

L'instabilité de couleur des UVCI de bœuf

Altération précoce de la couleur des UVCI de bœuf conditionnées sous atmosphère modifiée Partie 1 : Recherche d'indicateurs caractéristiques du virement précoce de couleur de la viande de bœuf

L'instabilité de couleur des UVCI de bœuf conditionnées sous atmosphère modifiée est un problème de plus en plus fréquent qui se traduit par l'apparition de zones brunes à la surface des viandes 3 à 5 jours avant la fin de DLC. Le problème pourrait être d'origine microbiologique ou biochimique.

PARAFITA E.

Adiv

10 rue Jacqueline AURIOL
63039 CLERMONT-FERRAND cedex 02

Depuis les années 60, beaucoup de travaux ont été réalisés sur la couleur des viandes, néanmoins, aucune étude ne s'est encore intéressée au brusque changement de couleur des UVCI (unité de vente consommateur industrielle) conditionnées sous atmosphère modifiée 70 % O₂ ; 30 % CO₂, qui s'observe principalement lorsque la maturation préalable des viandes est réalisée sous vide et qui survient 3 à 5 jours avant la DLC commerciale. Ce phénomène, qui n'apparaît pas si tôt ou si fréquemment lorsque la viande est maturée sur carcasse, n'a pas encore été expliqué à ce jour. Il constitue un problème économique important car il génère des retours clients de plus en plus fréquents.

Si certains professionnels mettent en avant des raisons microbiologiques, d'autres pensent au contraire à des causes biochimiques.

Dans ce contexte, l'Adiv a mené en 2009, une étude dont les grands objectifs étaient :

- d'identifier les paramètres intrinsèques de la viande impliqués dans les mécanismes d'altération (virement) précoce de la viande bovine lors de la conservation sous atmosphère protectrice ;
- de relier, si possible, des mesures précoces de ces indicateurs à un potentiel de stabilité/non stabilité de la couleur des muscles lorsqu'ils sont conditionnés sous atmosphère protectrice ;
- puis d'étudier l'impact des paramètres technologiques d'élaboration des UVCI (durée de maturation, muscle, âge des animaux, composition de l'atmosphère, etc.) sur l'évolution des indicateurs biochimiques caractéristiques de l'altération de la couleur des viandes bovines.

Cet article présente les résultats de l'identification des indicateurs caractéristiques de l'altération précoce de la couleur des viandes bovines. Les résultats sur l'impact des paramètres technologiques d'élaboration des UVCI feront l'objet d'un article à paraître dans le prochain numéro de V & PC.

Cette étude a été financée par Interbev et FranceAgriMer.



MATÉRIEL ET MÉTHODE

Expérimentation 1 : incidence des flores microbiologiques sur le virement de couleur précoce des UVCI

Les prélèvements de surface ont été réalisés le jour d'apparition du virement de couleur sur les zones altérées et sur les zones restées rouges sur une dizaine de tranches de faux-filets issus de génisses ou jeunes bovins maturés de 6 à 13 jours à 4 °C, en carcasses ou sous-vide.

Pour chaque prélèvement, les flores suivantes ont été analysées :

- Flore totale
- *Pseudomonas*
- Enterobactéries
- *Brochotrix*
- Flore lactique

Expérimentation 2 : implication des *Pseudomonas* dans le virement de couleur précoce des UVCI

Les essais ont été réalisés sur un faux-filet mûré sous vide à 4 °C durant 13 jours.

Le faux-filet a été tranché puis chacune des 15 tranches a reçu l'un des trois traitements suivants :

- sans antibiotique = témoin;
- avec une dose moyennement concentrée en antibiotiques = S1;
- avec une dose très concentrée en antibiotiques = S2.

Le traitement antibiotique consistait à immerger les tranches dans une solution de deux antibiotiques : gentamycine et kanamycine pour lesquels les souches indigènes de *Pseudomonas* se sont révélées sensibles.

