

OPTIMISATION DU DOSAGE DE LA PHOSPHATASE ACIDE MUSCULAIRE DU POULET *POST-MORTEM*. ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE LORS DU STOCKAGE DE LA VIANDE À + 4 °C et - 20 °C

EL HADEF EL OKKI S¹, PHILIPPON Claude² et MOUTHON G¹

1: *Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort, France*

2: *INSERM U 139, Hôpital Henri Mondor, 94010 Creteil, France*

Reçu, le 20 janvier 1986/Accepté, le 7 juillet 1986

Abstract

AN OPTIMIZED ASSAY FOR MUSCULAR ACID PHOSPHATASE. APPLICATION TO THE STUDY OF ENZYME STABILITY DURING STORAGE CHICKEN MEAT AT + 4 °C AND - 20 °C. — A colorimetric quantitative determination of total acid phosphatase in chicken muscle is proposed. Optimal conditions for the use of this enzyme were studied. This method allowed to establish that the muscular acid phosphatase of chicken does not resist to a 30 minutes incubation at 65 °C but that its activity is unchanged when the meat is stored at + 4 °C for 10 days or at - 20 °C for 4 months.

L'utilisation du froid constitue un excellent moyen de conservation des denrées alimentaires périssables. Cependant, au cours du stockage à l'état congelé, les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles de la viande évoluent. Cette évolution se traduit surtout par une perte d'eau à la décongélation associée à une diminution de jutosité (Cheftel *et al* 1977, Davey et Graafhuis 1976), et des changements de texture liés à l'augmentation du nombre de liaisons thermo-résistantes du collagène, causant la diminution de la tendreté de la viande (Valin 1981, 1982). La mesure des qualités organoleptiques de la viande n'est pas aisée. Si l'analyse sensorielle reste préférée aux mesures instrumentales (mesures de pH, des propriétés rhéologiques de l'eau, etc...) (Touraille 1983), elle est néanmoins subjective, car basée sur la mémoire sensorielle d'un jury de dégustateurs.

La mesure de l'évolution des propriétés biochimiques des protéines, susceptible de se produire au cours de la conservation de la viande peut éventuellement constituer une base d'appréciation de la fraîcheur de la denrée. En ce qui concerne les enzymes, il suffit de tester leur activité.

Dans ce but, il nous a paru opportun de tester l'activité de la phosphatase acide musculaire ou phosphomonostérase II, E.C. 3-1-3-2, enzyme lysosomale assez bien répartie dans les tissus animaux (Courtois et Perles 1980).

Les techniques d'évaluation de l'activité

phosphatasique sont nombreuses, et en pratique trois protocoles opératoires sont adoptés de préférence dans les laboratoires français : la méthode de Bodansky et celle de King appliquées en médecine humaine (Courtois et Perles 1980, Louisot 1982) et enfin la technique d'Aschaffenburg et Mullen ou celle de Sanders et Sager (Lecoq 1966) qui servent actuellement d'épreuves de contrôle de la pasteurisation du lait. La première constitue un test rapide, alors que la dernière est utilisée en cas d'expertises contradictoires. Toutes ces techniques tiennent compte des paramètres spécifiques liés à la nature et à l'origine de l'enzyme. Avant de mesurer l'activité phosphatasique de la viande fraîche de poulet et après sa conservation dans les conditions ordinaires de réfrigération et de congélation, il a donc été nécessaire d'établir un protocole expérimental et une technique de dosage appropriés et d'étudier les principaux facteurs influençant la réaction enzymatique.

Matériel et Méthode

1. Préparation des échantillons

Pour l'optimisation du dosage, les échantillons sont prélevés dans la cuisse de poulet. Quant à la deuxième étape du travail, concernant la comparaison des activités phosphatasiques entre la viande fraîche et celle conservée par le froid, les prélèvements sont effectués dans trois régions anatomiques différentes : cuisse, pilon et bréchet.

Tableau 1. — Étude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur un échantillon de viande prélevé de la cuisine de poulet.

numéro de série	nombre de mesures	moyenne (écart-type) (UI)	moyenne \pm ts/Vn ^a (UI)
1	20	553,72 (12,86)	553,72 \pm 6,02
2	20	555,18 (12,98)	555,18 \pm 6,07
3	20	555,36 (13,41)	555,36 \pm 6,27

a : au seuil de sécurité de 95 % dans la table du t de Student.

