

IXe CONGRES DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES

- B U D A P E S T I 9 6 3 -

DETERMINATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES SUBSTANCES COLLAGENES

METHODES CHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES

par : Cl. BARRAUD
R. VOLFF

DETERMINATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES SUBSTANCES COLLAGENES

METHODES CHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES

-:-

par Cl. BARRAUD
et R. VOLFF (I)

La teneur en substances collagènes demeure l'un des critères d'appréciation les plus valables de la qualité des produits alimentaires à base de viandes.

Les textes législatifs tendent d'ailleurs à en limiter le taux dans différents produits, ainsi par exemple en France, l'arrêté du 28 Mai 1957 fixe à 5 % maximum la proportion de "couennes, tendons, nerfs et aponévroses" dans les pâtés ordinaires ; la circulaire du 3 Août 1912 interdit l'emploi dans la préparation de la charcuterie des "déchetts sans valeur alimentaire, tels que couennes ou tendons, si ce n'est pour obtenir de la gélatine".

Mais l'estimation de ces substances reste difficile pour le laboratoire de contrôle, bien que soient décrites des méthodes chimiques, basées sur le dosage de l'hydroxyproline et des méthodes histométriques faisant appel à des colorants spécifiques du collagène. Nous les avons mises en oeuvre dans l'appréciation de couenne ajoutée à des saucisses cuites à pâte fine.

Avant même de rendre compte de ces résultats, il est indispensable de faire quelques remarques préliminaires.

Le législateur a groupé sous le même interdit ou la même restriction la "couenne" (au singulier et au pluriel), les "tendons", les "nerfs" (sans doute au sens professionnel de "tendons"), les "aponévroses", les "déchetts sans valeur alimentaire", c'est-à-dire apparemment tous les tissus riches en fibres élastiques et conjonctives. Pourtant, il faut reconnaître que tous ces tissus n'ont pas la même signification péjorative. Par exemple, la présence de fragments d'aponévroses ou de tendons ne saurait faire systématiquement sous-estimer un produit qui, par ailleurs, présenterait des

(I) Laboratoires du Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viandes

Directeur : Cl. BARRAUD

Institut National de la Conserve (Institut APPERT) Service : Vérification et Analyses

Directeur : R. VOLFF.

caractéristiques chimiques et organoleptiques satisfaisantes : la préparation industrielle ne relève pas de la dissection anatomique ; il est impossible de réaliser à grande échelle, un parage parfait des viandes. Par contre, l'addition de couenne en nature, dans une saucisse ou un saucisson sec ne saurait être admissible et doit même être considérée comme une fraude manifeste.

La couenne en nature est prohibée, mais l'emploi comme liant de la gélatine qui en dérive est autorisé. Or, chacun sait que, sur le plan technologique, l'incorporation de couenne, en petite quantité, améliore favorablement la tenue des hachis de viande soumis à un autoclavage ou à une cuisson prolongée. Les fragments de couenne subissent alors une transformation partielle en gélatine qui contribue à la liaison du produit. Dans ce cas, doit-on considérer que l'on dose de la couenne ou de la gélatine ?

Il apparaît qu'un dosage chimique, global et aveugle, du collagène peut faire conclure à des résultats erronés, et qu'il est indispensable de compléter les résultats de l'analyse chimique par un examen histologique qui renseignera sur la nature du collagène dosé.

PREPARATION DES ECHANTILLONS -

Il a été préparé en usine des échantillons de saucisses à pâte fine de type Francfort et Strasbourg, contenant de la couenne à des taux différents. Le mot "couenne" est entendu ici dans le sens de tégument cutané.

En vue de tenir compte des divers procédés industriels d'utilisation des couennes, celles-ci ont été traitées de trois manières différentes, correspondant aux lots A, B, C suivants :

- les couennes du lot A sont cuites à l'eau chaude, pendant 20 minutes, égouttées et hachées encore chaudes dans un broyeur colloïdal. (Les caractéristiques du broyeur utilisé sont les suivantes : rotation à 2800 tours-minute environ, diamètre des orifices de la dernière grille : 1 m, possibilité de passer le hachis plusieurs fois de suite en circuit continu). La masse fluide obtenue est salée à 2 % et recueillie dans des bacs où elle se prend en masse sous l'aspect d'un magma compact, blanchâtre et de consistance élastique.

