

Influence du pH et de la concentration en sel sur la stabilité d'émulsions élaborées avec différentes fractions protéiques.

C. DENOYER, J.P. GIRARD

Station de Recherches sur la Viande, I.N.R.A., THEIX, 63110 BEAUMONT, FRANCE.

Les produits divisés occupent une place prépondérante dans ce qu'il est convenu d'appeler la 3e transformation où ils représentent plus de 50 % de la production. Trois types essentiels de produits cuits, crus et secs se différencient suivant les propriétés fonctionnelles des protéines viande, exploitées au cours de la transformation.

Les pouvoirs gélifiant, émulsifiant et foisonnant des constituants protéiques sont les qualités essentiellement recherchées pour la fabrication des produits cuits, regroupés en France sous l'appellation de "pâtes fines". C'est ainsi que les auteurs allemands HAMM (1960, 1973) et HAMM et VAN HOOF (1974) considèrent comme fondamental le pouvoir gélifiant des protéines myofibrillaires de la viande en relation avec le pouvoir de rétention d'eau de celle-ci. Tandis que les auteurs américains, HANSEN (1960) en particulier, s'appuyant sur des résultats d'études histochimiques mettent en avant la capacité émulsifiante des protéines de la viande.

Pour notre part (GIRARD, 1981 ; GIRARD et al., 1981), nous avons montré que la structure de ces produits est évolutive au cours de leur structuration, c'est-à-dire lors du cuitage. La distribution en taille des particules de gras très hétérodispersée au départ correspond vraisemblablement à une suspension de gras au sein d'un gel de protéine, tandis qu'enfin de cuitage, la structure se caractérise par une population unique monodispersée comparable à celle d'une émulsion "chaude".

Par suite les aptitudes à l'émulsification des différentes fractions protéiques, ainsi que les modifications du comportement hydrophile et lipophile des constituants protéiques considérés dans leur ensemble méritaient d'être pris en considération sur ces deux points le travail que nous allons présenter complète les résultats de VAN EERD (1971).

MATERIEL ET METHODES

Mesures des équilibres hydrophiles lipophiles : HLB

Le HLB des émulsifiants

Le HLB des protéines est déterminé à l'aide de deux huiles de HLB requis connus :

- Huile de ricin : HLB requis = 14,20
- Huile de paraffine : HLB requis = 10,45

La gamme des valeurs de HLB requis intermédiaire entre ces deux valeurs extrêmes est réalisé par mélange en proportions convenables de ces deux huiles ; la valeur du HLB requis de chaque mélange d'huile est calculée à partir de la formule :

$$\text{HLB requis} = \frac{P_A \times 10,45 + P_B \times 14,20}{P_A + P_B}$$

où P_A et P_B désignent respectivement les poids d'huile de paraffine et d'huile de ricin entrant dans les mélanges d'huile.

Les émulsions sont réalisées à partir de ces huiles et de ces mélanges d'huiles d'une part et de la solution d'émulsifiant d'autre part suivant les proportions : 50 g d'huile ou de mélange d'huiles, 50 ml de solution émulsifiante. L'émulsification est effectuée à l'aide d'un POLYTRON pendant 30 s à 13 000 RPM.

Deux méthodes de mesure sont principalement utilisées pour apprécier la stabilité d'une émulsion. Il s'agit de l'activité émulsifiante et de l'indice de stabilité. Ces deux méthodes reposent sur la détermination des quantités d'huile ou d'eau séparées et diffèrent en ce sens que la première est effectuée à froid, au cours du temps et après centrifugation et que la seconde nécessite un traitement thermique une fois l'émulsion réalisée.

Nous avons opté pour la seconde méthode plus rapide de mise en oeuvre. Les conditions de traitement thermique retenues sont : 60 minutes à 50°C. Les résultats sont exprimés en ml de phase relarguée pour 100 ml d'émulsion.

Le HLB de l'émulsifiant étudié correspond au HLB requis de l'huile ou du mélange d'huiles donnant l'émulsion la plus stable.