La viande est parée et débarrassée des aponévroses et de la graisse, puis 10 grammes sont broyés à l'ultraturax dans 90 ml de NaCl 0,15M au sein d'un bain réfrigérant. Le temps de broyage fixé à 1 minute permet l'obtention d'un broyat au 1/10 très homogène. Après centrifugation à 3500 rpm (appareil Jouan E 61) pendant 10 minutes, la dilution au 1/10 du surnageant constitue la prise d'essai (dilution finale de l'extrait de viande au 1/100).

2. Dosage enzymatique

2.1 Principe

Les phosphatases catalysent l'hydrolyse du paranitro-phénylphosphate disodique (PNPP) en libérant le paranitro-phénol, composé qui vire au jaune en milieu alcalin (Lecoq, 1966).

2.2. Mesure de l'activité phosphatique

Dans un tube à hémolyse contenant 300 μ l d'une solution de PNPP (provenant de Sigma Chemical

Company) tamponnée et préchauffée à 37 °C pendant 5 minutes, la réaction enzymatique est déclenchée en ajoutant 60 μ l d'extrait de viande (NaCl 0,15M remplace l'extrait de viande pour la réalisation du témoin). La mesure est réalisée après arrêt de la réaction pour addition de 1500 μ l de NaOH 0,1N dans le milieu réactif. Cette opération a un double objectif : stopper la réaction enzymatique par un changement brusque de pH (qui passe de 5,5 à 12) et révéler la coloration jaune traduisant la formation de paranitro-phénol. L'intensité de la couleur mesurée à 405 nm (spectrophotomètre Beckmann modèle 35 à trajet optique horizontal) est proportionnelle à l'activité phosphatique.

3. Expression des résultats

L'activité phosphatique déduite de la cinétique de la réaction est ramenée au nombre de micromoles de paranitro-phénol formé par litre d'extrait de viande et par minute (μ mol/l/mn) ou Unités Internationales (UI).

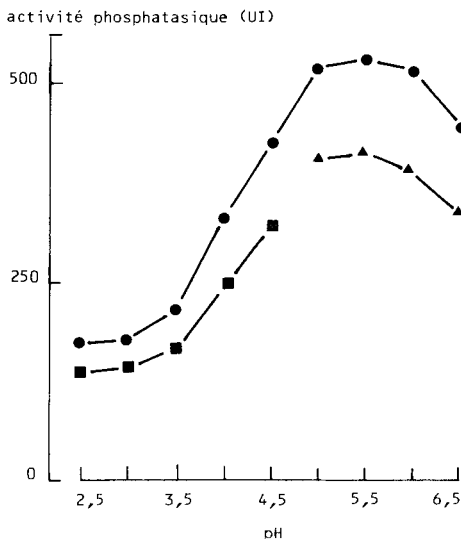


Fig. 1. — Effet de la nature du tampon et du pH sur l'activité phosphatique.

Tampons : acétate (●), citrate/HCl (■), citrate/-NaOH (▲)

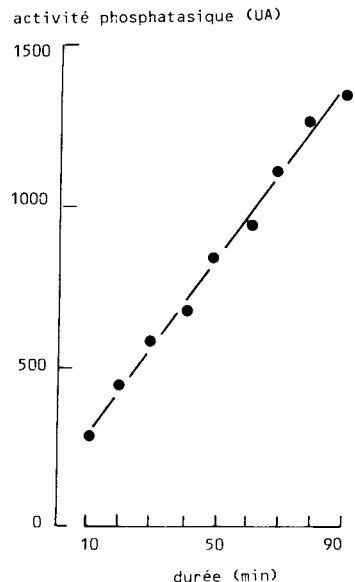


Fig. 2. — Durée de la réaction.

La cinétique de la réaction est exprimée en micromoles de PNP par litre en fonction de la durée de la réaction (soit unités arbitraires, UA).

Toutes les mesures étant réalisées en double, les points expérimentaux sur les figures désignent donc la moyenne.

Les traitements statistiques sont effectués d'après la table du t de Student (Schwartz 1969).