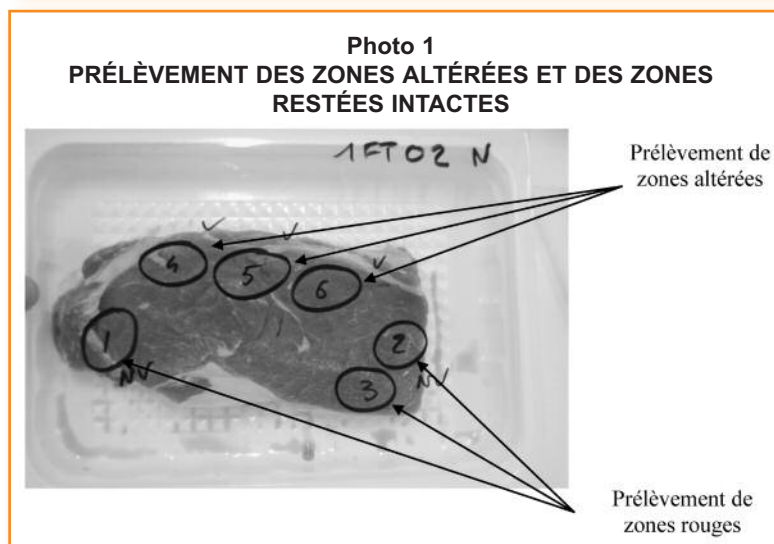
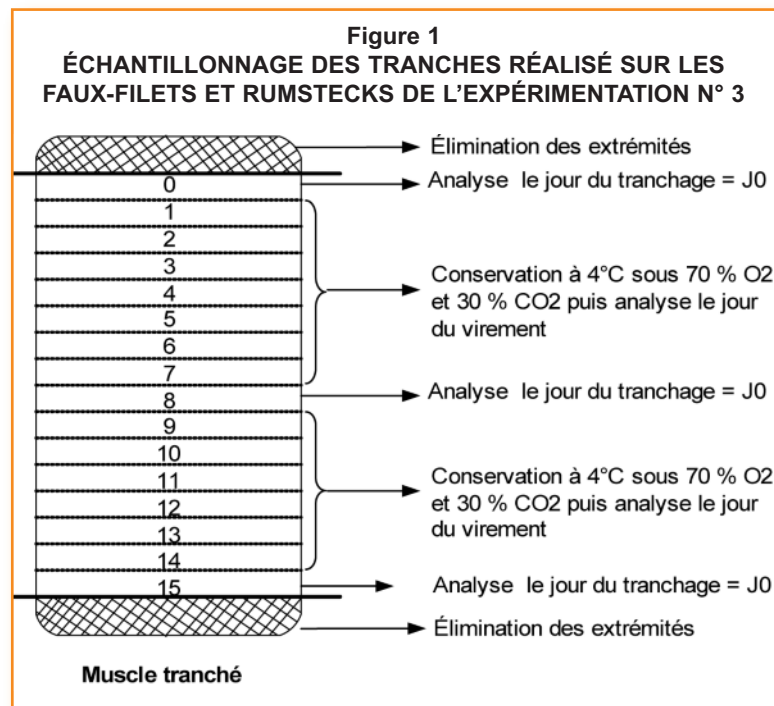
Les concentrations utilisées pour chaque solution ont été les suivantes :

- solution S1 : 200 mg/L de gentamycine + 400 mg/L de kanamycine;
- solution S2 : 300 mg/L de gentamycine + 600 mg/L de kanamycine.

Après traitement, les tranches étaient conservées à 4 °C sous atmosphère modifiée (70 % O₂ et 30 % CO₂) jusqu'à l'apparition de virement.

Des analyses microbiologiques sur les tranches ont été réalisées pour vérifier la présence ou non de *Pseudomonas* sur les zones altérées.

La comparaison des délais d'apparition de virement entre les tranches ayant subi les différents traitements devrait permettre de conclure quant à l'implication de *Pseudomonas* dans le virement de



couleur précoce des UVCI conditionnées sous atmosphère modifiée 70 % O₂ et 30 % CO₂.

Expérimentation 3 : recherche d'indicateurs biochimiques impliqués dans le virement précoce des UVCI

Échantillonnage :

Les essais ont porté sur le faux-filet et le rumsteck de quatre génisses charolaises mûrées sous vide durant 13 jours puis conditionnés sous atmosphère modifiée (70 % O₂ et 30 % CO₂) et conservés à 4 °C jusqu'à l'apparition du virement.

