

DETECTION DES PROTEINES DE SOJA OU DE LAITDANS LES PRODUITS DE VIANDE STERILISES OU NONA.FROUIN - C.BARRAUD - D.JONDEAUService de Recherche de la Société OLIDA-CABY ASSOCIES
FRANCERESUME

Les auteurs ont cherché à améliorer la sensibilité des méthodes de détection des protéines de soja et des lactoprotéines. Ils ont obtenu ce résultat en combinant la méthode de séparation physique, par solvants, filtrations et centrifugations, de HOOG, à la méthode de détection par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de PENNY et HOFFMANN qu'ils ont modifiée.

Ils décrivent en détail leur méthode d'analyse.

Les résultats obtenus permettent de détecter des doses de 0,5 % de lactoprotéines ou protéines de soja sur des pâtés en boîtes 1/6e stérilisés 1 h 15 à 117° C, ce qui correspond à un traitement thermique de ces protéines dans des conditions pratiques, sévères, en présence de sucres et de divers ingrédients autorisés par la législation française.

Les limites de détection sont bien meilleures sur des produits non stérilisés; elles sont, par ailleurs, moins bonnes, voisines de 5 % sur les TVP obtenues par traitement thermique (Archer-Daniels) par suite, sans doute, des réactions de MAILLARD produites lors de la texturisation.

En tout état de cause, ces limites sont suffisantes pour les usages industriellement rentables de ces protéines.

SUMMARY

The authors wanted to improve the detection methods sensitiveness for soja proteins and lactoproteins.

They achieved this purpose by mixing the physical separation method (solvents, filtration and centrifugation) of de HOOG with the detection method by polyacrylamid gel electrophoresis described by PENNY and HOFFMANN.

They go into all the details of their analysis method.

The results allow to detect lactoproteins and soja proteins at the amount of 0,5 % on canned patties (cans=1/6) sterilised 1 h 15 at 117° C; this agree with a thermic treatment of these proteins in practical hard condition, in the presence of sugars and all the ingredients the addition of which are authorised by the French Legislation.

The detection limits are more accurate on non-sterilized products; they are not so good, nearly 5 %, for TVP manufactured (achieved) by thermal treatment (Archer-Daniels) on account of the MAILLARD reaction, which is the result of texturisation.

In any case, these limits are sufficient for profitable industrial uses of these proteins.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoren haben versucht, die Empfindlichkeit der Entdeckungsmethoden von Soja- und Milchproteinen zu verbessern.

Sie haben dieses erreicht durch eine Kombination der physikalischen Scheidungs-methode (mit Lösungsmitteln, Filtrieren und Zentrifugierung) von de Hoog mit der etwas veränderten Entdeckungsmethode von Penny und Hoffmann, welche auf der Elektrophorese auf Polyacrylamidgelel beruht.

Sie beschreiben in allen Einzelheiten ihre Analyse-methode.

Die Ergebnisse machen es möglich, Milch- oder Sojaproteine in einer Menge von 0,5% in eingemachten Pasteten festzustellen, welche in 1/6 Dosen für eine Dauer von 1 Std. 15 Min. bei 117°C sterilisiert wurden, was einer Hitzebehandlung dieser Proteine unter strengen praktischen Bedingungen in Gegenwart von Zucker und verschiedenen anderen, durch die französische Gesetzgebung autorisierten Zutaten, gleichkommt.

Die Entdeckungsgrenzen sind sehr viel besser bei nicht sterilisierten Produkten ; sie sind jedoch schlechter, nahe bei 5%, bei den durch Hitzebehandlung (Archer-Daniels) erhaltenen TVP, zweifellos auf Grund der Maillard-Reaktionen, die während der Texturisierung stattfinden.

Auf jeden Fall sind diese Grenzen ausreichend für industriell rentable Anwendungen dieser Proteine.

PRINCIPE DE LA METHODE

Depuis quelques années, la recherche des protéines de Soja ou de lait dans les produits de viande a fait l'objet de nombreuses études et publications.

