

EFFET DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE DE STOCKAGE SUR LA PROTEOLYSE DES MUSCLES D'ANIMAUX AXENIQUES

J. BOUSSET

Laboratoire de Recherches sur la Viande de l'I.N.R.A.
C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas, FRANCE

Les études de protéolyse entreprises avant 1950 avaient conclu qu'il n'y avait pas ou peu de protéolyse dans la viande. Ces constatations étaient le résultat de plusieurs faits. On considérait que la protéolyse devait se traduire par l'apparition de composés azotés de faible poids moléculaire et même pour certains d'acides aminés libres. De plus, on étudiait les phénomènes aux températures de conservation de la viande, 0 à 5°C. Dans ces conditions les phénomènes s'ils existent sont très lents et difficiles à mettre en évidence surtout lors d'études sur de courtes périodes, 7 à 14 jours. Les périodes longues étaient difficiles à aborder car les effets du développement bactérien venaient se superposer aux phénomènes endogènes étudiés et il est connu que, dans le cas de la protéolyse, ils sont très importants (SEPERICH 1977).

Lorsque vers les années 1954 on développa les études sur les possibilités de conservation des denrées alimentaires par irradiations gamma on constata que dans des conditions de stérilité complète et à température ambiante on assistait à une protéolyse très importante. Les études ont été reprises avec de la viande prélevée de façon stérile (ZENDER 1958, RADOUCO-THOMAS 1959, SHARP 1963). Les résultats étaient semblables : diminution des fractions solubles et augmentation de l'azote non protéique. Ces données ont été ensuite confirmées par BODWELL 1964 sur bovins, KHAN 1964 sur poulets, même à basse température.

Depuis quelques années un nombre considérable d'études ont été développées pour mettre en évidence les actions possibles des différentes enzymes que l'on connaissait : surtout les cathepsines. Après 1972 et le travail de BUSCH & al. l'accent a été mis sur le CAF et son rôle sur les raies Z ; PENNY en 1974 a démontré qu'il y avait bien liaison entre destruction de la raie Z et développement de la tendreté post mortem. Le même auteur en 1979 montrait que parallèlement au CAF une autre enzyme, inactivée par le calcium agissait également sur les raies Z à un pH légèrement inférieur. D'autres enzymes ont également été étudiées par : HOLMES 1971, OKITANI 1974, OTSUKA 1976, GANA 1977, SEPERICH 1977, VENUGOPAL 1978.

Face à une telle accumulation de faits nous avons étudié quel pouvait être le résultat de l'en-semble de ces protéases sur de la viande conservée à différentes températures et pendant des périodes longues. Pour éviter tout risque de présence des bactéries nous avons employé de la chair d'animaux axéniques.

MATERIEL ET METHODES

Des rats FISHER axéniques, âgés de 1 an, sont anesthésiés à l'éther et immédiatement saignés par section des veines et artères jugulaires. Après dépeçage, la chair, prélevée par dissection, est découpée en éléments de 2 à 3 cm³ et l'ensemble est homogénéisé. De la masse ainsi obtenue on prélève, au hasard, des échantillons de 15 à 20 grammes qui sont placés dans des flacons de verre bouchés hermétiquement. L'ensemble de ces manipulations est réalisé dans l'isolateur stérile où ont été élevés les animaux. Les flacons sont sortis et placés au réfrigérateur à 2°C ou à l'étuve à 12-22-32° C pendant des temps variables 1-2-3-4-6-8 semaines. Après le temps de conservation atteint chaque flacon est ouvert stérilement. On contrôle la stérilité du produit par examen direct au microscope et ensemencement sur milieu complet. Chaque échantillon est finement broyé au broyeur à couteaux de façon à obtenir une pâte très homogène.

L'azote total (Nt) est déterminé sur deux fois 1 gramme de ce broyat. Deux fois 5 grammes sont extraits au 1/10 par de l'eau à 4°C avec agitation magnétique pendant 1 heure. L'extrait est ensuite centrifugé à 10.000 g 10 min. à 4°C. 10 ml de surnageant sont utilisés pour la détermination de l'azote soluble (Ns). Une seconde prise de 10 ml additionnée d'un volume égal de TCA à 10% est placée une nuit au réfrigérateur. Après centrifugation à 10.000 g le surnageant contient l'azote non précipitable au TCA (Nnp).