Résultats

1. Détermination des conditions optimales du dosage

1.1 Influence du pH et de la nature du tampon

Parmi les trois solutions tampons (citrate trisodique 0,2 M/HCl 0,2 M ; citrate trisodique 0,2 M/NaOH 0,2 M et acétate de Na 0,2 M/acide acétique 0,2 M) essayées pour mesurer l'activité enzymatique de pH 2,5 à pH 6,5, le tampon acétate semble donner le meilleur résultat, le pH optimum de la réaction se situant à 5,5 (fig 1).

1.2 Durée de la réaction

L'activité phosphatasique en fonction de la durée d'incubation est étudiée pendant 90 min, les mesures étant effectuées toutes les 10 minutes.

La progression linéaire de la formation de para-nitrophénol en fonction du temps, exprimée par la figure 2, indique que l'équilibre de la réaction n'est pas atteint durant 90 min d'incubation à 37 °C et à pH 5,5 (tampon acétate).

Le choix d'une durée de la réaction de 30 min permet d'effectuer le dosage en cinétique avec une variation de la vitesse suffisamment élevée pour assurer une bonne sensibilité des mesures.

1.3 Effet de la température d'incubation

La durée de la réaction étant fixée à 30 min, l'activité phosphatasique est mesurée à des températures de 25 °C à 70 °C par pas de 5 °C. L'expérimentation a révélé une activité optimale à 50 °C (fig 3). Néanmoins, comme le montre la

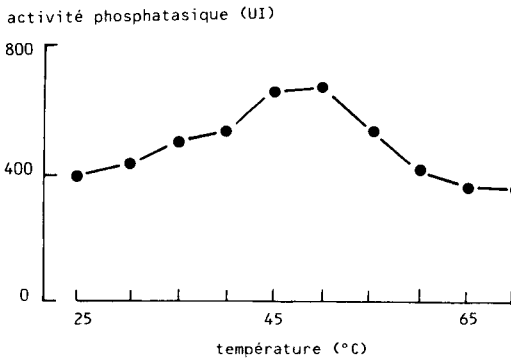


Fig. 3. — Effet de la température sur l'activité phosphatasique.

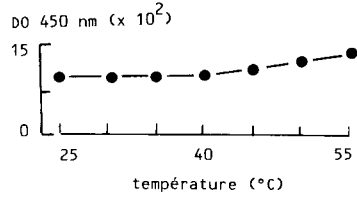


Fig. 4. — Effet de la température sur le PNPP en solution à pH 5,5 (tampon acétate) pendant une incubation de 30 minutes.

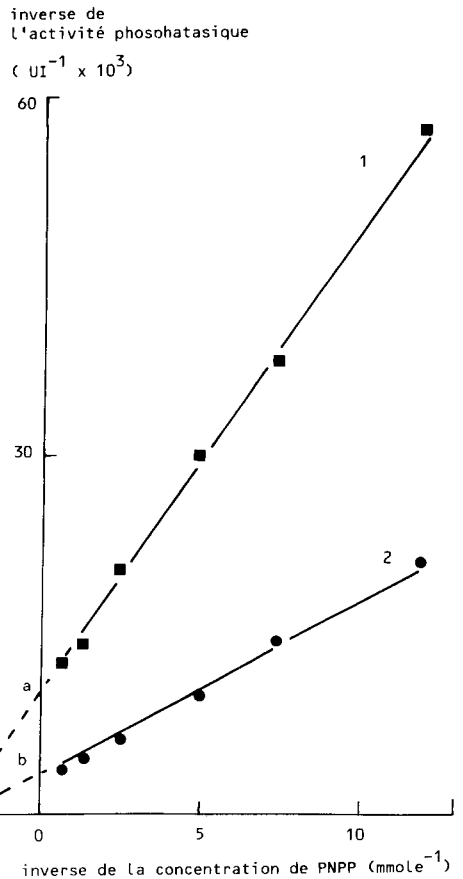


Fig. 5. — Variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du PNPP pour deux dilutions de l'extrait de viande : au 1/1000 (droite 1) et au 1/100 (droite 2). a et b permettent de déterminer la vitesse maximum de la réaction respectivement pour chacune des dilutions de l'échantillon, c désigne -1/Km.