- HLB de la viande

Considérant les protéines de la viande dans leur ensemble, l'étude du HLB a porté uniquement sur l'effet du pH.

La viande de porc broyée au hachoir est amenée à différents pH à l'aide de solutions d'acide chlorhydrique 0,1 N d'une part et de soude 0,1 N d'autre part. Puis 2,5 g de viande sont mis en suspension dans 50 ml d'une solution de NaCl à 3 %, et l'émulsification s'effectue avec 50 g d'huile.

Le HLB de la viande correspond au HLB requis de l'huile ou du mélange d'huiles entrant dans l'émulsion la plus stable.

- HLB des protéines de la viande

Dans le cas des protéines sarcoplasmiques, de l'actine, de la myosine et de l'actomyosine notre étude a porté sur l'influence du pH, de la concentration sur la stabilité des émulsions. L'importance du nombre de paramètres pris en considération nous a amené à effectuer notre expérimentation avec un seul type de gras de HLB requis = 13 (68 % d'huile de ricin, 32 % d'huile de paraffine, en poids). Cette valeur retenue correspond approximativement au HLB des protéines de la viande déterminé par VAN EERD (1971).

Extraction des protéines de la viande

La viande (*Longissimus dorsi* de porc) est prélevée sur un animal anesthésié juste avant abattage par injection intraveineuse d'une solution de sulfate de magnésium (substance à effet curarisant). Le prélèvement pour l'extraction de la myosine et de l'actine est effectué aussitôt après la mort, pour l'extraction des protéines sarcoplasmiques et de l'actomyosine, il y a lieu 24 heures post mortem. Toutes les opérations d'extraction et de purification conduisant aux différentes fractions testées ont été précédemment décrites (DENOYER, 1978). La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide S.D.S. décrite par LEAMMLI (1970) nous a permis de préciser la pureté de l'actine, de la myosine et de l'actomyosine.

Electrophorégrammes des fractions protéiques de la viande

Actine : la fraction protéique obtenue après séparation de la myosine et de l'actine et purification de l'actine renferme 84 % d'actine comme le révèle son électrophorégramme (cf. fig. 1) ; l'épaulement que l'on peut constater pour un Rf légèrement inférieur à celui de l'actine correspond à de la tropomyosine. Par ailleurs l'examen de l'électrophorégramme révèle que la myosine est complètement absente de cette fraction protéique.

Myosine : le degré de pureté de cette fraction protéique s'établit à 84 % (cf. fig. 1) en considérant le pic propre à la myosine et les pics (1 et 2) qui correspondent aux chaînes légères associées à la tête de la myosine et à la troponine. L'actine est présente à l'état de traces non quantifiables.

Actomyosine : elle représente 80 % de la fraction protéique isolée. Les pourcentages de myosine d'actine et des "light chains" de myosine s'établissent respectivement à 44, 31 et 5 % (cf. fig. 1)

RESULTATS

Influence du pH sur l'équilibre hydrophile-lipophile des protéines viandes considérées dans leur ensemble

VAN EERD (1971) s'est limité à l'étude du pouvoir stabilisant conféré par les protéines viande et à celles de leur équilibre hydrophile-lipophile à deux stades de la maturation : la pré- et la post-rigor. Nous avons abordé dans cette première partie l'étude de l'influence du pH dans un large domaine de pH 4-8 unités. Les courbes représentatives (cf. fig. 2) des quantités de phase relarguée (inverse de la stabilité) en fonction du HLB requis des huiles ou mélanges d'huiles entrant dans la constitution des émulsions, présentent pour chaque valeur du pH de la viande l'allure d'une parabole dont nous avons calculé l'équation ($y = ax^2 + bx + c$) (1) à partir des valeurs expérimentales. Dans tous les cas le coefficient de corrélation est supérieur à 0,95 et l'indice de dispersion défini comme l'écart type des écarts à la droite de régression est faible. Le minimum de chaque parabole (désigné par X min en abscisse) obtenu pour $y' = 2ax + b = 0$ (2) correspond au maximum de stabilité de l'émulsion et par suite au HLB de l'émulsifiant dans les conditions expérimentales retenues. Cette détermination présente l'avantage de quantifier avec précision le HLB de la protéine.

