



**HAL**  
open science

# Analyse du transfert de matière et des modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire lors du marinage, saumurage et malaxage des viandes

Diaa Sharedeh

► **To cite this version:**

Diaa Sharedeh. Analyse du transfert de matière et des modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire lors du marinage, saumurage et malaxage des viandes. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22573 . tel-01221210

**HAL Id: tel-01221210**

**<https://theses.hal.science/tel-01221210>**

Submitted on 27 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR D'UNIVERSITE

**Spécialités : Sciences des Aliments**

Soutenue le 21 mai 2015

***Diaa SHAREDEH***

# Analyse du transfert de matière et des modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire lors du marinage, saumurage et malaxage des viandes

Directeur de thèse : Jean Dominique DAUDIN

Co-directeurs : Philippe Gatellier et Thierry Astruc

### JURY DE THESE :

<b>Président :</b>	P. Michaud	Professeur, Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, Université Blaise Pascal.
<b>Rapporteurs :</b>	C. Bonazzi P. Bohuon M. De-Lamballerie	Directeur de Recherches, Massy UMR GénIAL (INRA - AgroParisTech). Professeur, Montpellier SupAgro. Professeur, Nantes ONIRIS.
<b>Membres :</b>	P. Gatellier J.D Daudin	Ingénieur de Recherches, Theix UR QuaPA – INRA. Directeur de Recherches, Theix UR QuaPA - INRA.
<b>Invité :</b>	T. Astruc	Ingénieur de Recherches, Theix UR QuaPA - INRA.

### Laboratoires d'accueil :



# Un grand merci à toutes les personnes ayant de près ou de loin participé au bon déroulement de ce travail de recherche.

Mes premiers remerciements vont à **Jean-Dominique Daudin**, **Philippe Gatellier** et **Thierry Astruc** pour avoir encadré mon travail pendant ma thèse. Ils ont toujours pris le temps de répondre à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir et m'ont fait confiance. J'espère en retour avoir été à la hauteur de leurs attentes.

Un grand merci à **Jean-Dominique**, pour sa disponibilité, pour sa grande patience lors ses explications, pour son aide très précieuse lors de la rédaction du manuscrit, des articles scientifiques et pour m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors de congrès.

Un grand merci à **Philippe** pour sa disponibilité, ses explications, pour m'avoir transmis ses connaissances scientifiques sur les changements physicochimiques des protéines et pour son aide précieuse notamment, lors de la rédaction d'articles scientifiques et du manuscrit

Un grand merci à **Thierry** pour sa disponibilité, ses explications, pour m'avoir transmis ses connaissances scientifiques sur la structure de tissu musculaire et pour son aide précieuse notamment, lors de la rédaction d'articles scientifiques et du manuscrit.

Merci de tout cœur,

...à **Alain Kondjoyan**, Directeur de l'Unité de Recherches "**Qualité des Produits Animaux (QuaPA)**" pour ses conseils, son soutien et ses encouragements, surtout pendant les derniers mois de ma thèse.

...à **Jean-Marc LOBACCARO** Directeur de l'Ecole Doctorale des sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, pour son soutien et ses encouragements, surtout pendant les derniers mois de ma thèse.

...à **l'Unité de Recherches "Qualité des Produits Animaux (QuaPA)** pour son soutien financier qui m'a permis de terminer ma thèse.

...à **la Ville de Clermont-Ferrand** pour m'avoir attribué une bourse doctorale municipale en 2014, ce que m'a donné une bouffée d'oxygène.

...aux membres de l'équipe de "**Imagerie et Transferts**", où j'étais localisé, j'adresse tout particulièrement mes remerciements à **Pierre-Sylvain Mirade**, responsable de cette équipe, pour m'avoir accueillie, pour ses conseils, son soutien et ses encouragements.

...aux membres de l'équipe de "**Biochimie et Protéines du Muscle**" (BPM) où j'ai fait la plupart de mes analyses. J'adresse tout particulièrement mes remerciements à **Véronique Santé-Lhoutellier**, responsable de cette équipe, pour m'avoir accueillie, pour ses conseils, son soutien et ses encouragements.

...aux membres de mon jury de thèse, **M. Philippe Michaud**, Professeur au Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique à l'Université Blaise Pascal, qui a été mon correspondant universitaire, **M. Philippe Bohuon**, Professeur à SupAgro Montpellier, **M<sup>me</sup> Marie De-Lamballerie**, Professeur à Nantes ONIRIS (Nantes) et **M<sup>me</sup> Catherine Bonazzi**, Directrice de Recherches à l'INRA (Massy) pour avoir accepté de rapporter ce travail.

