des bromélaïnes, tout au moins au stade de la recherche industrielle, en Colombie britannique (82).

Pour l'attendrissement des jambons et mélanges pour saucisses, l'emploi direct du jus d'ananas frais aux Philippines a donné de bons résultats, en même temps qu'une intensification de l'arôme (85) : ce dernier effet est-il dû simplement à la présence ajoutée de l'arôme propre du fruit, considéré comme agréable, ou a une production par voie enzymatique de composés volatils à partir de précurseurs contenus dans la viande ?

La chose n'est pas précisée ; mais il est probable que les deux effets existent, puisque les matières protéiques sont transformées en composés moins complexes et partiellement, en acides aminés libres, dont certains ont une odeur caractéristique.

Effets biologiques.

En relation avec les applications thérapeutiques des bromélaïnes que nous envisagerons au chapitre suivant, notons quelques travaux de recherche destinés à une meilleure connaissance des effets de celles-ci, postérieurs à l'étude déjà systématique publiée dans le Bulletin de Madagascar en 1968.

Avec Mrs BURROUGHS (27) des essais conduits sur six adultes, accompagnés de nombreuses observations et analyses, utilisaient dans la ration journalière soit de la pulpe fraîche, soit des tranches en conserve, soit, pour les témoins, des pêches au sirop ; ils avaient surtout pour but de savoir si le transit intestinal était modifié par l'absorption des matières celluloses indigestes ; mais la conclusion a été négative pour les quantités entrant dans la ration.

Signalons trois brevets pris récemment protégeant les produits suivants : un dentifrice anti-inflammatoire contenant du jus ou de la pulpe d'ananas frais, c'est-à-dire des bromélaïnes, un lait anti-inflammatoire renfermant les mêmes produits et un sucre anti-inflammatoire imbibé de jus ou pulpe d'ananas pour l'alimentation infantile (38, 39, 40).

Il est curieux de rapporter à ce sujet la demande de brevet français par une société japonaise (14) : c'est le produit de la réaction d'un sang avec une protéase qui serait par lui-même anti-inflammatoire, et ce produit permettrait d'éviter des effets secondaires indésirables.

La coagulation du sang est évidemment un risque de l'introduction, par injection ou même ingestion, d'enzymes.

mes protéolytiques ; une équipe japonaise a étudié le pouvoir agglutinant éventuel des bromélaïnes dans différents groupes sanguins du poulet (65). Quant à l'œdème du poumon provoqué artificiellement par injection d'adrénaline, il peut être évité ou diminué par ingestion de bromélaïnes chez l'animal (90, 119) ; enfin si l'on injecte directement une bromélaïne dans le cartilage d'une articulation chez le lapin, on observe une dégénérescence des cellules provoquant une arthrite artificielle (104).

Applications médicales.

C'est encore dans ce domaine que les travaux sont les plus nombreux, sans doute parce que les autres, à part le traitement des viandes, sont peu exploités. Nous n'en citerons que quelques-uns pour montrer la diversité des modes d'action.

Quelques articles généraux provenant de divers pays montrent que ces enzymes peuvent rendre des services, aussi bien en médecine générale qu'en chirurgie (37, 59, 61).

Les désordres digestifs, soit par insuffisance de sécrétion des protéases, soit par excès d'alimentation, soit venant de causes locales, peuvent être résolus dans certains cas par l'absorption de bromélaïnes, parfois associées avec d'autres enzymes ou des sédatifs (34, 66, 97, 117).

Dans un tout autre genre d'affections, les bromélaïnes peuvent aussi être utiles, par le fait qu'elles sont anti-infectieuses et antalgiques, permettant la résolution d'œdèmes et de traumatismes, aussi bien en petite chirurgie (30, 143) qu'en médecine générale (61), en obstétrique (71), en chirurgie dentaire (53) ou en phlébologie (128) ; comme nous l'avons vu avec la papaïne, des ulcères chroniques de la jambe peuvent être améliorés par les bromélaïnes. De même les affections oculaires ou nasales (67, 139).