- Les couennes du lot B sont traitées comme précédemment, mais leur cuisson dure 3 heures en eau, additionnée de vinaigre. Elles forment après refroidissement, une masse comparable à celle du lot A. Une partie de ce lot est colorée par du carmin de cochenille liquide à raison de 100 g pour 100 kg ; cette partie constitue le lot B_I ; cet essai de couennes colorées correspond au fait que, dans la pratique habituelle, certains fabricants colorent légèrement les couennes pour les rendre moins apparentes dans les produits finis.

- Les couennes du lot C ne subissent aucune cuisson ; elles sont passées crues au broyeur colloïdal, additionnées d'une égale quantité de glace en neige pour éviter tout échauffement. L'essai portant sur les couennes à l'état cru correspond au fait que la cuisson nuit, en général, aux colorations histologiques et qu'il est donc intéressant de comparer les aspects microscopiques que présente la couenne crue et après cuisson. Les couennes hachées crues, se prennent mal en masse et restent molles. Une partie des couennes du lot C est colorée au carmin comme précédemment, et constitue le lot C_I.

Les saucisses, elles-mêmes, sont du genre Francfort (pur porc) et Strasbourg (viande de boeuf et gras de porc).

La mêlée de base des saucisses de Francfort répond à la formule suivante :

- maigre trié de porc..... 50 kg
- glace (en neige)..... 20 kg
- gorges de porc salées..... 50 kg

.../...

Le maigre a été, au préalable, paré des aponévroses, nerfs et tendons. Les blocs de couennes, préparés la veille, sont découpés en tronçons et passés au hachoir à grille de 1 mm environ, les couennes prennent alors l'aspect d'une semoule humide. Elles ont été versées dans le cutter dans les proportions ci-dessous. Les gras ont été parfaitement débarassés des "rougeurs" et des glandes salivaires. Les saucisses ont été introduites en fumoir à 45°C pendant 4 heures, puis cuites pendant 10 mn, dans de l'eau non colorée, portée à 80°C.

La farce des saucisses de Strasbourg répond à la formule suivante :

- viande maigre de boeuf de 2e qualité.... 50 kg
- glace en neige..... 27 kg
- gorges de porc salées..... 50 kg

Cette série d'essais à base de viande de boeuf a été spécialement préparée avec de la viande de 2e choix, afin de faire porter l'étude sur des échantillons riches en collagène constitutif.

Les couennes sont ajoutées dans les proportions suivantes :

| Francfort | Echantillon Strasbourg | lot de couenne utilisé | % couenne ajoutée |
|-----------|---------------------------|---------------------------|----------------------|
| F1 | S1 | O | témoin |
| F2A | S2A | A | 4,8 |
| F3A | S3A | A | 9,1 |
| F4A | S4A | A | 13,0 |
| F2B | S2B | B | 4,8 |
| F3B | S3B | B | 9,1 |
| F4B | S4B | B | 13,0 |
| F3C | | C | 8,3 |
| F3BI | | BI | 9,1 |
| F3CI | | CI | 8,3 |

METHODES HISTOLOGIQUES MISES EN OEUVRE -

Ces méthodes ont été exposées par l'un de nous (Cl. BARRAUD - Techniques histologiques appliquées aux produits alimentaires à base de viande - Rec. Med. Vet. Alfort - 1963, 139, 243-261).

Il est fait trois prélèvements par saucisse : un au centre et un à chaque extrémité. Chaque prélèvement est représenté par un bloc de 25 mm de long et 5 mm d'épaisseur environ, ayant comme largeur le diamètre de l'échantillon . Il est opéré longitudinalement et non transversalement à la saucisse, afin que la coupe ultérieure réalise un rectangle de plus grandes dimensions possibles.

