

Activité protéolytique de l'ananas utilisé en conserverie et de ses déchets.

Renée TISSEAU*

ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE L'ANANAS UTILISE EN CONSERVERIE ET DE SES DECHETS

Renée TISSEAU (IRFA)

Fruits, Jun. 1976, vol. 31, n°6, p. 373-378.

RÉSUMÉ - La broméline existe dans toutes les parties du plant d'ananas et peut être obtenue à partir des déchets de conserverie.

Un échantillonnage reproduisant fictivement le découpage industriel de l'ananas a permis de comparer la broméline extraite des parties comestibles du fruit à celle que l'on extrait des déchets.

Les mesures d'activité protéolytique des bromélines séparées par précipitation acétonique ont été faites à partir de deux tests d'activité :

- Test de coagulation du lait,
- Test de digestion de la caséine.

On confirme l'activité enzymatique supérieure des extraits de fruits traités encore verts.

L'activité enzymatique de la broméline de l'écorce, bien que non négligeable, est généralement plus faible que celle de la broméline extraite des autres parties du fruit.

Cette étude technologique s'inspire en grande partie des recherches de Guy MARCILLAT sur la broméline de l'ananas. Guy MARCILLAT, élève du Professeur CROUZET, de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, a effectué un stage de longue durée au Laboratoire de Chimie-Technologie de l'IRFA. Nous pensons pouvoir proposer prochainement à nos lecteurs de larges extraits de sa thèse : «Étude sur la broméline de l'ananas».

R. HUET

La broméline, enzyme protéolytique que l'on trouve dans le commerce, provient généralement de tige d'ananas. Le fruit en contient lui-même des quantités non négligeables et nous avons tenté d'évaluer la production envisageable à partir de déchets de conserverie.

Cette étude comprend :

- un échantillonnage reproduisant fictivement le découpage industriel de l'ananas,

* - Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (IRFA)
B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France).

- une extraction de broméline par précipitation à l'acétone,
- la mesure de l'activité enzymatique et la mesure de l'activité spécifique des extraits.

ECHANTILLONNAGE

Deux lots de fruits ont été utilisés. Le premier, acheté dans le commerce, se composait de petits fruits très mûrs qui avaient subi un transport maritime et un entreposage de durée indéterminée. Le deuxième se composait de gros

fruits 4/4 verts provenant de la République populaire du Bénin par voie aérienne.

Chaque lot de six fruits a été découpé en trois échantillons :

- 1) échantillon T : partie qui constitue les tranches après passage à la cylindreuse-écoeuruse (en conserverie),
- 2) échantillon J : partie avec laquelle on prépare le jus d'ananas et le «crush». Elle comporte le cylindre central et les portions de pulpe adhérant à l'écorce que l'on récupère après grattage à l'aide de l'«éradicateur»,
- 3) échantillon E : formé par l'écorce ayant subi le traitement 2 et par les calottes inférieures et supérieures du fruit.

On extrait le jus de chaque échantillon par broyage dans un appareil ménager et filtration du broyat à travers une mousseline.

Les mesures pondérales effectuées au cours de cet échantillonnage sont consignées au tableau 1.

EXTRACTION DE LA BROMÉLINE

On utilise la précipitation à l'acétone selon la méthode décrite par HEINICKE et GORTNER (3) pour la préparation commerciale de la broméline de tige.

Un volume de jus refroidi entre 0 et 4°C est mélangé à un volume d'acétone pure réfrigérée à -20°C. Le précipité obtenu, d'activité enzymatique négligeable, est séparé par centrifugation à basse température et éliminé. On ajoute au surnageant une fois son volume d'acétone froide (-20°C) et on sépare par centrifugation le nouveau précipité. Le culot de centrifugation séché sous vide et broyé au mortier constitue la poudre. Pour des raisons que nous n'avons pas précisées, le degré de clarification des jus n'est pas constant et les rendements varient entre 2 et 5 g d'extrait par kg d'échantillon frais quel qu'il soit.