Cependant, les méthodes publiées jusqu'à présent, n'étaient pas assez sensibles lorsqu'on les appliquait à des produits ayant subi de violents traitements thermiques, comme ceux utilisés lors de la stérilisation des produits de viande.

Ces résultats médiocres proviennent de l'altération par la chaleur des protéines spécifiques, à la suite des réactions de MAILLARD. Nous avons donc cherché à augmenter la sensibilité des techniques basées sur l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, car ces méthodes nous ont semblé les meilleures, d'autant plus qu'elles se prêtent à une adaptation rapide pour détecter toute autre protéine nouvelle, grâce au grand pouvoir séparateur qui les caractérise.

Il nous a semblé que le meilleur moyen d'augmenter la sensibilité de cette méthode était de procéder à une séparation préalable.

C'est-à-dire d'éliminer les protéines de haut poids moléculaire, et, de façon plus générale, tous les corps qui peuvent interférer avec ceux que nous cherchons à mettre en évidence.

Nous avons donc recherché les méthodes physiques de séparation des protéines correspondant à la tranche de poids moléculaire que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sépare bien.

La meilleure nous a semblé être celle de P. de HOOG qui consiste, schématiquement, à éliminer l'eau et la graisse par solvant, puis les protéines de haut et très bas poids moléculaire par filtration et centrifugation.

Nous avons préféré l'usage de l'éther de pétrole à l'acétone, car le premier a une action moindre sur la structure protéinique, par suite de sa plus faible polarité.

L'eau est évaporée au préalable à froid, pour les mêmes raisons.

Les protéines de poids moléculaires moyen et bas sont récupérées par une solution de soude, ajustée à pH 9. On élimine par filtration la tranche de P.M. la plus élevée, puis par centrifugation, celle de très bas P.M.

Les protéines restantes sont ensuite reprises par l'urée et le Mercaptol, pour les réduire à leur structure primaire.

Après cette opération, nous effectuons la séparation proprement dite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH 9,5.

L'analyse se termine par coloration au bleu de Coomassie, puis rinçage.

Les limites de détection des protéines pures, exprimées en poids sec, se situent aux environs de 0,5 à 1 % de la masse totale sur produits stérilisés. Elles sont évidemment bien meilleures sur produits non stérilisés, et moins bonnes sur les produits texturés avec traitement thermique violent.

M E T H O D E

A/ - REACTIFS

- 1 - Acrylamide Monomer (Canalco)
- 2 - N - N' Méthylène bis - Acrylamide bis (Canalco)
- 3 - 2 Amino - 2 Hydroxyméthyl - 1 - 3 Propanédiol (Tris)
- 4 - N - N - N' - N' Tétrathylène diamine (Canalco) (TEMED) (Canalco)
- 5 - H Cl 1 N
- 6 - Persulfate d'amonium (Canalco)
- 7 - Riboflavine (Canalco)
- 8 - Glycine (Canalco)
- 9 - Sucrose
- 10 - Acide acétique R P
- 11 - Bleu de Coomassie (Ed.Gurr.London - Touzart et Matignon)
- 12 - Bleu de Bromophénol
- 13 - Mercaptoéthanol (Eastman - Touzart et Matignon)
- 14 - Dodécylsulfate de sodium (= laurate sulfate de sodium - OSI)
- 15 - Ether de pétrole E_b : 45-60
- 16 - Alcool méthylique pur
- 17 - Urée pure
- 18 - Sable de Fontainebleau

Solutions

- | | | | | |
|-----------|----------------------|---------|---|--------------|
| 1/ - A' : | H Cl | 48 ml |) | |
| | Tris | 36,3 g |) | |
| | Temed | 0,23 ml |) | pH = 8,8-9,0 |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 2/ - B : | H Cl N | 48 ml |) | |
| | Tris | 5,98 g |) | |
| | Temed | 0,46 ml |) | pH = 6,6-6,8 |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 3/ - C' : | Acrylamide | 60 g |) | |
| | Bis | 0,4 g |) | |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 4/ - D : | Acrylamide | 20 g |) | |
| | Bis | 5 g |) | |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 5/ - E : | Riboflavine | 4 g |) | |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 6/ - F : | Sucrose | 40 g |) | |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |
| 7/ - G : | Catalyseur | |) | |
| | Amno-Persulfate | 0,14 g |) | |
| | H ₂ O QSP | 100 ml |) | |