Les tranches n° 0, 8, 15 de chaque faux-filet et rumsteck étaient congelées le jour du tranchage (J0), les autres étaient congelées le jour d'apparition du virement (cf. figure 1).

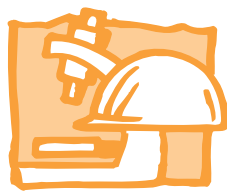
Suivi visuel et préparation des échantillons (photo 1)

Un suivi journalier sur chaque tranche a permis d'observer l'apparition du virement de couleur. Les prélèvements de 2 cm de diamètre sur 0,5 cm de haut ont été réalisés à l'emporte-pièce le jour d'apparition du virement, sur les zones altérées et sur les zones restées rouges.

Après identification, chaque prélèvement était conditionné sous vide, surgelé à -35 °C puis stocké à -80 °C en attendant d'être analysés.

Analyse des échantillons

L'analyse des échantillons portait sur différents critères biochimiques. Le choix de ces critères a été réalisé sur la base d'études scientifiques et de conseils d'experts.



Ainsi, la couleur de la viande rouge étant fortement liée à l'état d'oxydation de la myoglobine, les marqueurs testés sont corrélés directement ou indirectement aux phénomènes oxydatifs des viandes. Les indicateurs biochimiques analysés sur les zones altérées et sur les zones restées rouges de chaque tranche sont répertoriées ci – dessous.

- Les carbonyles : il s'agit du marqueur le plus utilisé pour mettre en évidence l'oxydation des protéines. Lors du processus de peroxydation des protéines, la scission de la chaîne peptidique entraîne la formation d'un carbonyle qu'il est possible de quantifier par réaction avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) selon la méthode de Levine et al. (1990). Le complexe de couleur jaune ainsi formé est détectable par spectrophotométrie à 370 nm (dosage réalisé par l'atelier d'analyses nutritionnelles de l'Adiv - Protocoles sous licence Inra).
- La teneur en thiols libres : les groupes thiols sont présents dans la plupart des protéines, bien que seulement en petites quantités. Leur présence dans des protéines est très importante, notamment parce qu'elle permet la formation des ponts disulfures. Le dosage des thiols libres (Winterbourn, 1990) avec le réactif DTNP (5,5-DiThio-bis (2-Nitro-Pyridine)) permet ainsi de renseigner sur l'état de l'oxydation des protéines. Le groupement thiol est en effet très fragile : il s'oxyde très facilement. (dosage réalisé par le laboratoire de Génie chimique et biochimique – Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand).
- Le statut antioxydant total : il s'agit d'un dosage permettant d'évaluer l'équilibre entre teneurs en substances antioxydantes et en substances oxydables. La méthode de dosage appliquée à la viande bovine est adaptée de celle proposée par Miller et al., en 1993 (dosage réalisé par l'atelier d'analyses nutritionnelles de l'Adiv - Protocoles sous licence Inra).

- Les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS ou thiobarbituric acid-reactives substances) : il s'agit d'un marqueur de la peroxydation lipidique dont la méthode de dosage est décrite par Lynch et Frei en 1993. Les aldéhydes générés par peroxydation des acides gras polyinsaturés réagissent en milieu acide (présence d'acide thichloroacétique) et à chaud avec l'acide thiobarbiturique pour former un complexe de couleur rose qui absorbe à 535 nm. La teneur en TBARS peut être exprimée en équivalent MDA ou malondialdéhyde, qui est un des aldéhydes générés lors de l'étape finale de peroxydation (dosage réalisé par le laboratoire d'analyses de l'Adiv).
- L'activité des enzymes isocitrate deshydrogénase (ICDH) et cytochrome C oxydase (cox) : il s'agit de deux enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif dont la méthode de dosage est celle décrite par Cassar et Malek en 2004 (dosage réalisé par l'équipe C2M, URH, Inra de Theix).
- Le pH : la détermination du pH a été réalisée par voie chimique afin de déterminer parfaitement la valeur au niveau de chacune des zones (analyse réalisée par le laboratoire Adiv).