Enfin leur association avec un antibiotique permet d'augmenter l'action de celui-ci, quand ce ne serait que par un nettoyage complet des déchets et tissus mortifiés d'une plaie, permettant à l'antibiotique de se trouver

directement en contact avec les tissus vivants à protéger (107, 135) ; pour le traitement des bronchites on a même proposé une association antibiotique-expectorant-bromélaïne, l'enzyme ayant un rôle protecteur et potentialisateur pour les produits associés (19).

CONCLUSION

Est-il possible de tirer un enseignement pratique de ce nombre de travaux d'informations et de brevets, d'intérêt très variables, sur les tendances de la production et de l'utilisation des enzymes protéolytiques de fruits ?

De l'ensemble se dégagent quelques indications : ces enzymes ou plutôt mélanges d'enzymes, exercent une action intéressante, sinon irremplaçable, dans un certain nombre de cas où leur utilisation est recherchée : en particulier pour l'attendrissement des viandes, leur solubilisation partielle pour en tirer des produits alimentaires, pour la valorisation des déchets de poisson, pour le traitement des boues de certains effluents, dans l'industrie du fromage et de la bière, dans celle des produits lessiviels et finalement dans les spécialités pharmaceutiques qui font appel à la papaïne et la bromélaïne. La ficine est certainement intéressante, mais sa production est presque inexistante. Ces enzymes entrent en compétition avec les protéases extraites de cultures microbiennes, mais leurs propriétés respectives ne sont pas forcément identiques, et le choix d'une protéase, tout en tenant compte de son prix de revient, devra se porter sur le produit le plus adapté à son usage.

Au cours de cette étude nous avons eu l'occasion de lire un ouvrage édité en 1658 sur les Antilles ; il traite en particulier de nombreux végétaux, dont la figue, la papaye et l'ananas, soulignant, en termes de l'époque, quelques propriétés du suc, du lait ou de la pulpe de ces fruits : on y trouve déjà des observations sur leur pouvoir à la fois anti-infectieux et «corrosif».

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Anonyme.
Enzyme tenderizing.
Food Manuf., oct. 1971, 46, 10, 31.
- 2 - Anonyme.
Enzymes and Flavor.
Flavour Ind., sep. 1971, 2, 9, 503-504.
- 3 - Anonyme.
Point de vue d'un utilisateur d'enzymes.
Nouv. de la Chimie, 10 jul. 1969, p. 1-2.
- 4 - Anonyme.
Internal spray system tenderizes meat.
Food Tech. Austr., jul. 1969, 21, 7, 353.
- 5 - Anonyme.
Multi-enzymes for reducing BOD in whey.
Food Eng., apr. 1969, 14, 4, 15.
- 6 - Anonyme.
Ananas.
Bull. Madagascar, notice 33, oct. 1968, n°269, 833-845.
- 7 - Anonyme.
Bromelain, a protein digesting enzyme from pineapple.
Chem. Eng. News, sep. 1957, 35, 83.
- 8 - Anonyme.
New product from pineapple.
Food Eng., oct. 1957, 29, 10, 155.
- 9 - Anonyme.
Produits pour l'hygiène de la bouche.
Brevet français 2.070.058 B, 26 sep. 1969.
- 10 - Anonyme.
Procédé de préparation de boissons riches en protéines.
Brevet français 2.106.715 B, 22 sep. 1970.
- 11 - Anonyme.
Produit de liquéfaction totale des fruits.
Brevet français 2.103.345, 2 aug. 1971.
- 12 - Anonyme.
Composition détergente contenant des enzymes.
Brevet français 2.116.046, 25 nov. 1971.

