

# Valorisation de déchets de conserverie d'ananas. Possibilités d'extraction de bromeline.

Renée TISSEAU\*

VALORISATION DE DECHETS DE CONSERVERIE D'ANANAS.  
POSSIBILITES D'EXTRACTION DE BROMELINE.

Renée TISSEAU

*Fruits*, Dec. 1986, vol. 41, n° 11, p. 703-708.

RESUME - L'extraction de la bromeline, enzyme protéolytique de l'ananas, peut s'intégrer dans une chaîne de récupération de déchets de conserverie d'ananas. Une fabrication expérimentale de bromeline à partir de déchets a été conduite dans une usine martiniquaise ; présentation de l'étude du rendement en poudre enzymatique brute et des analyses d'activité.

## INTRODUCTION

Environ 35 à 40 p. 100 du tonnage des fruits traités en conserveries d'ananas sont écartés sous forme de déchets (peaux, feuilles, etc.). Ces déchets posent un problème aux usiniers, étant donné le volume qu'ils représentent et la pollution qu'ils entraînent s'ils sont inutilisés. Les possibilités de récupération de ce matériel sont nombreuses ; la rentabilité de chacune d'elles dépend de l'infrastructure qu'elles nécessitent. Les utilisations les plus simples peuvent être l'épandage direct aux champs, la fabrication de compost ou, mieux encore, la transformation en tourteaux destinés à l'alimentation du bétail. Cette transformation, qui nécessite broyage et pressurage des déchets, aboutit à deux sous-produits ; d'une part, des résidus solides ou tourteaux qui, après ensilage, peuvent être utilisés avec profit pour engraisser bovins, ovins ou porcins et, d'autre part, le jus de presse représentant environ 35 p. 100 du tonnage des ananas entrés à l'usine. Ce dernier, appelé aussi deuxième jus, contient, entre autres constituants,

des sucres et des enzymes protéolytiques qui peuvent être récupérés séparément.

## VALORISATION DU JUS DE PRESSE

Le jus de presse représente environ 35 p. 100 du poids de déchets traités. Il contient de 7 à 10 p. 100 de matières sèches solubles : sucres, acides organiques, sels minéraux, enzymes protéolytiques ... et est chargé de particules en suspension : débris de cellules végétales, matières pectiques ... Il peut être transformé en vin, vinaigre, éthanol, utilisé pour une fabrication de citrates, etc. Mais, c'est surtout en vue de la récupération des sucres totaux qu'il contient (60 à 80 g/l) qu'il est actuellement traité dans certaines usines. Le jus centrifugé passe sur des colonnes-échangeuses d'ions qui laissent filtrer les sucres en retenant les autres constituants. On peut valoriser l'opération en intercalant un processus d'extraction d'enzymes protéolytiques entre la centrifugation du jus et la récupération des sucres sans nuire à la qualité et à la quantité des produits obtenus.

\* - IRFA/CIRAD - B.P. 5035 - 34032 MONTPELLIER CEDEX.

## EXTRACTION DE LA BROMELINE

**Procédé classique d'extraction industriel de bromeline «Stem bromelain».**

La bromeline, mélange de plusieurs enzymes hydrolases protéases à groupe thiol, existe en quantité variable dans les végétaux de la famille des Broméliacées. La bromeline commercialisée est extraite de l'espèce comestible *Ananas comosus* dont on cultive surtout la variété 'Cayenne lisse' pour la transformation en conserve ainsi que pour la consommation en fruits frais. Elle est présente dans toutes les parties de la plante mais la préparation commerciale est habituellement extraite de la tige (la «stem bromelain»). La méthode la plus couramment employée consiste à précipiter en milieu réfrigéré les protéines qui la constituent par de l'acétone à 0-4°C, et à isoler la bromeline par purification du précipité obtenu.

C'est un procédé coûteux pour une valorisation de sous-produit. On a mis au point une technique d'extraction mieux adaptée aux conditions d'une conserverie d'ananas en pays tropical.

