

D 7

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE
LA CONCENTRATION EN CHLORURE DE SODIUM
SUR LA GELATINISATION DU PERIMYSIUM DU MUSCLE DE PORC

J. KOPP J. CHARPENTIER P. SALÉ

Le maintien d'une cohésion intermusculaire suffisante est une qualité essentielle que doit présenter le jambon à l'issue des opérations de saumurage et de cuisson. En effet la séparation partielle des muscles qui peut se produire lors de chocs dus au transport ou lors du tranchage au moment de la vente, constitue bien souvent un obstacle à la commercialisation de produits qui peuvent, par ailleurs, présenter des qualités organoleptiques très satisfaisantes. L'examen des tranches de jambon montre que le collage des muscles s'effectue par l'intermédiaire de gélatine formée à partir du collagène du pérимыsium. Cette gélatinisation s'opère lors de la cuisson du jambon et ses modalités mêmes conditionnent la consistance du gel et son aptitude à assurer la cohésion du produit. Bien que les paramètres impliqués dans la technologie du jambon obtenu par saumurage et cuisson soient certes multiples, il semble néanmoins que la concentration en chlorure de sodium des saumures et la température de cuisson soient particulièrement susceptibles d'influer sur le processus de la gélatinisation. Aussi nous a-t-il semblé opportun d'étudier l'influence de ces deux facteurs sur la gélatinisation du pérимыsium de muscle de porc.

MATERIEL ET METHODES

Préparation du collagène pérимыsial

Le pérимыsium du muscle Longissimus Dorsi de porcs Large-White de (100 ± 5) kg de poids vif a été prélevé 24 h après abattage des animaux. Après avoir été débarrassé de tout résidu musculaire, l'aponévrose est coupée en dés de 5 mm puis broyée à sec dans le bac préalablement réfrigéré d'un Robot-Coupeur. Deux broyages successifs en présence d'eau à 4°C (rapport tissu/eau = 1/100) sont effectués au broyeur Waring Blendor. La purification se poursuit par 3 opérations de dégraissage-séchage à l'acétone (dans le même rapport) jusqu'à l'obtention d'un chevelu blanc sec dont les caractéristiques sont les suivantes :

- teneur en eau mesurée après dessiccation à 105° pendant 48 h : 9,7
- teneur en Hydroxyproline 102 mg/g
- teneur en azote : 148 mg/g (déterminé par la méthode inspirée de

FERRARI, 1960).

Soit un rapport de 73,6 mg d'NHyp/g Ntotal.

Les échantillons sont conservés sous sachets plastiques clos à

Solubilisation

Des échantillons d'épimysium de 100 mg, en trois exemplaires, sont mis en présence de 20 ml de solvant dans des tubes de centrifugeuse de 100 ml. Toutes les expériences ont été réalisées avec un tampon de base acétique/acétate de Na : $r/2 = 0,06$ ajusté à un pH final de 5,0 au pHmètre 29 RADIOMETER après addition du sel. Les tubes sont clos par un ensemble bouchon-canne de condensation en verre de 50 cm afin d'éviter les pertes de solvant par évaporation. Les tubes sont placés au Bain Marie au glycérol (thermostaté à $\pm 0,5^\circ\text{C}$), un thermomètre de contrôle placé dans un des tubes permet de définir le temps zéro lorsque l'équilibre des températures est atteint (5 mn de délai en moyenne).

En fin d'expérience les phases soluble et insoluble sont séparées par filtration avec rinçage par le même solvant à la température d'extraction. Les solutions sont évaporées à sec par des évaporateurs rotatifs BUCHI. Les résidus secs solubles et insolubles sont mis à hydrolyser sous reflux en présence de 60 ml d'HCl 6 N pendant 8 h. en vue de la détermination de l'hydroxyproline.

Détermination de l'hydroxyproline

Nous avons utilisé la méthode de BERGMAN-LOXLEY (1963) adaptée à l'autoanalyseur et complétée par la neutralisation automatique en continu des hydrolysats de protéines. Les résultats de solubilité sont exprimés sous la forme :