Les techniques de dosage des carbonyles, thiols et TBARS ont été adaptées aux dosages sur la viande et produits carnés par Mercier et al., en 1998. Chaque échantillon était préalablement broyé à l'azote liquide (mode opératoire sous licence Inra) pour une homogénéisation parfaite. Cette technique de broyage assure la stabilité de l'échantillon à la préparation (pas de dégradation des composés intrinsèques ni de génération de dérivés).

Analyse statistique des résultats

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel STATVIEW afin de mettre en évidence des effets significatifs entre les zones présentant un virement de couleur et les

zones non altérées. Le virement de couleur n'étant pas forcément apparu en même temps sur les différentes tranches, cette analyse a été complétée par un test t apparié permettant ainsi le traitement de comparaison entre zones altérées et non altérées, tranche par tranche. Le traitement d'analyse statistique a donc porté sur chaque critère microbiologique et biochimique analysé.

Les résultats de l'analyse statistique sont exprimés avec la notation symbolique habituelle.

NS = non significatif : Le facteur ou l'interaction considérée n'a pas d'influence sur la mesure effectuée (probabilité $\geq 5\%$);

* = le facteur a un effet significatif (probabilité $< 5\%$);

** = le facteur a une influence importante (probabilité $< 1\%$);

*** = le facteur a une influence très importante (probabilité $< 0,1\%$).

RÉSULTATS

Expérimentation 1 : incidence des flores microbiologiques sur le virement de couleur précoce des UVCI

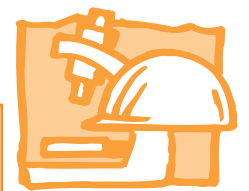
Les analyses microbiologiques montrent que les zones altérées des faux-filets et des rumstecks sont souvent plus contaminées que les zones non altérées. Néanmoins les résultats de l'analyse statistique par un test t apparié ne montrent aucune différence significative entre les deux zones d'une même tranche (cf. tableau 1).

Expérimentation 2 : Implication des *Pseudomonas* dans l'apparition du virement précoce des UVCI

Les essais menés dans le cadre de l'expérimentation n° 2 ne montrent aucune différence entre les différents traitements pratiqués sur les tranches d'un même faux-filet (sans antibiotique

Tableau 1
RÉSULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES SELON LA ZONE DE PRÉLÈVEMENT

FLORE (exprimée en LOG)	ZONE ALTÉRÉE		ZONE NON ALTÉRÉE		valeur de p test t apparié
	Moyenne	Écart type	Moyenne	Écart type	
Flore totale	7,12E+00	1,04	6,50E+00	1,35	0,2337
<i>Pseudomonas</i>	5,21E+00	2,02	4,42E+00	2,48	0,331
Entérobactéries	2,62E+00	2,08	2,02E+00	1,11	0,3552
<i>Brochotrix</i>	5,51E+00	1,75	4,80E+00	1,88	0,3585
Flore lactique	5,93E+00	0,74	5,31E+00	1,06	0,3805



vs antibiotiques à dose S1 vs antibiotiques à dose S2). Ainsi, le virement de couleur est apparu de façon plus ou moins similaire sur toutes les tranches qu'elles aient reçues une dose d'antibiotique ou non.

Les analyses microbiologiques, par ailleurs, ont confirmé l'absence de *Pseudomonas* sur les zones altérées. Ces résultats montrent que les *Pseudomonas* ne sont pas impliqués dans l'apparition du virement de couleur précoce des UVCI de bœuf.