Tous les blocs de prélèvement sont inclus en paraffine selon la méthode classique d'histologie. Ils ont été, au préalable, plongés dans un bain d'acide trichloracétique à 3 % pendant 24 heures environ, afin de

ramollir les fragments de couenne. Les coupes ont, en moyenne, 2 à 3 microns d'épaisseur. Elles sont colorées par l'hématéine-éosine et par le picro-indigo-carmin selon Calleja.

Le mode de lecture et d'appréciation quantitative des couennes a été exposé en détail dans l'article précité. C'est un procédé d'histométrie faisant appel à du matériel simple : il consiste à poser la préparation dont les éléments collagènes sont spécifiquement colorés, sur un carré de papier millimétré et à observer l'ensemble par transillumination, à l'aide d'une loupe binoculaire de grossissement X 10 ; on compte le nombre de mm carrés couverts par les fragments de couenne et l'on rapporte à la surface totale de la préparation.

RESULTATS ET DISCUSSION -

Les résultats d'estimation histologique figurent au tableau suivant :

.../...

412

| ECHANTILLONS | % JOUENNE AJOUTEE | HEMATEINE - EOSINE (3 lectures) | CALLEJA (3 lectures) | MOYENNE | MOYENNE CORRIGEE | ERREUR |
|--------------|----------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------|---------------------|--------|
| Francfort FI | 0 | 1,0 1,1 0,8 | 0,8 0,9 0,3 | 0,8 | 0,8 | 0 |
| F2A | 4,8 | 6,4 7,2 6,5 | 8,0 6,9 6,9 | 6,9 | 4,5 | - 6 % |
| F3A | 9,1 | 14,2 15,0 13,6 | 12,4 12,6 9,1 | 12,8 | 9,0 | - 1 % |
| F4A | 13,0 | 10,5 15,5 13,7 | 15,3 15,7 15,1 | 14,3 | 10,3 | - 23 % |
| F2B | 4,8 | 8,0 7,5 8,0 | 6,2 6,9 8,0 | 7,4 | 4,9 | + 2 % |
| F3B | 9,1 | 14,1 14,4 12,9 | illisibles | 13,8 | 9,8 | + 8 % |
| F4B | 13,0 | 11,5 10,6 13,4 | illisibles | 11,8 | 8,3 | - 30 % |
| F2Bj | 9,1 | 9,5 13,9 15,1 | illisibles | 12,8 | 9,0 | - 1 % |
| F3C | 8,3 | 10,0 9,7 8,5 | 10,2 7,5 6,9 | 8,8 | 7,8 | - 6 % |
| F3C1 | 8,3 | 6,0 7,0 7,6 | illisibles | 6,8 | 5,8 | - 30 % |
| Strasbourg | | | | | | |
| S1 | 0 | 0,9 2,4 2,4 | 1,0 1,8 2,3 | 1,6 | 1,6 | 0 |
| S2A | 4,8 | 9,2 8,8 7,5 | 10,7 8,0 7,2 | 8,5 | 5,3 | + 10 % |
| S3A | 9,1 | 7,8 9,7 18,0 | 6,7 10,5 19,0 | 11,9 | 8,0 | - 10 % |
| S4A | 13,0 | 22,4 20,8 19,2 | illisibles | 20,8 | 14,5 | + 11 % |
| S2F | 4,8 | 8,8 6,5 7,7 | 7,8 7,5 7,9 | 7,7 | 4,8 | 0 |
| S3F | 9,1 | 10,3 16,5 15,4 | illisibles | 14,0 | 9,6 | + 5 % |
| S4B | 13,0 | 19,7 18,4 24,0 | illisibles | 20,7 | 14,7 | + 13 % |

Ces résultats appellent les commentaires suivants :

1/ La lecture directe des coupes histologiques a donné, dans le cas des saucisses étudiées, des résultats qui pèchent par excès ; la colonne "moyenne" du tableau précédent montre que les chiffres obtenus sont, en général, nettement supérieurs aux pourcentages réels de couenne ajoutée. Ceci peut s'expliquer par deux raisons : le gonflement de la couenne par imbibition et la présence de substances collagènes constitutives.