$$s = \frac{\text{Hydroxyproline soluble}}{\text{Hydroxyproline totale}}$$

Polarimétrie

La solubilisation du collagène est effectuée en maintenant les quantités adéquates de collagène pendant 15 heures à 65°C dans des milieux de concentration en chlorure de sodium comprises entre 4 et 24 p.100. Après détermination par la méthode de FOLIN de l'azote protéique solubilisé, les concentrations étaient ajustées dans tous les cas à 1,5 mg de protéine par ml. Des essais préalables nous avaient montré que les résultats obtenus par la méthode de FOLIN ne sont pas influencés par la teneur du milieu en NaCl. Après une conservation de 3 jours à $+ 8^\circ\text{C}$ les solutions étaient de nouveau portées à 65°C pendant 40 minutes puis immédiatement transférées dans la cellule d'un polarimètre électronique QUICK ROUSSEL-JOUAN thermostatée à $+ 6^\circ\text{C}$. Les mesures du pouvoir rotatoire étaient effectuées à 395 m μ . La

valeur de rotation α est obtenue directement en millidegrés sur l'échelle d'un galvanomètre devant lequel est placé un suiveur de spot Photodyne Sefram. Ce dispositif permettait l'enregistrement des variations de α en fonction du temps.

Consistance et point de fusion

Des quantités de collagène variant de 0,7 à 3,2 grammes étaient mises dans 30 ml de solution de NaCl de concentrations comprises entre 0 et 24 p. 100 et maintenues à 65°C pendant 15 heures. Après filtration, la teneur en protéines du filtrat est déterminée par la méthode de FOLIN sur une partie aliquote après dilution convenable. Les teneurs en protéines des solutions ainsi obtenues variaient entre 8 et 48 mg par millilitre. La réfrigération de ces solutions à + 8°C s'accompagne de leur gélification. Les gels étaient conservés à + 8°C et leur consistance était mesurée chaque jour au moyen de l'appareil mis au point dans notre Station par P. SALÉ.

Un cylindre de 8 mm de diamètre, animé d'une vitesse de 1 mm/seconde vient déformer la surface de l'échantillon de gélatine. Le cylindre est monté sur un dispositif utilisé pour l'étude des propriétés mécaniques des viandes qui permet l'enregistrement direct des diagrammes force-déplacements. Compte tenu du faible niveau des efforts à mesurer, il a été nécessaire de compléter la chaîne de mesure des forces par un amplificateur à grand gain, ce qui a permis de porter la sensibilité à 5 g/cm.

La consistance des gels est définie par la pente initiale de la courbe de variation de la force de résistance en fonction de la distance de pénétration, ces deux grandeurs étant exprimées respectivement en grammes et en centimètres. La température de fusion de gels maintenus 48 heures à + 8°C était déterminée en soumettant ces gels à des températures progressivement croissantes. La température de fusion correspondait à celle pour laquelle des billes de verre de 2 mm de diamètre, initialement retenues à la surface du gel, pouvaient tomber librement par gravité.

RESULTATS ET DISCUSSION

La gélatinisation comprend trois phases successives, à savoir :

- la solubilisation qui se traduit par une dépolymérisation plus ou moins importante du collagène allant jusqu'à une dissociation des éléments constitutifs du tropocollagène et à la perte de leur configuration hélicoïdale.

- la renaturation de ces éléments qui s'accompagne d'un recouvrement plus ou moins important de la structure native hélicoïdale.
- la gélification proprement dite qui correspond à l'association des éléments ainsi en partie restructurés.

Il convient donc d'examiner l'action de la température et du NaCl à ces différents stades de la transformation du collagène du périnysium en gélatine.

I - Solubilisation :

1) Influence de la température de solubilisation

La figure 1 représente la variation de la solubilité, mesurée après 3 h d'extraction, en relation avec la température et pour différentes teneurs en sel du solvant. Dans ces conditions il apparaît que le processus de solubilisation est fortement retardé dans l'échelle des températures lorsque la concentration saline atteint ou dépasse 10 %. Par contre une faible concentration en sel (de l'ordre de 5 %) favorise le rendement de la solubilisation pour des températures supérieures à 50°C.

L'effet conjugué de la température et de la concentration se traduit par un effet prédominant de stabilisation par le sel aux plus basses températures. Pourtant, un apport supplémentaire d'énergie (par une température plus élevée) permet d'annuler cet effet de stabilisation du sel jusque vers 15 %. Au-delà de cette concentration les modifications de structures sont plus importantes et probablement de nature différente. Il apparaît donc que le défaut de solubilisation peut être corrigé par une élévation de la température jusqu'à la limite d'une concentration saline de 20 % environ.

2) Influence de la concentration en NaCl

La figure 2 représente la relation entre la teneur en sel du solvant et le rendement quantitatif de l'étape de solubilisation pour différentes températures et pour un temps d'extraction commun de 3 heures.