Nous avons obtenu par suite pour chacun de ces paramètres une série de paraboles qui diffèrent entre elles par ce qu'il est convenu d'appeler la "largeur de zone" de l'émulsifiant. Cette donnée reste mal précisée : elle correspond au domaine de HLB de l'émulsifiant et il est couramment admis de dire que la "largeur de zone" de l'émulsifiant placé dans les conditions A est plus grande comparativement à celle du même émulsifiant placé dans les conditions B (cf. fig. 3).

Pour quantifier cette "largeur de zone" nous avons été amenés à calculer le rayon de courbure de chaque parabole en son minimum suivant l'expression classique du rayon de courbure en coordonnées cartésiennes :

$$e = \frac{(1 + y''^2)^{3/2}}{y''} \quad (3)$$

De l'examen des courbes de la figure 2, il ressort une augmentation de stabilité des émulsions pour des valeurs de pH croissantes de la viande. Sur ce point il convient de noter que nous avons traduit en "stabilité" l'inverse du nombre de ml de phase relarguée lors du traitement thermique. C'est ainsi que le minimum des paraboles tracées pour chaque valeur de pH de la viande tend vers des valeurs nulles en ordonnée.

Mais une augmentation de pH se traduit également par une migration de ces minima vers des valeurs élevées en abscisse comme illustré figures 2 et 4, ce qui dénote une modification de l'équilibre hydrophile-lipophile des

protéines ; c'est ainsi qu'une augmentation de pH dans le domaine 4,5 - 6,5 unités pH s'accompagne d'une augmentation simultanée de HLB de 11,2 à 13 unités HLB ; pour des valeurs plus élevées du pH > 6,5 le HLB des protéines viande diminue. Cette évolution va dans le sens des résultats de VAN EERD (1971-1972) ; selon cet auteur, le HLB des protéines viande au stade de la pré-rigor s'établirait à 14,6 tandis qu'au stade de la post-rigor s'élèverait à 13. Nos résultats ne diffèrent de ceux de VAN EERD qu'au niveau des valeurs de l'équilibre hydrophile-lipophile des protéines de la viande ; ce fait peut être imputable aux conditions expérimentales retenues.

Enfin la courbe de la figure 4 révèle une augmentation constante du rayon de courbure des paraboles, donc du domaine de H.L.B. des protéines pour des valeurs croissantes du pH

Le pouvoir stabilisant conféré par les différentes fractions protéiques de la viande

Dans le but de compléter certains points laissés dans l'ombre par les travaux de VAN EERD (1971-1972), nous avons entrepris l'étude des influences : du pH, de l'addition de chlorure de sodium sur les pouvoirs stabilisants des quatre principales fractions protéiques de la viande concernées dans la technologie des pâtes fines :

Actine
Myosine
Actomyosine
Protéines sarcoplasmiques

Les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous sommes placés reproduisent au niveau du pH d'une part la qualité des viandes rencontrées dans la pratique et d'autre part l'évolution des caractéristiques physico-chimiques des la viande en cours de maturation ; au niveau de la force ionique, les conditions reproduisent celles de la pratique industrielle.

- Influence du pH

Cette étude a été effectuée à une concentration en protéines de 1 mg/ml et aux concentrations en sel suivantes

- 0,5 M en NaCl dans le cas de la solution de myosine,
- 0,1 M en NaCl dans le cas de la solution d'actine,
- 0,6 M en NaCl dans le cas de la solution d'actomyosine,
- 0,04 M en tampon phosphate (pH 7,4) dans le cas de la solution des protéines sarcoplasmiques.

Ces concentrations en sel correspondent aux concentrations finales des solutions d'extraction.