Les différentes formes d'azote sont dosées, après minéralisation KJELDAHL, par microdistillation. Pour chaque point temps-température 3 échantillons sont utilisés ; le temps 0 ayant été déterminé sur 6 échantillons.

RESULTATS

Dans nos conditions de manipulation il est difficile de parvenir à une saignée complète des animaux. Or il est connu que le sang a une activité protéolytique non négligeable; pour être sûr que la présence de sang résiduel n'influençait pas nos résultats, nous avons, dans un essai préliminaire, comparé des animaux saignés comme rapporté plus haut avec d'autres non saignés. Les résultats ne font pas apparaître de différences entre les deux groupes.

Pour la clarté de l'exposé nous appelons solubilisation le passage de l'azote de la fraction azote total à la fraction azote soluble; à ce stade il peut y avoir en plus des phénomènes protéolytiques d'autres phénomènes biochimiques ou biophysiques. Nous appelons protéolyse le passage de l'azote de la fraction azote soluble à la fraction azote non précipitable au TCA. De plus pour éviter toutes interférences dues aux variations éventuelles de matière sèche ou de composition en lipides des échantillons nous considérons toujours les résultats exprimés en % de Nt pour le Ns et Nnp et en % de Ns pour le Nnp.

A- Solubilisation de l'azote (Tableau IA)

En conservation isotherme à 2°C on ne constate pas d'évolution de la fraction soluble: les 2 points d'augmentation ne peuvent pas être retenus comme significatifs. A 12°C par contre il semble bien que la solubilisation soit déjà notable avec une augmentation de 5 points. A 22°C l'augmentation de 11 points, soit 46% en 8 semaines, est très importante et cette augmentation est sensiblement linéaire dans le temps. A 32°C on assiste en 8 semaines au doublement de la fraction soluble qui passe de 24% à 46% de Nt, l'accroissement est surtout très important durant les 4 à 6 premières semaines puis il semble se ralentir légèrement.

Si l'on compare les résultats obtenus à 8 semaines pour les différentes températures on constate qu'il y a plus que doublement de l'accroissement de la fraction soluble en % de Nt chaque fois que la température s'accroît de 10°C (+2, +5, +11, +22 points pour les quatre températures).

Tableau I Evolution des fractions azotées durant la conservation

A- Azote sol. % Azote tot. B- Azote non prot. % Azote tot. C- Azote non prot. % Azote sol.

	2°C	12°C	22°C	32°C
TO	24	24	24	24
IS	27	27	26	26
2S	26	26	26	29
3S	25	29	29	35
4S	27	29	27	33
6S	25	28	30	45
8S	26	29	35	46

	2°C	12°C	22°C	32°C
9	9	9	9	9
II	I3	I4	I9	
II	I3	I5	23	
II	I5	20	28	
I2	I6	I9	28	
I2	I7	22	37	
I3	I7	27	39	

	2°C	12°C	22°C	32°C
38	38	38	38	
42	46	54	73	
43	48	60	78	
46	51	68	80	
44	55	71	84	
49	59	75	83	
51	60	78	84	

TO= Temps 0 IS-2S-3S-4S-6S-8S = I-2-3-4-6-8 Semaines de conservation

B- Protéolyse de l'azote (Tableau IB)

A toutes les températures l'augmentation de l'azote non protéique en % de Nt est apparente et le phénomène est d'autant plus important que la température de conservation est plus élevée puisque l'on a + 4 points à 2°C, + 8 points à 12°C, +18 à 22°C et +30 à 32°C en 8 semaines de conservation soit, comme pour l'azote soluble, sensiblement un doublement du phénomène tous les 10°C. Ceci est vrai pour tous les temps de conservation bien qu'au delà de 6 semaines à 32°C la protéolyse semble un peu se ralentir. L'augmentation du Nnp suit sensiblement celle de l'azote soluble.