**Principe de la technique d'extraction de bromeline du jus de presse (fig. 1).**

Les protéines enzymatiques constituant la bromeline de déchets sont en grande partie dissoutes dans le jus de presse. Leurs poids moléculaires élevés se situent entre 18 000 et 33 000. Une double ultra-filtration permet de les extraire puis de les concentrer.

Le jus de presse, préalablement clarifié par centrifugation, est filtré successivement sur une membrane P 100 000 qui retient les molécules dont le poids est supérieur à 100 000, puis sur une membrane P 10 000 qui retient et concentre les molécules dont le poids est compris entre 10 000 et 100 000, en particulier les protéines enzymatiques constituant la bromeline. Les molécules sont ensuite précipitées par du sulfate d'ammonium.

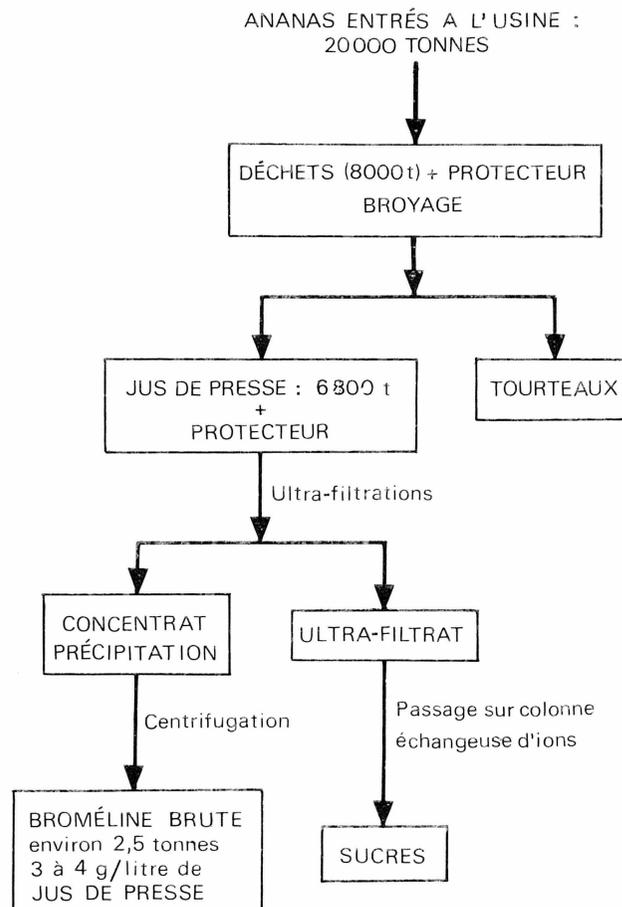
Le précipité, séparé par centrifugation, séché sous vide, constitue une poudre enzymatique brute qu'il convient de purifier selon les procédés classiques.

## CONDUITE DE L'EXPERIMENTATION

Elle a été menée dans une conserverie d'ananas située en Martinique.

Pour des raisons financières il était impérieux que les produits utilisés dans les préparations soient simples, faciles à manipuler et d'un prix de revient modique. Pour les mêmes raisons, toutes les manipulations ont été réalisées à la température ambiante (entre 25 et 30°C), alors que généralement les procédés d'obtention d'enzymes sont menés en milieu réfrigéré.

Figure 1 - SCHEMA D'EXTRACTION.



Le pH du jus de presse est voisin de 5, proche du pH optimum d'extraction de la bromeline. Une adjonction de tampon pourrait améliorer l'activité enzymatique finale, mais entraînerait une augmentation du prix de revient. On a été contraint, au cours des essais, de remplacer le sulfate d'ammonium pur pour analyse par du sulfate d'ammonium vendu comme engrais. Il n'a pas été constaté de diminution ni dans les rendements en poudre enzymatique, ni dans l'activité finale de ces poudres. L'engrais sulfate d'ammonium obtenu par synthèse est relativement pur, son prix de revient est faible et il peut convenir à une fabrication industrielle de bromeline.

Quelques phases essentielles de la production de bromeline ont été étudiées.