Il apparaît que le sel inhibe le phénomène de solubilisation au-delà d'une certaine concentration qui dépend de la température du milieu. Pour 75° et 65° cette concentration limite se situe vers 15 %, pour 55° elle tombe à 5 % et pour 45° cette valeur est pratiquement nulle c'est-à-dire que toute addition de sel se traduit, à cette température, par une chute de la solubilité, celle-ci s'annulant pratiquement vers 15 % de sel.

Il est à noter que le temps d'action ne permet pas de corriger, dans une grande mesure, ce défaut de solubilisation ainsi qu'il en résulte de la figure 3. Les résultats obtenus pour les autres températures (65°, 55° et 45°) sont très semblables. Le temps n'influe de façon sensible que pour les fortes teneurs en sel (> 15 %) et pour les basses températures (par exemple 45°), ces 2 effets étant additifs.

Il semble donc que le sel joue un rôle de stabilisation au niveau du collagène intact. Le mode d'action du sel, qui a surtout été envisagé dans le cas des formes solubles du collagène (VON HIPPEL et WONG, 1963) (BELLO, 1963) n'est pas encore élucidé dans le cas du collagène en place. Le sel peut intervenir par l'induction d'une réorganisation du réseau des liaisons hydrophobes, par une fixation directe sur la protéine elle-même ou par les 2 mécanismes conjugués (NEMETSCHKE, 1969 ; JACKSON *et al.*, 1965).

II - Renaturation :

La variation du pouvoir rotatoire spécifique en fonction du temps pour différentes concentrations de NaCl (fig. n° 4) montre que la formation de la structure hélicoïdale est ralentie lorsque la concentration de NaCl croît. Ces résultats confirment ceux obtenus par VON HIPPEL et WONG (1963) dans des conditions expérimentales toutefois très différentes. Il convient de remarquer que la renaturation qui se produit lors de l'abaissement de température est une réaction particulièrement rapide dont le déclenchement est immédiat. Les vitesses initiales de réaction sont nettement plus grandes que celles observées par HARRINGTON et VON HIPPEL (1961) avec des gélatines obtenues à partir de collagène d'origine certes très différents.

La rapidité de la réaction est telle que la phase initiale est expérimentalement difficile à observer. L'extrapolation des courbes au temps zéro réel semble toutefois montrer que, quelle que soit la concentration en NaCl la valeur initiale du pouvoir rotatoire est identique. L'extrapolation des courbes jusqu'au temps zéro permet d'obtenir les vitesses initiales de réaction. Selon VON HIPPEL et WONG (1963), le logarithme de la vitesse initiale varie linéairement en fonction de la concentration ionique et la pente de la droite ainsi obtenue est caractéristique du sel considéré. Une représentation graphique de ce type montre nettement l'existence de deux droites (Fig. n° 5), la rupture de pente correspondant à une concentration de 3,4 M.

Pour des concentrations en NaCl supérieures l'inhibition de la renaturation est plus importante et les mécanismes impliqués sont vraisemblablement différents. L'indépendance de la variation du pouvoir rotatoire spécifique vis-à-vis de la concentration en protéine, mis en évidence par FERRY et ELDRIDGE (1949), HARRINGTON et VON HIPPEL (1961), VON HIPPEL et WONG (1963) indique que la renaturation qui se produit lors de la transition gélatine-collagène est un phénomène essentiellement intramoléculaire. Selon VON HIPPEL et WONG (1963) les ions peuvent intervenir directement ou non dans le processus de renaturation. Dans le premier cas la stabilité de l'hélice de collagène serait altérée par la liaison des ions à des sites spécifiques de la chaîne polypeptidique. Dans le second cas les ions exerceraient une action compétitive à l'égard de l'eau impliquée dans le maintien de la structure en hélice. Nos résultats ne permettent nullement d'étayer préférentiellement une de ces deux hypothèses ; tout au plus mettent-ils vraisemblablement en évidence une action différente du chlorure de sodium à des concentrations supérieures à 3,4 M.