- 13 - Anonyme.
Dégrossage et décharnage des os.
Brevet français 2.134.017 B, 21 avril 1972.
- 14 - Anonyme.
Agent anti-inflammatoire et son procédé de préparation.
Brevet français 2.133.670 B, 13 apr. 1972.
- 15 - Anonyme.
Procédé de traitement enzymatique de protéines alimentaires.
Brevet français 2.074.905 B, 28 oct. 1970.
- 15 bis - Anonyme.
Substance sucrante.
Brevet français 2.138.898 B, 25 may 1972.
- 16 - ARNOLD (H.L.).
Immédiate treatment of insect stings.
J. Am. Med. Assn., Apr. 1972, 220, 525-526.
- 17 - ARNON (I.R.).
Papain.
Methods in enzymology, dec. 1970, 19, 226-243.
- 18 - ASENJO (C.F.).
A new proteolase from *Bromelia pinguin*.
Science, 1942, 95 (2454), p. 48-49.
- 19 - ASSUMPCAO (I.T.).
Un mélange enzyme-antibiotique-expectorant pour le traitement de la bronchite.
Rev. Bras. Med., dec. 1971, 28, 659-663.
- 20 - BALLS (A.K.).
Protein digesting enzymes from Papaya and Pineapple.
USDA, Circ. 631, dec. 1941, Washington.
- 21 - BALLS (H.K.) and LINEWEAVER.
Isolation and properties of crystalline Papain.
J. Biol. Chem., 1939, 130, 669-686.
- 22 - BALLS (A.) and THOMPSON (R.).
Bromelin : properties and commercial production.
Ind. Eng. Chem., jul. 1941, 33, 7, p. 950-953
- 23 - BERREBI (M.).
Les enzymes en cosmétologie biologique.
Parf., Cosm. Sav., jan. 1971, 1, 1, p. 36-38.
- 24 - BEUK (J.F.) and SAVICH (A.L.).
Method of tendering meat.
US Pat. 2.903.362, sep. 1969.
- 25 - BOIDIN (Cl.).
Quelques cas d'utilisation des enzymes.
Ann. Fals. Exp. Chim., may 1960, 53, 617, p. 262-271.
- 26 - BRINKMANN (D.) et DUIVEN (M.).
Emploi en fromagerie de l'enzyme coagulant issu de *Mucor pusillus*.
Ind. Alim. Agr., dec. 1972, 89, 12, 1755-1758.
- 27 - BURROUGHS (S.E.) and CALLOWAY (D.M.).
Gastrointestinal response to pineapple.
J. Am. Diet. Assn., 1968, 53, 4, p. 336-341.
- 28 - BUTENKO (L.A.).
Effets de la ficine sur la qualité de la viande.
Is vest. Vyss. Uchel. Zaved Pish Tekhno., 1970, 5, p. 77-79.
- 29 - CALDWELL (E.J.).
Physiology and anatomical effect of Papain on rabbit lung.
J. Appl. Physiol., sep. 1971, 31, 458-463.
- 30 - CAMPO (A.).
La bromélaïne en chirurgie.
Gaz. Med. Fr., 2 apr. 1964, 71, 1627-1634.
- 31 - CAYLE (T.).
Stabilized aqueous enzyme solutions.
US Pat. 3.296.094, jan. 1967.
- 32 - COLOMBETTI (G.).
Cura locale dell'ulcera tropicale con polpa di papain.
Minerve Med., dec. 1965, 56, 4200-4201.
- 33 - COUDERT (A.) et AJURIA (E.).
