

Dégradation du collagène musculaire de bovin par une collagénase produite par *Achromobacter iophagus*

BONNET, Madeleine et KOPP, J.

Station de Recherches sur la Viande - I.N.R.A. - THEIX - 63122 CEYRAT, France

Introduction

Le tissu conjonctif musculaire, et en particulier son constituant essentiel le collagène, est un facteur déterminant de la dureté de la viande. Une des voies possibles d'amélioration de la tendreté des muscles riches en collagène est la dégradation spécifique de cette protéine par une collagénase.

Dans le cadre d'un contrat DGRST (n° 76 700 79), en collaboration avec l'Institut Pasteur, nous avons étudié l'action d'une collagénase bactérienne, produite par *Achromobacter iophagus*, sur le tissu conjonctif musculaire. Pour pouvoir tester l'efficacité éventuelle de cette collagénase pour l'attendrissement de la viande, il convenait d'abord de caractériser l'incidence sur l'activité enzymatique :

- des facteurs technologiques : conditions optimum de température et de pH d'incubation
- des facteurs biologiques : quantité et qualité du substrat collagène

Matériel et méthodes

- La collagénase

L'enzyme utilisée dans cette étude a été produite et caractérisée par l'Institut Pasteur (Keil et al., 1975 ; Keil-Dlouha, 1976 ; Keil et Kopp, 1979) à partir de cultures d'*Achromobacter iophagus*, micro-organisme aérobie non pathogène, non sporulant et ne produisant pas de toxines.

Cette collagénase a un PM de 70 000 D et pure, a une activité spécifique d'environ 2,2 μ Kat/mg. Nos essais ont été réalisés avec l'enzyme brute, ayant une activité spécifique d'environ 10 000 U. WH soit env. 0,1 à 0,4 μ Kat/mg. Cette enzyme est testée par la méthode de Wüch-Heidrich (1963) sur substrat synthétique, est stable pendant plusieurs mois lorsque l'enzyme est lyophilisée et stockée à 0°C.

- Les substrats

1 - Collagène intra-musculaire

Nous avons extrait ce collagène de muscles Pectoralis profundus et Sternomandibularis de bovins d'âges variables : taurillons de 15-16 mois, génisses de 2-3 ans et vaches de 8-10 ans. Ces muscles ont été choisis pour leur forte teneur en collagène (1 à 2 % du poids frais), qui les classe dans la catégorie des muscles durs.

Les muscles ont été broyés au broyeur à lames (robot-coupe) pendant deux fois 15 secondes. Les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires sont extraites par trois lavages successifs à l'eau (+ 10°C) avec broyage au Waring-blendor, le rapport muscle (P)/eau (V) étant de 1/100. Le résidu conjonctif obtenu est délipidé à l'acétone (RP) et séché à l'air. La teneur en collagène de ce tissu, déterminée par dosage de l'hydroxyproline (Bonnet, Kopp, 1984) est de 65 à 70%.

2 - Fibres d'épimysium

Sur les mêmes animaux nous avons également prélevé des fibres d'épimysium de *congissimus dorsi*. Ces fibres lavées à l'eau, délipidées à l'acétone et séchées, nous ont permis de caractériser les propriétés physiques du collagène en particulier sa contraction hydrothermique. Ce tissu conjonctif a une teneur en collagène de 88 à 92 %.

- Conditions d'incubation

Toutes les mesures ont été réalisées parallèlement à un témoin identique incubé dans les mêmes conditions, sans enzyme. Nous avons testé l'activité de cette collagénase à différents pH de 5,5 à 7,4 et différentes températures de + 10°C à + 50°C. L'influence de ces conditions d'incubation a été étudiée sur du collagène intramusculaire de Pectoralis profundus de taurillon de 16 mois (rapport E/S = 1/200), pendant 16 heures, en milieu Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,23 M, CaCl₂ 3,10⁻³ M.

Les mesures d'énergie d'activation de la réaction enzymatique à pH 7,4 ont été réalisées dans les mêmes conditions.

L'influence de la quantité du substrat a été testée sur du collagène intramusculaire de Pectoralis profundus de vache de 10 ans, après incubation à 37°C pendant 3 heures, avec 0,1 mg d'enzyme pour des quantités de substrat variant de 20 à 80 mg.

Les cinétiques d'activité ont été réalisées sur le collagène intramusculaire et l'épimysium de muscles d'âges différents à pH 7,4, 37°C avec un rapport E/S de 1/100 et 1/250 pour des temps d'incubation variant de 30 mn à 16 heures.