III - Gélification :

Il est bien établi que la consistance d'un gel est fonction du nombre et de l'énergie des liaisons intervenant dans les associations intermoléculaires. La fusion d'un gel correspond à la rupture de ces liaisons d'où l'intérêt de la détermination de la température de fusion. Selon VEIS (1964) la variation du logarithme de la concentration d'un gel de gélatine en fonction de l'inverse de la température absolue est linéaire et correspond à l'équation :

$$\log. C = \frac{\Delta H}{2,303 RT} + \text{constante}$$

ΔH représentant la variation d'enthalpie correspondant à la formation des liaisons intermoléculaires. La variation de $\log. C$ en fonction de $\frac{1}{T}$ pour 0,8, et 24 p. 100 de NaCl (fig. n° 6) fournit plusieurs informations quant à l'influence du NaCl sur les liaisons intermoléculaires. Il apparaît tout d'abord que l'énergie de ces liaisons est supérieure pour les concentrations élevées de protéine puisque l'enthalpie est accrue et de plus que dans ces conditions l'influence du NaCl est faible puisque les enthalpies sont semblables. Le décalage des droites ainsi obtenues correspond vraisemblablement à une différence du nombre des liaisons. Par contre pour des concentrations de protéines comprises entre 10 et 26 mg par ml la nature des liaisons

impliquées dans les associations intermoléculaires est affectée par le NaCl puisque les enthalpies diffèrent notablement. Il convient également de remarquer que cette action du NaCl semble peu dépendante de la concentration puisque les enthalpies diffèrent relativement peu pour des concentrations de NaCl de 8 et 24 p. 100.

L'évolution de la consistance du gel en fonction du temps (fig. n° 7) montre que pour des concentrations de NaCl inférieures à 12 p. 100 la stabilité du gel est atteinte au bout de 2 jours mais que pour des concentrations comprises entre 12 et 20 p. 100 l'augmentation de la consistance se poursuit lentement pendant plusieurs jours. Lorsque la concentration de NaCl atteint 24 p.100 la consistance est extrêmement faible. Il convient toutefois de remarquer que dans nos conditions expérimentales les teneurs en protéine des gels sont différentes puisque la solubilité du collagène diminue lorsque la concentration en NaCl augmente. Lors d'expériences ultérieures, il serait évidemment intéressant de préciser l'influence du NaCl à teneur en protéine constante. Nos résultats présentent néanmoins un intérêt certain sur le plan pratique puisque la consistance des gels est diminuée à la fois par suite de la moindre solubilité du collagène et par l'action spécifique du NaCl.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de préciser l'action du chlorure de sodium aux différents stades de la transformation du collagène du périnysium en gélatine. La solubilisation thermique du collagène est inhibée au-delà d'une certaine concentration de chlorure de sodium qui dépend de la température du milieu.

Lors du refroidissement, le chlorure de sodium ralentit la renaturation du collagène préalablement dénaturé par l'élévation de température. Enfin le chlorure de sodium affaiblit les liaisons intermoléculaires impliquées dans le phénomène de gélification, ce qui entraîne une moindre consistance des gels. Sur le plan pratique, nos résultats indiquent que l'augmentation de la concentration en chlorure de sodium des saumures associée à un pourcentage de pompage important, l'absence d'égouttage à la sortie du saumurage et la diminution de la température de cuisson sont autant de facteurs qui s'opposent à la gélification du périnysium et par conséquent à une cohésion intermusculaire satisfaisante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELLO, J., 1963 *Biochemistry*, 2, 276.
- BERGMAN, I., R. LOXLEY, 1963 *Annal. Chem.*, 35, 12.
- FERRARI, A., 1960 *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 87, 792.
- FERRY, J.D., J.E. ELDRIDGE, 1949 *J. Phys. Chem.* 53, 184.
- HARRINGTON, W.H., P.H. VON HIPPEL, 1961 *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 100.
- JACKSON D.S., L.B. SANDBERG and CLEARY E.G., 1965 *Biochem. J.*, 96, 813.
- NEMETSCHKE, Th., 1969 *Virchov. Arch. Abt. B. Zellpath.* 2, 355.
- VEIS, A., 1964 *The macromolecular chemistry of gelatin*. Academic Press
N-Y. - London.P. 352.
- VON HIPPEL, P.H., K.Y. WONG, 1963 *Biochemistry*, 2, 664.