Lorsque la couenne est plongée dans de l'eau, elle absorbe une certaine quantité de liquide et augmente de volume ; cette imbibition peut avoir lieu au moment de la cuisson et aussi, vraisemblablement, par osmose dans la saucisse elle-même. L'étude précédente et des expériences antérieures ont montré que les particules de couenne pouvaient ainsi augmenter du tiers environ de leur volume initial. Comme l'histométrie procède par estimation du surface, on conclut que les résultats donnés par lecture directe doivent être affectés d'un coefficient de l'ordre de 2/3.

Les viandes employées pour la préparation des saucisses contiennent naturellement du collagène constitutif, sous forme de tendons et d'aponévroses qui échappent au parage industriel. Or, par la méthode préconisée et le grossissement X 10 utilisé, on est amené à compter en bloc la totalité de la surface millimétrique occupée par les tissus collagènes, qu'ils soient constitutifs ou d'addition. Il est bien entendu difficile d'estimer la part du collagène intrinsèque si l'on ne dispose pas d'un échantillon témoin. Cependant, l'expérience montre que les viandes industriellement parées, contiennent environ 1,5 à 2 % d'aponévroses et de tendons. On peut donc, pour apprécier la quantité de collagène d'addition, retrancher 2 points aux pourcentages trouvés par histométrie directe.

2/ L'aspect microscopique des fragments de couenne est très différent selon que la couenne a été hachée crue ou après cuisson. Dans le premier cas, les fragments sont de très petite dimension : 1/5 de millimètre carré environ contre 1/2 à 2 mm carré. Tout se passe comme si la couenne crue était pulvérisée par le broyeur colloïdal et avait un pouvoir d'imbibition moindre. Il est alors très difficile, sinon impossible, d'en estimer la quantité totale.

Par ailleurs, la couenne crue prend mieux les colorants de Calleja : chaque particule se colore en bleu très contrasté sur le fond de la préparation. Celle-ci apparaît constellée de petites tâches bleues déchiquetées. Cet aspect particulier attire l'attention de l'histologiste. S'il est donc difficile de faire dans ce cas une estimation quantitative valable, il reste possible de conclure à l'addition de couenne très finement hachée.

3/ Hormis cette éventualité, il apparaît que la marge d'erreur de l'histométrie appliquée au dosage des couennes dans les saucisses cuites reste inférieure à 15 %. Ces résultats sont acceptables. Cependant, dans les cas d'addition massive de couenne supérieure à 13 %, on observe des écarts de l'ordre de 20 à 30 %.

On ne saurait donc être trop prudent dans l'appréciation quantitative par voie histologique.

4/ L'expérience montre qu'il faut toujours associer la coloration par l'hématéine-éosine à celle par le picro-indigo-carmin.

La première coloration donne d'excellents résultats avec les couennes cuites qui, plus ou moins gélifiées par la cuisson, prennent une franche teinte violette. La seconde méthode est parfaite dans le cas de cuisson faible ou nulle : les structures collagènes apparaissent en bleu sur le fond verdâtre de la préparation. Elle fait souvent défaut avec les produits cuits ou autoclavés qui fixent mal les colorants.

Le fait de colorer la couenne avec du carmin de cochenille pour la rendre moins visible dans le produit fini, ne gêne en rien le dosage histologique.

5/ Trois prélèvements par échantillon sont indispensables pour pallier les défauts d'homogénéité dans la répartition des fragments de couenne.

METHODE CHIMIQUE -

La détermination chimique des "déchets" a fait l'objet de nombreuses études. Nombre de chercheurs ont trouvé que les tissus conjonctifs (collagène et élastine) renferment des teneurs relativement élevées d'un acide aminé "l'hydroxyproline" tandis que les muscles n'en contiennent que des faibles quantités.

Ils se sont alors efforcés de doser cet hydroxyproline pour déterminer si des produits de charcuterie vendus sur le marché avaient été préparés avec des viandes non parées contenant encore des aponévroses, tendons, couenne, vaisseaux, etc... et même, s'il y avait eu addition volontaire de ces "déchets".

La méthode qui a été utilisée ici est de MOHLER et ANACOPOULOS (1), lesquels se sont inspirés de celles préconisées notamment par NEUMAN et LOGAU, WIERBICKI et DEATHERAGE.