### Protecteur d'oxydation.

Au cours des opérations de broyage et de pressurage, l'éclatement des cellules libère des composés phénoliques qui s'oxydent rapidement en entraînant la complexation des protéines avec inhibition de leur activité enzymatique.

Il est nécessaire d'introduire le plus rapidement possible un composé réducteur qui limite ces réactions. Le métabisulfite de sodium a été choisi en raison de sa facilité d'utilisation et de son faible prix de revient. La dose de sel réducteur à introduire dans les déchets, ainsi que le stade de fabrication où cette introduction peut être faite, ont été étudiés en fonction de deux impératifs :

- La dose de métabisulfite doit être minimale pour éviter un coût important, mais suffisante pour empêcher l'oxydation des composés phénoliques.
- Pour que son efficacité soit maximum, le composé réducteur gagnerait à être introduit dans les déchets avant broyage. Mais, par ailleurs, on essaie de retarder son adjonction jusqu'au stade jus de presse en raison de l'utilisation ultérieure des tourteaux pour alimenter le bétail. On a étudié l'incidence de ce retard sur l'activité enzymatique du produit final.

#### Concentration et précipitation des protéines.

L'appareil d'ultra-filtration semi-pilote que nous avons utilisé (DC2 Amicon) nous a permis de séparer les protéines et de concentrer 10 à 20 fois leur solution, la dose d'agent précipitant nécessaire s'en trouvant réduite d'autant. Les protéines en solution précipitent par addition de certains sels neutres à forte concentration. Le sulfate d'ammonium a été choisi pour sa grande solubilité, son pouvoir précipitant élevé, sa disponibilité et son faible prix de revient. On a défini le pourcentage de concentration en sulfate d'ammonium de la solution précipitant donnant la meilleure activité au précipité.

### RESULTATS ET INTERPRETATION

#### Méthodes de dosage.

L'activité enzymatique des poudres résultant de chaque essai est dosée par deux méthodes d'une part, le test du «milk clotting» basé sur la coagulation d'une solution de lait et, d'autre part, le dosage d'activité enzymatique en utilisant la caséine comme substrat.

##### ● Test du milk clotting.

En présence d'enzymes protéolytiques, une solution de lait reconstitué tamponnée à pH 4,5, maintenue à 40°C, précipite en formant des grumeaux caractéristiques ; la vitesse de coagulation est fonction de l'activité enzymatique de la poudre.

On exprime ici les résultats en Unités arbitraires de coagulation ; un jus de presse, dont 1 ml produit la quantité de poudre enzymatique capable de faire coaguler à une température de 40°C et en 60 secondes, 15 ml de solution

de lait tamponnée à pH 4,5 titre 100 Unités arbitraires de coagulation.

##### ● Dosage d'activité utilisant la caséine comme substrat.

Une solution bien définie de caséine est hydrolysée à 40°C par une solution d'enzymes activées par de la cystéine. On stoppe l'hydrolyse au bout de 60 minutes par action de l'acide trichloroacétique. On mesure au spectrophotomètre la déviation optique à 280 nm des acides aminés libérés.

On exprime les résultats en Unités Papaine par mg de poudre NF PU/mg en utilisant une papaine étalon de titre connu comme référence, selon la méthode APA (technique préconisée par l'American pharmaceutical association).

#### Introduction d'agent protecteur.

Le but étant de protéger les protéines en évitant de charger les tourteaux en SO<sub>2</sub>, on expérimente différentes doses de métabisulfite de sodium introduites soit dans le broyat, soit dans le jus de presse. Les doses, le stade d'introduction, ainsi que les rendements en poudre et leur activité enzymatique sont détaillés dans le tableau 1.

On constate une baisse nette de rendement en poudre brute lorsque le métabisulfite est introduit dans le jus de presse après les opérations de broyage et de pressurage (essais 2 et 5), alors que l'activité enzymatique spécifique par milligramme de poudre reste assez voisine quels que soient les essais. L'oxydation des composés phénoliques a lieu très rapidement après l'éclatement des cellules, une partie des protéines se trouve complexée et ne précipite pas d'où la diminution de rendement en poudre brute.