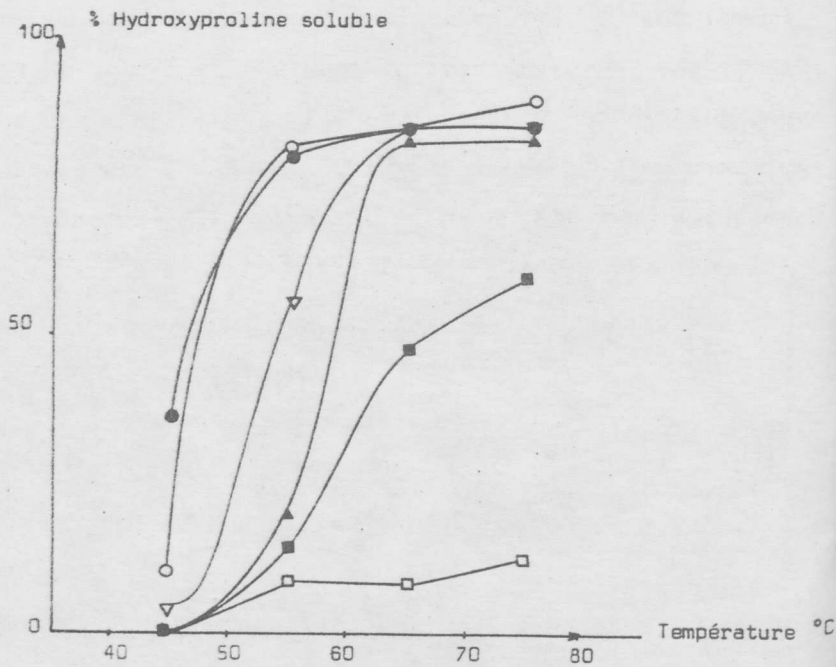


Fig. 1 : Variation de la solubilité du collagène épimysial en fonction de la température et de la teneur en sel après 3 heures d'extraction.

Légende :

●	0 % NaCl	} Teneur en sel
○	5 % "	
▽	10 % "	
▲	15 % "	
■	20 % "	
□	25 % "	

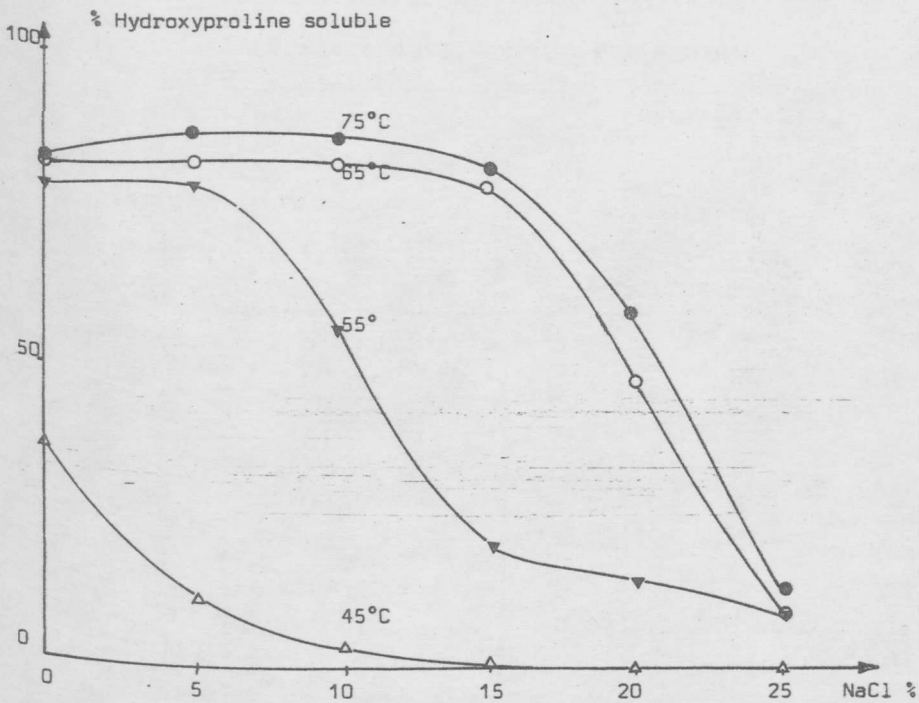


Fig. 2 - Variation de la solubilité du collagène épimysial en fonction de la teneur en sel après 3 h d'extraction.