- Influence du pH sur le pouvoir stabilisant des protéines myofibrillaires (actine, myosine et actomyosine)

Nous pouvons constater, à la vue de la courbe reproduite, (cf. fig. 5), une augmentation du pouvoir stabilisant des protéines salosolubles dans le domaine de pH 5 - 6. Ce pouvoir reste constant pour des pH plus élevés dans le cas des émulsions d'actine et d'actomyosine, tandis qu'il continue à augmenter légèrement dans le cas des émulsions réalisées avec de la myosine. A pH 6 les quantités de phase relarguées sont d'environ deux fois supérieures pour les émulsions élaborées avec de l'actine et de l'actomyosine comparativement à celles élaborées avec de la myosine.

Le pouvoir stabilisant de ces protéines, en fonction du pH, tel qu'il vient d'être décrit, suit grossièrement une évolution comparable à celle de leur solubilité (TRAUTMAN, 1966). C'est ainsi que la courbe de solubilisation révèle un maximum de solubilité (100 %) de ces protéines, atteint à pH 6. Par ailleurs, l'évolution du pouvoir stabilisant en fonction du pH reproduit également celle de la capacité émulsifiante rapportée par SULZBACHER (1973).

- Effet du pH sur le pouvoir stabilisant des protéines sarcoplasmiques

La stabilité des émulsions élaborées avec cette fraction protéique reste constante dans le domaine de pH exploré (5 - 9) (cf. fig. 5). Il convient de constater que pour des pH > à 6 les émulsions obtenues sont peu stables comparées à celles dans l'élaboration desquelles entrent les protéines salosolubles. C'est ainsi qu'à pH 6, valeur de pH qui correspond en général à celui de la viande lors de la transformation, les quantités de phase relarguées (eau et gras) par les émulsions réalisées avec des protéines sarcoplasmiques sont deux fois et demie plus importantes que celles relarguées par les émulsions élaborées avec de la myosine. Le rôle émulsifiant des protéines sarcoplasmiques controversées par HANSEN (1960) se trouve confirmé à la vue de nos résultats.

Les évolutions comparables entre pouvoir stabilisant et capacité émulsifiante constatées dans le cas des protéines salosolubles ne se vérifient pas à la vue de nos résultats et de ceux de SWIFT et SULZBACHER (1963) au niveau des protéines sarcoplasmiques

Les pouvoirs stabilisants conférés par les quatre fractions protéiques étudiées peuvent ainsi se classer par ordre décroissant : pouvoir stabilisant de la myosine supérieur à celui de l'actomyosine supérieur à celui de l'actine supérieur à celui des protéines sarcoplasmiques, quelle que soit la valeur du pH > 6.

VAN EERD (1972) rapporte également dans son étude de l'effet de la rigor sur les pouvoirs stabilisants des protéines de viande de mouton que la myosine confère une stabilité supérieure à celle de l'actomyosine. L'intérêt de l'utilisation des viandes en état de pré-rigor dans la technologie des produits hachés fins, rapporté par les auteurs allemands, trouve ainsi un complément d'explication.

Influence de la concentration en chlorure de sodium

L'étude de ce facteur a été menée dans les conditions expérimentales suivantes :

- concentration en protéines 1 mg/ml
- aux pH des protéines dans leur solution d'extraction :

actine : 5,85
myosine : 6,05
actomyosine : 5,97
protéines sarcoplasmiques : 6,93

Si l'on considère le pouvoir stabilisant conféré par les différentes fractions protéiques étudiées on constate figure 6, exception faite pour l'actine, que ce pouvoir augmente dans le domaine de concentration en sel 0 - 4 % environ et diminue pour des teneurs plus élevées en chlorure de sodium. Nos résultats vont dans le sens de ceux de WIRTH (1974). Selon cet auteur, le pouvoir de gonflement et la solubilité des protéines myofibrillaires augmentent jusqu'à une valeur limite comprise entre 4 et 5 % pour diminuer par la suite.

La diminution de pouvoir stabilisant de l'actine en fonction de la concentration en sel peut recevoir son explication par une modification de structure de la F-actine, BRISKEY et FUKAZAWA (1971).

Comparativement au classement, fourni antérieurement, le pouvoir stabilisant conféré par les quatre fractions protéiques étudiées en fonction du facteur pH, il convient de signaler que l'effet de l'addition de chlorure de sodium, se traduit par une modification légère de ce classement. Les protéines sarcoplasmiques se placent quant à leur pouvoir stabilisant avant l'actine, dans le domaine de concentration en sel étudié.

