

Evolution of sarcoplasmic protein solubility and of certain enzymatic activities in pork muscle as a function of post mortem conditions and genetic type (halothane sensitivity)

A. TALMANT, G. MONIN

Station de Recherches sur la Viande - INRA THEIX, 63110 BEAUMONT FRANCE

Protein solubility and certain enzymatic activities were determined on Longissimus dorsi (LD) muscle samples from 7 Pietrain pigs of which 4 were sensitive to halothane and 3 were not.

10 minutes after slaughter, 200g LD muscle were sampled and divided into 2 parts : the first immediately underwent analysis, the second was put at 42°C for 3 hours. A second sampling was taken the day after slaughter. Samples of each of the 3 specimens were homogeneized in 10 parts distilled water or a pH 7.4 phosphate buffer of variable molarity (0.01, 0.03 and 0.05M), pH was controlled and adjusted to 7.4 in each case. Samples were centrifuged (20 000G for 20 min.) after 2 hours at 20°C. Results involved protein solubility and the following enzymatic activities : creatine phosphokinase (CPK), phosphofructokinase (PFK), phosphoglycerate kinase (3-PGK), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH) in two concentrations of pyruvate (10 and 0.3mM) phosphorylase a and b (Ph a+b).

The results can be summarized as follows :

- Ionic strength clearly influences protein solubility and enzymatic activities, but variably, according to the enzyme considered ;
- Sample handling acts as much on the overall solubility as on enzymatic activities ; however all enzymes do not have the same sensitivity. Thus LDH and PK are hardly sensitive to different treatments ;
- Genetic type (halothane sensitivity) : whatever the treatment, genetic type and sample treatment interact both as far as protein solubility and certain enzymatic activities (CPK, PFK) are concerned.

Evolution de la solubilité et de quelques activités enzymatiques dans le muscle de porc en fonction des conditions post mortem et du type génétique (sensibilité à l'halothane)

A. TALMANT, G. MONIN

Station de Recherches sur la Viande, INRA THEIX, 63110 BEAUMONT - FRANCE

Introduction

Il est bien connu que le degré de dénaturation des protéines sarcoplasmiques de la viande de porc à l'issue de l'installation de la rigidité cadavérique dépend des conditions de pH et de température rencontrées lors de celle-ci. Cependant, il existe de grandes différences entre protéines individuelles en ce qui concerne la sensibilité à ces conditions de pH et de température (SCOPES, 1964). Une meilleure connaissance du degré de dénaturation de ces protéines pourrait aider à une amélioration des tests couramment utilisés pour apprécier l'état de dénaturation des protéines musculaires, tests assez peu sensibles car ils mesurent l'extractibilité d'un ensemble complexe de protéines sarcoplasmiques (méthode de la valeur de transmission, HART, 1962) ou sarcoplasmiques et myofibrillaires (BARTON, 1981). En outre, pour l'appréciation du type métabolique, il est souvent pratique d'utiliser des prélèvements réalisés après installation de la rigidité cadavérique : dans ce cas, il est nécessaire de savoir si les activités enzymatiques mesurées risquent d'avoir été altérées durant cette installation.

Matériel et méthodes

L'expérience a utilisé sept porcs de race Piétrain dont trois sensibles à l'halothane et quatre non sensibles.

Immédiatement après l'abattage 200 g de muscle Longissimus dorsi (LD) étaient prélevés et divisés en deux parts : l'une (échantillon 0) était aussitôt broyée dans un broyeur ménager et des parties aliquotes étaient homogénéisées dans 10 volumes d'eau distillée et dans une série de tampons phosphate pH 7,4 de concentration molaire 0,01 ; 0,03 ; 0,05 M. Après homogénéisation, le pH des homogénats était vérifié et au besoin ajusté à

7,4. Après 2 heures à 20°C, on centrifugeait (20 000 g ; 20 min.). L'autre part (échantillon T) était placée dans un sac plastique et immergée dans un bain-marie à 42°C pendant 3 heures puis traitée de la même façon. Un second prélèvement de muscle LD (échantillon 24) était effectué le lendemain de l'abattage sur la carcasse, et traité dans les mêmes conditions que le prélèvement 0.