Si l'on étudie les variations du Nnp en % du Ns (Tableau IC) on constate que l'on retrouve à la

fois les facteurs temps de conservation et températures mais il apparaît que l'azote non protéique ne peut pas atteindre 100% de l'azote soluble : dès que le Nnp représente 75% du Ns la protéolyse est moins rapide et il semble qu'elle soit parvenue à son maximum lorsque 85% de l'azote soluble est sous forme non protéique. Cette valeur est atteinte dès la quatrième semaine à 32°C et après 6 semaines à 22°C.

DISCUSSION

Dans nos différents échantillons le pH est toujours resté sensiblement constant et compris entre 6,2 et 6,5 ; l'absence d'acidification de la chair de rat avait déjà été notée.

Le pH sensiblement constant peut expliquer que nous n'avons jamais eu d'exsudats importants. RADOUCO-THOMAS avait déjà émis l'idée en 1959 que la formation d'exsudats serait liée à l'abaissement du pH lors de la protéolyse de viande stérile.

D'une façon générale nous pouvons dire que nous retrouvons le même type de phénomènes que ceux constatés par les différents auteurs. Cependant, en ce qui concerne la solubilisation de l'azote nous avons toujours constaté une augmentation de celle-ci alors qu'assez souvent (SHARP 1963, ZENDER 1958) notaient une diminution des protéines solubles. Ceci pourrait être du fait que, lorsque le pH de la viande diminue, l'extraction des composés solubles est plus faible si l'on ne compense pas le pH du tampon d'extraction (BOUSSET 1979). Dans nos essais le pH étant constant nous n'avons pas de phénomène semblable. On peut cependant noter que, au sens strict du terme, on a diminution des protéines solubles puisque l'on passe de $24-9 = 15\%$ de l'azote total sous forme de protéines solubles à $46-39 = 7\%$ d'azote protéique soluble après 8 semaines de conservation à 32°C. La protéolyse de l'azote soluble est plus rapide que la solubilisation de l'azote total.

On peut noter d'autre part que la solubilisation continue à progresser même après 8 semaines à 32°C ce qui laisse à penser qu'une partie au moins des protéines myofibrillaires est attaquée. Ceci est en accord avec les travaux actuels montrant la dégradation des raies Z par différentes enzymes, CAF de BUSCH 1972 agissant sur α -actine par exemple ; d'autres chaînes protéiques peuvent également être dégradées (VALIN et al 1975, OUALI 1976, VALIN 1978).

En ce qui concerne la protéolyse de l'azote soluble il semble bien que l'on soit parvenu au maximum de l'action possible lorsque 85% de l'azote soluble se trouve sous forme non protéique. Deux explications sont possibles : soit qu'à ce niveau les protéines qui subsistent ne possèdent plus de liaisons sensibles aux enzymes présentes soit, qu'une partie des enzymes initiales ait été également protéolysée et que le système se trouve ainsi bloqué. Nous ne pouvons pas actuellement discerner entre les deux explications quelle est la plus vraisemblable. Il semblerait pourtant que la première soit la plus plausible car les courbes de protéolyse suivent sensiblement celles de solubilisation ainsi, dès que des protéines sont solubilisées, l'équipement enzymatique est capable de les protéolyser jusqu'à la valeur de 85% correspondant à la présence, dans l'ensemble des protéines de la viande, de 15% de chaînes ayant des liaisons inattaquables par les enzymes endogènes.

Nos résultats montrent très bien que l'étude de la solubilisation ou de la protéolyse à basse température, inférieure à 12°C, ne peut mettre en évidence les phénomènes car, bien qu'existants, ils sont trop lents dans ces conditions. Les protéases endogènes sont surtout nécessaires au renouvellement des protéines cellulaires et donc elles agissent à des températures qui correspondent à celle de l'animal. Ceci ne veut pas dire qu'elles sont inactives à d'autres températures. Aux hautes températures elles peuvent être thermiquement inhibées, c'est cette propriété que l'on utilise pour conserver en l'état les viandes stérilisées par irradiation gamma. Mais aux faibles températures, par contre, les activités enzymatiques sont simplement fortement ralenties.