CONCLUSION

Sur le plan méthodologique la mise en équation des courbes obtenues à partir des points expérimentaux nous a permis de définir avec précision le H.L.B. des protéines de la viande, ainsi que le domaine ou largeur de zone de ce paramètre en fonction du pH.

Sur le plan des résultats notre étude des différentes fractions protéiques de la viande a montré tout d'abord la supériorité de la myosine quant à son pouvoir stabilisant, sur toutes les autres fractions protéiques de la viande dans les domaines de pH élevés. En cela notre étude a contribué à élucider une donnée de la pratique, le fait que les viandes en pré-rigor sont les plus appropriées dans ce secteur de la technologie.

Un second point qui découle de l'étude des différentes fractions protéiques de la viande, est le rôle négligeable joué par les protéines sarcoplasmiques en tant qu'agent émulsifiant. Ce rôle controversé par certains auteurs américains, en raison de la forme globulaire de ces protéines peut recevoir son explication par le fait que ces protéines se disposent suivant une couronne concentrique au globule de la phase dispersée. Cette couronne constituée par des petites sphères d'agents émulsifiants tangeantes entre elles contribue ainsi à abaisser la tension interfaciale.

Concernant toujours le pouvoir stabilisant de toutes ces fractions protéiques, nous avons montré qu'il augmentait avec le pH. Cet acquis souligne l'intérêt d'utilisation des viandes à haut pH dans ce secteur de la transformation.

Enfin notre étude a confirmé le résultat de WIRTH et d'HAMM concernant l'effet bénéfique joué par la chlorure de sodium dans le domaine de concentration 0 - 4 % sur le pouvoir stabilisant de toutes ces fractions protéiques, exception faite toutefois de l'actine.

BIBLIOGRAPHIE

- BRISKEY E.J., FUKAZAWA T., 1971 Myofibrillar proteins of skeletal muscle. *Adv. Food Research*, 19, 279.
- DENOYER C., 1978 Influence des caractéristiques de la phase lipidique sur la stabilité des émulsions : application à l'étude des matières premières entrant dans les produits charcutiers cuits. Thèse de Doctorat d'Université, soutenue le 18 mars 1978 à l'U.E.R. CLERMONT II.
- GIRARD J.P., 1981 Contribution à l'étude de la technologie des pâtes fines. *Sciences des Aliments*, 1(3), 315-327.
- GIRARD J.P., SALE P., SIMATOS Denise, 1981 Contribution à l'étude de la structure des pâtes fines. *Sciences des Aliments*, 1(3), 329-350.
- HAMM R., 1960 Biochemistry and meat hydration. *Adv. Food Research*, 10, 356.
- HAMM R., 1973 Die Bedeutung des Wasserbindungsvermögens des Fleisches bei der Bruhwurstherstellung. *Die Fleischwirtschaft*, 1, 73.
- HAMM R., VAN HOOF J., 1974 Einfluss von Natriumchlorid und Abbau und Kolloidchemisch Wirkung von zugesetztem Adenosintriphosphat in zerkleinerten Rindermuskel post rigor. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 156, 87.
- HANSEN L.J., 1960 Emulsion formation in finely comminuted sausage. *Food Technology*, 14, 565.
- LEAMMLI V.K., 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227, 680.
- SULZBACHER W.L., 1973 Meat emulsions. *J. Sci. Food Agr.*, 24, 589.

- SWIFT C.E., SULZBACHER W.L., 1963 Comminuted meat emulsions : Factors affecting meat proteins as emulsion stabilizers. Food Technology, 17, 107.
- TRAUTMAN J.C., 1966 Effect of temperature and pH on the soluble proteins of ham. J. Food Sci., 31, 409.
- VAN EERD J.P., 1971 Meat emulsion stability - Influence of hydrophilic lipophilic balance, salt concentration and blending surfactants. J. Food Sci., 36, 1121.
- VAN EERD J.P., 1972 Emulsion stability and protein extractibility of ovine muscle as a function of time post mortem. J. Food Sci., 37, 473.
- WIRTH F., 1974 Brühwurst Herstellung Heute : Wasserbindung, Fettbindung, Struktur. Die Fleischwirtschaft, 7, 192.