On réalisait ensuite les déterminations suivantes :

- Sur les homogénats : protéines par la méthode du biuret
- Sur les surnageants : protéines par la méthode du biuret ; activités enzymatiques suivantes :
créatine phosphokinase (CPK), phosphofructokinase (PFK), 3-phosphoglycérate kinase (3-PGK), pyruvate kinase (PK), déshydrogenase lactique (LDH) à 2 concentrations de pyruvate, 10 mM (LDH-H) et 0,3 mM (LDH-B), phosphorylase (a+b) (Ph a+b).

la réflectance était mesurée à 630 nm, avant broyage, sur chaque échantillon, à l'aide d'un réflectomètre portatif "Retrolux".

Resultats

1 - Influence de la force ionique du tampon d'extraction

La force ionique du tampon d'extraction influence nettement la solubilité des protéines musculaires. Cet effet est beaucoup plus net pour l'échantillon prélevé immédiatement post mortem que pour ceux prélevés 24 heures post mortem ou soumis au traitement thermique.

La force ionique influence directement le degré d'extraction de certaines enzymes, c'est ainsi que les activités LDH-H et LDH-B, 3-PGK et PFK mesurées dans les fractions solubles augmentent avec la force ionique du tampon sur l'échantillon 0 et dans une moindre mesure sur l'échantillon 24. Par contre les activités des enzymes Ph a+b et CPK ne sont pas influencées d'une façon sensible par la force ionique du tampon d'extraction dans les échantillons 0 et 24. Dans les échantillons soumis au traitement thermique, l'extraction des activités PK, LDH, CPK n'est pas modifiée. Cependant les activités 3-PGK, PFK et Ph a+b qui sont sensibles à l'effet dénaturant du traitement thermique décroissent lorsque la force ionique augmente.

2 - Influence des conditions d'installation de la rigor mortis

a - Traitement thermique

Le traitement thermique que nous avons utilisé influence nettement la solubilité globale des protéines sarcoplasmiques et l'extractibilité de certaines activités enzymatiques. Le tableau 3 nous montre que la solubilité des protéines sarcoplasmiques des échantillons T est de 60 à 70 % de celle observée dans les échantillons 0. Les enzymes dont l'activité est la plus affectée sont dans un ordre décroissant, la phosphorylase (2 à 10 % de l'activité initiale), la PFK (10 à 20 %), la 3-PGK (10 à 25 %), la CPK (30 à 40 % de l'activité initiale) ; les enzymes LDH-H, LDH-B et PK ne sont que peu ou pas affectées par le traitement thermique.

b - Installation de la rigor mortis sur la carcasse

Elle influence à la fois la solubilité globale des protéines et les activités des enzymes mesurées sur les échantillons 24. Les enzymes affectées sont les mêmes que dans le cas des échantillons T, mais la diminution d'activité observée est beaucoup plus faible dans tous les cas.

3 - Influence du génotype

La comparaison des tableaux 1 et 2 nous montre que la solubilité globale des protéines sarcoplasmiques est systématiquement plus faible chez les animaux sensibles à l'halothane que chez les non-sensibles. Cette différence est accentuée par le traitement thermique de l'échantillon. Le tableau 3 illustre bien ce fait en indiquant une perte de solubilité lors du traitement thermique plus importante chez les animaux sensibles que chez les non sensibles. La comparaison des tableaux 1 et 2 montre des activités enzymatiques plus élevées chez les animaux non sensibles à l'halothane ; ceci est très net pour les enzymes PFK, 3-PGK et LDH-H, beaucoup moins net pour Ph a+b, CPK et LDH-B. A l'inverse, l'activité de la PK est nettement plus faible chez les animaux non sensibles. Le tableau 3 montre que la perte d'activité des enzymes sensibles au traitement thermique est systématiquement 2 à 3 fois plus importante chez les animaux sensibles, sauf pour la PFK, dont la perte d'activité est du même ordre de grandeur dans les deux types d'animaux.

Sur les échantillons 24, ce sont les activités des enzymes Ph a+b, PFK et CPK qui se révèlent être les plus influencées par le génotype.

Le tableau 4 nous indique l'intensité des relations entre la réflectance et les activités des enzymes mesurées sur l'ensemble des échantillons 0, T et 24. Nous voyons que 2 activités enzymatiques sont en relation avec la réflectance, ce sont la PFK ($r = - 0,89$; figure 4) et la 3-PGK ($r = - 0,86$).

Cela signifie que ces deux enzymes voient leur activité enzymatique affectée d'une façon proportionnelle à la réflectance, critère généralement accepté comme reflétant la dénaturation des protéines sarcoplasmiques (BARTON, 1981).