Tableau 2. — Activité phosphatasique dans différentes régions anatomiques. Dosage dans la viande fraîche et après conservation par le froid

conditions du dosage	régions organiques		
	cuisse	pilon	bréchet
	m ± s (UI) (n = 10)		
<i>avant conservation</i> (2 h après la saignée)	553,72 ± 15,43	552,24 ± 14,53	543,25 ± 13,62
<i>après conservation</i> (durée en jours)			
à + 4 °C			
5	553,72 ± 15,43	556,53 ± 15,14	546,62 ± 14,33
10	552,82 ± 13,20	554,58 ± 13,73	541,43 ± 14,24
à - 2 °C			
10	551,63 ± 13,52	555,32 ± 13,50	540,46 ± 13,21
20	551,55 ± 14,38	549,83 ± 14,84	547,08 ± 15,70
30	559,36 ± 14,17	556,69 ± 15,12	546,28 ± 13,37
60	558,42 ± 13,84	554,32 ± 12,73	544,80 ± 12,82
90	553,32 ± 15,23	555,34 ± 14,37	540,29 ± 13,18
120	557,82 ± 13,70	549,28 ± 12,92	540,83 ± 14,17

comparaison de l'activité de la viande avant conservation : aucune différence significative entre les régions de la cuisse et du pilon ; $P < 0,001$ entre les régions de la cuisse et du bréchet et du pilon et du bréchet

comparaison par région avant et après conservation : aucune différence significative pour les régions de la cuisse, du pilon et du bréchet.

figure, cette température fragilise l'enzyme dont le pouvoir catalytique diminue brusquement au-delà de 50 °C. Des deux températures de dosage enzymatique à 25 °C ou 37 °C recommandées par « l'Enzyme-Commission » (Mathieu *et al* 1982), la dernière est retenue car elle permet d'activer suffisamment la réaction tout en respectant la stabilité de l'enzyme et du substrat, ce dernier s'hydrolysant spontanément à partir de 45 °C (fig 4).

1.4 Variation de la vitesse de la réaction à 37 °C en fonction de la concentration en substrat. Notion de V_m et K_m

Le PNPP tamponné à pH 5,5 (tampon acétate) est utilisé à différentes concentrations. La représentation linéaire de Lineweaver et Burk (Tze-Fei Wong 1975) (fig 5) a permis de déterminer la constante de Michaelis (concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est la moitié de la vitesse maximale), soit $K_m = 4 \times 10^{-4}$ M.

Pour une concentration de PNPP 4×10^{-3} M (soit 10 fois la K_m), la vitesse de la réaction représente 90 % de la vitesse maximale laquelle est estimée respectivement à 2720 UI et 7911 UI pour les dilutions à 1/1000 (droite 1 qui a pour équation $Y_1 = 3,15X + 7,91$) et 1/100 (droite 2 dont l'équation est $Y_2 = 1,10X + 2,72$) de l'extrait de viande. Le substrat est en excès suffisant à cette concentration et permet ainsi le dosage en cinétique.

2. Etude de la fiabilité de la méthode

Le tableau 1 résume l'étude de la reproductibilité de la technique de dosage sur trois séries de 20 mesures chacune, dans un même échantillon de viande prélevé au niveau de la cuisse de poulet.

3. Effet de la réfrigération et de la congélation de la viande sur l'activité phosphatasique

Après avoir optimisé les conditions de dosage, nous avons testé les effets de la réfrigération (+ 4 °C) et de la congélation (- 20 °C) de la viande sur l'activité phosphatasique. Les analyses ont porté sur trois régions anatomiques différentes : cuisse, pilon et bréchet. Les mesures sont réalisées sur des lots homogènes constitués chacun de 10 échantillons prélevés sur différents poulets.

Ainsi, pour chaque région anatomique étudiée deux lots ont concerné la réfrigération limitée à 10 jours et six lots ont été nécessaires pour étudier l'effet de la congélation dont la durée s'étale de 10 à 120 jours (tabl 2). L'établissement des valeurs de référence sur la viande fraîche a permis de constater une activité moins élevée dans les muscles du bréchet comparativement aux muscles de la cuisse ou du pilon. En revanche, le traitement statistique des résultats n'exprime aucune différence significative entre viande fraîche et celle réfrigérée ou congelée (tabl 3).

