

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

Recherche d'une technique simplifiée d'extraction de la broméline.

Renée TISSEAU*

ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE L'ANANAS UTILISÉ EN CONSERVERIE ET DE SES DÉCHETS

Renée TISSEAU (IRFA)

Fruits, fev. 1977, vol. 32, n°2, p. 87-92.

RESUME - Après avoir mesuré dans une première partie l'activité protéolytique des extraits acétoniques obtenus à partir des divers organes de l'ananas, l'auteur recherche une technique simplifiée d'extraction de la broméline adaptable à l'industrie.

L'agent précipitant choisi étant le sulfate d'ammonium, les différents facteurs de la réaction - clarification, pH, température, durée de contact, concentration - sont systématiquement étudiés.

A la lumière des résultats, la technique de référence est aménagée afin de la rendre plus simple et moins onéreuse, tout en conservant une efficacité acceptable. On compare, sur divers substrats, technique de référence, technique simplifiée et technique à l'acétone. Il apparaît que la technique simplifiée n'est pas adaptée à tous les substrats : convenable avec le jus d'ananas, acceptable avec les tiges, elle n'est pas applicable aux écorces de fruits. Les mauvais résultats obtenus dans ce dernier cas sont imputables à la difficulté d'isoler les protéines en présence des composés phénoliques du jus de presse des écorces. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour trouver un agent complexant ces composés d'un prix moins élevé que celui qui a été utilisé dans la technique de référence.

La mesure de l'activité protéolytique de l'ananas et de ses déchets de conserverie a donné lieu à une première étude (*Fruits*, 1976, vol. 31, n°6, p. 373-378), au cours de laquelle nous avons utilisé un agent précipitant classique, l'acétone. Cependant il existe d'autres moyens de séparer le complexe enzymatique protéolytique de l'ananas, appelé broméline.

Le sulfate d'ammonium présente, au moins théoriquement, certains avantages sur l'acétone en tant qu'agent précipitant :

- meilleure stabilité de l'extrait enzymatique,
- purification par ultra-filtration plus aisée,
- possibilité de précipitation à température ambiante alors

que la volatilité de l'acétone exige des manipulations en milieu réfrigéré.

Par contre, la récupération et le recyclage de l'acétone sont aisés alors que la précipitation au sulfate d'ammonium exige d'importantes quantités de réactif difficilement récupérables. La technique de laboratoire utilisant le sulfate d'ammonium est longue et exige des réactifs coûteux : le jus, extrait du matériel végétal par pression, est clarifié par un mélange chlorure de calcium-polyvinyl pyrrolidone en solution dans un Tampon Tris (hydroxyméthylamino-méthane) à pH 7,5. Après centrifugation et décantation, le surnageant maintenu à 0-4° C est lentement additionné de sulfate d'ammonium à 80 p. cent de saturation.

On sépare le précipité enzymatique obtenu par centrifugation à 0-4°C.

* - IRFA - GERDAT, B.P. 5035 - 34032 MONTPELLIER CEDEX

La précipitation au sulfate d'ammonium peut présenter un intérêt pratique sur le plan industriel si une technique simplifiée à température ambiante permet d'obtenir un extrait enzymatique dont l'activité protéolytique est égale ou supérieure à celle de l'extrait acétonique.

Dans le but d'adapter la technique de laboratoire aux conditions qui régissent le fonctionnement d'une unité de transformation fruitière, nous attachant à la rendre plus pratique et moins onéreuse, nous avons étudié, en premier lieu l'influence de différents facteurs de précipitation.

La technique simplifiée a été ensuite comparée à celle plus classique qui utilise l'acétone comme agent précipitant.

PLAN DE LA RECHERCHE

Étude d'une technique simplifiée de précipitation par le sulfate d'ammonium.

- 1 - clarification
- 2 - pH de précipitation
- 3 - température de précipitation
- 4 - durée du contact avec l'agent précipitant
- 5 - concentration de l'agent précipitant
- 6 - mode opératoire retenu pour l'extraction de la broméline de l'ananas par précipitation au sulfate d'ammonium.