Augmentation de l'antigénicité des cellules tumorales traitées par la papaine.
CR Acad. Sci. Paris, mai 1972, 274 D, p. 2833-5.
- 34 - DELMONT (J.).
Essais chimiques de bromélaïnes sur l'insuffisance digestive.
Mars Med., 1972, 109, p. 87-90.
- 35 - DILEY (D.R.).
Enzymes.
in : HULME, *Biochem. of Fruits*
Acad. Press, NY, 1970, p. 179-208.
- 36 - DRENTH (J.).
Structure of papain.
Adv. in protein Chem., 1971, 25, 79-115.
- 37 - DUBOIS (C.) et BARSAMIAN (L.).
Les bromélaïnes dans un service de médecine générale.
Gaz. Med. Fr., 4 jun 1964, 71, p. 2453-2455.
- 38 - DUBOIS-PREVOST (R.).
Lait anti-inflammatoire pour l'alimentation infantile.
Brevet français 2.118.857 B, 23 dec. 1970.
- 39 - DUBOIS-PREVOST (R.).
Sucre anti-inflammatoire.
Brevet français 2.121.470, 15 jan. 1971.
- 40 - DUBOIS-PREVOST (R.).
Dentifrice anti-inflammatoire.
Brevet français 2.122.301 B, 19 jan. 1971.
- 41 - DUPAIGNE (P.).
Arômes, précurseurs d'arômes et enzymes.
CR Symposium Arômes de fruits, FIJU, Berne, 1962, p. 7-24.
- 42 - DUPAIGNE (P.).
La désamérisation des produits d'agrumes par voie enzymatique.
Fruits, sep. 1969, 24, 9, p. 445-450.
- 43 - DUPAIGNE (P.).
Quelques produits de fruits.
Fruits, oct. 1971, 26, 10, 697-713.
- 44 - FAZBULLAH (K.K.) and SEEMANTHAM (B.).
Comparative study of papain yields.
Ind. J. Hort., 1968, 25, 3-4, p. 182-190.
- 45 - FERIN (J.).
Papain-induced emphysema and elimination of Ti O₂ particles from lung.
Am. Ind. Hyg. Assn. J., mar. 1971, 32, p. 157-162.
- 46 - FIEFFE (C.F.).
Verfahren zur Veredelung natürlicher Proteinstoffe.
Brevet allemand 1.692.550, 1970.
- 47 - FILHO (N.).
Utilisation de la Broméline pour les ulcères chroniques de la jambe.
Rev. Bras. Med., jul. 1970, 27, p. 373-378.
- 48 - FOYET (M.).
Extraction de la papaine.
Fruits, apr. 1972, 27, 4, p. 297-301.
- 49 - GARNIER (B.) et MOCQUOT (G.).
Coagulation du lait par la présure.
Ann. Nutr. Alim., 1968, 22, 2, p. 495.
- 50 - EL GHARBAWI (M.) and WHITAKER (J.R.).
Fractionation of stem bromelain.
Biochemistry, 1963, 2, 476-481.
- 51 - GOTTSCHALL (G.Y.).
Activation of papain during digestion of meat.
Food Res., jan. 1944, 9, 1, 1-9.
- 52 - GOYO (E.T.) and MATOS (M.).
Purification of Pinguinain by gel filtration.
Nature, jul. 1964, 203, 4930, p. 82-83.
- 53 - GRABER (G.).
Essais cliniques d'une spécialité enzymatique en chirurgie dentaire.
Schw. Monatsch. Zahnheilk., nov. 1970, 80, p. 1206-1212.

