

REFRIGERATION, FREEZING AND THAWING  
SESSION N: BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

A. LACOURT,  
Station de Recherches sur la Viande,  
I.N.R.A.,  
Theix, 63 Saint-Genes-Champanelle.

Je m'efforcerais essentiellement de présenter dans leurs grandes lignes les cinq communications constituant cette session. J'espère ainsi permettre de les compléter ou de les critiquer.

N 1 :

La première communication concerne l'évolution des propriétés des protéines au cours de la congélation en relation avec le déroulement des processus enzymatiques post mortem dans le muscle.

Ce travail a été effectué par DE ALECHINA, JANOUCIKINE et JASSEREVA.

L'étude porte sur 3 lots d'animaux :

- 1 lot témoin
- 1 lot ayant subi une injection d'adrenaline 3 heures avant l'abattage.
- 1 lot abattu sous l'action d'un relaxant musculaire : la dithyline.

1 - RESULTATS ET DISCUSSION

L'adrénaline provoque une utilisation des réserves musculaires de glycogène avant l'abattage.

La dithyline favorise un retard de l'installation de la rigor mortis de 12 à 15 heures.

1.1. - La solubilité des protéines sarcoplasmiques ( $\Gamma=0,15$ ) reste constante quels que soient les traitements préalables.

La solubilité des protéines myofibrillaires ( $\Gamma=0,53$ ) du lot témoin diminue de 19 % par rapport à l'azote totale à 6-7 % à 24 heures après la mort (rigor). Elle remonte ensuite lentement avec la maturation pour atteindre 10 % à 96 heures. On constate une baisse de la solubilité des essais congelés de l'ordre de 10 % par rapport au témoin non congelé. Le même phénomène existe pour le lot dithyline aux points 24 heures et 96 heures. Cette diminution de solubilité semble se produire lorsque la congélation est faite alors que le pH de la viande est inférieure à 6,0-6,2.

1.2. - Dosage des groupes acides et basiques démasqués des protéines solubles. Cette analyse ne fait pas apparaître de différence significative avant et après congélation.

1.3. - Le dosage des groupements SH des protéines solubles sarco-  
plasmiques ou myofibrillaires confirme les résultats obtenus au niveau de leur  
solubilité. Il semble que le dosage des SH permet de mettre en évidence les  
premiers changements de conformation des molécules protéiques provoqués par  
la congélation avant même que leur solubilité n'ait été affectée.

1.4. - Influence de la congélation sur la rétention d'eau

- Animaux adrénalisés : il existe une très légère augmentation de la  
rétention d'eau avec la maturation mais aucun effet notable du à la congélation.

- Lot témoin présente une chute importante au cours de l'installation  
de la rigor mortis. La rétention d'eau augmente ensuite entre 24 heures et 96  
heures post mortem. La congélation aggrave de façon importante ce phénomène.

Dans le lot dithyline, la rétention d'eau reste stable jusqu'à  
10 heures après l'abattage et chute au moment de l'installation de la rigor  
mortis à 24 heures post mortem. Là encore la maturation provoque une légère  
amélioration. La congélation aggrave la perte de rétention d'eau. Comme pour  
la solubilité il est à noter que ce phénomène est également valable pour les  
points 2 heures et 10 heures. Mais les auteurs de ce travail pensent qu'au  
cours de la décongélation des échantillons dont le pH est élevé une glycolyse  
intense abaisse le pH et par voie de conséquence dégrade les protéines muscu-  
laires.

Ils ont pu vérifier cette hypothèse en étudiant la chute du pH et  
l'évolution des propriétés des protéines au cours des instants qui ont suivi  
la réhydratation d'échantillons lyophilisés. Ainsi, 15 minutes après réhydra-  
tation la solubilité et la rétention d'eau ont atteint pratiquement leur valeur  
minimale.

DISCUSSION :

Les caractéristiques des protéines musculaires évoluent après la  
mort des animaux en fonction du pH intracellulaire d'une part et de la maturation  
d'autre part. La congélation provoque une aggravation notable de ces propriétés  
si elle est pratiquée à un moment où le pH musculaire est inférieur à 6,2.