Comparaison de deux méthodes de précipitation utilisant l'une le sulfate d'ammonium et l'autre l'acétone comme agent précipitant.

- 1 - échantillonnage
- 2 - obtention d'extraits
- 3 - mesure de l'activité des extraits
- 4 - résultat

Étude d'une technique simplifiée de précipitation par le sulfate d'ammonium.

Dans cette première partie, les tests de précipitation ont été effectués sur des jus obtenus à partir de pulpe d'ananas.

● Clarification.

Dans l'industrie des jus de fruit, on utilise certains enzymes, pectinases-cellulases, rapidases ... pour hydrolyser les matières celluloses et pectiques. Après un temps de contact, on sépare par centrifugation un précipité contenant les pectines dépolymérisées, diverses impuretés et une partie des protéines associées. Le pH optimum d'action de ces enzymes se situe entre 3, 5 et 6, ce qui permet d'agir sur le jus d'ananas sans faire intervenir de solution tampon et donc sans dilution du jus. Malgré le risque d'une légère perte d'activité protéolytique, nous avons choisi cette méthode de clarification en utilisant une même pectinase-cellulase pour toutes les extractions au sulfate d'ammonium de l'étude [la «rapidase» (pectine méthyl estérase) testée ultérieurement nous a donné des résultats meilleurs que ceux de la pectinase-cellulase utilisée].

● pH de précipitation.

Les précipitations par le sulfate d'ammonium se font en milieu généralement tamponné à un pH voisin de 7. L'addition d'un tampon a l'inconvénient de diluer le jus d'ananas et d'exiger une plus grande quantité d'agent précipitant pour respecter un taux convenable de saturation du milieu.

Des extractions de broméline par le sulfate d'ammonium effectuées aux pH respectifs de 3, 5 et 7 ont été réalisées sur trois jus d'ananas différents. Les activités totales des extraits obtenus ont été mesurées par la méthode de coagulation du lait et exprimées en unité totale de coagulation par gramme d'échantillon frais [méthode de BALL et HOOVER, modifiée par HINKEL et ALFRED (1) décrite dans le premier chapitre]. La précipitation en milieu tamponné à pH 7 n'a pas augmenté l'activité sur la coagulation du lait des extraits enzymatiques obtenus à partir des jus d'ananas testés (tableau 1).

TABLEAU 1 - Activités totales en unité de coagulation par g d'échantillon de pulpe fraîche d'extraits précipités à deux pH différents.

échantillons	pH 3,5	pH 7
jus 1	16 U	16 U
jus 2	5 U	4 U
jus 3	20 U	18 U

● Température de précipitation.

Les opérations successives de préparation d'extraits enzymatiques par précipitation au sulfate d'ammonium s'effectuent généralement à une température de 0 à plus 4°C.

Nous avons étudié l'incidence d'une précipitation à température ambiante sur l'activité des extraits obtenus.

Les préparations d'extraits ont été faites d'une part à une température de plus 4°C, d'autre part à température ambiante de 22°C, sur deux jus différents de pulpe d'ananas.

Les activités des extraits obtenus sont mesurées par deux tests : test de coagulation du lait et test d'hydrolyse de la caséine selon la méthode de KUNITZ (2) (décrite dans le premier chapitre). Les résultats sont exprimés en unités totales de coagulation du lait par g de pulpe fraîche, et en absorbance à 280 nm, après hydrolyse d'une durée de dix minutes de la caséine par l'extrait provenant de 1 g de pulpe fraîche (tableau 2).

TABLEAU 2 - Variation d'activité totale de la broméline extraite à différentes températures.

échantillons	unité totale de coagulation par g de pulpe fraîche	D.O. à 280° par g de pulpe fraîche
Jus 1		
temp. 22°C	6 U	
temp. 4°C	7 U	
Jus 2		
temp. 22°C	11 U	1,05
temp. 4°C	13 U	1,01

L'élévation de la température d'extraction de la broméline a une action légèrement inhibitrice sur l'activité des protéases entrant dans la réaction de coagulation du lait.