Discussion

Nos résultats relatifs à l'évolution de la solubilité globale des protéines sarcoplasmiques en fonction de la concentration molaire du tampon d'extraction sont en accord avec les connaissances relatives à l'effet de la force ionique des solutions salines sur la solubilité des protéines globulaires. Mais les diverses enzymes étudiées montrent une grande diversité de comportement. Dans l'échantillon 0, l'activité de certaines d'entre elles telles la Ph a+b et la CPK ne semble pas modulée par les variations de force ionique du tampon d'extraction alors que celle des autres enzymes l'est avec une intensité variable.

Ces différences de comportement individuel lors de l'extraction résultent très probablement de la liaison des enzymes sarcoplasmiques aux protéines de structure, décrite par SIGEL et PETTE (1969), AMBERSON et al. (1965), CLARKE et MASTERS (1975). Les enzymes liées à des éléments de structure seraient les plus sensibles à l'action de la force ionique du milieu d'extraction ; à l'inverse, les plus libres comme la CPK pourraient être classées comme "solubles" et leur degré d'extraction relativement indépendant de la concentration molaire du milieu d'extraction.

Nos observations relatives à l'effet du traitement thermique sur la relation force ionique-extractibilité des activités enzymatiques sont difficilement interprétables. Les résultats ne nous suggèrent pas d'hypothèse satisfaisante. Si l'on considère la liaison des enzymes aux protéines de structures, CLARKE et MASTERS (1975) ont montré que la PFK et la PK ont une affinité comparable pour la F-actine, or elles présentent un comportement radicalement opposé lors du traitement thermique : la PFK est pratiquement totalement dénaturée alors que

La PK présente une grande stabilité.

Il est admis que la conjonction pH bas (< 5,6)-température élevée (> 38°C) provoque la dénaturation partielle des protéines, ce qui abaisse leur solubilité et affecte leur activité enzymatique. BENDALL et WISMER-PEDERSEN (1962) puis FISCHER et al. (1978, 1979) pensent que les protéines sarcoplasmiques précipitent lors de leur dénaturation sur les protéines myofibrillaires. Si nos résultats sont en accord avec ceux de FISCHER et al. (1979), pour la Ph a+b et la 3-PGK, ils ne le sont pas pour la LDH qui se révèle très résistante au traitement thermique.

Les différences d'extractibilité des activités enzymatiques, observées entre animaux sensibles et non sensibles à l'halothane sur tous les échantillons, s'expliquent probablement essentiellement par la vitesse de chute du pH post mortem beaucoup plus élevée chez les animaux sensibles, phénomène bien connu depuis les travaux d'EIKELENBOOM et MINKEMA (1974), et qui entraîne la dénaturation des protéines sarcoplasmiques. Cette dénaturation est probablement déjà très avancée chez les porcs sensibles lorsque les échantillons sont homogénéisés dans le tampon d'extraction (échantillon 0) ou soumis au traitement thermique, environ 30 minutes après la mort (échantillon T) et la différence entre échantillons provenant des deux types de porcs n'est pas nivelée par le traitement thermique.

Les résultats présentés à la figure 1 et au tableau 4 nous suggèrent la possibilité d'utiliser l'enzyme PFK comme indice de taux de dénaturation des protéines et index de qualité de viande mesurée en laboratoire. Ces résultats demandent cependant d'être étayés en considérant des animaux de caractéristiques variées.

La grande stabilité de l'enzyme PK dans les différentes conditions post mortem permet de retenir la mesure de son activité comme critère d'intensité du métabolisme glycolytique lors des études du type métabolique musculaire, même lorsque les prélèvements sont réalisés plusieurs heures après la mort, ce qui en fait un critère très pratique d'emploi.

Références bibliographiques

AMBERSON W.R., ROISEN F.J., BAUER A.C., 1965. The attachment of glycolytic enzyme to muscle ultrastructure. J. Cell. Comp. Physiol., 66, 71-90.