N 2 :

La seconde communication de GORBATOV et al consiste en l'étude comparative  
du collagène soluble et fibrillaire au moyen de la spectrométrie Infra Rouge.

## 1 - PRESENTATION DU TRAVAIL

L'énergie transmise par la lumière dans le domaine de l'infra rouge provoque une vibration des moments dipolaires existant dans les molécules. Chaque moment dipolaire possède une série de fréquences propres, pour lesquelles il entre en résonance et absorbe ainsi l'énergie du rayonnement. Les pics d'absorption d'énergie sont donc caractéristiques d'un système atomique donné. Les variations d'intensité d'un pic sont proportionnelles à la densité des systèmes considérés alors que la localisation maxima d'absorption sur l'échelle des fréquences (effets bathochromes ou hypsochromes) est liée à la masse, à la géométrie et aux forces de rappels des atomes oscillants.

Les protéines présentent une série de bandes d'absorption qui sont liées à la liaison peptidique. Ces bandes caractéristiques sont constantes d'une protéine à l'autre mais peuvent subir de légers déplacements dans le spectre, déplacements révélant la présence de liaisons hydrogènes, ou d'eau liée aux structures moléculaires.

Les principales bandes d'absorption en IR des protéines sont les suivantes :

- 1) la bande Amide A qui est située à  $3400-3460\text{cm}^{-1}$  et qui correspond aux oscillations valentes du groupement N - H. S'il y a formation de liaisons H, on observe un déplacement vers  $3120-3330\text{cm}^{-1}$
- 2) La bande Amide I,  $1600-1700\text{cm}^{-1}$  est due au groupement C=O
- 3) La bande Amide II,  $1510-1570\text{cm}^{-1}$ , correspond aux oscillations déformatives (perpendiculaires à la liaison N - H)
- 4) La liaison OH absorbe à  $3610\text{cm}^{-1}$ . Si l'oxygène participe à une liaison hydrogène, il y a déplacement vers  $3400-3500\text{cm}^{-1}$

Les quatre produits étudiés provenant du collagène sont :

- NFC : collagène natif fibrillaire
- TC : Tropocollagène (collagène natif soluble)
- ASSC : collagène solubilisé par traitement préalable aux alcalis et sel
- ESC : collagène solubilisé par traitement enzymatique

## 2 - RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. - Collagène comprimé : Les spectres sont décalés pour plus de clarté.

- a) bande Amide I - NFC et TC présentent des spectres identiques  
ASSC et ESC présentent des pics d'absorptions décalés vers les basses fréquences ce qui est caractéristique de la formation de liaisons hydrogène

b) bande Amide A - TC et HFC présentent des spectres identiques. Il faut noter la présence importante d'hydroxyles et d'eau liée ( $3450-3550\text{ cm}^{-1}$ ).

ASSC et ESC présentent des pics d'absorption aux mêmes fréquences mais le rapport des intensités change. On constate une augmentation des OH et de l'eau liée. Il faut noter en particulier l'importance de l'absorption à  $3400\text{ cm}^{-1}$  pour ESC.

Ainsi l'étude des spectres à ces fréquences permet de suggérer que le traitement enzymatique affecte la structure cristalline qui ordonne la molécule de collagène avec perte de structure et hydratation.

2.2. Etude des films obtenus à partir de ASSC et ESC. On obtient une meilleure définition des spectres car les échantillons ont une épaisseur de 20 microns.

Les spectres diffèrent au niveau de la bande Amide II.

En effet, la bande Amide I (groupe CO:  $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ ) est localisée au même endroit dans les deux cas. La bande Amide II, qui est due à l'oscillation déformative de NH, dans le cas de ASSC est déplacée de  $40\text{ cm}^{-1}$  de telle sorte que les bandes Amides II et Amide I sont confondues. Ce phénomène prouve que les hydrogènes de NH dans ASSC participent à des liaisons hydrogène.

L'étude des spectres à  $3300-3500$  peut nous dire si ces liaisons hydrogène stabilisent ou non la structure des molécules.