Légende :

●	75°C	}	Températures de solubilisation.
○	65°C		
▼	55°C		
△	45°C		

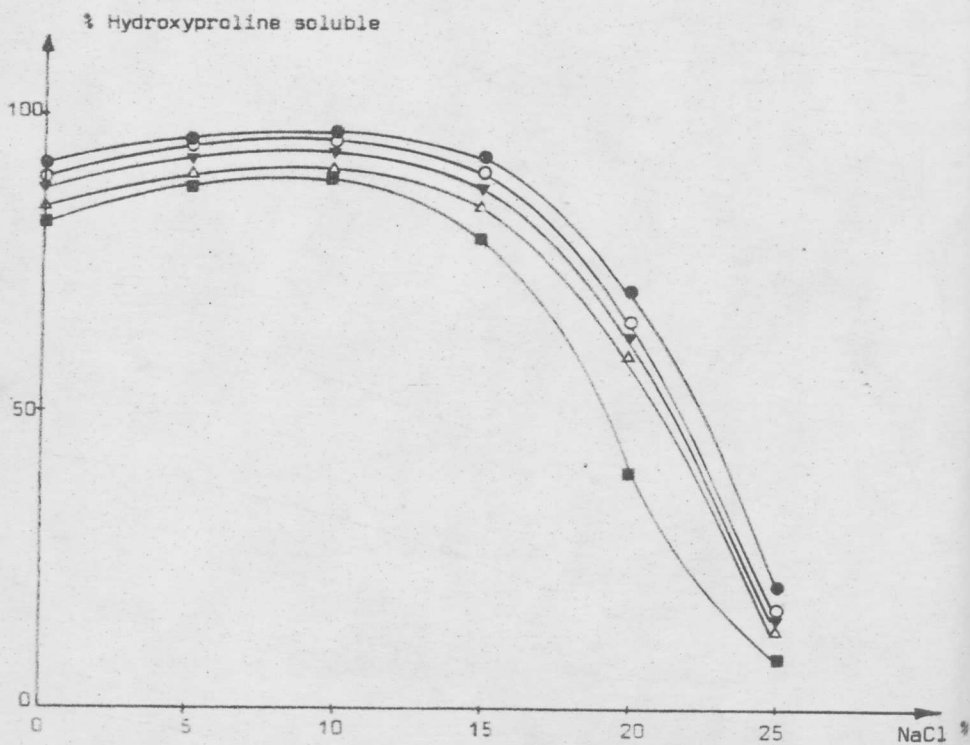


Fig. 3 : Variation de la solubilité du collagène épimysial à 75°C en fonction de la teneur en sel pour différents temps d'extraction.

Légende :