...aux membres extérieurs de mon comité de thèse, **M. Antoine Collignan**, Professeur à SupAgro Montpellier, et **M. Alexis Beakou**, Professeur à l'IFMA (Clermont-Ferrand) pour leurs conseils avisés.

Je tiens particulièrement à remercier *Stéphane Portanguen* pour son dévouement dans les montages expérimentaux et *Raphaël Favier* de m'avoir aidé lors des essais pendant toute ma thèse, et en particulier pour la réalisation des coupes histologiques

...à *Françoise Lassalas* pour les aspects administratifs.

... à *M<sup>me</sup> Claude Ferreira* et à *M. Laurent Aubry* pour leur gentillesse et leur sympathie

... à *M. Jean-Michel Auberger*, pour sa disponibilité lors de problèmes informatiques

... à *Saïd Abouelkaram*, pour son aide et son soutien moral

... à *l'ensemble des membres de l'unité QuaPA* qui ont ainsi participé à rendre mon travail thèse très formateur et ceci dans une bonne ambiance de travail

... à *mes amis que j'ai rencontrés à l'INRA* qui m'ont toujours soutenu et aidé à avancer lors de ma thèse.

... aux doctorants et stagiaires que j'ai rencontrés pendant ma thèse, pour leur bonne humeur notamment, *Fatima, Caroline, Juliana, Rami, Salem, Yasmine, khaled, Jihène, Hassan.*

De manière générale, je remercie toutes les personnes avec qui les contacts furent enrichissants et très sympathiques pendant ces trois années.

**Je tiens à remercier mes chers parents qui ont tant fait pour moi, mes frères et sœurs restés en Syrie, ma chère Taghrid pour sa patience et ses encouragements et mes 3 enfants, Ahmad, Ismail et Lynn. Je suis heureux d'avoir l'occasion de leur témoigner mon affection.**

**Je vous dédie ce manuscrit**

---

Liste des travaux.....	i
Liste des abréviations.....	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	ix
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>

---

**CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

<b>1 LES CARACTERISTIQUES DE LA VIANDE .....</b>	<b>- 5 -</b>
1.1 LA COMPOSITION ET LA STRUCTURE DU TISSU MUSCULAIRE .....	- 5 -
1.2 LES QUALITES DE LA VIANDE .....	- 9 -
1.3 LA TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE.....	- 15 -
1.4 LA TRANSFORMATION DE LA VIANDE ET DES PRODUITS CARNES .....	- 17 -
<b>2 LES TRANSFERTS DE MATIERE .....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1 LES CAS TYPES QUI PROVOQUENT DES TRANSFERTS DE MATIERE.....	- 25 -
2.2 LES LOIS DE DIFFUSION.....	- 27 -
2.3 LES METHODES D'ESTIMATION DES DIFFUSIVITES APPARENTES.....	- 29 -
2.4 LES VALEURS DES DIFFUSIVITES APPARENTES DANS LE TISSU MUSCULAIRE .....	- 32 -
<b>3 LE MARINAGE ET LE SAUMURAGE DES VIANDES.....</b>	<b>- 33 -</b>
3.1 LES DIFFERENTES TECHNIQUES ET LES INGREDIENTS DE LA SAUMURE.....	- 34 -
3.2 L'EFFET DE MARINAGE SUR LE POUVOIR DE RETENTION D'EAU ET LES VARIATIONS DE VOLUME.....	- 35 -
3.3 L'EFFET DU MARINAGE ET DU SAUMURAGE DE LA VIANDE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE ET SUR LA STRUCTURE DE LA VIANDE - 39 -	- 39 -
3.4 L'EFFET DU MARINAGE ET DU SAUMURAGE DE LA VIANDE SUR LES MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES .....	- 41 -
3.5 L'EFFET DE MARINAGE ET SAUMURAGE DE LA VIANDE SUR LE RENDEMENT DE CUISSON .....	- 45 -
3.6 L'EFFET DE MARINAGE ET SAUMURAGE DE LA VIANDE SUR LA QUALITE ORGANOLEPTIQUE.....	- 47 -
3.7 L'EFFET DE MARINAGE ET SAUMURAGE DE LA VIANDE SUR LA DUREE DE CONSERVATION.....	- 50 -
<b>4 LE MALAXAGE DE LA VIANDE .....</b>	<b>- 52 -</b>
4.1 DEFINITION ET TECHNOLOGIE DU MALAXAGE .....	- 52 -
4.2 L'EFFET DU MALAXAGE SUR LES MODIFICATIONS STRUCTURALES ET LA PENETRATION DES INGREDIENTS .....	- 54 -
4.3 EFFET DU MALAXAGE SUR LA CAPACITE DE RETENTION D'EAU ET LE RENDEMENT DE CUISSON .....	- 56 -
4.4 L'EFFET DU MALAXAGE SUR LA SOLUBILITE DES PROTEINES ET LEURS EXTRACTIONS .....	- 57 -
4.5 MAITRISE DE L'OPERATION DE MALAXAGE.....	- 59 -