● **Durée du contact avec l'agent précipitant.**

Nous n'avons pas pu mettre en évidence le bénéfice d'une diminution excessive de vitesse d'introduction du sulfate d'ammonium. Il est versé lentement (quelques minutes) de façon continue et en agitant régulièrement. Après complète dissolution du sel, on a fait varier les temps de contact avant centrifugation de plusieurs lots de jus, provenant de trois différents échantillons de jus de pulpe. Les mesures d'activité totale des différents extraits sont exprimées en unités totales de coagulation du lait par g de pulpe fraîche.

TABLEAU 3 - Activités totales exprimées en unité de coagulation du lait par g de pulpe fraîche d'extraits enzymatiques obtenus après différents temps de contact avec l'agent précipitant.

échantillons	Temps de contact				
	1 h	2 h	3 h	6 h	9 h
1	13 U	14 U	16 U		
2	12 U		12 U	12 U	
3	11 U		11 U	11 U	11 U

Dans nos conditions de travail, il n'est pas utile de prolonger au-delà d'une heure le temps de contact avant centrifugation du sulfate d'ammonium avec le jus d'ananas.

● **Concentration de l'agent précipitant.**

La précipitation des protéines du jus d'ananas est optimale lorsque la concentration finale du jus en sulfate d'ammonium atteint un certain degré de saturation.

En nous basant sur le tableau de concentrations finales de COLOWICK et KAPLAN (3), nous avons obtenu :

- 55 p. cent de l'activité totale entre 0 et 30 p. cent de saturation
- 39 p. cent de l'activité totale entre 30 et 60 p. cent de saturation
- traces d'activité entre 60 et 90 p. cent de saturation.

Un taux de saturation de 70 p. cent semble suffisant.

● **Mode opératoire retenu pour l'extraction de la broméline de l'ananas par précipitation au sulfate d'ammonium d'un poids donné d'échantillon.**

Le jus d'ananas correspondant à un poids donné d'échantillon est extrait par broyage dans un appareil ménager et filtré à travers une mousseline.

On clarifie le filtrat en ajoutant sous agitation 2 g de pectinase-cellulase par litre de jus. Après une heure de repos, on centrifuge à 6.000 t/minute. Après décantation, on introduit le sulfate d'ammonium, de façon à obtenir une concentration finale égale à 70 p. cent de saturation, soit 472 g de sulfate d'ammonium par litre de jus clarifié. Le sel est introduit par petites doses sous une agitation magnétique que l'on continue pendant quinze minutes avant de transvaser la solution dans des godets de centrifugation.

Après une heure de repos à température ambiante, on centrifuge pendant quinze minutes à 6.000 tours/minute. On récupère le précipité qui est séché dans un dessiccateur sous vide jusqu'à poids constant. Après broyage au mortier, la poudre enzymatique brute obtenue est gardée au congélateur.

Comparaison de deux méthodes de précipitation utilisant l'une le sulfate d'ammonium et l'autre l'acétone comme agent précipitant.

Certaines des modifications apportées à la technique de précipitation de la broméline par le sulfate d'ammonium amènent une légère inactivation de l'extrait enzymatique final. La méthode proposée peut présenter un intérêt si cette action dépressive n'est pas supérieure à la dénaturation que risque la broméline au contact du solvant dans le cas de la précipitation acétonique.

L'étude a été réalisée à partir d'un lot de cinq ananas, reçu de Côte d'Ivoire par voie aérienne, chaque fruit étant accompagné de sa tige et de son pédoncule.

● **Échantillonnage.**

Chaque fruit a été divisé en trois échantillons :

- échantillon P : toute la partie pulpeuse du fruit, cylindre central compris
- échantillon E : formé par l'écorce totalement débarrassée de la pulpe ainsi que des calottes inférieure et supérieure du fruit
- échantillon T : tige et pédoncule réunis dans un même échantillon.

Chaque échantillon pesé est broyé dans un appareil ménager et filtré à travers une mousseline. Le filtrat mesuré est divisé en deux portions égales, la première sera traitée par précipitation acétonique, la seconde sera précipitée par le sulfate d'ammonium.