En effet, alors que ASSC présente un déplacement caractérisant la présence élevée de OH et d'eau liée, ESC a un pic d'absorption nette à  $3340\text{ cm}^{-1}$  prouvant ainsi une structure ordonnée plus importante. Le traitement aux alcalis provoque un plus grand relâchement des molécules que le traitement enzymatique.

### 2.3. - Etude en présence de polyvinyl alcool - PVA

Le PVA pénètre dans les protéines sans en affecter la structure. Lorsqu'on étudie ASSC en présence de PVA il n'y a pas de modifications notables du spectre.

- ESC + PVA présente un déplacement de la bande Amine II de  $25-30\text{ cm}^{-1}$

- ESC + glyoxal : ce produit agit comme agent de tannage. On voit ainsi que PVA agit de la même manière sur ESC en durcissant les molécules.

### CONCLUSION :

Le traitement du collagène par les alcalis ou les enzymes provoquent un relâchement de la structure tertiaire des molécules avec une augmentation de l'eau liée.

L'étude directe des échantillons n'indique pas de changement profond. Le produit de solubilisation par les alcalis présente une structure largement détruite avec une intervention importante d'eau au niveau des OH et COOH libérés. Ceci est sans doute lié au fait que le traitement en présence de soude provoque d'une part une désamination des acides et d'autre part une libération des sucres aminés et des hexoses.

Dans le cas de ESC, l'attaque enzymatique correspond à la coupure de telopeptides. On observe des changements moindres un relâchement de la molécule moins important. La spirale de base reste inchangée.

N 3 :

Le travail que nous avons effectué avec Monsieur ARNAL porte sur l'évolution en fonction de l'âge des caractéristiques métaboliques de muscles d'agneaux en relation avec la synthèse protéique "in vivo".

La qualité de la viande est fréquemment étudiée en relation avec les caractéristiques métaboliques des muscles et la vitesse de croissance des animaux. Nous avons étudié l'évolution avec l'âge de ces caractéristiques dans des muscles blancs et des muscles rouges d'agneaux âgés de 1, 5, 10 et 16 semaines.

#### 1 - EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES METABOLIQUES ET CONTRACTILES DES MUSCLES D'AGNEAUX.

Le pourcentage en différentes fibres des muscles étudiés présente une assez grande variabilité entre les animaux mais les moyennes restent pratiquement constantes entre l'âge de 1 semaine et celui de 16 semaines. On peut toutefois noter une légère diminution du nombre de fibres réagissant positivement à l'ATPase après incubation à pH basique 10,2 (type contraction rapide).

La concentration en myoglobine des muscles augmente très nettement avec l'âge et cela d'autant plus vite que le muscle est plus rouge.

L'activité succinic deshydrogenase des homogénats de muscles diminue avec l'âge et cela d'autant plus vite que le muscle est de type blanc rapide. Cette chute de l'activité est surtout importante entre la 1<sup>ère</sup> et la 5<sup>e</sup> semaine.

L'activité  $\alpha$  glycérophosphate deshydrogénase présente une diminution plus régulière et moins rapide pendant les 16 premières semaines de vie.

La représentation simultanée de l'activité ATPasique des myofibrilles extraites et du pourcentage de fibres de type contraction rapide révèle une très nette tendance à la diminution du niveau activité ATPasique dans les deux muscles étudiés mais plus marquée dans le muscle Diaphragma.

## 2 - SYNTHESE PROTEIQUE IN VIVO EN FONCTION DE L'AGE ET DU TYPE DE MUSCLE

Cette figure montre l'incorporation de L lysine  $^{14}\text{C}$  dans les protéines de deux muscles caractéristiques TFL (blanc) et D (rouge). Cette incorporation obéit à une loi de type  $y = a \text{Lnt} + b$ .

On constate dans le cas du muscle blanc une vitesse d'incorporation deux fois plus importante à 1 semaine qu'à 16 semaines. Pour le muscle Diaphragma les pentes sont analogues mais la quantité de L lysine incorporée 1 heure après l'injection est significativement plus importante à 1 semaine. A 16 semaines la quantité incorporée par D est significativement supérieure à celle incorporée par TFL.