Une meilleure représentation du taux d'extraction consiste à l'exprimer, non pas en poids de poudre sèche brute, mais en poids de protéines. A cet effet nous avons dosé la teneur en protéines des extraits par la méthode de LOWRY (5). Elle consiste à mesurer l'intensité de la coloration bleue obtenue par action du Réactif de Folin-Ciocalteu sur la solution protéique en présence de sels cuivriques et en milieu basique. On utilise comme référence une gamme étalon de sérum albumine bovine. L'intensité de la coloration est fonction de la teneur en tyrosine et en tryptophane.

Les dosages ont été effectués sur chaque échantillon, pour chaque fruit, et les moyennes sont exprimées en g de protéine par kg d'échantillon traité (tableau 2).

MESURES D'ACTIVITÉ DE LA BROMÉLINE EXTRAITE

La broméline extraite de l'ananas est constituée par plusieurs protéines dont la composition en acides aminés diffère (7). La séparation de ces protéines par chromatographie sur DEA cellulose ou sur Sephadex permet la mise en évidence de plusieurs pics d'activité enzymatique, 3 à 6 selon les méthodes de séparation et selon les parties du plant d'ananas dont les protéines étaient extraites.

C'est ainsi que G. MARCILLAT (6), après avoir précipité la broméline des parties du même fruit constituant soit les tranches, soit le cylindre central, a soumis les extraits à une chromatographie sur DEA cellulose. Il a mis en évidence trois pics d'activité protéolytique dans la broméline extraite des tranches et six dans la broméline extraite du cylindre central (figures 1 et 2).

On peut mesurer ces activités en faisant agir les protéases de la broméline sur différents substrats naturels tels que la caséine, l'hémoglobine, la ficine ... ou synthétiques tels que le benzoyl-L-arginine amide (BAA) ou le benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE). Pour l'étude d'une activité protéolytique bien déterminée, il est plus rationnel d'utiliser des substrats synthétiques spécifiques de cette activité et dont la synthèse permet une formulation rigoureusement constante. Les substrats naturels, de par leur complexité, ont l'avantage dans notre objectif de mettre en valeur une activité enzymatique plus globale de l'extrait ; par ailleurs leur vitesse d'hydrolyse est plus rapide. Nous les avons utilisés malgré l'inconvénient que représente la disparité éventuelle de leurs différentes sources. Nous avons effectué deux séries de mesures d'activité :

- Activité protéolytique mesurée par la méthode de coagulation du lait (méthode de BALL et HOOVER modifiée par HINKEL et ALFRED (8)).
- Activité protéolytique sur la caséine selon la méthode de KUNITZ (4).

Mesure de l'activité protéolytique par le test de coagulation du lait.

La poudre brute résultant de la précipitation acétonique est dissoute dans une solution tamponnée à pH 6 de chlorhydrate de cystéine 0,035 M qui agit comme activateur. Un aliquot est introduit dans un tube à essai contenant 15 ml d'une solution à 20 p. cent de lait en poudre dans un tampon acide acétique - hydroxyde de sodium à pH 4,5. Le tube à essai est maintenu à une température de 40° dans un bain-marie thermostaté. On chronomètre le temps qui s'écoule entre l'addition de solution de poudre enzymatique et le début de coagulation du lait. Pour tester la méthode, nous avons utilisé une broméline de tige du commerce comme échantillon de référence. Nous avons constaté que, dans nos conditions, les mesures sont parfaite-

TABLEAU 1 - Teneur en jus des différentes parties de l'ananas provenant d'un découpage industriel fictif.

Échantillons	Poids moyen par fruit (g)	Volume de jus (ml)	Volume de jus par kg échantillon (ml).
fruits mûrs			
T	405	258	640
J	206	129	620
E	286	109	380
fruits verts			
T	1.045	690	660
J	490	351	720
E	566	225	400

TABLEAU 2 - Rendements en broméline brute et en protéines précipitées des diverses parties de l'ananas.