Après traitement, on obtiendra six échantillons d'extraits enzymatiques par fruit :

- échantillon PA - jus de pulpe précipité à l'acétone
- échantillon EA - jus d'écorce précipité à l'acétone
- échantillon TA - jus de tige et de pédoncule précipité à l'acétone
- échantillon PS - jus de pulpe précipité au sulfate d'ammonium
- échantillon ES - jus d'écorce précipité au sulfate d'ammonium
- échantillon TS - jus de tige et de pédoncule précipité au sulfate d'ammonium.

● **Extraction de la broméline.**

- Précipitation acétonique.

On utilise la méthode décrite par HEINICKE et GORTNER.

Un volume de jus refroidi à 0-4°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 -15°C et éliminé. On ajoute au surnageant une fois son volume d'acétone à -20°C et on sépare par centrifugation le nouveau précipité. Le culot de centrifugation est séché sous vide et broyé au mortier ; il constitue

l'extrait acétonique brut contenant la broméline.

- Précipitation au sulfate d'ammonium.

On utilise les procédés de clarification et de précipitation au sulfate d'ammonium décrits précédemment.

- Mesure de l'activité enzymatique de la broméline extraite par les différents procédés.

Les techniques de mesures par les deux tests d'activité utilisés : test d'activité protéolytique mesurée par la méthode de coagulation du lait et test d'activité protéolytique en utilisant la caséine comme substrat, ainsi que la définition des unités de mesure arbitraires employées ont été exposés dans le premier chapitre de cette étude (Fruits, 1976, vol. 31, n°6, p. 373-378).

L'activité totale des poudres enzymatiques, extraites des jus étudiés et exprimée en unité arbitraire de coagulation du lait par g d'échantillon frais traité, est consignée dans le tableau 4.

L'activité totale des poudres enzymatiques extraites des jus étudiés et exprimés en Deviation Optique à 280 nm, produite par l'action d'une durée de dix minutes sur la caséine de la broméline extraite de 1 g d'échantillon frais, est consignée dans le tableau 5.

TABLEAU 4 - Activité totale exprimée en unités de coagulation du lait par gramme d'échantillon frais.

échantillon	ananas				
	I	II	III	IV	V
PA	24	23	17	20	14
EA	4	5	3	7	4
TA	<1	1	1	1	<1
PS	24	29	22	24	23
ES	<1	2	<1	1	1
TS	2	1	<1	1	1

TABLEAU 5 - Activité totale exprimée en D.O. à 280 nm après action sur la caséine de la broméline extraite de 1 gramme d'échantillon frais.

échantillon	ananas				
	I	II	III	IV	V
PA	0,875	0,916	0,825	0,740	0,857
EA	0,460	0,674	0,374	0,845	0,425
TA	0,166	0,175	0,148	0,076	0,119
PS	0,876	1,015	0,828	1,023	0,990
ES	0,086	0,167	0,056	0,095	0,030
TS	-	0,189	0,167	-	0,035

Les protéines ont été dosées par la méthode de LAYNE (4) en utilisant les coefficients de correction de WARBURG et CHRISTIAN. La quantité de protéine est exprimée en mg de protéine contenus dans la poudre acétonique extraite de 1 gramme d'échantillon frais (tableau 6).

TABLEAU 6 - Rendement en protéine des extraits acétoniques exprimés en mg par gramme d'échantillon frais.

échantillon	ananas				
	I	II	III	IV	V
PA	0,85	0,75	0,73	0,65	0,84
EA	0,54	0,47	0,35	0,50	-
TA	0,45	0,60	0,66	0,66	0,52

L'activité spécifique est l'activité enzymatique rapportée à 1 mg de protéine contenue dans les extraits acétoniques (tableaux 7 et 8).

TABLEAU 7 - Activité spécifique exprimée en unité de coagulation du lait par mg de protéine contenue dans l'extrait acétonique brut.

