

Extraction of sarcoplasmic nitrogen - Influence of the pH of the buffer

J. BOUSSET

Laboratoire de recherches sur la Viande de l'INRA

C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas (France)

Buffer capacity and pH are variable in meat. If the same buffer is used to extract different types of meat, the pH and ionic strength of the extract is variable. This is the case when extracting sarcoplasmic nitrogen.

The experiments carried out on different types of meat point out that the pH of the extract (pH_e) depends both on buffer pH (pH_t) and on meat pH (pH_v) according to the relation :

$$(1) \quad pH_t - pH_e = 0,25 (pH_t - pH_v) + 0,01$$

The effect of change in pH and ionic strength on extraction of soluble nitrogen was studied on different meat samples by using phosphate buffers in a pH range of 6-8.

The nitrogen extracted varied ; half of the variation was attributed to the ionic strength and half to the pH. In the pH range tested, TCA-soluble nitrogen was neither influenced by variation of pH nor by ionic strength. The higher the pH and the ionic strength, the larger the extraction of soluble nitrogen. The increase was about 13 % when the pH increased from 6 to 8.

Use of a classical phosphate buffer (pH 7,4) induced a relative error of 4 % for total soluble nitrogen and 6 % for protein soluble nitrogen.

To eliminate these errors it is suggested to calculate the buffer pH for extraction according to equation (1) so that whatever the meat pH, the extract pH remains constant.

Gewinnung des Sarkoplasma-Stickstoffs - Einfluss des pH-Wertes der gebrauchten Pufferlösung.

J. BOUSSET.

Laboratoire de Recherches sur la Viande, INRA-JOUY, 78350 JOUY-en-JOSAS (France).

Der pH-Wert und Puffervermögen des Fleisches sind sehr variationsfähig. Deswegen die gleiche Extraktionslösung gibt nicht mit verschiedenen Fleischtypen Extrakte von konstantem pH-Wert und konstanter Ionenstärke. Dies Phänomen spielt eine besondere Rolle bei der Extraktion des Sarkoplasma Stickstoffs.

Die Versuche, die wir mit verschiedenen Fleischtypen angestellt haben, zeigen dass der pH-Wert des Extraktes (pH_e) ist gleichzeitig vom pH-Wert der Pufferlösung (pH_t) und vom pH-Wert des Fleisches (pH_v) abhängig und zwar in Verhältnis:

$$(1) \quad pH_t - pH_e = 0,25 (pH_t - pH_v) + 0,01.$$

Die Wirkungen der Variationen des pH-Wertes und der Ionenstärke wurden durch Beobachtung der Fleischextraktion mit Phosphat-Pufferlösungen pH-Wert im Bereich 6 bis 8 ermittelt. Die Variation des extrahierten Stickstoffs hängt halb und halb von der Ionenstärke und dem pH-Wert ab. Der, durch die trichloressigsäure nicht präzipitierte Stickstoff, ist durch die Variationen des pH-Wertes und der Ionenstärke nicht beeinflusst. Die Extraktion vom gesamten löslichen Stickstoff steigt mit wachsender Ionenstärke oder steigendem pH-Wert. Diese Steigerung ist von ungefähr 13% wenn der pH-Wert von 6 bis 8 erhöht wird.

Die Anwendung einer einzigen Pufferlösung führt zu Abschätzungen mit relativen Fehlern beschwert. Im Falle einer klassischen Pufferlösung pH=7,4, erreichen diese Fehler ungefähr 4% für den gesamten löslichen Stickstoff und 6% für den Protein-Stickstoff. Um solche Fehler zu vermeiden, schlagen wir vor den pH-Wert der Pufferlösung für Extraktion nach der Gleichung (1) zu wählen, dadurch wird der pH-Wert des Extraktes, unabhängig vom ursprünglichen pH-Wert des Fleisches, konstant.