Échantillons	Rendement en poudre brute (g/kg échantillon)	Rendement en protéines précipitées (g/kg échantillon)
fruits mûrs		
T	4,95	0,38
J	4,15	0,35
E	4,90	0,44
fruits verts		
T	3,73	0,44
J	3,46	0,51
E	3,01	0,43

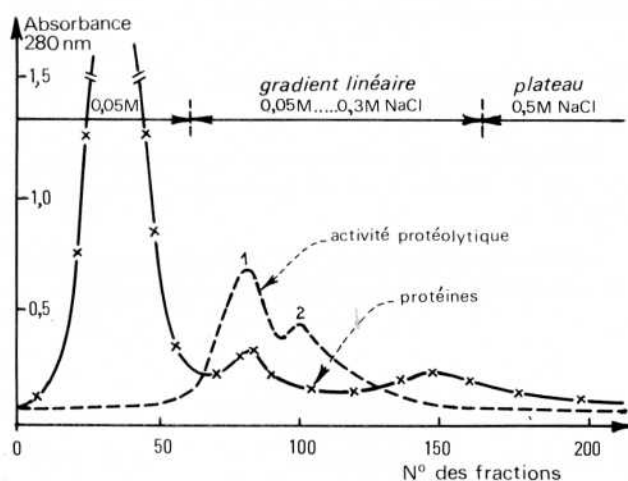


Figure 1 • CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE CELLULOSE DE LA BROMÉLINE DU FRUIT.

ment reproductibles si la température du bain-marie est rigoureusement stable et si la quantité de protéine enzymatique est suffisante pour déclencher la coagulation entre 55 et 90 secondes. Entre ces deux temps, on peut représenter par une droite la vitesse de coagulation d'une même solution de lait en fonction de la quantité de protéine enzymatique en solution d'un même extrait (figure 3).

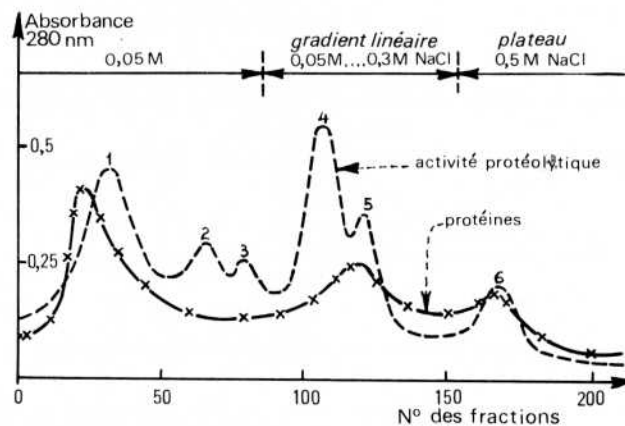
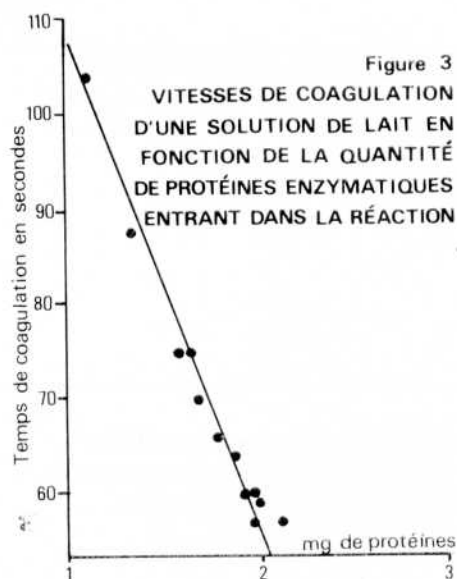


Figure 2 • CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE CELLULOSE DE LA BROMÉLINE DU CYL CENTRAL.