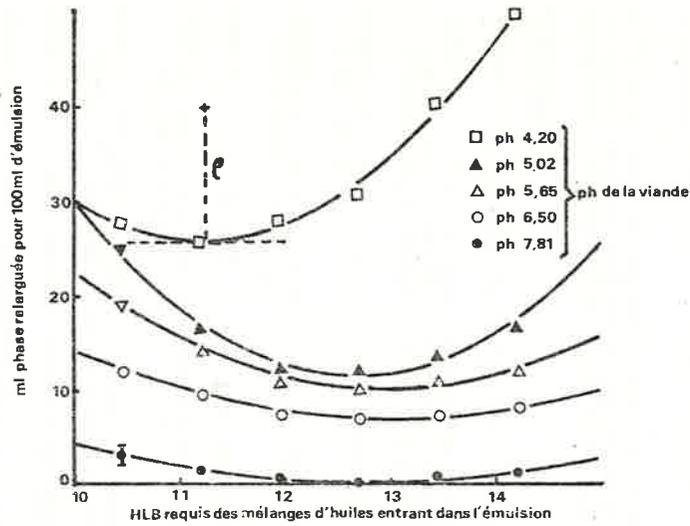


Fig.2 Quantité de phase relarguée (inverse de la stabilité) à partir d'émulsions élaborées avec de la viande et des mélanges d'huiles.

— Courbes théoriques calculées à partir des points expérimentaux.
 Ⓢ Rayon de courbure de la parabole représentative de la stabilité en son minimum ; il correspond au HLB de la viande dans les conditions expérimentales retenues.

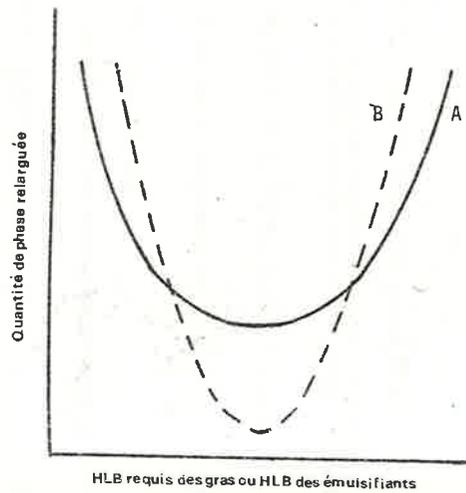


Fig.3 Influence des conditions expérimentales sur la forme des courbes représentatives stabilité conférée par un émulsifiant ou un gras entrant dans l'émulsion

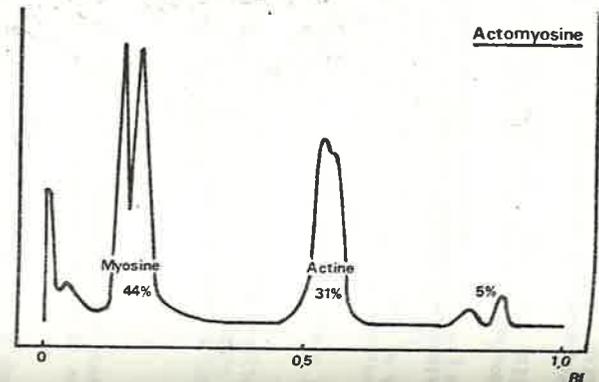
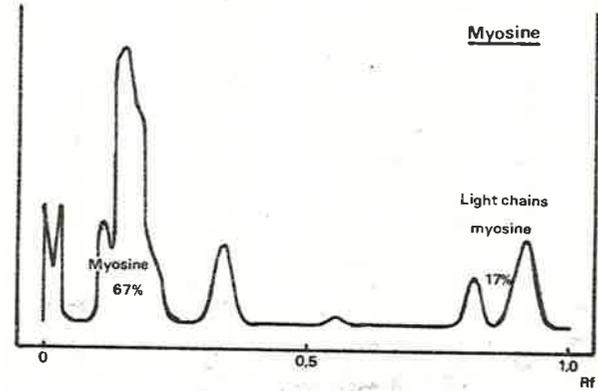
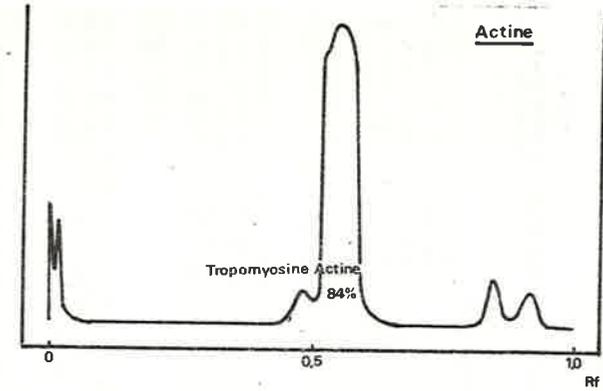