## 3 - DISCUSSION

Nous confirmons ainsi que dans les premières semaines de la vie les activités de la succinic deshydrogenase et de l' $\alpha$  glycerophosphate deshydrogenase diminuent assez rapidement alors que la concentration musculaire de la myoglobine augmente. Nous montrons qu'il existe une tendance très nette de l'évolution de l'ATPase myofibrillaire rapide vers l'ATPase de type lent. Nous suggérons ainsi la différenciation possible des fibres de type  $\alpha\text{R}$  en  $\beta\text{R}$ .

Il pourrait être noté au passage qu'il est nécessaire de mesurer l'importance des shunts oxydatifs ( $\alpha$  glycerophosphate, malate-aspartate pour apprécier le caractère rouge effectif (métabolisme aérobie) des cellules musculaires. En effet ces shunts permettent une oxydation rapide du NADH produit par la glyceraldehyde deshydrogenase. Si tel n'est pas le cas c'est la transformation de l'acide pyruvique en acide lactique qui permet, en régénérant le  $\text{NAD}^+$ , le fonctionnement de la glycogénolyse. Ceci peut avoir des conséquences importantes dans les instants qui précèdent l'abattage des animaux.

En dernier lieu nous montrons que la synthèse protéique in vivo semble plus importante dans les muscles blancs des animaux âgés d'une semaine. Ce phénomène est nettement inversé à 16 semaines où le muscle rouge incorpore, de façon significative davantage de lysine que les muscles blancs.

N 4 :

La 4ème communication de PAVLOWSKI et SIMBIREVA traite de la libération et de la variation de l'activité des enzymes lysosomales des muscles pendant la maturation de viande réfrigérée.

Cette étude est effectuée sur du muscle Longissimus dorsi maintenu à 2°C et prélevé sur des bovins âgés de 3 à 4 ans. Les enzymes lysosomales étudiées sont la cathepsine B, la cathepsine D, la phosphatase acide, la DNase et la RNase. L'activité enzymatique totale est faite sur un homogénat en présence de triton X 100. L'activité libre et l'activité liée sont obtenues à partir d'extraits musculaires dans du saccharose 0,25 M. Les lysosomes sont récoltés par centrifugation différentielle entre 8500 g et 14000g.

## 2 - RESULTATS

2.1.- L'évolution des activités totale, libre et liée de la cathepsine D et de la cathepsine B au cours de la maturation du muscle Longissimus dorsi est caractéristique :

La cathepsine D est 8 fois plus active que la cathepsine B. L'activité libre atteint un maximum après 72 heures et est alors égale à 80 % de l'activité maximale. L'inactivation est pratiquement totale après 240 heures (10 jours)

La cathepsine B atteint son maximum d'activité libre après 48 heures (60 % de l'activité maximale). Après 7 à 8 jours les muscles ont perdu toute activité cathepsine B.

2.2. - Les activités de la DNase et de la RNase sont exprimées en  $\Delta E/mg$  de protéine/heure.

L'activité DNase est 11 fois inférieure à l'activité RNase. La DNase est très rapidement libérée et atteint 80 % de l'activité maximale après 24 heures. Elle se dégrade également très vite puisqu'elle a perdu toute activité après 5 jours.

L'activité libre de la RNase atteint lentement sa valeur maximale (65 % de l'activité totale maximale) après 48 heures. Elle est inactivée après 7 à 8 jours.

2.3. - Les activités de la phosphatase acide sont exprimées en micromoles de phosphate inorganique/mg de protéine/30minutes; par dosage du phosphate libéré à partir du substrat : le  $\beta$  glycerophosphate.

On voit que l'activité libre est du même ordre de grandeur que l'activité totale au temps 0. Cette enzyme est inactivée très rapidement puisqu'

96 heures, on ne retrouve plus aucune activité.

### 3 - DISCUSSION

Ce travail confirme le fait que les enzymes lysosomales sont libérées dans le milieu cellulaire à des vitesses différentes.

Il corrobore la plupart des travaux mettant en évidence que la cathepsine D et la RNase existent dans le muscle à des concentrations plus grandes que la cathepsine B et la DNase.