CONCLUSION

De la présente étude on peut conclure que la solubilisation et la protéolyse dans la viande se produisent toujours mais étant fortement influencées par la température (doublement tous les 10°C) elles ne se manifestent vraiment qu'à partir de 20°C et n'atteignent des valeurs très importantes qu'à 32°C en 8 semaines (doublement de l'azote soluble en % de Nt, quadruplement de l'azote non protéique en % du Nt).

Aux températures normales de conservation de la viande, seule l'augmentation du Nnp % du Ns peut être détectée. Ce dernier point ne signifie pas qu'il n'y ait pas d'actions enregistrables par d'autres critères. L'effet de la rupture de la raie Z par le CAF ou d'autres enzymes se traduit par une augmentation de la tendreté sans que l'on note en étude globale une protéolyse importante. Ces constatations pouvaient

déjà être faites à la suite des travaux de RADOUCO-THOMAS puisque, comparant des animaux adrénalisés et des témoins, il remarquait que dans les animaux adrénalisés où la protéolyse était presque nulle, la tendreté était supérieure aux témoins. Il ne faut donc pas lier protéolyse globale, surtout apparition d'acides aminés libres, et accroissement de la tendreté. Si cet accroissement de la tendreté est bien, au moins partiellement, d'origine protéolytique il faut l'étudier par d'autres techniques que la protéolyse globale.

Par contre la technique de protéolyse globale sur viande axénique, "stérile" ou stérilisée peut être utile pour étudier des enchaînements de protéolyses spécifiques ou mettre en évidence des produits qui n'apparaissent qu'en quantité très faible aux températures normales de conservation de la viande. On peut par ces techniques réaliser les études à toutes températures sans que le développement bactérien ne perturbe les résultats.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame Thérèse MERA pour son assistance technique lors de la réalisation du présent travail.

Nous remercions également le Laboratoire des animaux sans germes du CNRS (Dr. Doct. SACQUET) pour la fourniture gracieuse des animaux nécessaires à cette expérimentation et l'aide technique apportée lors des manipulations en isolateurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BODWELL C.E., PEARSON A.M., 1964 - J. Food Sci., 29, 602-607
- BOUSSET J., 1979 - 25ème Congrès Eur. Viande, BUDAPEST, I, 243-246
- BUSCH W.A., STOMER M.H., GOLL D.E. & SUZUKI A., 1972 - J. Cell Sci., 52, 367-381
- GANA E., BOUMA J.M.W. & GRUBER M., 1977 - Rev. Roum. Biochem. 14, 13-17
- HOLMES D., PARSONS M.E., PARK D.C. & PENNINGTON R.J., 1971 - Biochem. J. 125 98P
- KHAN A.W. & BERG Van Den L., 1964 - J. Food Sci. 29, 49-52
- OKITANI A., OTSUKA Y., SUGITANI M. & FUJIMAKI M., 1974 - Agric. Biol. Chem. 38, 573-579
- OTSUKA Y., OKITANI A., KATAKAI R. & FUJIMAKI M., 1976 - Agric. Biol. Chem. 40, 2335-2342
- OUALI A., 1976 - Thèse doctorat 3ème cycle Université Clermont-Ferrand
- PENNY I.F., VOYLE C.A. & DRANSFIELD E., 1974 - J. Sci. Food Agric. 25, 703-708
- PENNY I.F. & FERGUSON-PRYCE R., 1979 - Meat Sci. 3, 121-134
- RADOUCO-THOMAS C., LATASLE-DOROLLE C., ZENDER R., BUSSET R., MEYER H.M. & MOUTON R.F., 1959
Food Res. 24, 453-482
- SHARP J.G., 1963 - J. Sci. Food Agric. 14, 468-479
- SEPERICH G.J., 1977 - Dissert. abst. inter. 37, 4384-B
- VALIN C., PALANSKA O., GOUTEFONGEA R., 1975 - Ann. Technol. Agric. 24, 47-64
- VALIN C. 1978 - 24ème Congrès Européen Chercheurs Viande - KULMBACH
- VENUGOPAL B. & BAILEY M.E., 1978 - Meat Sci. 2, 227-239
- ZENDER R., LATASLE-DOROLLE C., COLLETT R.A. & ROWINSKI P., 1958 - Food Res. 23, 305-326