échantillon	ananas				
	I	II	III	IV	V
PA	28	31	23	31	17
EA	9	8	4	11	8
TA	1	2	2	2	1

TABLEAU 8 - Activité spécifique exprimée en D.O. à 280 nm par action sur la caséine d'un extrait acétonique brut contenant 1 mg de protéine.

échantillon	ananas				
	I	II	III	IV	V
PA	1,03	1,25	1,13	1,13	1,30
EA	1,02	1,12	0,57	1,28	-
TA	0,31	0,37	0,42	0,15	0,82

Il est impossible de déterminer l'activité spécifique des extraits obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium; la clarification enzymatique des jus avant précipitation apporte une certaine proportion de protéines qui sont précipitées avec les protéines propres des jus et augmentent le taux de protéines dans les extraits.

DISCUSSION

L'extraction de la broméline de l'ananas par le sulfate d'ammonium à température ambiante est de réalisation facile.

Dans nos conditions, la précipitation du jus de pulpe sans réajustement de pH ainsi que la diminution du temps de contact avec l'agent précipitant n'ont pas eu d'interférence sur l'activité de l'extrait. Par contre, la clarification du jus de pulpe par un procédé enzymatique et la précipitation de température ambiante ont tendance à inactiver légèrement les extraits enzymatiques obtenus. Toutefois quel que soit le substrat utilisé pour les mesures, l'activité des extraits de pulpe obtenus à température ambiante par précipitation au sulfate d'ammonium est toujours égale ou

TABLEAU 9 - Activité totale exprimée en D.O. à 280 nm d'extraits d'écorce obtenus par différents modes de précipitation.

échantillon	précipitation acétonique	précipitation $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ après clarification enzymatique	précipitation $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ après clarification par le polyvinyl pyrrolidone
jus d'écorce 1	0,461	0,135	0,640
jus d'écorce 2	0,750	0,224	0,630

supérieure à l'activité des extraits de pulpe résultant d'une précipitation acétonique à basse température.

Les extraits de jus d'écorce, lorsqu'ils sont acétoniques, ont une activité protéolytique certaine si la mesure en est faite en utilisant la caséine comme substrat. Les extraits de jus d'écorce, lorsqu'ils sont obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium selon la méthode simplifiée, ont perdu la presque totalité de leur activité protéolytique. Ceci est dû aux composés phénoliques présents dans le jus d'écorce qui se combinent avec les protéines et empêchent l'isolation d'enzyme active (5). La présence dans le milieu d'extraction de Polyvinyl pyrrolidone (Polydar AT), qui a la propriété de complexer préférentiellement les composés phénoliques (6) permettrait d'obtenir à partir du jus d'écorce une broméline au moins aussi active que celle extraite par précipitation acétonique.

La vérification en a été faite en extrayant la broméline de deux jus d'écorce par différents procédés.

- 1 - extraction acétonique
- 2 - extraction par le sulfate d'ammonium selon la méthode simplifiée
- 3 - extraction par le sulfate d'ammonium selon la méthode simplifiée en ce qui concerne la température et la durée de contact, mais en utilisant le polyvinyl pyrrolidone (Polyclar AT).

L'activité protéolytique totale des extraits a été mesurée en utilisant la caséine comme substrat et exprimée en Déviation Optique à 280 nm, produite par l'action, d'une durée de dix minutes, sur la caséine, de la broméline extraite de 1 g d'écorce fraîche (tableau 9).

La présence du polyvinyl pyrrolidone ou d'un autre agent ayant les mêmes propriétés vis-à-vis des composés phénoliques (nylon, destran, polyéthylène glycol) est indispensable. Ces produits ont l'inconvénient d'être très onéreux. Des résines industrielles spécifiques de la séparation des polyphénols ne peuvent les remplacer car elles retiennent également une partie des protéines.

On commercialise généralement la «broméline» de tige. Dans nos conditions d'extraction, l'activité enzymatique rapportée à un même poids d'échantillon frais des extraits bruts de tige est toujours inférieure à celle des extraits bruts de pulpe ou d'écorce.