Le substrat,  $\beta$  glycerophosphate, utilisé pour la phosphatase acide doit certainement mettre en évidence la phosphatase acide existant à l'état libre dans le cytoplasme.

La DNase et la phosphatase acide perdent toute activité après 4 à 5 jours post mortem, les cathepsines B et D et la RNase après 8 à 10 jours. Pourtant les travaux de M.F. EINO et D.W. STANLEY (J. Food Sci, 38, 45) mettent en évidence pour la cathepsine D une chute maximale, après 14 jours de 10 % de l'activité totale au temps 0.

Nous avons obtenu des résultats tout à fait comparables sur 8 animaux après 15 jours de maturation. tableau 1.

N 5 :

C.A. VOYLE a étudié les changements intervenant dans la structure fine de fibres musculaires individuelles chauffées à différentes températures.

Des travaux similaires ont déjà été fait sur des morceaux de muscle pour mettre en évidence les modifications intervenant au niveau de la structure fine des fibres musculaires au cours de leur chauffage. L'originalité de ce travail tient dans le fait qu'il a été effectué sur des fibres individuelles disséquées de rat maintenu à + 10°C pendant 24 heures. Après une préparation adéquate des échantillons, les essais sont observés au microscope électronique.

### 1 - RESULTATS

Aussi longtemps que la température de chauffage est inférieure à 50°C aucun changement de la structure fibrillaire ne peut être mis en évidence. A 50°C la périodicité des filaments fins d'actine ne peut plus être discernée, à 60°C la strie Z disparaît de la majorité des échantillons examinés et un groupement des filaments d'actine se produit. Dans la bande



anisotrope l'apparence filamenteuse est obscurcie mais la ligne M reste distincte ; à 65°C la ligne M disparaît et la bande anisotrope se rétrécit à la moitié de sa largeur initiale.

A la température maximale de chauffage des fibres, 70°C, atteinte en 3 minutes, des modifications profondes transforment la bande A anisotrope et la bande isotrope. La bande A se rétrécit en une zone amorphe et très riche en électrons, masquant ainsi presque totalement la ligne M. Les filaments d'actine sont entièrement désagrégés et se retrouvent en rangs linéaires à chaque bout de la bande A. La strie Z a complètement disparue mais des vésicules du reticulum sarcoplasmique restent reconnaissables.

## 2 - DISCUSSION

Ce travail met en évidence la disparition de la strie Z à la suite d'un chauffage. Il est possible que ce phénomène soit dû au fait que les échantillons ont été prélevés 24 heures post mortem contrairement aux autres travaux qui ont été effectués après 7 jours post mortem. Il est intéressant de comparer ces modifications de la structure fine des fibres musculaires provoquées par le chauffage à 70°C aux résultats obtenus par VALIN qui a étudié le relarguage des nucléotides et des protéines à partir de myofibrilles chauffées à 55, 65, 70 et 75°C.

Dans la figure 1, le relarguage des nucléotides est exprimé d'une façon globale par la densité optique à 257nm de l'extrait obtenu sur myofibrilles dénaturées à une température donnée, en pour cent de la densité optique d'un extrait contenant les nucléotides totaux liés aux myofibrilles (échantillon non chauffé). On obtient ainsi un relarguage de 49,2 % à 55°C, de 83,6 % à 65°C et de 86 % et 87 % à 70 et 75°C. Ainsi au delà de 65°C on observe un plateau pour des valeurs voisines de 90 % ce qui traduit un relarguage pratiquement total des nucléotides à partir de 65 °C.

Le phénomène va de pair avec le relarguage protéique qui croît en fonction du pH et de la température jusqu'à 70°C. Sur le plan qualitatif, ces protéines sont constituées en majorité par de l'actine dépolymérisée, des troponines, de la tropomyosine et des chaînes légères de myosine. La présence de myosine et d' $\alpha$  actinine semble plus hypothétique dans l'état actuel de nos recherches.

Ces données semblent indiquer des remaniements importants au niveau des filaments fins d'actine, ce qui confirme parfaitement le travail du Docteur VOYLE.