Discussion

Ces résultats semblent indiquer une répartition inégale de la phosphatase acide au niveau des muscles où elle reste stable après stockage de la viande pendant 10 jours à + 4 °C et durant 120 jours à - 20 °C. D'autres enzymes possèdent cette aptitude à résister aux basses températures de stockage de la viande, notamment les lipases et les oxydases qui demeurent douées d'activité jusqu'à - 20 °C. Cette particularité constitue d'ailleurs, lors de la conservation des viandes, la principale cause de vieillissement et d'apparition d'odeurs anormales désagréables, suite à l'oxydation et à l'hydrolyse des matières grasses (Fennema 1979, Wachmutch et Hinada 1974).

Il est toutefois vraisemblable que les dommages créés au niveau des structures membra-

naires par la congélation entraînent une modification structurale de la cellule et la délocalisation des enzymes. C'est dans cette optique que nous continuons actuellement l'étude de l'activité phosphatasique de la viande avant et après congélation par des investigations au niveau de la fibre musculaire. Nous utilisons des techniques d'histo-chimie et d'histoenzymologie permettant la mise en évidence de l'activité phosphatasique par une réaction colorée directement sur une coupe tissulaire. La quantification de cette coloration (et donc de l'activité enzymatique) se fait par microscopie quantitative (Pette *et al* 1979). La morphométrie qui utilise l'analyseur d'image ou Texture Analysis System, Leitz TAS (Mouthon *et al* 1983) permet l'interprétation quantitative des images histologiques observées en précisant les surfaces et la localisation des sites d'activité phosphatasique.

Résumé

Une microméthode de dosage colorimétrique de la phosphatase acide musculaire de poulet est proposée par les auteurs. Après optimisation des conditions de fonctionnement de l'enzyme, cette technique est appliquée à l'étude de la stabilité de la phosphatase lors du stockage de la viande. Si l'enzyme ne résiste pas à une incubation de 30 min à 65 °C, elle garde en revanche toute son activité quand la viande est conservée à + 4 °C pendant 10 jours et à - 20 °C pendant 4 mois.

Références

- CHEFTEL JC, CHEFTEL H, BESANCON P, 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. 193 pp, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris
- COURTOIS JE, PERLES R, 1980. Précis de chimie biologique, 181 pp, Masson, Paris
- DAVEY CL, GRAAFHUIS AE, 1976. Structural changes in beef muscle during aging. *J Sci Food Agric* 27:301-306
- FENNEMA OR, 1979. Proteins at low temperatures. ACS Symposium, Anaheim, 12-17 Mars 1978, 233 pp, American Chemical Society, Washington D C
- LECOQ R, 1966. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Vol 2, 1185-1188, Doin, Paris
- LOUISOT P, 1982. Biochimie générale et médicale : structure, métabolisme, sémiologique. Vol 3, 564 pp, Simep, Lyon
- MATHIEU A, 1982. Recommandations. (Société Française de Biologie Clinique : Commission Enzymologie). *Ann Biol Clin* 40:87-116
- MOUTHON G, POSTIC L, COLIN M, MICHAUX J M, ROCHEFONDEUR S, 1983. Étude histoenzymologique et morphométrique de muscles de veau et de jeunes bovins à partir de biopsies ; mise en évidence de l'action de différents effecteurs. Réunion viandes et produits carnés. Paris 3-4 mars 1983, 2 pp.
- PETTE D, WAS MUND H, WIMMER M, 1979. Principe and method of kinetic microphotometric enzyme activity determination *in situ*. *Histochemistry* 64:1-10
- SCHWARTZ D, 1969. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, 375 pp, 3^e ed, Flammarion Médecine Sciences, Paris
- TOURAILLE C, 1983. Méthodes de mesures des qualités organoleptiques des viandes de volailles. In Lahellec C, Richard FH, Colin P, eds, Qualité des viandes de volailles. Compte-rendu du 6^e Symposium Européen. Ploufragan (France), 17-20 mai 1983, 469-493
- TZE-FEI WONG J 1975. Kinetics of enzyme mechanisms, 540 pp, Academic Press, London
- VALIN C, 1980. Brefs rappels des mécanismes de la rigor mortis et de la maturation des viandes. *Ann Technol Agric* 29:539-546
- VALIN C, 1982. Influence des conditions de conservation sur l'évolution post-mortem biochimique et biophysique des viandes. In Commission viandes et produits carnés. Hygiène et technologie de la viande fraîche CNERNA, 203-216, CNRS Paris
- WACHMUTCH ED, HINADA K, 1974. Alkaline phosphatase from pig kidney. Method of purification and molecular properties. *Biochem J* 141:237-282.