- 8/ - J : Colorant pour front de solvant
Solution de bleu de bromophénol à 0,005 %
- 9/ - Colorant Coomassie
Colorant brilliant blue : 0,2 %
- 10/ - Tampon pour électrodes
Solution saturée de tétraborate de sodium contenant
0,5 % de dodécylsulfate de sodium
- 11/ - Solution d'extraction de protéines
Solution d'urée : 8 M
- 12/ - Solution de fixation des protéines et de décoloration
- | | |
|----------------------|---------|
| Alcool méthylique | 300 ml |
| Acide acétique | 50 ml |
| H ₂ O QSP | 1000 ml |

B/ - MATERIEL

Le matériel utilisé ici comprend, d'une part, plusieurs Soxhlet, d'autre part, un appareil pour électrophorèse sur gel de polyacrylamide - Canalco - type 1200.

C/ - MODE OPERATOIRE

Préparation de l'échantillon

- . Prendre un mortier, y mettre 40 g de sable de Fontainebleau et 10/12 g de l'échantillon
- . Bien broyer
- . Mettre la totalité dans une capsule en porcelaine avec un petit agitateur en verre
- . Mettre la capsule dans un dessiccateur muni d'un dispositif pour faire le vide et en présence de P₂ O₅ (grande surface); faire le vide (1/4 d'heure à la trompe à eau).
- . Mettre 2 h à l'étuve à 50/55° C, puis changer le P₂ O₅ si nécessaire
- . Mélanger à nouveau le contenu des capsules
- . Mettre une nuit sous vide à 50/55° C, toujours en présence de P₂ O₅ pour terminer la déshydratation.
- . Verser le contenu de la capsule sur du papier Joseph, de manière à pouvoir mettre le tout dans un extracteur de Soxhlet
- . Dans la fiole du Soxhlet, mettre 150 ml d'éther de pétrole. Extraire 4/5 h.
- . Faire sécher le contenu de l'extracteur à l'air libre de manière à évaporer l'éther de pétrole résiduel.
- . Verser le mélange sable + extrait dans un bécher de 100 ml
- . Ajouter 30 ml H₂ O
- . Ajuster le pH à 9,0 avec de la soude N
- . Mettre au bain-marie à 40° C pendant 15 mn en agitant de temps en temps. Laisser décanter.
- . Prélever le liquide et l'extrait qui se trouvent au-dessus du sable, en filtrant sur nylon.
- . Centrifuger 3 à 4 mn à 3000 t/mn
- . Eliminer le surnageant
- . Mettre le centrifugat dans un tube à essai avec 1 ou 2 ml d'urée 8 M et 6 gouttes de Mercaptoéthanol
- . Laisser en contact une nuit

Electrophorèse

Faire un gel de séparation A' - 4 ml)
C' - 4 ml) pour 12 tubes
G - 8 ml)

Recouvrir avec de l'eau
Attendre 1/2 h (ce gel peut se préparer la veille)
Faire le gel de concentration après avoir éliminé l'eau

B - 0,5 ml)
D - 0,5 ml)
E - 0,5 ml)
H₂O - 0,5 ml)
F² - 2 ml)

Recouvrir avec de l'eau
Illuminer 1/2 h devant la lampe spéciale pour effectuer la polymérisation des gels
Faire le gel d'échantillon dans un béccher entouré de papier d'aluminium après avoir éliminé l'eau

B - 0,5 ml)
D - 0,5 ml)
E - 0,5 ml)
F - 2 ml)