---

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES**

---

<b>1 LES EXPERIENCES DE MARINAGE, SAUMURAGE ET MALAXAGE .....</b>	<b>- 65 -</b>
1.1 MARINAGE-SAUMURAGE PAR IMMERSION [CH 3] .....	- 65 -
1.2 SAUMURAGE STATIQUE UNIDIRECTIONNEL D'ECHANTILLONS [CH 5].....	- 67 -
1.3 ANALYSE DE LA DYNAMIQUE DE DEFORMATION DES MUSCLES LORS DU MALAXAGE [CH 4].....	- 69 -
1.4 SAUMURAGE-MALAXAGE DE MUSCLES [CH 4, 6 ET 7] .....	- 71 -

<b>2</b>	<b>LES ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES.....</b>	<b>- 77 -</b>
2.1	LES ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES [CH 3, 5, 6, 7] .....	- 77 -
2.2	LES ANALYSES BIOCHIMIQUES [CH 3, 6] .....	- 78 -
<b>3</b>	<b>METHODES HISTOLOGIQUES [CH 3, 5, 7].....</b>	<b>- 81 -</b>
<b>4</b>	<b>ESTIMATION DE LA DIFFUSIVITE APPARENTE DU NaCl (D) .....</b>	<b>- 85 -</b>

---

**CHAPITRE 3 : EFFETS DU pH ET DU NaCl LORS DU MARINAGE DE VIANDE BOVINE SUR L'ETAT PHYSICOCHIMIQUE DES LIPIDES ET DES PROTEINES ET SUR LA STRUCTURE DU TISSU**

---

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>- 91 -</b>
2.1	ANIMAL AND SAMPLES .....	- 91 -
2.2	MARINATING TRIALS .....	- 91 -
2.3	PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS .....	- 92 -
2.4	HISTOLOGY AND IMAGE ANALYSIS.....	- 92 -
2.5	BIOCHEMICAL MEASUREMENTS .....	- 93 -
2.6	STATISTICAL ANALYSIS .....	- 95 -
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>- 95 -</b>
3.1	CONTROL OF MARINATING .....	- 95 -
3.2	HISTOLOGICAL AND DIMENSIONAL CHANGES.....	- 97 -
3.3	LIPID AND PROTEIN OXIDATION .....	- 99 -
3.4	CHANGES IN PROTEIN STATE .....	- 102 -
<b>4</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>- 105 -</b>

---

**CHAPITRE 4 : ANALYSE, REPRODUCTION ET MESURE DU TRAITEMENT MECANIQUE DE PIECES DE VIANDE AU COURS DU BARATTAGE AU MOYEN D'UN NOUVEAU SIMULATEUR DE LABORATOIRE**

---

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>- 109 -</b>
<b>2</b>	<b>BASIS OF A TUMBLER SIMULATOR BRIEF DESIGN .....</b>	<b>- 110 -</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>- 111 -</b>
3.1	THE TWO TYPES OF MUSCLES USED FOR THE TESTS .....	- 111 -
3.2	SLOW-MOTION FILMS TO ANALYZE MUSCLE DEFORMATION .....	- 112 -
3.3	TRIALS TO TEST THE SIMULATOR .....	- 113 -
3.4	STATISTICS.....	- 113 -
<b>4</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>- 113 -</b>
4.1	ANALYSIS OF MUSCLE DEFORMATION .....	- 113 -
4.2	REPRODUCTION OF MUSCLE DEFORMATION.....	- 117 -
4.3	TEST OF THE SIMULATOR .....	- 118 -
<b>4</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>- 125 -</b>