- BARTON-GADE P., 1981. The measurement of meat quality in pigs post mortem. Porcine stress and meat quality. Agricultural Food Research Society, As (Norway).
- BENDALL J.R., WISMER-PEDERSEN, 1962. Some properties of fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. J. Food Sci. 27, 144-154.
- CLARKE F.M., MASTERS C.J., 1975. On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 381, 37-46.
- EIKELENBOOM G., MINKEMA D., 1974. Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for the halothane induced porcine malignant hyperthermia syndrome. Tijdsch. Diergen., 99, 421-426.
- FISCHER C., HOFMANN K., HAMM R., 1978. Electrophoretic examination of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in normal and PSE pork. Fleischwirtschaft, 58(2), 303-306.
- FISCHER C., HAMM R., HONIKEL K.O., 1979. Changes in solubility and enzymic activity of muscle glycogen phosphorylase in PSE-muscle. Meat Science, 3(1), 11-19.
- HART P.C., 1962. The transmission value, a method for meat quality evaluation. Res. Inst. for Anim. Husbandry, "Schoonord", ZEIST. The Netherlands.
- MONIN G., GIRARD J.P., SELIER P., OLLIVIER L., 1982. Composition du muscle Longissimus dorsi du porc Pietrain en relation avec la sensibilité à l'halothane et la teneur en gras de la carcasse. Sci. Aliments, 2, 107-112.
- SCOPES R.K., 1964. The influence of post mortem conditions on the solubilities of muscle proteins. Biochem. J., 91, 201-207.
- SIGEL P., PETTE D., 1969. Intracellular localization of glycogenolytic and glycolytic enzymes in white and red rabbit skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem., 17(4), 225-237.

Traitement (1)	Molarité	S (2)	Ph a+b	PFK	3-PGK	CPK	LDH-H	LDH-B	PK
0	H ₂ O	31,4	383	3 503	2 930	148 100	6 300	4 700	3 300
	0,01	33,9	369	3 490	2 788	134 700	7 100	6 251	3 580
	0,03	37,3	365	3 870	3 200	117 900	8 390	6 881	3 900
	0,05	37,9	441	3 890	2 950	127 900	8 080	6 550	3 880
T	H ₂ O	21,0	11,4	703	288	20 410	5 705	5 140	3 115
	0,01	21,9	10,1	642	293	22 664	6 870	5 433	3 190
	0,03	22,2	8,1	492	273	14 700	6 800	5 063	3 330
	0,05	23,0	7,6	497	208	20 690	7 620	5 223	3 400
24	H ₂ O	28,8	264	2 019	2 531	81 340	7 620	6 150	3 720
	0,01	31,0	259	2 339	2 800	68 130	8 320	6 100	3 975
	0,03	31,8	268	1 925	2 606	52 500	7 530	5 864	3 730
	0,05	32,7	316	1 930	6 230	64 120	8 420	6 190	3 900

Tableau 1 : Solubilité des protéines sarcoplasmiques et activités enzymatiques dans les échantillons provenant des porcs sensibles à l'halothane.

(1) 0 : échantillon prélevé juste après l'abattage ; T : échantillon soumis au traitement thermique ;
24 : échantillon prélevé 24 heures après l'abattage

(2) Solubilité mesurée par le rapport de l'azote soluble sur l'azote de l'homogénat.

Traitement	Molarité	S	Ph a+b	PFK	3-PGK	CPK	LDH-H	LDH-B	PK
0	H ₂ O	37,7	459	4 975	3 800	118 800	8 154	4 872	2 574
	0,01	40,5	397	4 286	3 339	136 000	7 667	4 862	2 126
	0,03	41,0	414	4 651	3 797	127 400	9 130	6 076	2 540
	0,05	42,6	434	4 768	4 241	136 400	10 020	6 920	3 046
T	H ₂ O	26,9	37,9	969	1 011	48 700	7 310	5 770	2 317
	0,01	26,9	35,3	816	787	36 600	6 923	5 280	2 230
	0,03	27,7	32,7	546	750	48 800	8 067	6 120	2 364
	0,05	27,5	28,9	573	673	44 400	8 247	6 060	2 480
24	H ₂ O	35,9	362	3 252	3 447	129 400	7 795	5 960	2 330
	0,01	37,4	387	3 494	3 176	116 400	7 700	6 160	2 461
	0,03	38,9	373	3 577	3 205	109 500	7 990	6 320	2 380
	0,05	39,9	398	3 641	3 418	105 600	8 529	6 470	2 840

Tableau 2 : Solubilité des protéines sarcoplasmiques et activités enzymatiques dans les échantillons provenant des porcs non sensibles à l'halothane