- 54 - GRAMPP (E.).
Einsatz von Enzymen in der Obstverarbeitung.
CR Symposium Comm. Scient. et Techn., FIJU, Aarhus, 1969,
9, 73-108.
- 55 - HALE (M.B.).
Relative activities of commercially available enzymes.
Food Techn., jan. 1969, 23, 1, p. 107-110.
- 56 - HALEM (M.A.) and GREECHAR (P.).
Effect of crude papain on tenderization of poultry meat.
J. Sci. Food Techn., jan. 1970, 7, 1, p. 40-41.
- 57 - HEINICKE (R.M.).
Extraction of stem bromelain.
US Pat. 3.002.891, 1958.
- 58 - HEINICKE (R.M.) and GORTNER (W.H.).
Stem bromelain. New protease from pineapple plant
Econ. Bot., jul. 1957, 11, 3, 225-234.
- 59 - HEINICKE (R.M.).
Effect of bromelain on chemical laboratory tests.
Jap. Heart J., nov. 1971, 12, p. 517-522.
- 60 - HENNRICH (N.) and KLOCKOW (N.H.).
Isolation and properties of bromelin protease.
FEBS Letters, 1969, 2, 5, p. 278-280.
- 61 - HEYNEN (U.).
Utilisation thérapeutique d'enzymes protéolytiques.
Z. Allgemeinmed., mai 1970, 46, p. 482-4.
- 62 - HOGAM (F.M.).
Enzymbereitung zur Verbesserung der Zartheit von Fleisch.
Br. all. 1.492.682, 1969.
- 63 - HOOGERHEIDE (J.C.).
Utilisation des enzymes dans les préparations déterives.
Fette Seifen Anstrich., 1968, 70, 10, p. 743-748.
- 64 - HWANG (P.T.) and HSU (R.S.).
Separation of bromelain from pineapple stem with tannic acid.
Chem. Abst., 1971, 74, 21, 30.
- 65 - IMASE (N.).
Studies on bromelain agglutinins in chicken blood group.
Jap. J. Zootech. Sci., jun 1970, 41, 6, p. 278-306.
- 66 - JANET (A.).
Essais chimiques avec un mélange enzymatique.
Bordeaux Med., feb. 1971, 4, p. 571-572.
- 67 - JASSAUD (P.).
Etude chimique d'un nouvel antibiotique en ORL.
Rev. Laryng. Oto Rhino. Bordeaux, nov. 1970, 91, 1039-1042.
- 68 - JOHANSON (W.G.).
Evolution of papain emphysema in rat.
J. Lab. Clin. Med., oct. 1971, 78, 599-607.
- 69 - JOSE (J.S.).
Chemical experience with new enzyme preparation.
Praxis, sep. 1970, 59, p. 1307-1310.
- 70 - JOSEPH (R.L.).
Production of tender beef.
Process Biochem., 1970, 5, 11, p. 55-58.
- 71 - KAUFMANN (E.).
Avantages de la bromelaïne en gynécologie et obstétrique.
Praxis, nov. 1971, 60, p. 1579-1581.
- 72 - KILPADI (V.) et HENON.
Verfahren zur Herstellung von Käse.
Br. all. 1.492.826, 1969.
- 73 - KNOBL (G.M.) et STILLINGS (B.R.).
Fish protein concentrates.
Comm. Fish. Rev., jul. 1971, 33, 7, p. 54-63.
- 74 - KRAMER (D.E.).
Some properties of a proteolytic enzyme from *Ficus carica*,
var. Kadota.
Diss. Abstr., 1967, B 28, 5, p. 1785-8.
- 75 - KRAMER (D.E.) et WHITAKER (J.R.).