Il serait donc important de pouvoir introduire, au moins en partie, le métabisulfite de sodium avant broyage. Une dose minime de 0,5 p. 1000 de métabisulfite peut protéger les protéines au moment de l'éclatement des cellules et être en grande partie dissoute dans le jus de presse. (Les traces restant dans les résidus de presse peuvent être éliminées si l'on destine ces tourteaux à l'alimentation du bétail. Un ajout complémentaire de 1 p. 1000 de métabisulfite dans le jus de presse, après séparation des tourteaux, protégerait les protéines pendant les processus de centrifugation et d'ultra-filtration. La totalité du métabisulfite introduit dans le jus se retrouve dans l'ultra-filtrat, après séparation des protéines, et est retenue ultérieurement sur les colonnes échangeuses d'ions destinées à libérer les sucres.

#### Précipitation des protéines - Dose d'agent précipitant.

Après ultra-filtration, les protéines qui ont été concentrées 10 à 20 fois sont en solution aqueuse. La précipitation de chacune d'elles est fonction du sel précipitant

TABLEAU 1 - Action du protecteur d'oxydation.

Essai N°	Dose de $S_2O_3Na_2$ introduite p. 1000	Stade d'introduction	Rendement en poudre brute par litre de jus traité (g/l)	Activité enzymatique sur la caséine NF PU/mg de poudre	Activité en Unités arbitraires de coagulation par ml de jus	mg de poudre nécessaire pour coaguler 15 ml de sol. de lait
1	1 + 1	dans le broyat dans le jus	6,0	7 500	36	17,0
2	0 + 1,5	dans le broyat dans le jus	3,7	7 900	28	11,0
3	1 + 1	dans le broyat dans le jus	7,7	7 200	50	15,0
4	1 + 1,2	dans le broyat dans le jus	6,9	6 500	44	15,6
5	0 + 2	dans le broyat dans le jus	3,1	6 100	22	15,4

TABLEAU 2 - Activité de la poudre enzymatique en fonction des doses d'agent précipitant.

Pourcentage de saturation en sel	Doses successives de $SO_4(NH_4)_2$ en g/l de solution de protéines	Doses cumulées de $SO_4(NH_4)_2$ en g/l de solution de protéines	Pourcentages de l'activité successifs	
			successifs	cumulés
20	114	114	42	42
40	129	243	28	70
60	147	390	20	90
80	171	561	8	98
100	206	767	2	100

TABLEAU 3 - Activité enzymatique des poudres brutes obtenues.

Essai N°	Rendement en poudre enz. brute en g/l de jus	Activité enzymatique sur la caséine Unités A.P.A. en NF PU/mg de poudre	Activité milk clotting en Unités arbitraires de coagulation par ml de jus	mg de poudre nécessaire pour coaguler 15 ml de sol. de lait
1	6	7 500	38	17
2	3,7	7 900	28	11
3	7,7	7 200	50	15
4	6,9	6 500	44	15,6
5	3,6	6 100	15	18
6	3,4	8 200	29	11,6
7	3,1	8 000	22	14,4
Bromeline brute industrielle		19 500		4,2
Papaïne raffinée standard		48 000		2,2

et du nombre de charges de chaque espèce ionique en solution. A des concentrations salines très élevées, les protéines peuvent être complètement précipitées. Pour définir le pourcentage de concentration de la solution de sulfate d'ammonium donnant les meilleurs résultats, on a réalisé une série de précipitations à des degrés croissants de

saturation en sel. Les degrés de saturation en sel et l'activité enzymatique correspondante des poudres isolées sont portés dans le tableau 2.

Pour espérer déclencher une précipitation pratiquement totale des protéines actives on a, dans tous les essais, employé 561 g de  $SO_4(NH_4)_2$  par litre de concentrat.

### Activité enzymatique des poudres obtenues.

Après précipitation des protéines et centrifugation, on récupère un précipité qui est séché sous vide et réduit en poudre.

L'activité enzymatique de la poudre brute obtenue à chaque essai est testée selon la méthode du milk clotting et dosée par action sur la caséine.