Enfin compte-tenu de l'effet favorable de la concentration saline sur l'activité de cette collagénase, nous avons été amenés à faire varier la concentration en NaCl du milieu d'incubation de 0 à 2 M. Ceci nous a permis d'étudier l'influence de cette teneur en NaCl sur la solubilisation du substrat, l'activité spécifique de l'enzyme et la vitesse de la réaction enzymatique.

- Mesures de l'activité enzymatique sur les tissus conjonctifs musculaires

1 - Mesures spectrophotométriques

Pour les études de cinétique, nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique de Kopp (1971). Les mesures de densité optique à 230 et 270 nm sur les filtrats d'incubation, permettent de déterminer la quantité de substrat dégradé par l'enzyme en un temps donné, et l'activité enzymatique spécifique.

2 - Mesure de l'hydroxyproline libérée

La quantité de collagène solubilisé sous l'action de l'enzyme a été mesurée par la teneur en hydroxyproline du filtrat d'incubation. Après hydrolyse acide cet acide aminé spécifique du collagène est dosé par la méthode modifiée de Bergman et Loxley (1963). L'activité de l'enzyme est exprimée en μ g d'hydroxyproline libérée par unité de temps ou en hydroxyproline libérée % hydroxyproline totale.

- Mesures des modifications physico-chimiques du tissu conjonctif

Outre la solubilisation d'une fraction du collagène dans le filtrat d'incubation, la collagénase peut entraîner une modification des propriétés physico-chimiques du collagène insoluble. Pour étudier ces éventuelles modifications nous avons utilisé deux méthodes :

1 - Solubilisation hydrothermique

Après l'incubation enzymatique, le résidu de collagène insoluble a été chauffé à 70°C pendant 2 h., pH 7,4.

Le dosage de l'hydroxyproline sur le filtrat et le résidu de cette cuisson permet de caractériser en % de collagène solubilisé la stabilité thermique du tissu après traitement enzymatique par le pourcentage de collagène solubilisé.

2 - Contraction thermique isométrique des fibres d'épimysium

Après l'incubation enzymatique, les fibres d'épimysium dont les sections ont été déterminées par le calcul (Kopp et Bonnet, 1982) sont disposées dans le contractomètre (Kopp et al., 1977). Le chauffage est réalisé en milieu pH 7,4, à la vitesse de 3°C/mn entre + 20 et + 95°C. Les diagrammes de contraction sont enregistrés en fonction de la température du four et les tensions sont exprimées en Dal/cm² de section initiale de collagène sec. Le comportement thermique des échantillons est caractérisé par trois paramètres : la température de début de contraction (θ C), la température du maximum de contraction (θ M) et la tension maximum à θ M (TM).

Résultats

- Influence des conditions d'incubation

Influence du pH et de la température (figures 1a et 1b)

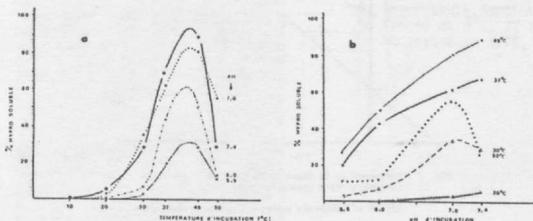


Fig. 1 : Influence de la température (a) et du pH (b) sur l'activité enzymatique (% d'hydroxyproline libérée après 16 h. d'incubation)

Temperature (a) and pH (b) dependence of enzymatic activity (% Hydro released after a 16 h. incubation)

La dégradation du collagène musculaire est largement influencée par les conditions de pH et de température. L'activité est maximum pour des pH > 6,0 (fig. 1a). A 37°C un abaissement du pH de 7,4 à 5,5 entraîne une réduction de 70 % de l'activité : respectivement 69,22 % et 19,12 % d'hydroxyproline sont respectivement solubilisés lors d'une incubation pendant 16 h de collagène intramusculaire.

L'inactivation par la température (fig. 1b) est rapide au-delà de 45-50°C d'autant plus que le pH est plus acide. Aucune activité n'est décelable après 15 mn à 55°C. L'énergie d'activation est constante entre + 20 et 37°C et égale à 63 000 Cal/Mole.