Le dosage repose sur l'hydrolyse chlorhydrique des protéines du tissu conjonctif avec formation d'hydroxyproline, traitement par de la soude et du carbonate de soude pour transformer l'hydroxyproline en oxyproline, lequel donne avec la paradiméthyl aminobenzaldéhyde une coloration rouge spécifique. Le calcul du pourcentage de collagène se fait en multipliant par 8 celui de l'hydroxyproline.

.../...

(1) communication provisoire de l'Institut Allemand de la Recherche sur l'Alimentation à Munich en 1955.

RESULTATS ET DISCUSSION -

Les essais ont donné les résultats suivants : (tableau I)

A titre indicatif, voici quelques résultats obtenus par cette méthode sur divers tissus (tableaux II)

- TABLEAU I -

| | HYDROXYPROLINE | COLLAGENE % | COLLAGENE / PROTIDES |
|-----|----------------|-------------|-----------------------------------|
| | H % | H x 8 | $\frac{H \times 8}{P} \times 100$ |
| FI | 0,18 | 1,44 | 10,6 |
| F2A | 0,30 | 2,40 | 16,8 |
| F3A | 0,38 | 3,04 | 22,3 |
| F4A | 0,49 | 3,90 | 26,7 |
| F2B | 0,27 | 2,16 | 15,4 |
| F3B | 0,36 | 2,90 | 20,9 |
| F4B | 0,60 | 4,80 | 32,2 |
| F3C | 0,44 | 3,52 | 26,5 |
| SI | 0,22 | 1,76 | 13,7 |
| S2A | 0,34 | 2,70 | 19,8 |
| S3A | 0,44 | 3,50 | 25,0 |
| S4A | 0,61 | 4,88 | 33,0 |
| S2B | 0,42 | 3,26 | 24,1 |
| S3B | 0,48 | 3,84 | 26,8 |
| S4B | 0,57 | 4,56 | 30,6 |

.../...

- TABLEAU II -

| | HYDROXYPROLINE % | COLLAGENE % | COLLAGENE / PROTIDES % (N x 6,25) |
|---|---------------------|----------------|---|
| Viande maigre de porc (1er lot)..... | 0,13 | 1,04 | 5,1 |
| Viande maigre de porc (2e lot)..... | 0,10 | 0,80 | 3,4 |
| Viande maigre de boeuf..... | 0,12 | 0,96 | 4,6 |
| Foie de porc..... | 0,11 | 0,88 | 4,4 |
| Cervelle d'agneau..... | 0,02 | 0,16 | 1,0 |
| Langue de porc (avec arrière gorge). | 0,47 | 3,76 | 19,0 |
| Couennes..... | 3,60 | 28,80 | 85,4 |
| Déchets de porc (couennes, tendons, restes de parage)..... | 2,91 | 23,28 | 71,4 |
| Tendons de boeuf (collier)..... | 3,82 | 30,56 | 82,1 |

- TABLEAU III -

| POURCENTAGE DE COUENNE AJOUTEE | VALEURS TROUVEES EXPRIMEES EN COLLAGENE / PROTIDES |
|-----------------------------------|---|
| 0 | 10,6 et 13,7 |
| 4,8 | 16,8 - 15,4 - 19,8 - 24,1 |
| 9,1 | 22,3 - 20,9 - 25,0 - 26,8 |
| 13,0 | 26,7 - 32,2 - 33,0 - 30,6 |

.../...

CONCLUSIONS -

Les résultats obtenus ci-dessus permettent de tirer les conclusions suivantes :

1/ les résultats de l'analyse peuvent être exprimés directement en hydroxyproline pour 100 g de produit ou même pour 100 g de protides. Toutefois, il semble plus logique de les exprimer en collagène/protides ; par ailleurs, les chiffres étant supérieurs, permettent de donner des valeurs limites plus précises.