Ficus enzymes. II. Kadota varieties.
J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 2178-83.
- 76 - KRISNAMURTHY (E.V.) et BHATIA (G.S.).
Preparation of crude papain from raw papaya.
J. Sci. Food Agric., 1960, 11, p. 433.
- 77 - KUNUMITSU (D.K.) et YASUNOBU (K.T.).
Chymopapain.
Methods in Enzymology, dec. 1970, 19, p. 244-256.
- 78 - LASSOUDIÈRE (A.).
La papaine.
Fruits, nov. 1969, 24, 12, 503-530.
- 79 - LIENER (T.E.) et FRIEDENSON (B.).
Ficin.
Methods in enzymology, dec. 1970, 19, p. 260-273.
- 80 - LILOV (L.) et DIMKOV (R.).
Effet de la papaine, broméline et ficine sur le cytochrome oxydase
du foie.
Europ. Meet. Meat. Res. Workers, 1969, 15, p. 389-396.
- 81 - Mc ANELLY (J.) et WARNER (K.).
Preparing solutions for antemortem injection for meat tenderization.
US Pat. 3.446.626, may 1969.
- 82 - Mc BRIDE (J.R.) et IDLER (D.R.).
The liquefaction of British Columbia herring.
J. Fish. Res. Board Cann., 1961, 18, 93-112.
- 83 - MAKHRADZE (R.V.).
Propriétés physicochimiques et biologiques de la Ficine.
Akad. Nauk. Gruz. SSR, 1969, 54, 3, p. 605-608.
- 84 - MANECKE (G.) et GUENZEL (G.).
Préparation de papaine active insoluble.
Naturwissenschaften., 1969, 54, 24, p. 667.
- 85 - MENSALVES (F.S.) et MADLSACORY (P.I.).
Effect of fresh pineapple juice on tenderization and flavor of ham
and sausage.
Philipp. J. Animal Ind., 1968, 24, 1, p. 11-27.
- 86 - MERNIER (M.).
Etudes toxicologiques de l'enzyme extrait de *Mucor pusillus* LINDT.
C.R. Réunion Sté Exp. Chim. Fr., 14 fév. 1973, (à l'impression).
- 87 - METAIS (P.), BIETH (J.) et WARTER (J.).
Inhibiteurs de protéases.
Probl. actuels de Bioch. appliquée, 2e série, 1968, Masson, p. 220-296.
- 88 - METAIS (P.) et BIETH (J.).
Inhibiteurs naturels des protéases.
Gaz. Med. Fr., 30 avril 1971, 78, 17, p. 2693-1732.
- 89 - MINAMI (Y.) et DOL (E.).
Fractionation, purification and properties of bromelaine from stem
pineapple.
Ag. Biol. Chem., 1971, 35, 9, p. 1419-30.
- 90 - MINESHITA (S.) et SHIGEI (T.).
Prévention of adrenalin-induced edema by bromelain.
Jap. J. Pharm., sep. 1970, 20, 3, p. 373-381.
- 91 - MIYADA (D.S.) et TAPPEL (A.I.).
Hydrolysis of beef proteins by various proteolytic enzymes.
Food. Res., mars 1956, 21, 2, p. 217-225.
- 92 - MOLL (M.) et VINH THAT.
Quelques méthodes de contrôle des enzymes protéolytiques.
BIOS, mars 1971, p. 3-11.
- 93 - MURACHI (T.).
Bromelain enzymes.
Methods in Enzymology, dec. 1970, 19, p. 272-285.
- 94 - MURACHI (T.) et NEURATH (H.).
Fractionation of stem bromelain.
J. Biol. Chem., 1960, 235, p. 99-107.