OTA, MOORE et STEIN (7) en 1964 ainsi que G. MARCILLAT en 1974 (8) ont trouvé des différences d'activité du même ordre entre la broméline de tige et la broméline de fruit en utilisant des substrats différents :

- caséine et benzoyl - L - argininamide (OTA et col.)

- caséine et benzoyl - L - arginine ethylester (G. MARCILLAT).

CONCLUSION

L'intérêt de nos résultats se module en fonction de la matière première que l'on utilise.

Les jus de pulpe se prêtent aisément à la production de broméline brute. La méthode simplifiée de précipitation au sulfate d'ammonium leur convient et présente des avantages sur la précipitation acétonique. L'extrait obtenu a une activité au moins égale à l'extrait acétonique et la technique est moins onéreuse, car la réfrigération n'est plus nécessaire. La récupération du sulfate d'ammonium à partir des solutions résiduelles peut être envisagée.

Les écorces d'ananas sont moins riches en broméline que la pulpe. Mais le jus de pulpe trouve d'autres débouchés rémunérateurs soit directement sous forme de jus pasteurisé ou congelé, soit après transformation en sirop pour être ajouté aux tranches, par contre l'écorce est une matière première disponible et impropre à d'autres usages.

Toutefois la méthode simplifiée d'extraction au sulfate d'ammonium n'est pas applicable aux écorces au niveau actuel de nos recherches. Le polyvinyl pyrrolidone, utilisé au cours de l'extraction en laboratoire, se révèle irremplaçable avec ce matériel végétal ; mais son prix élevé fait douter de la réussite commerciale d'une technique l'utilisant.

La méthode d'extraction industrielle de la broméline, à partir des déchets d'ananas, que nous avons mise au point, prendra toute sa valeur lorsque l'on aura trouvé un agent bon marché, susceptible de remplacer le polyvinyl pyrrolidone.

Les tiges d'ananas contiennent apparemment beaucoup moins de broméline que la pulpe et que l'écorce du fruit, quel que soit le mode d'extraction utilisé. La technique simplifiée au sulfate d'ammonium peut leur être appliquée sans risque de perte notable d'activité.

BIBLIOGRAPHIE

1. WIELAND.
Enzymes in food processing and products.
Food Processing Review, 1972, n°23.
2. KUNITZ (M.).
Crystalline Soybean trypsin inhibitor.
J. Gen. Physiol., 1947, 30, p. 291-305.

3. COLLOWICK et KAPLAN.
Methods in enzymology.
1955, vol. 1, p. 76.
4. LAYNE (E.).
Methods in enzymology.
1957, vol. 3, p. 451-484.
5. LOOMIS (W.D.) et BATAILLE (J.).
Plant Phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.
Phytochemistry, 1966, vol. 5, p. 423-438.
6. JONES (J.D.), HULME (A.C.) et WOOLTORTON (L.S.C.).
The use of polyvinyl pyrolidone in the isolation of enzyme from apple fruit.
Phytochemistry, 1965, vol. 4, p. 659-676.
7. OTA (S.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.).
Preparation and chemical properties of stem bromelain.
Biochemistry, 1964, 3, p. 180-185.
8. MARCILLAT (G.).
Contribution à l'étude de la broméline de l'ananas.
DEA Biochimie, Univ. Sc. Techn. Languedoc, Montpellier, juillet 1974.



ERRATUM :

Une inversion s'est produite au montage des photos de la revue FRUITS, vol. 32, n 1, p. 49.
Il convient de lire les légendes comme suit :

Photo 6 : Symptômes de concave gum sur une branche d'un oranger 'Hamlin' inoculé avec de l'écorce du pomelo 'Marsh seedless' A.R. 1.

Photo 7 : Écaillage de l'écorce d'un oranger 'Tarocco' greffé sur bigaradier.

Photo 8 : Écaillage de l'écorce d'un bigaradier greffé sur pomelo 'Marsh seedless' (arbre A.R. 1).

Photo 9 : Écaillage de l'écorce d'un bigaradier greffé en mandarinier 'Commun'.