MDHLER avait estimé que cette teneur ne devait pas excéder, dans les produits de charcuterie, 25 à 30 %. Si l'on rapporte à 100 g de viande (dont la teneur en protides admise est de l'ordre de 20 %), la quantité de collagène est de l'ordre de 5 à 6 %. Ce qui correspond à peu près aux prescriptions de l'arrêté du 28 Mai 1957, pris par le Gouvernement Français pour les conserves de "Pâtés", c'est-à-dire à 5 % maximum de couennes, tendons, aponévroses, nerfs, etc....

2/ Le tableau III donne les chiffres de collagène/protides obtenus par comparaison avec le pourcentage de couennes ajoutées.

Il ressort que les chiffres indiqués par MOHLER semblent un peu élevés. Les résultats obtenus montrent que l'on peut conclure :

- non addition de couenne pour des valeurs du rapport collagène/protides, inférieures à 15 ;
- addition de 5 % environ, pour des valeurs comprises entre 15 et 25 ;
- addition de 10 % environ, pour des valeurs comprises entre 25 et 30 ;
- et enfin, addition de 15 % environ, pour des valeurs comprises entre 30 et 35

3/ Le dosage de l'hydroxyproline varie pour un même échantillon de 5 à 10 % environ (tout au moins d'après les essais que nous avons effectués), ce qui permet d'affirmer que la méthode ne peut donner des résultats qu'à plus de 10 % près et qu'il semble impossible de donner un chiffre rigoureusement exact. Ceci est d'ailleurs normal, puisque la teneur en hydroxyproline de tissus rigoureusement semblables varie elle-même dans d'assez fortes proportions.

C'est d'ailleurs ce que montre le tableau II, où la teneur en collagène/protides des déchets de porc couennes et tendons d'une part, et des couennes seules d'autre part, varie de 71,4 % à 85,4 %.

4/ Enfin, il reste à signaler que cette méthode chimique ne peut s'appliquer à des produits de charcuterie renfermant des abats, puisque ceux-ci contiennent une assez forte quantité d'hydroxyproline.

.../...

CONCLUSION GENERALE -

Aucune des deux méthodes, chimiques ou histologiques, ne saurait être employée exclusivement sous peine de commettre des erreurs ; par contre, appliquées conjointement, elles se complètent très favorablement dans le cadre d'un contrôle de la qualité, par estimation des substances collagènes.

La méthode chimique donnera des chiffres objectifs sur le plan quantitatif, même dans le cas de broyage extrême des "couennes" crues ; la méthode histologique permettra de reconnaître la nature qualitative des substances collagènes en cause et, dans le cas particulier des produits crus ou peu cuits (saucisses, saucissons), permettra également de faire des estimations quantitatives valables.

-:-:-:-:-

419

IXe CONGRES DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES

- B U D A P E S T I 9 6 3 -

DETERMINATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES SUBSTANCES COLLAGENES

METHODES CHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES

par : Cl. BARRAUD
R. VOLFF

RESUMES EN FRANCAIS, ANGLAIS et ALLEMAND.

DETERMINATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES SUBSTANCES COLLAGENES

METHODES CHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES

par : Cl. BARRAUD
R. VOLFF

RESUME :

Les auteurs rapportent les résultats obtenus en matière de détermination de la couenne d'addition dans des saucisses cuites, à pâte fine, par voies histométrique et chimique. Une méthode histométrique originale a été employée. Les deux techniques de dosage sont critiquées. Il apparaît nécessaire, dans le cadre d'une estimation de la qualité des produits, de compléter l'une par l'autre les deux méthodes.

- o -

SUMMARY :

The authors give results obtained by histometrical and chemical technics, for the determining of pork rind added in thin stuffing cooked sausages. An original histometrical method has been used. Both dosing technics are critized-each of them seems to have to be completed by the other for the evaluation of the products quality

- o -

ZUSAMMENFASSUNG :

Es wird über die histometrische und chemische Bestimmung des Schwartezusatzes in der gekochten Feinwurst berichtet.

Eine originale histometrische Methode wird angewandt ; eine kritische Betrachtung dieser Methoden wird angeführt.

In Rahem einer Bestimmung der qualität der Fleischwaren, scheint es notwendig, die histometrische und die chemische Methoden zu kombinieren.