Extraction de l'azote sarcoplasmique - Influence du pH du tampon utilisé

J. BOUSSET

Laboratoire de recherches sur la Viande de l'INRA

C.N.R.Z. , 78350 Jouy-en-Josas

Le pH et le pouvoir tampon des viandes sont très variables. Un milieu d'extraction donné ne fournit donc pas, pour différentes viandes, une solution extraite de pH et de force ionique constante. Le problème se pose en particulier pour l'extraction de l'azote sarcoplasmique.

Les essais que nous avons réalisés sur des viandes de différents types ont montré que le pH de l'extrait (pH_e) dépend à la fois de celui du tampon (pH_t) et de celui de la viande (pH_v), selon la relation:

$$(1) \quad pH_t - pH_e = 0,25 (pH_t - pH_v) + 0,01$$

Les effets de la variation du pH et de la force ionique ont été étudiés en considérant l'extraction de viandes par des tampons phosphates de pH compris entre 6 et 8. La moitié de la variation de l'azote extrait est imputable à la force ionique et l'autre moitié est due au pH. L'azote non précipitable par le TCA n'est influencé ni par les variations de pH ni par celle de la force ionique. L'extraction de l'azote soluble total est d'autant plus forte que le pH ou la force ionique sont plus élevés. L'accroissement est d'environ 13 p.100 quand le pH passe de 6 à 8.

L'adoption d'un tampon unique conduit à des erreurs relatives d'estimation qui, dans le cas du tampon classique de pH = 7,4, sont de l'ordre de 4 p.100 pour l'azote soluble total et de 6 p.100 pour l'azote protéique. Pour supprimer ces erreurs, il est proposé de choisir le pH du tampon d'extraction d'après l'équation (1) pour que, quel que soit le pH initial de la viande, le pH de l'extrait demeure constant.

Экстракция азота саркоплазмы -
Влияние pH употребленного буферного раствора.

Ж.БУССЕТ

Лаборатория по исследованию мяса, ИНРА - ЖУИ, 78350 Жуи-ан-Жозас, Франция.

Величина pH и буферная способность мяса очень изменчивы. Поэтому для различных типов мяса одна и та же экстракционная среда не дает экстрактов с постоянным pH и постоянной ионной силой. Это явление имеет особое значение при извлечении азота саркоплазмы.

Исследования, проведенные нами над различными сортами мяса, показали что pH экстракта (pH_e) зависит одновременно от pH буферного раствора (pH_t) и от pH мяса (pH_v), а именно:

$$(1) \quad pH_t - pH_e = 0,25 (pH_t - pH_v) + 0,01$$

Последствия изменения pH и ионной силы были изучены наблюдением над экстракцией мяса буферными растворами фосфата pH от 6 до 8. Половина изменения содержания азота в экстракте зависит от ионной силы, а другая половина от pH. Изменения ионной силы и pH не влияют на азот не преципитируемый трихлоруксусной кислотой. Экстракция общего растворимого азота увеличивается с повышением pH или ионной силы. При повышении pH от 6 до 8 это увеличение составляет около 13%.

Употребление для экстракции только одного буферного раствора ведет за собой относительные ошибки определения азота, которые, при применении классического буферного раствора pH = 7,4 достигают 4% для общего растворимого азота и 6% для белкового азота. Во избежание этих ошибок мы предлагаем выбирать pH буферного экстракционного раствора при помощи формулы (1) что бы, какое бы ни было первоначальное pH мяса, pH экстракта оставалось бы постоянным.

Extraction de l'azote sarcoplasmique - Influence du pH du tampon utilisé

J. BOUSSET

Laboratoire de recherches sur la Viande de l'I.N.R.A.

C.N.R.Z. - 78350 Jouy-en-Josas (France)

L'azote sarcoplasmique soluble représente $\frac{1}{3}$ de l'azote du muscle. La définition de cette fraction n'est pas rigoureuse. On admet qu'elle est constituée par le contenu sarcoplasmique que l'on peut extraire par un tampon très dilué de pH 7, l'extrait étant centrifugé à 15.000/20.000 g (SCOPES, 1970). Il contient surtout les différentes enzymes de la cellule et essentiellement celles de la chaîne respiratoire qui en représentent environ 70 %. Il est toujours plus ou moins contaminé par des protéines extracellulaires, particulièrement dans les muscles lents fortement irrigués.