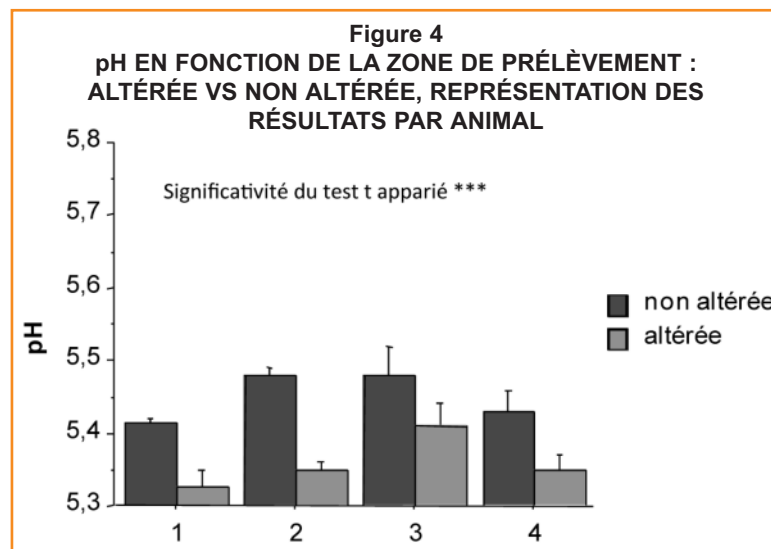
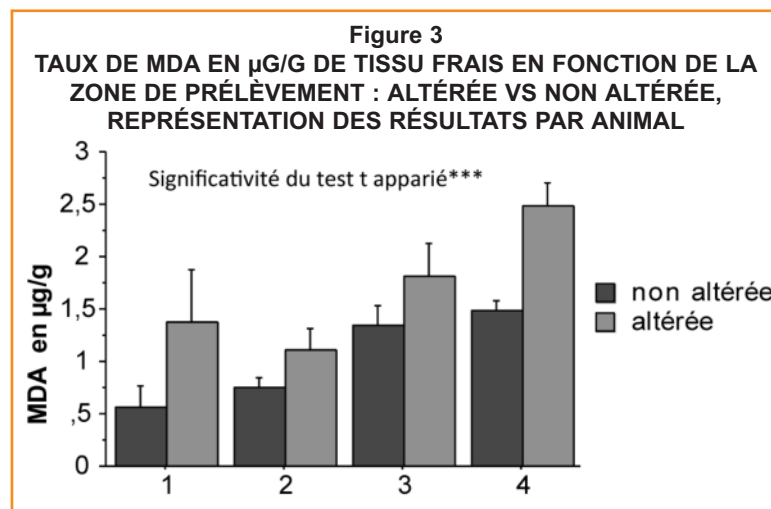
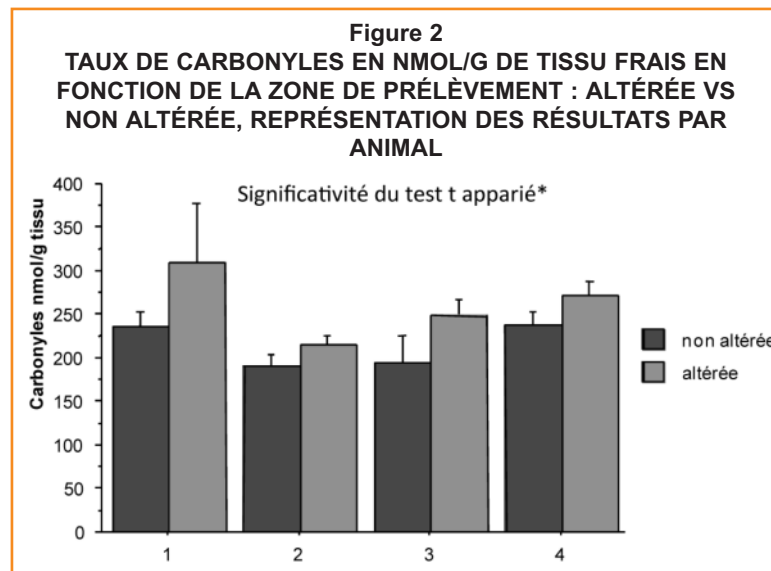
Expérimentation 3 : Recherche d'indicateurs biochimiques impliqués dans le virement précoce des UVCI

L'analyse de variance (par Anova) des résultats de l'expérimentation 3 met en évidence que les zones présentant un virement de couleur montrent des différences significatives avec les zones restées rouges d'une même tranche, à savoir un taux de carbonyle et de TBars plus élevé (respectivement $p = 0,0128$ et $p = 0,0010$) et une légère acidification ($p = 0,0006$). Ces effets ont été confirmés par les probabilités obtenues par un test t par paire :

- carbonyle ($p = 0,0185$) (cf. figure 2);
- TBars ($p = 0,0005$) (cf. figure 3);
- pH ($p = 0,0003$) (cf. figure 4).