- 95 - MURACHI (T.), YASHI (M.) et YASUDA (Y.).
Purification of stem bromelain.
Biochemistry, 1964, 3, 1, p. 48-55.
- 96 - MURAYAMA (S.) et CALVEZ (L.).
Effect of commercial proteolytic enzymes on production of fish sauces.
Bull. Tokai Reg. Fisheries Res. Lab., 1962, 32, p. 155-163.
- 97 - NAVA (M.).
Traitement de la diarrhée par les enzymes.
Prensa Med. Mexico, jan. 1968, 33, p. 57-58.
- 98 - OKADA (Y.).
Interaction of papain with anti-papain.
J. of Biochim., 1964, 56, 2, p. 190-1.
- 99 - OTA (S.) et HORIE (K.).
Heterogeneity of bromelain of the pineapple stalk.
J. of Biochem., sep. 1969, 66, 3, p. 413-414.
- 100 - OTA (S.) et MOORE (S.).
Preparation and chemical properties of stem bromelain.
Biochemistry, 1964, 3, p. 180-185.
- 101 - PANT (R.) et SRIVASTANA (S.C.).
Proteolytic activity of plant latex.
Current Sci., jan. 1966, 35, 2, 42-43.
- 102 - PARODI (A.H.).
Le syndrome de l'indigestion et son traitement.
Prensa Med. Argent., jan. 1971, 59, p. 119-123.
- 103 - POSZAR (K.H.) et HORVAI (H.R.).
Enzymes protéolytiques des plantes poussant en Hongrie.
Elelmiszertudomány, 1967, 1, 3, p. 67-73.
- 104 - PRASAD (G.L.) et SINGH (R.H.).
Ananase induced degenerative arthritis.
Ind. J. Med. Res., 1969, 57, 6, p. 1095-1102.
- 105 - PULLEY (J.E.).
Enzymes simplify processing.
Food Eng., fev. 1969, 41, 2, p. 68-71.
- 106 - PUSHPAKOM (R.).
Experimental papain-induced emphysema in dogs.
Ann. Rev. Resp. Disea., nov. 1969, 102, p. 778-789.
- 107 - RICHARD (A.) et NEUBANER (N.D.).
A plant protein for potentiation of antibiotics.
Exp. Med. Surgery, 1961, 19, 2, p. 143-160.
- 108 - RIGAUD (A.) et BRISOU (J.).
Application thérapeutique locale d'un produit à base de papaine.
Presse Med., 18 avril 1956, 64, p. 722.
- 109 - De ROCHEFORT (C.).
Histoire naturelle et morale des îles Antilles.
Ed. A. Leers, Rotterdam, 1658.
- 110 - ROSSET (R.).
Problèmes enzymatiques des viandes.
Ann. Nutrit. Alim., 1968, 22, 2, p. 443.
- 111 - SANTOS (A.C.) et HERNANDEZ (V.S.).
Preparation and use of papain for the production of fish hydrolysates.
Philipp. Agriculturist, 1968, 52, 2, p. 91-100.
- 112 - SCHACK (R.P.).
Isolation of a new proteolytic enzyme from papaya latex.
CR Trav. Lab. Carlsberg, 1967, 36, 4, p. 67-83.
- 113 - SCOCCA (J.) et LEE (Y.L.).
Composition and structure of the carbohydrates of pineapple stem bromelain.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 18, p. 4852-63.
- 114 - SCRIBAN (R.).
Identification et dosage de la papaine dans la bière. II.
BIOS, 1971, 1, p. 22-23.
- 115 - SCRIBAN (R.) et STIENNE (M.).
Die Rolle der Proteolischenbehandlung des Bieres.
Tagesz. für Brauerei, 1969, 66, 85, p. 554-556.
- 116 - SEN (D.P.) et SRIPATHY (N.V.).
Fish hydrolysates with papain.
Food Techn., mai 1962, 16, 5, p. 138-142.
- 117 - SEYFADEH (H.).
Traitement enzymatique des désordres post-praudiaux.
Mediz. Welt, dec. 1970, 49, p. 2122-2124.
- 118 - SGARBIERI (V.C.) et GUPTA (S.M.).
Ficus enzymes - I. Separation of proteolytic enzymes.
J. Biol. Chem., 1964, 239, p. 2170.
- 119 - SHIGEI (A.) et AKTRA (S.).
Protective effect of bromelain against adrenalin pulmonary edema of rats.
Jap. Heart J., 1967, 8, 6, p. 718-720.
- 120 - SHRIVPURI (O.N.) et DUA (K.L.).
Ann. Allergy, 1963, 21, 3, 139-144.
- 121 - SKELTON (G.S.).
Development of proteolytic enzymes in papaya.
Phytochem., 1969, 8, p. 59-60.
- 121 bis - SMITH (G.C.).
Increasing the tenderness of the Bullock beef by use of antemortem enzyme injection.
J. Food Sci., jan. 1973, 38, 1, 381-382.
- 122 - De SOUZA (A.H.).
Bromelina.
Rev. Soc. Brasil. Anim., 1948, 17, p. 67-80.
- 123 - STAPERT (P.G.).
Détergents enzymatiques.
Nouv. Naarden, nov. 1969, 20, 209, p. 4-6.
- 124 - STARKOW (G.L.).
Thérapie des affections oculaires par la papaine.
Klin. Monatsbl. Augenheilkd., dec. 1971, 159, p. 755-759.
- 125 - SUZUKI (H.).
Some properties of cellulases of pineapple stem.
Bot. Mag. Tokyo, 1972, 84, 996, p. 389-397.
- 126 - TASSONI (P.).
Action liquéfiante des enzymes.
Valsalva, dec. 1970, 46, p. 281-285.
- 127 - TEIXEIRA (C.G.).
Extração de latex da papaia.
Agronomico (Campinas), 1965, 17, 11, p. 4-6.
- 128 - TESSLER (L.).
Les bromelaines en phlébologie.
Phlébologie, juin 1965, 18, 2, 137-141.
- 129 - THEODORE (P.).
The proteolytic enzyme Ficin.
Diss. Abstr., 1969, B 28, 2, p. 532.
- 130 - TORRES DE CASTRO
Enzymes do ananas.
Univ. Tecn. Lisboa, Inst. Sup. Agronom., 1970, p. 141.
- 131 - TUTTYA (I.).
Enzymatic degumming of silk wick papain.
J. Sericicult. Sci. Jap., 1967, 36, 2, p. 120-124.
- 132 - UNDERKOFER (L.A.).
Meat tenderizer.
US Pat. 2.904.442, sep. 1959.
- 133 - VAISHWANA (P.) et JIDDEWAR (G.G.).
Effect of papain on hepatic lipids in fatty liver.
Ind. J. Exp. Biol., oct. 1970, 8, 4, 328-329.
- 134 - VALLANCIN (B.).
Intérêt en ORL des bromelaines.
Gaz. Med. Fr., 2 dec. 1964, 71, 4304-4305.