Dans les travaux réalisés sur la viande, la fraction sarcoplasmique est le plus souvent extraite par la méthode de HELANDER (1957) ou des méthodes qui en dérivent: l'échantillon de muscle, immédiatement congelé après prélèvement, est coupé au cryomicrotome et le produit émancé est extrait, pour la partie sarcoplasmique, par du tampon phosphate pH 7,4, 0,03M. Souvent on n'utilise pas le cryomicrotome et on se contente d'agiter des éléments finement broyés comme le fait ASCHAR. Les résultats obtenus sont équivalents.

L'étude de la méthode de HELANDER (1957) fait ressortir plusieurs points qui semblent indiquer qu'elle n'est pas parfaitement adaptée aux viandes en cours de maturation dont le pH s'écarte notablement de la neutralité et dont le pouvoir tampon est relativement important. Comme le signale SCOPES (1970) les protéines sarcoplasmiques et, spécialement les globulines sont sensibles aux variations de pH. Or, HELANDER a finalement retenu dans ses études un pH de 7,4 pour les muscles ayant des pH très voisins de 7; il extrait donc à une valeur de pH supérieure à 7. D'autre part, la molarité du tampon 0,03M qu'il utilise est faible vis-à-vis du pouvoir tampon de la viande. Dans ces conditions le pH de l'extrait ne peut être constant.

Dans les travaux de technologie impliquant la détermination de la fraction sarcoplasmique des viandes, le problème des caractéristiques du tampon se trouve donc posé.

Cette note rapporte des résultats obtenus dans notre Laboratoire sur l'influence du pH et de la force ionique des tampons d'extractions.

Matériel et Méthodes

Nous avons étudié 11 échantillons de viande bovine et porcine.

Extraction des échantillons

Environ 70 g de muscles sont broyés dans un appareil à couteaux rotatifs pendant trois minutes de façon à obtenir un produit ayant l'aspect et la consistance d'une "pâte fine" (aspect entièrement homogène lorsqu'on l'écrase à la spatule).

Une aliquote est pesée en double dans des tubes de centrifugeuse et additionnée de 9 fois son poids de différents tampons étudiés. Les tubes sont placés en chambre froide au bain-marie à 4°C avec agitation magnétique pendant 1 à 2 heures suivant les essais. Le contenu est centrifugé à 5000 g à 4°C pendant 20 minutes et le surnageant est prélevé. L'azote non précipitable par le TCA est obtenu en mélangeant un volume égal du surnageant précédent et de TCA à 10 %. Après précipitation 1 nuit à 4°C, le précipité est centrifugé 10 minutes à 5000 g et les dosages réalisés sur le surnageant.

L'azote est déterminé sur les minéralisats, selon KJELDAHL, par microdistillation et dosage en retour de l'ammoniaque. Les tampons sont préparés par mélange de phosphates mono et bipotassiques de façon à obtenir les différents pH. La molarité est de 0,03 M. La force ionique est précisée dans les différents essais.

Résultats

I - Effet de tampons de différents pH

Nous avons utilisé des tampons de pH 5,98-6,50-6,82-7,04-7,25-7,54 - 7,96 pour extraire l'azote sarcoplasmique des différents échantillons. Nous avons calculé pour chaque viande et pour l'ensemble des échantillons les paramètres des droites de régression $y = ax + b$ avec $y = \text{pH tampon} - \text{pH de l'extrait}$ et $x = \text{pH tampon} - \text{pH viande}$.

Que l'on traite l'ensemble des échantillons individuellement ou en les regroupant, les valeurs des paramètres de régression sont toujours très groupées. Le coefficient de régression varie de 0,23 à 0,29, l'ordonnée à l'origine de - 0,07 à + 0,07 et le coefficient de corrélation de 0,91 à 0,96.