Influence du temps d'incubation (fig. 2)

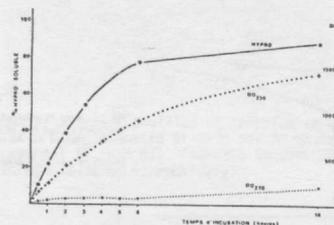


Fig. 2 : Influence du temps d'incubation (37°C, pH 7,4) sur l'hydrolyse enzymatique (— % Hydroxyproline libérée, D.O. du filtrat d'incubation)

Effect of incubation time (hours) on collagen breakdown (— % Hydro released, D.O. of filtrate)

Le temps d'action de l'enzyme influe sur le niveau de dégradation du collagène. Des temps longs sont nécessaires quel que soit le tissu considéré. Pour un tissu conjonctif intra-musculaire de Pectoralis profundus d'animal de 16 mois, le niveau de 80 % de la solubilisation maximum est obtenu qu'après 5 heures d'incubation.

Influence de la concentration en NaCl (fig. 3a - 3b)

Dans les conditions optima de pH et de température (7,4 ; 37°C) nous avons constaté que la concentration en NaCl du milieu d'incubation ne doit pas être inférieure à 0,2 M.

Dans ces conditions la constante d'affinité Km et la vitesse maximum Vm sont respectivement multipliées par 15 et 14 par rapport aux valeurs obtenues en l'absence de sel.

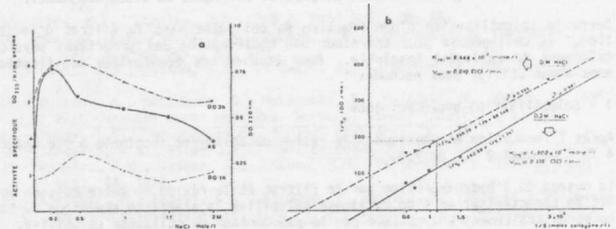


Fig. 3 : Influence de la concentration saline (NaCl) sur :
 a - La solubilisation du substrat (D.O.) et l'activité spécifique de l'enzyme (AS)
 b - La vitesse de l'hydrolyse enzymatique
 Effect of salt concentration (NaCl) on :
 a - Substrate solubilization (D.O.) and enzyme specific activity (AS)
 b - Solubilization rate

- Influence du substrat

Influence de la quantité de substrat (fig. 4)

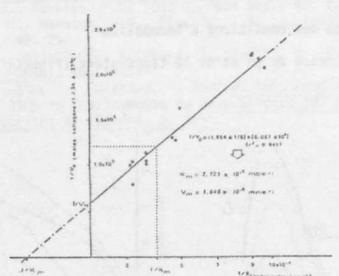


Fig. 4 : Influence de la quantité de substrat : droite de Lineweaver-Burk (hydro libérée)
 Effect of substrate amount : Lineweaver-Burk plot

Nous avons incubé des quantités variables (20 à 80 mg) de collagène intramusculaire de Pectoralis profundus de vache de 10 ans (à 37°C, 1 h, pH 7,4) avec 0,1 mg d'enzyme. Dans ces conditions nous avons obtenu un Km de $2,72 \times 10^{-5}$ mole/l et une Vm de $1,65 \times 10^{-5}$ mole/l. L'affinité de la collagénase pour ce substrat est donc grande.

Influence de la qualité du substrat
 Degré de réticulation

Avec l'âge, le collagène musculaire se réticule. Cette polymérisation se traduit par une modification de ses propriétés physico-chimiques : une diminution de sa solubilité hydrothermique et une augmentation des températures et tensions maxima de contraction isométrique. La collagénase voit son activité sur le collagène intramusculaire freinée par les modifications qualitatives du substrat avec l'âge (fig. 5)

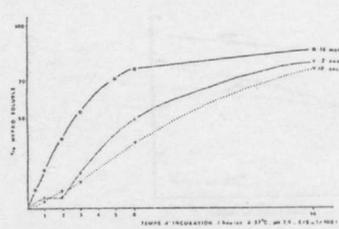


Fig. 5 : Influence de la réticulation du collagène intramusculaire (âge des animaux) sur la vitesse de solubilisation par la collagénase
 Effect of collagen crosslinking state (animal age) on its solubilization rate

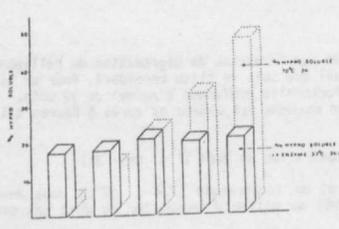


Fig. 6 : Solubilisation enzymatique de collagène épimysial de stabilité thermique variable (animaux de 16 mois à 10 ans)
 Enzymatic solubilization of epimysial collagen varying in thermal stability (animals aged 16 months to 10 years)

Le pourcentage total de collagène que l'enzyme est capable de dégrader ne diminue que faiblement entre 16 mois et 10 ans, mais le temps nécessaire pour atteindre ce résultat augmente rapidement avec l'âge de l'animal.