Prélever une tubulure d'échantillon (3 cm)
Mélanger à un peu de gel (0,3 ml)
Recouvrir avec du tampon d'électrode
Laisser 1/2 h devant la lampe spéciale
Après 1/2 h, mettre les tubes sur l'appareil à électrophorèse; finir de remplir très précautionneusement tous les tubes avec le tampon pour électrodes
Verser le tampon pour électrodes doucement dans la partie supérieure en ajoutant le colorant J (1 à 2 gouttes)
Mélanger doucement
Verser le tampon pour électrodes dans la partie inférieure
Mettre le courant 5 mA par tube
Quant le colorant atteint 1 à 2 mm avant le bas du tube, soit au bout de 3/4 d'heure à 1 h, enlever le tube et corriger en conséquence l'ampérage pour amener le front d'électrophorèse au même niveau sur les autres tubes.
Sortir le gel du tube d'électrophorèse et mettre dans un tube à coloration contenant la solution d'alcool méthylique-acide acétique de manière à ce que le gel soit bien recouvert.
Laisser en contact 2 h
Éliminer l'alcool. Laver une fois avec de l'eau distillée
Verser la solution de bleu de Coomassie de manière à bien recouvrir le gel
Laisser en contact 2 h
Éliminer le colorant
Verser la solution d'alcool méthylique-acide acétique
Par des lavages successifs, décolorer le fond du gel
La décoloration est d'autant plus aisée que la quantité de colorant J ajoutée est plus faible.
Le temps de décoloration peut atteindre ou dépasser 24 h, il est alors prudent de maintenir les tubes à l'obscurité pendant cette opération.
Effectuer la lecture en comparaison de tubes témoins, avec et sans les produits recherchés.

R E S U L T A T S

=====

Les essais ont été effectués sur des produits fabriqués au laboratoire selon deux sortes de formules :

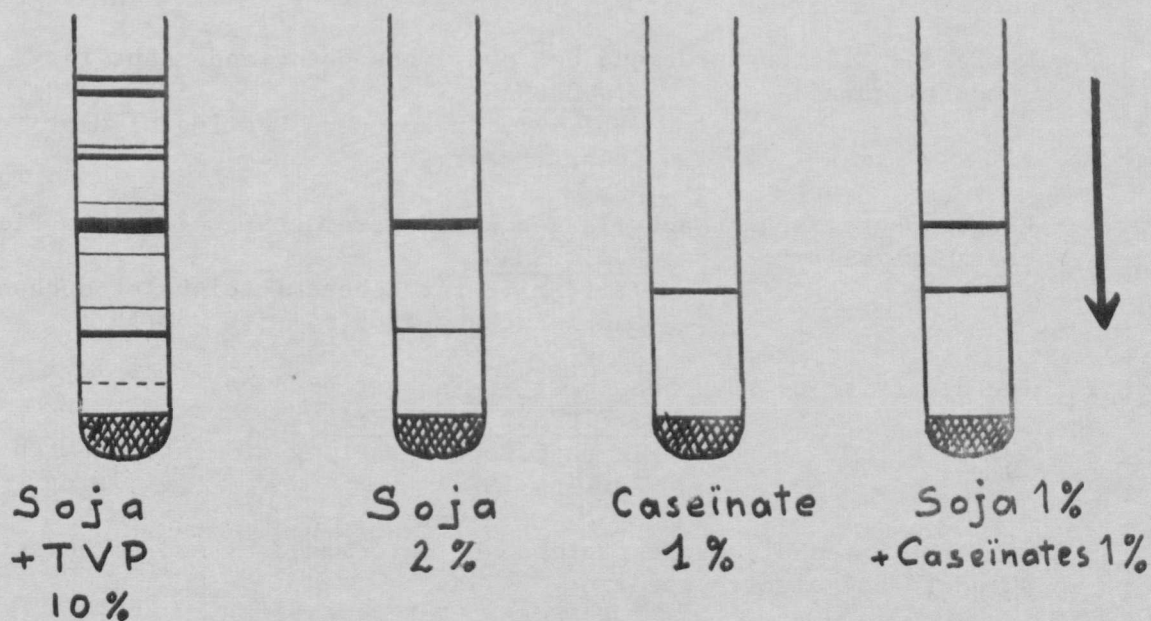
- a) - Pâté de foie
- b) - Pâté de viande

contenant du foie, des gelées, du maigre, du gras, du blanc d'oeuf, de la farine, des sels, épices et arômes, auxquels ont été ajoutées des quantités variables de protéinate de soja, TVP et/ou caséinate. Ces produits étaient conditionnés en boîte 1/6e ronde et autoclavés à 117° C pendant 1 h 15 mn.