Les analyses portant sur les autres indicateurs biochimiques n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les zones altérées et non altérées bien que sur l'analyse du statut antioxydant total, le test T apparié donne une probabilité de 0,0764. Ces résultats suggèrent que le virement de couleur est donc directement relié aux phénomènes d'oxydation des protéines et des lipides. La baisse de pH enregistrée sur les zones altérées pourrait provenir soit de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques au cours de la maturation sous vide soit d'un phénomène de lipolyse. Sans avoir vérifié l'une ou l'autre de ces hypothèses, il est clairement admis aujourd'hui (Renner et al., 1992) qu'une légère acidification peut entraîner une augmentation de la vitesse d'autoxydation de la myoglobine des viandes et donc l'apparition d'un brunissement à la surface des viandes.

Par ailleurs, les différences observées sur l'ensemble des indicateurs biochimiques ne sont significatives que lorsque l'on compare les valeurs de chaque zone pour un même animal et ne le sont pas forcément d'un animal à l'autre ce qui suppose l'apparition d'un phénomène de déséquilibre endogène



entre les éléments pro et antioxydant d'un même animal qui déclenche l'oxydation de la myoglobine et donc son brunissement.

Potentialité des marqueurs biochimiques à prédire la stabilité de couleur des UVCI

L'analyse des marqueurs biochimiques

caractéristiques du virement (carbonyles, TBars et pH), réalisés à J0, le jour de tranchage, ne permettent pas de prédire la stabilité de couleur des UVCI. Néanmoins des analyses supplémentaires réalisées en début de conditionnement (J0) et portant sur le taux de fer hémique, de vitamine E et sur le statut antioxydant total (SAO) montrent des

résultats intéressants. Sans que l'on puisse mettre en évidence des différences significatives sur le taux de vitamine E et de SAO, il semblerait que les tranches provenant de l'animal 4 pour lequel la stabilité de couleur était accrue (délai de virement > 18 jours), présentent un taux de fer héminique particulièrement bas (15,68 µg/g) comparativement aux autres animaux ayant montré une certaine instabilité de couleur (20,05 µg de fer/g en moyenne). Le fer étant un élément pro-oxydant, ceci confirme l'hypothèse selon laquelle le virement de couleur précoce des UVCI est lié à un problème d'oxydation.

DISCUSSION

Selon les résultats de cette étude, le virement de couleur précoce des UVCI n'est pas lié au développement de *Pseudomonas* mais pourrait être induit par un phénomène oxydatif. Ceci explique pourquoi les carbonyles et le malondialdéhyde (respectivement marqueurs du stress oxydatif des protéines et des lipides) sont des composés présents en quantité significativement supérieure sur les zones altérées des UVCI comparativement aux zones restées rouges d'une même tranche.

La myoglobine est le principal pigment responsable de la couleur de la viande. L'état chimique de ce pigment contrôle l'apparence de la couleur de la viande fraîche. En effet, c'est l'état d'oxydation de l'atome de fer situé dans l'hème de la protéine qui est à l'origine de sa couleur. Le pigment peut ainsi se trouver sous plusieurs formes : sous forme réduite, désoxygénée (couleur rouge pourpre), sous forme oxygénée (couleur rouge vif) qui est la teinte recherchée par le consommateur et sous forme oxydée (couleur brune).

Ainsi, la couleur brune qui apparaît à la surface des tranches au moment du virement est liée à la présence de metmyoglobine (= myoglobine oxydée).

Les travaux d'Anton et al. (1993) montrent que l'oxydation de la myoglobine et la peroxydation des lipides membranaires sont deux processus liés. L'ensemble de ces phénomènes permet aux auteurs de suggérer que plus un muscle est riche en myoglobine, plus la catalyse de l'oxydation des lipides est facilitée avec comme conséquences, une plus forte oxydation de la myoglobine et un brunissement de la viande. L'inter-relation entre les processus oxydatifs des lipides et le pigment de la viande est également appuyée par les travaux de Faustman et al., 1989, Faustman et Cassens, 1990, 1991. Ainsi, ce phénomène de virement de couleur précoce serait induit par une oxydation des lipides. L'oxydation des acides gras conduit à la production de radicaux libres lipidiques capables de propager l'oxydation aux protéines et en particulier à la myoglobine.