Par mesures successives, nous avons déterminé pour chaque échantillon la quantité d'extrait brut nécessaire pour faire coaguler 15 ml de solution de lait en 60 secondes. Nous en avons déduit la quantité d'échantillon frais correspondant. L'activité totale des échantillons a été exprimée en Unités de coagulation par g de fruit frais ; une valeur arbitraire de 100 Unités était attribuée à la quantité d'extrait qui coagule 15 ml de lait en 60 secondes. Les valeurs portées au tableau 3 ne concernent que les fruits



On exprime les activités spécifiques en Unités d'activité de coagulation par mg de protéine contenu dans l'extrait brut (tableau 5).

Dans les mêmes conditions la broméline de tige du commerce, utilisée comme échantillon de référence et contenant 57 p. cent de protéine, a une activité spécifique de 90.

Mesure de l'activité protéolytique en utilisant la caséine comme substrat.

A une température de 37°C la broméline, activée par la cystéine, hydrolyse la caséine en solution tamponnée à pH 7,6. Il y a libération d'acides aminés dont on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 280 nm.

Nous avons mesuré l'activité de la broméline extraite de chaque partie d'ananas en faisant agir sur la caséine des

TABEAU 3 - Activités totales dans les fruits verts exprimées en Unité de coagulation du lait par g d'échantillon frais.

fruits échantillon	fruits					
	A	B	C	D	E	F
T	18	16	26	14	10	11
J	17	13	29	12	14	17
E	14	15	18	9	11	8

TABEAU 4 - Activités totales dans les fruits mûrs exprimées en Unités d'activité de coagulation du lait par g d'échantillon frais.

fruits échantillons	fruits	
	I	II
T	8	7
J	9	4
E	6	2

quantités d'extrait brut correspondant chacune à 1 g d'échantillon frais (tableau 6).

On exprime l'activité spécifique sur la caséine par rapport à 1 mg de protéine contenu dans chaque extrait brut (tableau 7).

L'activité spécifique de la broméline de tige du commerce, mesurée dans les mêmes conditions, est égale à 1,00.

TABEAU 5 - Activités spécifiques en Unités de coagulation du lait par mg de protéine.

fruits échantillon	fruits verts						fruits mûrs	
	A	B	C	D	E	F	I	II
T	40	34	46	24	30	27	22	19
J	36	35	45	23	35	26	30	9
E	30	32	35	21	30	22	15	4

verts du deuxième lot. Par suite de leur surmaturité et du stockage qu'ils ont subi, les fruits mûrs du premier lot ont des activités très réduites qui n'ont pu être mesurées que sur deux fruits (tableau 4).

TABLEAU 6 - Activité totale exprimée en D.O. à 280 nm produite par l'action sur la caséine de la broméline extraite de 1 g d'échantillon frais.

fruits échantillon	A	B	C	D	E	F
T	0,370	0,600	0,398	0,495	0,687	0,357
J	0,398	0,582	0,364	0,488	0,568	0,570
E	0,307	0,510	0,427	0,654	0,356	0,330

TABLEAU 7 - Activité spécifique sur la caséine.

fruits échantillon	A	B	C	D	E	F
T	0,82	1,30	0,71	0,87	2,08	0,89
J	0,85	1,62	0,57	0,92	1,42	0,88
E	0,67	1,11	0,82	1,52	0,96	0,89

DISCUSSION

La mesure de l'activité des extraits de broméline donne dans certains cas des enseignements divergents, selon le substrat utilisé. C'est ainsi que, sur la caséine, l'activité spécifique des extraits de fruit se situe en moyenne au même niveau que l'activité spécifique de l'extrait de tige du commerce. Par contre, l'estimation de l'activité par coagulation du lait donne une mesure deux à trois fois plus faible pour les extraits de fruit. Une divergence semblable a été signalée par OTA et coll. (7) entre activités de broméline de tige et de broméline de fruit mesurées sur la caséine ou sur la benzoyl-L-arginine amide (BAA). Sur la caséine, l'activité mesurée en variation d'absorbance par mg d'extrait, à 280 nm, passe de 7,4 pour la broméline de tige à 4,0 pour la broméline de fruit vert ; sur la BAA, la variation d'absorbance à 570 nm va de 3,7 pour la broméline de tige à 9,1 pour la broméline de fruit vert.