Fig.1 Electrophorogrammes des différentes fractions des protéines myofibrillaires.

Fig. 4 Evolution: (1) du HLB de la viande, (2) du rayon de courbure des paraboles, en fonction du pH de la viande.

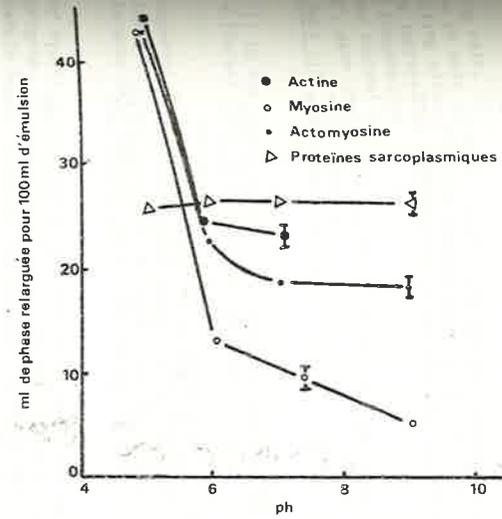
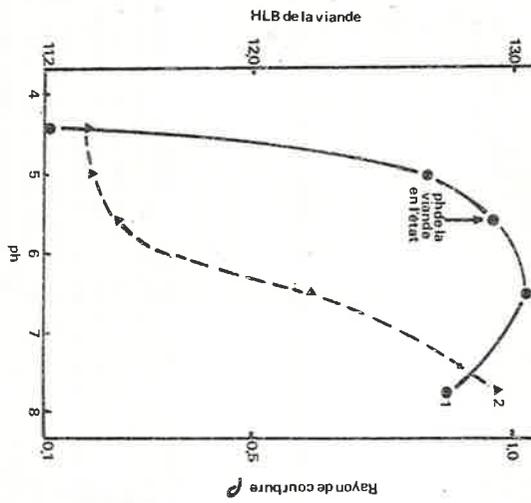


Fig. 5 Stabilité des émulsions élaborées avec une huile de HLB:13, en fonction du pH de la solution protéique.

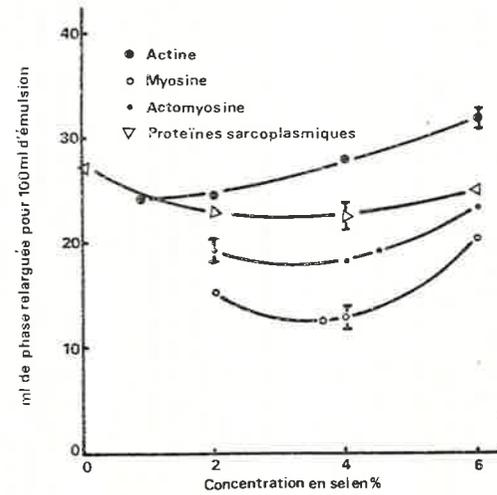


Fig. 6 Stabilité des émulsions élaborées avec une huile de HLB:13, en fonction de la concentration en sel de la solution protéique.