---

## **CHAPITRE 5 : ANALYSE DE L'AMELIORATION DE LA PENETRATION DU SEL DANS LE TISSU MUSCULAIRE PAR UN TRAITEMENT MECANIQUE SUR UN SIMULATEUR DE BARATTAGE**

---

<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>- 129 -</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>- 130 -</b>
2.1 SAMPLES AND PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS.....	- 130 -
2.2 BRINING OR/AND MASSAGING TRIALS.....	- 130 -
2.3 ASSESSMENT OF SALT APPARENT DIFFUSIVITY FROM NaCl PROFILES.....	- 133 -
2.4 ASSESSMENT OF MICROSTRUCTURAL CHANGES .....	- 134 -
2.5 STATISTICS.....	- 135 -
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>- 135 -</b>
3.1 COMPARISON OF CASES 1 AND 2.....	- 135 -
3.2 COMPARISON OF CASES 3 AND 4.....	- 138 -
3.3 PREDICTION OF SALT HOMOGENIZATION IN SMALL MEAT CUBES.....	- 141 -
<b>4 CONCLUSION .....</b>	<b>- 144 -</b>

---

## **CHAPITRE 6 : IMPACT DES SOLLICITATIONS MECANQUES APPLIQUEES AUX VIANDES LORS DU SAUMURAGE-MALAXAGE SUR LE RENDEMENT DE CUISSON, LA SOLUBILITE ET L'HYDROPHOBIE DES PROTEINES**

---

<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>- 147 -</b>
<b>2 MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>- 149 -</b>
2.1 LES ECHANTILLONS .....	- 149 -
2.2 LE SIMULATEUR DE MALAXAGE DU LABORATOIRE .....	- 149 -
2.3 LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE .....	- 150 -
2.4 PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS A LA FIN D'UN SAUMURAGE-MALAXAGE.....	- 151 -
2.5 ANALYSES.....	- 151 -
2.6 STATISTIQUES.....	- 154 -
<b>3 RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>- 154 -</b>
3.1 TRAITEMENT MECANIQUE ET REPARTITION DU SEL ET DE L'EAU DANS LES MUSCLES.....	- 154 -
3.2 RENDEMENT DE CUISSON.....	- 156 -
3.3 SOLUBILISATION DES PROTEINES AU SEIN DU TISSU MUSCULAIRE.....	- 158 -
3.4 EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBILISEES DANS L'EXUDAT DE MALAXAGE.....	- 161 -
3.5 MODIFICATION DE L'HYDROPHOBIE DES PROTEINES MYOFIBRILLAIRES AU SEIN DU MUSCLE.....	- 165 -
<b>4 CONCLUSION .....</b>	<b>- 169 -</b>

---

## **CHAPITRE 7 : ANALYSE QUANTITATIVE DES MODIFICATIONS STRUCTURALES DU TISSU MUSCULAIRE DUES A L'ACTION MECANIQUE LORS DU SAUMURAGE-MALAXAGE**

---

<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>- 173 -</b>
<b>2 MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>- 175 -</b>
2.1 LES ECHANTILLONS .....	- 175 -
2.2 LE SIMULATEUR DE MALAXAGE DU LABORATOIRE .....	- 175 -
2.3 LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE .....	- 176 -

2.4 PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS A LA FIN D'UN SAUMURAGE-MALAXAGE.....	- 177 -
2.5 COUPES HISTOLOGIQUES ET IMAGES EN MICROSCOPIE OPTIQUE.....	- 177 -
2.6 ANALYSE DES IMAGES HISTOLOGIQUES .....	- 179 -
2.7 ANALYSES.....	- 180 -
2.8 STATISTIQUES.....	- 180 -
<b>3 RESULTATS .....</b>	<b>- 180 -</b>
3.1 TRAITEMENT MECANIQUE ET REPARTITION DU SEL ET DE L'EAU DANS LES MUSCLES.....	- 180 -
3.2 ÉLABORATION D'UN INDICE DE DEGRADATION DU TISSU CONJONCTIF.....	- 183 -
3.3 EFFET TRAITEMENT MECANIQUE SUR LA DEGRADATION DE L'ENDOMYSIUM DU MUSCLE SM .....	- 186 -
3.4 COMPARAISON DE LA DEGRADATION DE L'ENDOMYSIUM DES MUSCLES SM ET RF .....	- 189 -
<b>4. DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>- 191 -</b>

Discussion générale	195
---------------------	-----

Références Bibliographique	203
----------------------------	-----

Annexes...	219.
------------	------

Analyse du transfert de matière et des modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire lors du marinage, du saumurage et du malaxage de viandes.