■	1 h	Temps d'extraction
△	3 h	
▼	6 h	
○	10 h	
●	16 h	

$-\alpha_{395}^6$

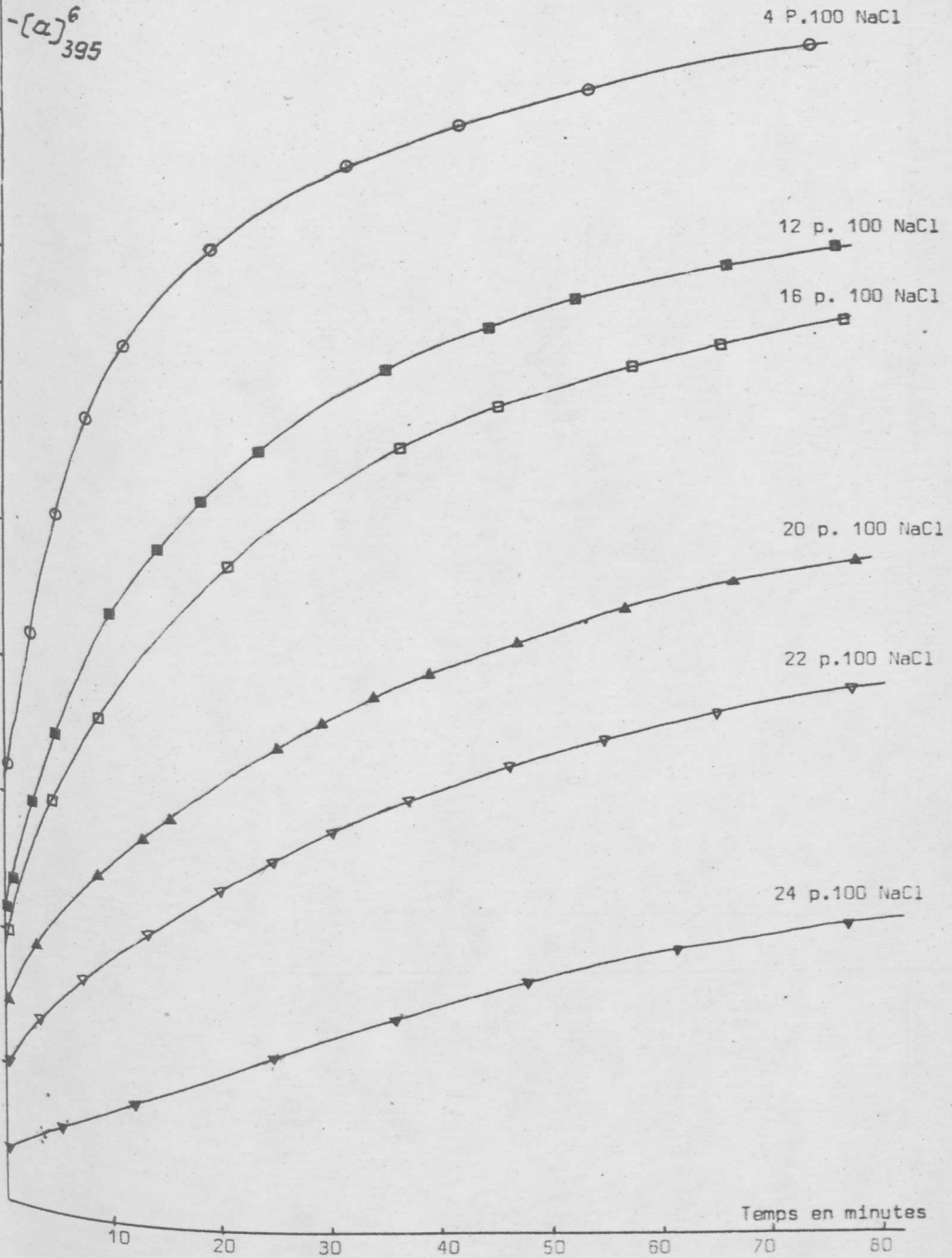


Fig. 4 - Evolution du pouvoir rotatoire spécifique à 395 m μ et à 6°C en fonction du temps et de la concentration en NaCl