Par ailleurs, la vitesse d'oxydation de la myoglobine est augmentée par des pH bas, des hautes températures et des basses pressions en oxygène (Renner et al., 1992). De plus, le fer est, au pH physiologique, séquestré par une protéine : la ferritine. Il est relargué au cours de la maturation sous forme de fer libre à cause de l'abaissement du pH. Le fer lié est peu réactif alors que le fer libre est une source importante d'oxydation. Un pH plus bas peut donc entraîner une libération de fer catalytique plus importante et conduire à une oxydation plus marquée. C'est donc un déséquilibre entre les éléments pro et antioxydants de la viande qui déclencherait ce phénomène d'oxydation entraînant alors l'appari-

tion de zones brunes à la surface des tranches.

Ce phénomène de brunissement est bien documenté dans la littérature, néanmoins, il a principalement été étudié dans le cas de conditionnements sous film étirable perméable à l'air. Aucune étude ne fait référence à ce brusque virement de couleur et aucun travaux n'avaient encore permis de connaître l'origine de ce phénomène observé sur les UVCI de bœuf conditionnées sous atmosphère modifiée.

CONCLUSION

Les causes du virement précoce de couleur des UVCI de bœuf sont donc d'origine biochimique et non microbiologique.

Ainsi, les virements précoces des UVCI étudiés dans le cadre de ce projet seraient liés à une autoxydation de la myoglobine entretenue et probablement induite par une peroxydation des lipides. Néanmoins sans une parfaite connaissance de la composition chimique des matrices (teneur en vitamine E, myoglobine, fer libre, PUFAS, etc.), il est difficile de comprendre l'origine d'apparition du phénomène.

De même, ces résultats ne permettent pas de connaître les conditions pour lesquelles le virement peut apparaître spontanément sur certaines UVCI et pas sur d'autres, pourtant élaborées de la même façon.

Des essais complémentaires à cette étude ont donc été menés par l'Adiv pour connaître l'impact des paramètres technologiques (type de muscle, âge des animaux, durée et type de maturation, taux d'oxygène, etc.) sur l'apparition du virement et afin de mieux comprendre les conditions d'apparition de ce phénomène.

B I B L I O G R A P H I E

ANTON M., SALGUES C., GATELLIER P., RENNERRE M. (1993). Etudes des relations oxydatives entre les lipides membranaires et la myoglobine in vitro. *Sci. Aliments*, 13, 261-274.

CASSAR-MALEK I., HOQUETTE J.-F., JURIE C., LISTRAT A., JAILLER R., BAUCHART D., BRIAND Y., (2004) Muscle specific metabolic, histochemical and biochemical responses to nutritionally-induced discontinuous growth path. *Anim. Sci.* 79, 49-59.

FAUSTMANN C., CASSENS R.G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh red meat. *J. Mus. Foods*. P217-243.

FAUSTMANN C., CASSENS R.G. (1991). The effect of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. *J. Anim. Sci.* 69 : 184-193.

FAUSTMANN C., CASSENS R.G., SCHAEFFER D.M., BUEGE P.R., SCHELLER K.K. (1989). Vitamin E supplementation of Holstein steer diets improves sirloin steak color. *J. Food Sci.*, 54, 485-486.

LEVINE R.L., GARLAND D., OLIVER C.N., AMICI A., CLIMENT I., LENZ A.G., AHN B. W., SHALTIEL S., STADTMAN E.R. (1990).

Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol.*, 186, 464-478.

LYNCH S.M., FREI B. (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 34 (10) : 1745-1753.

MERCIER Y., GATELLIER P., VIAU M., REMIGNON H., RENNERRE M. (1998) Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci* 48 : 301-318.

MILLER NJ, RICE – EVANS C., DAVIES M.J., GOPINATHAN V., MILNER A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84, 407-412.

RENNERRE M., ANTON M., GATELLIER P. (1992). Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles. *Meat Sci*, 32 : 331-342.

WINTERBOURN C.C (1990). Oxidative reactions of hemoglobin/Methods Enzymol, 186, B 265-272.