La droite représentative, pour toutes les valeurs groupées, est: $y = 0,25 x + 0,01$ $r = 0,92$ ^{xxx} (1).

Discussion et conclusion

De l'ensemble de ces données on peut déduire que la méthode originale de HELANDER(1957) bien adaptée à une étude sur du muscle frais ou immédiatement post mortem de pH voisin de 7 ne peut être, d'une façon générale, retenue pour des études sur des viandes en maturation à pH variables. Plusieurs cas sont à considérer. Si l'on étudie l'évolution de l'azote non précipité par le TCA on peut employer indifféremment n'importe quel tampon et, par conséquent, le tampon phosphate 7,4, 0,03M peut être retenu. Par contre, dans le cas d'une étude au niveau de la fraction protéique, on doit surveiller de très près le tampon employé et surtout le pH de l'extrait obtenu.

Pour des études où l'on dose l'azote soluble comme un ensemble, l'erreur de détermination sera d'environ 4 à 6 %. On réduirait cette erreur de moitié environ en utilisant un tampon dont la force ionique ne varierait pas avec le pH. Par contre, si l'on suit une fraction précise des protéines sarcoplasmiques, les faibles variations de pH peuvent avoir un rôle beaucoup plus important et, dans ce cas, on a intérêt à adapter le pH du tampon d'extraction à celui de la viande mise en oeuvre. Toutefois, dans certains cas particuliers, si l'on peut doser la protéine extraite par une méthode spécifique on a intérêt à employer cette dernière méthode quel que soit le tampon qu'elle utilise. C'est le cas, par exemple, pour les lactico-déhydrogénases que l'on extrait par un tampon 0,1 M dont la force ionique est telle que le pH d'extraction ne joue plus comme l'a montré l'école de HULTIN (1966-1967-1970).

Tant que l'on n'aura pas une connaissance précise de la composition du sarcoplasme (connaissance difficile à acquérir du fait de sa complexité) il ne sera pas possible de savoir exactement la part qui, dans les variations d'extractions au cours de la maturation de la viande, revient à cette transformation en propre et celle qui revient aux aléas du mode opératoire.

Pour notre part nous pensons qu'il est cependant justifié de faire varier le pH du tampon d'extraction en fonction du pH de la viande, en calculant celui-là d'après l'équation (1) proposée ci-dessus. Cette équation se simplifie en :

$$pH_{\text{tampon}} = 9,73 - \frac{1}{3} pH_{\text{viande}}$$

dans les conditions d'extraction de HELANDER (1957) où les pH des extraits sont de 7,29.

Références bibliographiques

- ASGHAR A., YEATES N.T.M. - 1974. Systematic procedure for the fractionation of muscle protein, with particular reference to biochemical evaluation of meat quality.- *Agr.Biol.Chem.*, **38** (10), 1851-1858.
- HELANDER E. - 1957. On quantitative muscle protein determination. Sarcoplasmic myofibril protein content of normal and atrophic skeletal muscles.- *Acta physiol.Scand.*, **41**, Suppl.141, 1-99.
- HULTIN H.O., WASTORT C. -1966. Factors affecting the distribution of lactate dehydrogenase between particulate and non particulate fraction of homogenized skeletal muscle.- *Arch.Biochem.Biophys.*, **117**, 523-533.
- HULTIN H.O., SOUTHARD J.H. - 1967. Cellular distribution of lactate dehydrogenase in chicken breast muscle.- *J. Food Sci.*, **32**, 503-510.
- MELNICK R.L., HULTIN H.O. -1970. Factors affecting the distribution of lactate dehydrogenase between particulate and soluble phases of homogenized trout skeletal muscle.-*J.Food Sci.*, **35**, 67-72.
- SCOPES R.K. -1970. Characterization and study of sarcoplasmic proteins. In the physiology and biochemistry of muscle as a food, 2. - The University of Wisconsin press, 1970, 471-492.