Des enzymes de titre connu, papaïne standard et bromeline brute industrielle, sont introduites en référence dans les séries de dosage. Les résultats sont indiqués tableau 3.

Il faut environ 8 fois plus de poudre extraite des déchets que de papaïne raffinée et 4 fois plus que de bromeline brute industrielle pour faire coaguler une même quantité de solution de lait dans des conditions identiques. L'activité mesurée par action sur la caséine est également environ 8 fois plus importante pour la papaïne raffinée et 3 à 4 fois plus pour la bromeline brute par rapport à la poudre enzymatique de déchets.

Les poudres brutes que nous avons obtenues sont relativement pauvres en protéines et très chargées en sulfate d'ammonium comme le montre le tableau 4.

TABLEAU 4.

Essai N°	Pourcentage de protéines	Pourcentage de sulfate d'ammonium
2	12	60
3	20	51
4	17	54
5	17	56
6	18	55
7		
8	23	59
Bromeline brute industrielle	85	
Papaïne raff.	60	

On peut éliminer le sulfate d'ammonium par dialyse. De ce fait, le rendement en poudre se trouve diminué de moitié environ, mais l'activité enzymatique du produit final est notablement augmentée et se rapproche de celle de la bromeline brute industrielle (Crude Bromelain). On notera cependant que le sulfate d'ammonium peut agir comme agent protecteur en cours de transport ou de stockage.

### Stabilité de la poudre enzymatique en cours de stockage.

Les poudres brutes conservées pendant 2 mois à l'obscurité dans un compartiment maintenu à 15°C gardent leur activité enzymatique.

### Thermoréaction.

Certaines préparations industrielles utilisent des composés enzymatiques à des températures élevées. La papaïne est généralement choisie pour sa thermostabilité.

Des échantillons de bromeline brute obtenus à partir de déchets d'ananas, ainsi qu'un échantillon de papaïne raffinée sont soumis à des températures de 55°C et de 70°C pendant 20 minutes. Les résultats des analyses d'activité exprimés en gamma tyrosine libérés par milligramme et par minute sont représentés sur la figure 2. L'activité de la papaïne augmente avec la température jusqu'à 44°C, revient au point initial à 70°C, alors que l'activité des bromelines de déchets, stable jusqu'à 55°C, chute rapidement lorsque la température augmente. Ces résultats ont été confirmés par des analyses de bromeline de déchets effectués dans les laboratoires de la société Rapidase.

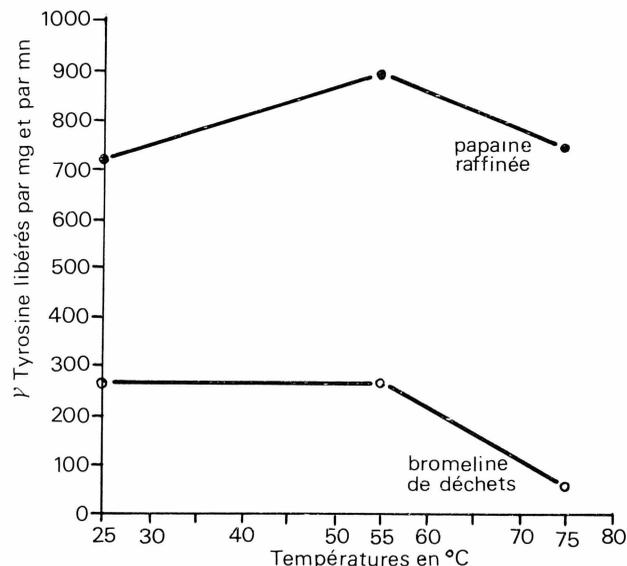


Figure 2 - ACTION D'UNE ELEVATION DE TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE COMPAREE DE LA PAPAINE RAFFINEE ET DE LA BROMELINE DE DECHETS.

### CONCLUSION

Les déchets de conserverie d'ananas, source d'encombrement et de pollution, peuvent être récupérés et transformés en un certain nombre de sous-produits. Trois d'entre eux sont complémentaires et peuvent être fabriqués successivement dans une même chaîne de récupération. Ce sont : les tourteaux destinés à l'alimentation du bétail, une enzyme protéolytique, la bromeline, et des sucres pouvant être isolés, concentrés et réintroduits dans les boîtes de tranches d'ananas.