**Résumé :** Le marinage et le saumurage améliorent la durée de conservation, la tendreté et la jutosité de la viande et du poisson. En complément, un malaxage ou « barattage » est souvent appliqué aux pièces de viande préalablement à la cuisson. Le but principal de cette étude était d'évaluer l'impact des conditions de traitement sur les modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire ; une grande partie concerne le malaxage. Les essais relatifs au marinage ont permis de fixer le pH et la teneur en NaCl de petits échantillons de *Semitendinosus* de bœuf respectivement à 6,5, 5,4 ou 4,3 et à 0,9 ou 2 % en masse ; une ANOVA a révélé les effets de ces 2 paramètres sur la taille des cellules et des espaces extracellulaires, l'oxydation des lipides et des protéines et l'hydrophobie de surface de ces dernières. Un simulateur de saumurage-malaxage conçu par le laboratoire a permis d'imposer des successions de déformations contrôlées (nombre de 350 à 2500, taux de compression de 10 à 30%) à des muscles *Semimembranosus* (SM) ou *Rectus femoris* (RF) de porc. Des traitements mécaniques semblables à ceux existant dans des barattes industrielles de tailles différentes ont ainsi été reproduits. Les principales conclusions sont : (1) le malaxage augmente nettement la diffusivité apparente du NaCl, d'une part, en altérant la structure tissulaire (+ 20 %), et d'autre part, en induisant une convection s'ajoutant à la diffusion (+200 %) ; (2) le traitement mécanique entraîne en lui-même une augmentation de la solubilité des protéines, connue pour moduler les qualités des viandes transformées, de 20 à 50% par rapport à des échantillons non malaxés, qu'ils soient salés ou non ; (3) il entraîne aussi une augmentation modérée de l'hydrophobie des protéines ; (4) la dégradation de l'endomysium, servant d'indicateur des modifications structurales, est plus marquée au milieu qu'en périphérie du muscle malaxé et d'autant plus importante que le traitement mécanique est fort et long.

**Mots clés :** protéines, transfert matière, histologie, viande, marinage, saumurage, malaxage.

## Analysis of mass transfer and muscle tissue biochemical and structural changes in marinating, brining and tumbling of meat

**Abstract:** Marinating and brining improve shelf-life, tenderness and juiciness of meat and fish. As a supplement massaging or tumbling is often applied to meat pieces before cooking. The main aim of this study was to assess the impacts of the processing conditions on the biochemical and structural changes in the meat tissue; a great part is focused on massaging. In the marinating trials the pH and NaCl content of thin samples of beef *Semimembranosus* muscle were set at 6.5, 5.4 or 4.3 and at 0,9 or 2 % (w/w), respectively; an ANOVA have shown the effect of these two parameters on the cells and extra cellular space sizes, the oxidation of lipids and proteins and the protein surface hydrophobicity. A brining-massaging simulator built by the laboratory was used to apply controlled successions of deformations (number from 350 to 2500, compression ratio from 10 to 30 %) to *Semimembranosus* (SM) ou *Rectus femoris* (RF) pork muscles. Mechanical treatments similar to those existing in industrial tumblers of various diameters were so reproduced. The main conclusions are: (1) massaging clearly increases the NaCl apparent diffusivity, on the one hand, by a modifying the tissue structure (+20%) and, on the other hand, by adding convection to diffusion (+200%); (2) the mechanical treatment promotes by itself an increase in protein solubility, known to affect processed meat quality, from 20 to 50 % in comparison with salted or unsalted reference samples; (3) it also increases moderately protein hydrophobicity; (4) the *endomysium* degradation, used as an indicator of structural changes, was more pronounced in the muscle periphery than in the middle and all the more marked than massaging was strong and long.