Les résultats ont été confirmés, ensuite, sur fabrication industrielle. Les bandes obtenues sur les gels permettent de caractériser les protéines de soja et le caséinate grâce à des R_f bien déterminés.

Mais nous avons pu constater qu'à concentration égale les TVP donnent des bandes de coloration moins intenses que les protéinates de soja. Cela a pour conséquence de ne pas permettre d'obtenir la même sensibilité de détection pour les deux formes de soja. En effet, la limite que nous avons pu atteindre pour les protéinates de soja et les caséinates est de 0,5 %, tandis que pour les TVP, nous n'avons pas pu descendre au-dessous de 5 %. Ce résultat est dû au traitement thermique appliqué aux TVP lors de leur fabrication.

Ces limites nous ont paru suffisantes, aussi n'avons nous pas jugé utile de pousser davantage la séparation et la concentration des protéines comme l'eût permis un usage plus poussé de la méthode de P. de HOOG avant l'électrophorèse.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Mise en évidence des protéines de soja dans les produits carnés
O.FLEISCHMANN
1966 - Die Fleischwirtschaft n°2,p.172
- 2 - Ernährungs Forschung U.FREIMUTH, W.KRAUSE
1970 15 367
- 3 - Zür Unterscheidung von Fleisch und TVP Erzeug-nissen
F.GUENTHER, O.BURCKHART, I.OOSTINGA
1969, Die Fleischwirtschaft n°4,p.474/76
- 4 - Identifizierung von soja und Fleischeiweiss Mittels Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gel-electrophorèse
K.HOFFMANN, I.F.PENNY
1971, Die Fleischwirtschaft, n°4,p.577/78
- 5 - Nachweis und Bestimmung von Aufgeschlossenen Milcheiweiss und soja-protein in Fleischer-Zeugnissen
P.de HOOG, S. van den REEK, F.BROUWER
1970, Die Fleischwirtschaft, n°12,p.1663/66
- 6 - Untersuchungen zum serologischen nachweis von soja-protein in erhitzten Fleisch-Zeugnissen,1
H.KRUGER, D.GROSSKLAUS
1970, Die Fleischwirtschaft, n°11,p.1529/41
- 7 - Histologischer Nachweis von TVP
H.LINKE
1969, Die Fleischwirtschaft, n°4, p.469/71
- 8 - Enzymatic precipitation in agar gel as a method for the detection of sodium caseinate in raw and heated meat products
J.NORDAL, L.ROSSEBO
1972, Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und forschung, vol.148,2,p.65/69
- 9 - Recherche Electrophorétique des protéines non viande dans les produits carnés
W.J.OLSMAN
1967 - 13 th European Meeting of Meat Research Workers
- 10 - Elektrophoretischer Nachweis von Fleischfremden Eiweissen in Fleischerzeugnissen
W.J.OLSMAN
Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und forschung 1969,141,5,p.253/59
- 11 - The detection of soya bean protein in meat products
I.F.PENNY, K.HOFFMANN
17 th European meeting of meat Research Workers 1971
- 12 - Subunits Sizes of muscle protein, as determined by sodium Dodecyl sulphate gel electrophoresis
R.K.SCOPEES, I.F.PENNY
1971.Bioch.Bioph.Acta 236,p.409/10

13 - Mise en évidence de la caséine et des caséinates dans les produits
carnés

J.P.W.VAN BAAL, N.H.LEGET

1965, Zett Schrift für Leben-mittel
Untersuchung und forschung,127,p.263/8

14 - Nachweis von Fremdeiweiss in Fleischerzeugnissen Mittels Nicht Sero-
logischer Methoden

J.WITTMANN, L.KOTTER, H.SCHMIDT

1966, Archiv.für Lebensmittel-hygiene
12,p.272