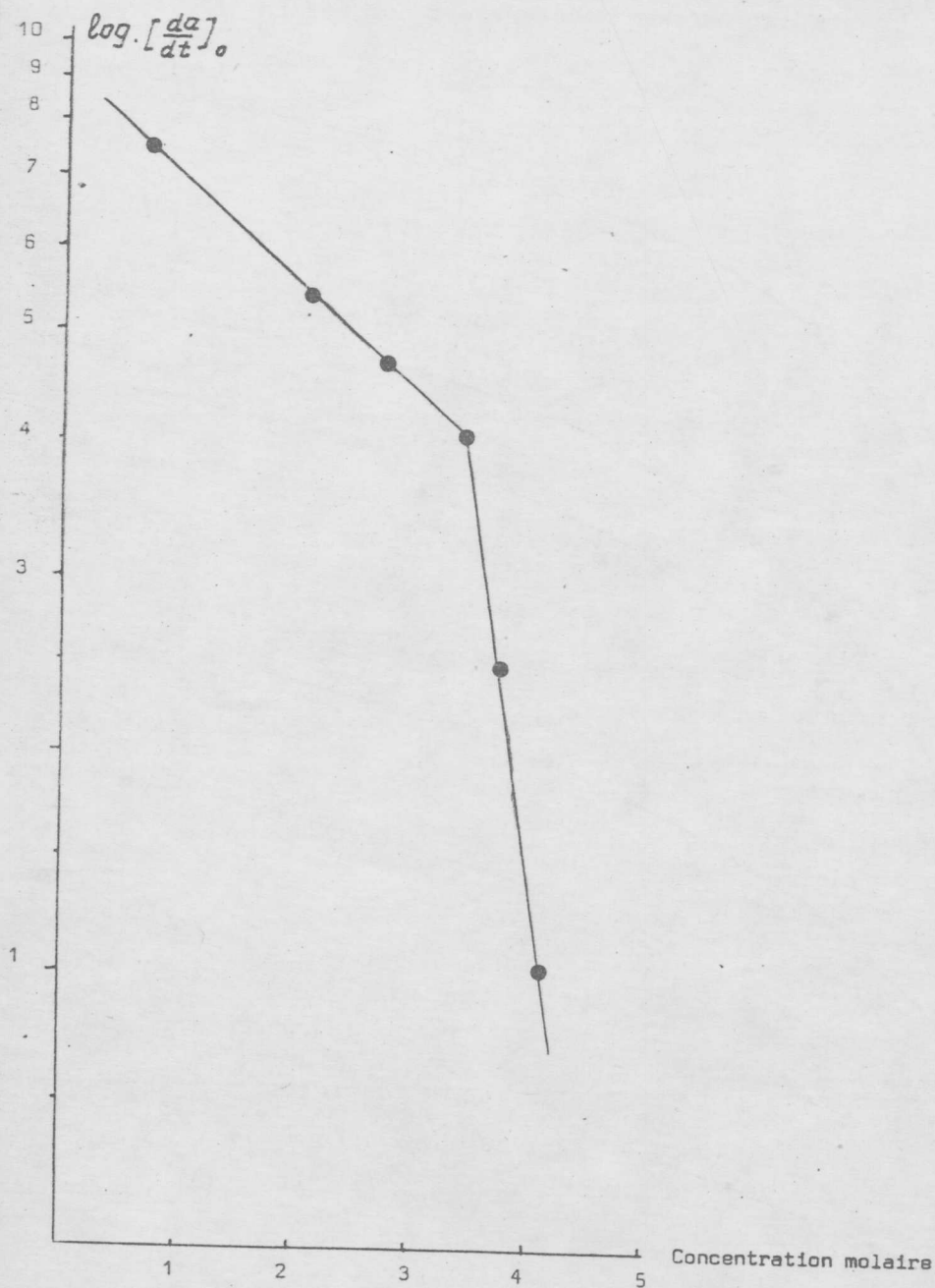


Fig. 5 - Variation de la vitesse initiale d'augmentation du pouvoir spécifique rotatoire à 395 m μ et à 6°C en fonction de la concentration en protéine de la solution.

- H₂O
- 8 p.100 NaCl
- 20 p. 100 NaCl

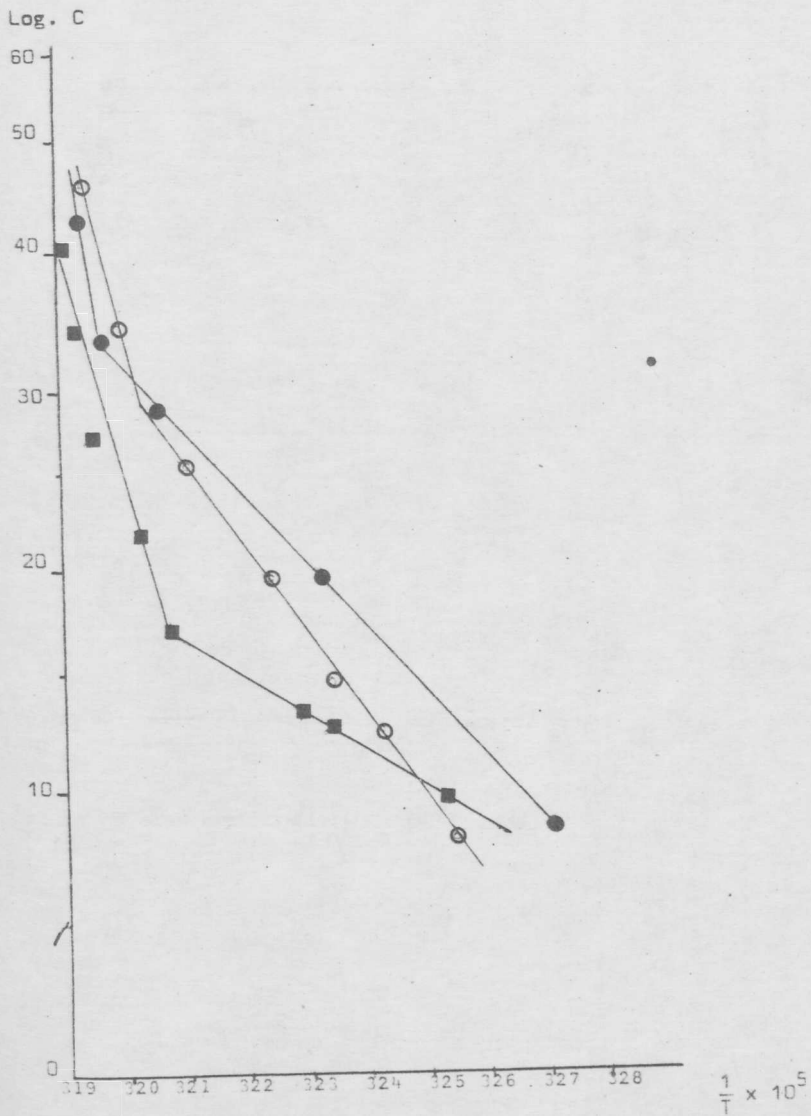


Fig. 6 - Variation de log C en fonction de $\frac{1}{T}$