**Keywords:** proteins, mass transfer, histology, meat, marinating, brining, tumbling.

*Articles soumis à des revues à comité de lecture*

1. Sharedeh, D., Gatellier, P., Astruc, T., Daudin, J.D. . Incidence of pH and NaCl levels on physicochemical states of lipids and proteins and on microstructure of bovine meat. *Meat Science*.
2. Daudin, J.D., Sharedeh, D., Favier, R., Portangen, S., Auberger, J.M., Kondjoyan, A. Analysis, reproduction and measurement of meat chunks mechanical treatment in tumbling using a new laboratory simulator. *Journal of Food Engineering*.
3. Sharedeh, D., Mirade, P.S., Venien, A., Daudin, J.D., Analysis of salt penetration enhancement in meat tissue by mechanical treatment using a tumbling simulator. *Journal of Food Engineering*.

*Communications par affiche à des congrès Européens et Internationaux*

4. Sharedeh, D., Gatellier, P., Peyrin, F., Astruc, T., Daudin, J.D. (2011). Biochemical and Structural Changes promoted by Beef Meat Marination. In **57<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology** ( 7-12 August 2011, Ghent-Belgium 7-12 August 2011, Ghent-Belgium), pp 1-4.
5. Sharedeh, D., Favier, R., Auberger, J.M., Portangen, S., Daudin, J.D. (2012). A laboratory tumbler simulator – salt penetration improvement due to mechanical treatment. In **58<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology** (August, Montréal, Canada ), pp 1-4.
6. Sharedeh, D., Vénien, A., Favier, R., Chekrar, F., Gatellier, P., Astruc, T., Daudin, J.D. (2012). Incidence of mechanical action during tumbling of meat on mass transfer, tissue structure and protein solubilization In **EFFoST Annual Meeting - A Lunch Box for Tomorrow : An interactive combination of integrated analysis and specialized knowledge of food** (November, Montpellier, France
7. Sharedeh, D., Favier, R., Vénien, A., Gatellier, P., Astruc, T., Daudin, J.D. (2015). Quantitative analysis of tissue structural changes promoted by mechanical action in meat tumbling. In **61<sup>st</sup> International Congress of Meat Science and Technology** (August, Clermont-Ferrand, France ), pp 1-4.

*Communications par affiche à des congrès nationaux*

8. Sharedeh, D., Auberger, J.M., Favier, R., Portangen, S., and Daudin, J.D. (2012). Un simulateur pour l'étude du malaxage des viandes ; incidence du traitement mécanique sur le transfert du sel. In *14<sup>ième</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes* (Novembre, Caen, France ), pp 1-2.
9. Sharedeh, D., Chekrar, F., Daudin, J.D., and Vénien, A. (2012). Dégradation de l'endomysium lors du salage et du malaxage de deux muscles de porc. In *14<sup>ième</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes* (Novembre, Caen, France ), pp 1-2.
10. . Favier, R., Sharedeh, D., Osswald, V., and Daudin, J.D. (2014). Comportement mécanique de deux muscles du jambon pendant le malaxage. In *15<sup>ième</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes* (Novembre, Lempdes, France), pp 1-2.
11. Sharedeh, D., Favier, R., Gatellier, P., and Daudin, J.D. (2014). Impact des sollicitations mécaniques appliquées aux viandes lors du saumurage-malaxage sur la solubilité des protéines. In *15<sup>ième</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies des Viandes* (Novembre, Lempdes, France ), pp 1-2.



*Liste des abréviations et des notations*

<b>Notation (Française)</b>	<b>Notation équivalente Anglaise</b>	<b>Signification et unité</b>
BBP	BBP	Bleu de Bromophenol
BSA		Albumine de sérum bovin
Csel	Csalt	Concentration en NaCl dans la saumure (g NaCl/100 g saumre)
C		Saumurage-malaxage de courte durée
D	D <sub>salt</sub>	Diffusivité apparente du NaCl (m <sup>2</sup> /s)
Dd	Dd	Durée de la déformation (ms)
Dpm	Dpm	Distance entre piston et la surface de la viande (mm)
Dpt	Dpt	Distance entre piston et bas de la cuve (mm)
DNPH		2,4 dinitrophenylhydrazine
DTNP		5-nitropyridine
E	E	Energie de déformation pendant une déformation(J)
ECS	ECS	Espace extracellulaire (%)
Et		Energie de déformation totale pendant un essai(J)
F	F	Force de réaction (N)
Fmax	Fmax	Force maximum de déformation (N)
FCSA	FCSA	Surface moyenne de la section des fibres musculaires (μm <sup>2</sup> )
HES	HES	Hématoxyline Eosine Safran
HC		Hauteur de chute (cm)
I		Nom du prélèvement à mi-distance (Intermédiaire) entre la surface et le 'milieu' d'un muscle
INRA		Institut national de la recherche agronomique
L		Saumurage-malaxage de longue durée