Il apparaît cependant que la maturation finale du fruit provoque une diminution de toutes les formes d'activité de la broméline. OTA et coll. (7), comparant les extraits de fruits verts et de fruits mûrs, ont mesuré une diminution d'activité de 4,0 à 3,0 quand elle est mesurée par variations d'absorbance de substrat à la caséine, et de 9,1 à 7,2 avec un substrat au BAA. GORTNER et SINGLETON (2) ont fait des observations concordantes par le test de coagulation du lait. De même les tableaux 4 et 5 montrent une diminution d'activité très importante dans les extraits de fruits surmûrs. On peut également expliquer de la même façon l'activité réduite des extraits D-E et F, par rapport à celle des extraits A-B-C (tableau 3). En effet, ces fruits faisant partie du même lot cueilli au stade vert ont été soumis à l'extraction les uns, A-B-C, immédiatement et les autres, D-E-F, trois jours plus tard à un stade de maturité plus avancé, 1/4 jaune.

A l'intérieur d'un même fruit on observe peu de différence d'activité entre la partie constituant les tranches et celle dont on extrait le jus. Mais l'écorce du fruit donne généralement des extraits d'activité plus faibles quel que soit le mode de dosage, ou la maturité du fruit (tableau 6).

Les extraits enzymatiques ont été obtenus par précipitation à l'acétone, suivant la méthode mentionnée plus haut. Le procédé a été utilisé industriellement (1), car sa mise en oeuvre est simple et la récupération, puis le recyclage de l'acétone, aisée. On peut cependant craindre que le contact de ce solvant avec la protéine de l'enzyme conduise à une perte partielle d'activité. Pour cette raison on conseille actuellement l'emploi d'agents de précipitation plus adaptés, comme le sulfate d'ammonium. La récupération dans la liqueur de précipitation en est moins aisée, car sa concentration nécessite une dépense d'énergie non négligeable. Une étude ultérieure nous précisera si cette dépense est compensée par un gain d'activité appréciable.

CONCLUSION

L'intérêt que peut présenter la récupération de la broméline à partir de déchets de conserverie d'ananas nécessite une étude économique à laquelle nous pouvons apporter quelques éléments.

En premier lieu il faut savoir que les différentes méthodes de mesure d'activité ne donnent pas toujours des résultats concordants.

En second lieu l'activité enzymatique des extraits sera plus élevée si les fruits sont traités encore verts, ce qui est peu compatible avec l'obtention de produits tranches et jus de bonne qualité.

Nous avons montré enfin que l'écorce, qui constitue la grande masse des déchets, donne des extraits dont l'activité, bien que non négligeable, est généralement plus faible que

celle des autres parties du fruit.

Dans ces conditions la nécessité de parvenir à des coûts de production très bas paraît évidente.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anonyme.
New product from pineapple.
Food Eng., oct. 1957, 29, 10, p. 155.
2. GORTNER (W.A.) et SINGLETON (V.L.).
Chemical and physical development of the pineapple fruit. III.- Nitrogenous and enzyme constituents.
J. Food Science, 1965, 30, p. 24-29.
3. HEINICKE (R.M.) et GORTNER (W.A.).
Stem Bromelain. New protease from pineapple plant.
Econ. Bot., jul. 1957, 11, 3, p. 225-234.
4. KUNITZ (M.).
Crystalline Soybean trypsin inhibitor.
J. Gen. Physiol., 1947, 30, p. 291-305.
5. LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL.
Protein measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, p. 265-275.
6. MARCILLAT (G.).
Contribution à l'étude de la broméline de l'ananas.
DEA Biochim. Univ. Sci. Techn. Languedoc, Montpellier, juillet 1974.
7. OTA (S.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.).
Preparation and chemical properties of Stem bromelain.
Biochemistry, 1964, 3, p. 180-185.
8. WIELAND (H.).
Enzymes in Food Processing and Products.
Food Processing review, 1972, n 23.