Trai- tement	Force ionique	S		Ph a+b		PFK		3-PGK		CPK		LDH-H		LDH-B		PK	
		NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S
T	H ₂ O	71	67	8	3	19	20	27	10	41	14	90	90	118	109	90	94
	0,01	66	65	9	3	19	18	24	11	27	17	91	97	109	87	105	89
	0,03	68	59	8	2	12	13	20	9	38	12	89	81	101	74	99	86
	0,05	65	61	7	2	12	13	16	7	33	16	82	94	88	80	81	88
24	H ₂ O	95	92	79	69	65	57	91	86	109	55	95	121	122	131	90	113
	0,01	92	91	97	70	81	67	95	100	86	51	100	117	127	98	116	111
	0,03	95	85	90	73	77	49	84	81	86	45	88	90	104	85	94	96
	0,05	95	86	92	72	76	49	81	89	77	50	85	104	93	95	93	101

Tableau 3 : Influence du génotype sur l'évolution des activités enzymatiques lors de l'installation de la rigor mortis.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la solubilité ou des activités mesurées sur l'échantillon 0

NS : porcs non sensibles à l'halothane

S : porcs sensibles

Enzymes	S	CPK	PFK	3-PGK	PK	LDH-H	LDH-B	Ph a+b
R	- 0,87	- 0,78	- 0,89	- 0,86	- 0,07	- 0,54	- 0,37	- 0,73

Tableau 4 : Relation entre la réflectance et la solubilité des protéines ou les activités enzymatiques mesurées sur l'ensemble des échantillons 0, T et 24.

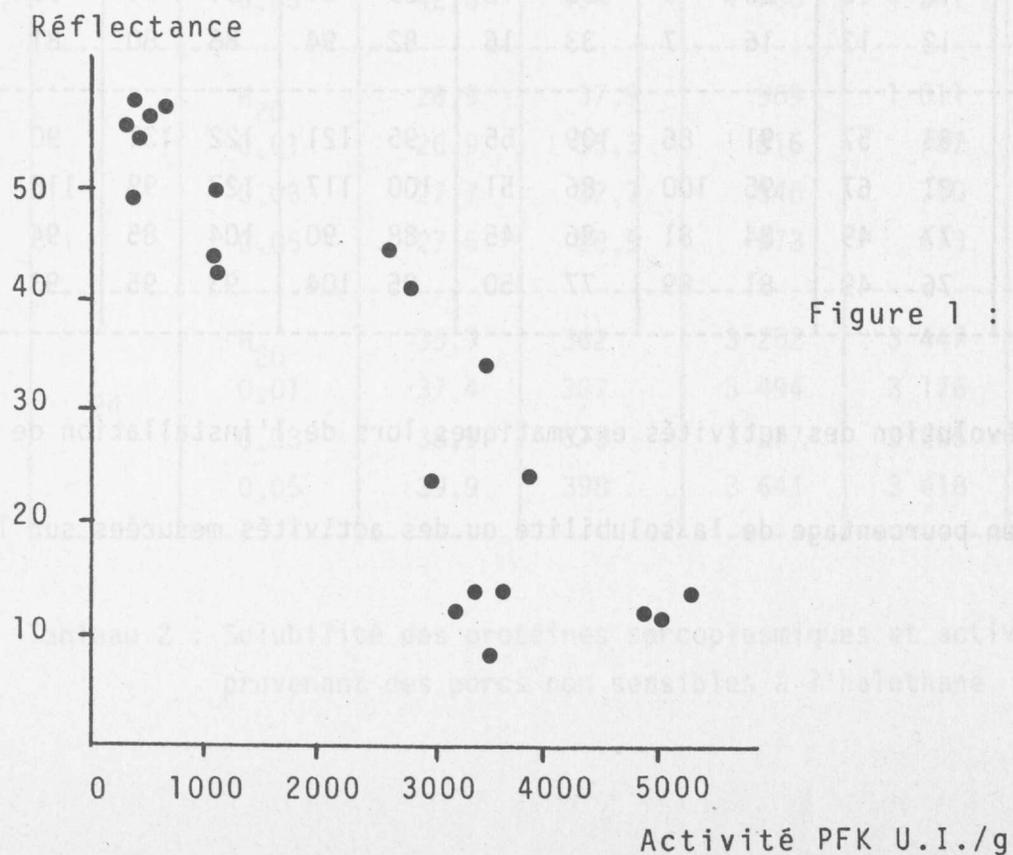


Figure 1 : Relation entre la réflectance mesurée à 630 m μ et l'activité enzymatique de la PFK mesurée sur les extraits tampon phosphate pH 7,4 0,03 M.