Alors que sur le collagène intramusculaire l'action de l'enzyme est inversement proportionnelle à l'âge (fig. 5), sur l'épimysium, curieusement, quel que soit l'âge de l'animal, l'enzyme ne dégrade qu'une fraction constante de l'ordre de 20 %, du collagène (fig. 6). Malgré cette faible solubilisation des épimysies par l'enzyme, les propriétés des fibres au chauffage, après incubation, sont significativement modifiées (fig. 7).

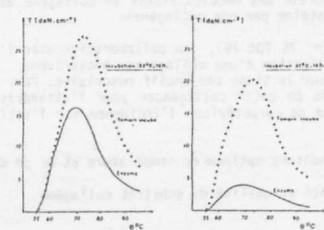


Fig. 7 : Influence de l'incubation enzymatique à 22°C et 37°C (pH 7,4) sur la contraction isométrique de fibres épimysiales (fourilles 16 mois)
 Effect of enzymatic treatment (22°C and 37°C at pH 7,4) on isometric tension during heating of epimysial fibers (16 months bull)

Il y a réduction importante des tensions isométriques au-delà de la température de dénaturation. Ces résultats nous conduisent à penser que, comme d'autres collagénases, cette enzyme présente des affinités variables en fonction du type génétique de collagène (Weiss, 1976).

Discussion - Conclusion

Après l'abattage des animaux, le muscle subit des modifications biochimiques progressives, il s'en suit un abaissement du pH en 24 heures de 7,0 - 7,2 à 5,5 - 5,8. A cette chute de pH est associée une diminution de la température de dénaturation, plus rapide que la température de conservation est plus basse. C'est pourquoi, compte tenu de l'importance du pH et de la température sur l'activité de l'enzyme, celle-ci sera rapidement réduite sur le collagène in situ lors de l'évolution post mortem normale.

De plus, le temps d'action de l'enzyme influe bien favorablement sur le processus de dégradation du collagène mais in situ, le temps effectif d'action peut être inférieur au temps optimum nécessaire en raison essentiellement de la chute rapide de pH et de température.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il semble bien que le premier facteur limitant à une utilisation pour l'attendrissage des muscles durs, soit la dénutrition simultanée du pH et de la température dans un intervalle de temps court par rapport à la vitesse propre de la réaction enzymatique elle-même avec ce type de substrat.

Ces conclusions ont été confirmées lors de l'étude de l'influence de l'incubation de cette collagénase sur la tendreté de muscles riches en collagène (Bonnet, Kopp, 1983). Il faut noter que cette étude sur muscles, n'a pu être

faite qu'après injections directes d'enzymes dans les muscles, l'enzyme injectée ante mortem étant inhibée par le sérum : cette inhibition a été confirmée in vitro sur du collagène intramusculaire extrait (Keil et Kopp, 1979).

Il s'avère donc que si le potentiel de dégradation du collagène musculaire est significativement son intérêt pour l'attendrissage de muscles durs riches en collagène.

Références

Bergman, R. et Loxley, L. 1963 *Analyt. Chem.*, **35**, 1961
 Bonnet, M., Kopp, J. 1983 *Sci. Alim.* (sous presse).
 Bonnet, M., Kopp, J. 1984 *Cah. Techn. INRA*, **5**, 19-30.
 Keil, B., Gilles, M.M., Lecroisey, A., Hurion, N., Tong, N.T. 1975 *Febs Letters*, **56**(2), 292.
 Keil, B., Kopp, J. 1979 *Compte Rendu Contrat DGRST 76 7 0079*.
 Keil-Dlouha, V. 1976 *Biochem. Biophys. Acta*, **429**, 239.
 Kopp, J. 1971 *Ann. Techn. Agric.*, **20**(2), 185-192.
 Kopp, J., Salé, P. et Bonnet, Y. 1977 *Can. Inst. Food Sci. Techn. I.*, **10**(1), 69-72.
 Kopp, J., Bonnet, M. 1982 *Sci. Alim.*, **2**(N Hors série II), 127-132.
 Weiss, J.R. 1976 *Int. Res. of Connective tissues*, **7**, 101-157.
 Wülich, E., Heidrich, H.G. 1963 *Z. für Physiol. Chemie*, **333**, 149-151.