Une fabrication expérimentale de bromeline de déchets a été conduite volontairement à température tropicale dans

une conserverie martiniquaise. On peut obtenir 1 à 2 g de bromeline brute à partir de déchets, par kg d'ananas entré à l'usine. Cette bromeline brute a une activité environ 8 fois plus faible que celle d'une papaine pure raffinée et 3 fois plus faible qu'une bromeline brute industrielle de tige. Le sulfate d'ammonium constitue une importante proportion de la poudre. Son élimination ultérieure diminuerait le rendement mais augmenterait la concentration de l'extrait en protéine active.

Une conservation de plusieurs semaines à l'obscurité et à une température de 15°C n'altère pas l'activité de la poudre brute. Stable jusqu'à la température de 55°C, l'activité enzymatique de la bromeline de déchets décroît lorsqu'elle est soumise à une température supérieure.

Le prix de revient de ce produit devrait être relativement faible étant donné la disponibilité des déchets et la rusticité du procédé de fabrication.

### BIBLIOGRAPHIE

- CAYGILL (J.C.).  
Sulphydryl plant proteases.  
*Enzyme Microb. Technol.*, 1979, 1 (oct.), p. 233-241.
- COLOWICK (S.P.) et KAPLAN (N.O.).  
Methods in enzymology.  
*Ed. Academy Press New-York*, 1955, vol. 1, p. 76.
- DUPAIGNE (P.).  
Quelques applications industrielles des produits entrant dans la composition des fruits.  
*Fruits*, 1973, 28 (1), p. 305-318.
- DUPAIGNE (P.).  
Effets biochimiques des bromelines. Leur utilisation en thérapeutique.  
*Fruits*, 1975, 30 (9), p. 545-567.
- HAGANA.  
Bromelain activation and stabilization.  
*Japanese Patent 71 37 866 (1971)*.
- HEBERT (J.P.), SCRIBAN (R.) and STROBBEL (B.).  
Analytical study of proteolytic enzymes for beer stabilization.  
*ASCB Journal*, 1977 (1), p. 31-36.
- HEINICKE (R.M.).  
Extraction of stem bromelain.  
*US Patent 3002 891 (1958)*.
- HEINICKE (R.M.).  
Stabilization of bromelain preparations.  
*US Patent 3293 143 (1970)*.
- HEINICKE (R.M.) and GORTNER (W.H.).  
Stem bromelain. New protease from pineapple plant.  
*Eco. Bot.*, Jul. 1957, 11 (3), p. 225-231.
- LOOMIS (W.D.) and BATAILLE (J.).  
Plant phenolic compounds and their isolation of plant enzymes.  
*Phytochem.*, 1966, 5 (3), p. 422-438.
- MARCILLAT (G.).  
Contribution à l'étude de la bromeline de l'ananas.  
*Thèse de Docteur en Biochimie*, 1978 USTL. Montpellier
- MOLL (M.) et VINH THAT.  
Quelques méthodes de contrôle des enzymes protéolytiques.  
*Bios*, 1971, p. 3-11.
- MURACHI (T.).  
Bromelain enzymes  
*Method in enzymology*, Dec. 1970, 19, p. 272-285.
- OTA (S.).  
Autodigestion of the main proteolytically active components of the stem bromelain.  
*J. Biochem.*, 1968, 71 (5), p. 494-500.
- OTA (S.).  
Fractionation and properties of the active components of bromelain in the stem and the fruit of pineapple plant.  
*J. of Biochemistry*, 1972, 71 (5), p. 817-830.
- OTA (S.) and MOORE (S.).  
Preparation and chemical properties of stem bromelain.  
*Biochemistry*, 1964, 3, p. 180-184.
- SCRIBAN (R.), HEBERT (J.P.) et STROBBEL (B.).  
La papaine industrielle.  
*Union Générale des Brasseries françaises - BIOS* 1975, (7-8), p. 254-265.