- 135 - VASCONCELOS (W.).
Action d'un mélange enzyme-antibiotique pour le traitement des affections cutanées.
Rev. Bras. Med., oct. 1969, 26, p. 616-619.
- 136 - WANG (M.) et WEIR (C.E.).
Enzymatic tenderization of meat.
Food Res., oct. 1958, 23, 5, p. 423-438.
- 137 - WHITAKER (J.R.) et EL GHARDAMI (M.).
Tenderization of meat with proteolytic enzymes.
Proc. 13^e Conf. Calif. Pig Inst., fev. 1959, 7-10.
- 138 - WIEG (A.J.).
Une nouvelle méthode de brassage de la bière.
Nouv. Naarden, mai 1969, 20, 204, p. 5-10.
- 139 - WILLIAMS (D.C.).
Some properties of plant proteolytic enzymes, ficin and papaïn.
Diss. Abst., 58, jan. 1969, 29, 7, p. 22968-22978.
- 140 - WILLIAMS (D.C.) et SGARBIERI (V.C.).
Proteolytic activity in the genus *Ficus*.
Plant. Phys., 1968, 43, 7, p. 1083-1088.
- 141 - WINNICK (T.) et CONE (W.H.).
Activation of ficin.
J. Biol. Chem., 1944, 153, 465.
- 142 - YOUNG (M.H.) et WARNER (W.D.).
Process for purifying bromelain.
US Pat. 3.442.764, mai 1969.
- 143 - ZAFARI (I.).
Action thérapeutique des bromélines en traumatologie et petite chirurgie.
Thèse med. Paris, 1964, n°489, 35 p.
- 144 - ZOCH (H.).
Teneur en enzyme des papaiïnes commerciales.
Arzmittelforsch., sep. 1969, 19, p. 1593-7.

Note - Afin de ne pas alourdir le texte, nous avons cité seulement le ou les premiers auteurs des articles et parfois condensé le titre. Nous nous en excusons auprès des auteurs.