Lp	Lp	Course du piston lors de la compression d'un muscle (mm)
M	M	Nom du prélèvement au (M)ilieu d'un muscle
MDA		Malondialdehyde
Mt	Mt	Epaisseur moyen d'un muscle (mm)
N		Nombre de compressions
PRE	WHC	Pouvoir de rétention d'eau (%)
Psd		Pourcentage de surface dégradée sur une coupe histologique (%)
QuaPA		Qualité des Produits Animaux
RF	RF	Muscle <i>Rectus femoris</i>
RS		Rouge Sirius
S	S	Nom du prélèvement près de la (S)urface d'un muscle
SEM	SEM	Erreur type sur la moyenne
SM	SM	Muscle <i>Semimembranosus</i>
T		Température (°C)
<i>t</i>		Temps (s)
TBA		Acide thiobarbiturique
TBARS	TBARS	Thio barbituric acid reactive substances
TC	Cr	Taux de compression d'un muscle dans le simulateur de malaxage (%)
x		Distance (mm)
	2D	2 dimensions
	3D	3 dimensions
INDICES		
0		Etat initial
max		Maximum

## Liste des figures

- Figure 1 : Organisation d'un muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique. Tiré de (Camirand, 2004). \_\_\_\_\_ - 6 -
- Figure 2 : Caractérisation du type de fibres par histochimie du muscle longissimus dorsi de porc. L'activité ATPasique de l'actomyosine a été caractérisée après pré-incubation acide à pH 4,45. Tiré de (Promeyrat et al., 2013). \_\_\_\_\_ - 8 -
- Figure 3 : Les trois formes chimiques de la myoglobine. \_\_\_\_\_ - 12 -
- Figure 4 : La force maximale de cisaillement de muscle maturés crus rapportée à la section de collagène intramusculaire. 7 muscles de bovins d'âge variant de 3 à 24 mois (Dumont, 1986). \_\_\_\_\_ - 13 -
- Figure 5 : Evolution de la dureté de la viande de la viande bovine après abattage (Ouali, 1991). P : état pantelant ; RM : rigor mortis. \_\_\_\_\_ - 14 -
- Figure 6 : Evolution de deux types de bactérie au cours du stockage en fonction de la température (T1 = 0-3°C et T2 = 7-8°C) (Christieans, 2003). \_\_\_\_\_ - 16 -
- Figure 7 : Le pourcentage d'eau transformée en glace en fonction de la température. D'après (Jul, 1984). \_\_\_\_\_ - 17 -
- Figure 8 : Evolution de la perte de poids à la cuisson en fonction de la température. Tiré de Davey et Gilbert (1974) et Combes, Lepetit et al., (2004). Davey et Gilbert (1974 : muscles Sternomandibularis bovins cuits 1 h au bain marie entre 25 et 100°C. Combes et al, (2004) : muscles Longissimus Lumborum de lapin cuits 1h au bain marie entre 50 et 90°C (moyenne ± SEM). \_\_\_\_\_ - 21 -
- Figure 9 : Importance de la flore totale en fin de fabrication en fonction de l'aw de viande saumurée puis séchée à 60°C. D'après Omolosh (1982). \_\_\_\_\_ - 23 -
- Figure 10 : Représentation schématique des transferts de matière dans le cas de saumurage à 60°C. D'après Omolosh (1982). \_\_\_\_\_ - 24 -
- Figure 11 : Les transferts de l'eau et de NaCl au cours du salage sec. \_\_\_\_\_ - 26 -
- Figure 12 : Les transferts de matière dans le cas du séchage d'un produit salé. \_\_\_\_\_ - 26 -
- Figure 13 : la cellule de la diffusion. \_\_\_\_\_ - 26 -
- Figure 14 : La méthode des cylindres de viande dans des portes-échantillons sont en contact avec la marinade. - 30 -
- Figure 15 : Représentation schématique de l'influence du pH et du NaCl sur la charge protéique. Tiré de Solignat et Mangin (2003). \_\_\_\_\_ - 36 -
- Figure 16 : Influence du pH et du sel (0,22 M) sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande de bœuf crue. D'après Hamm (1960), repris notamment par Laroche (1978) et Offer et Knight (1988). \_\_\_\_\_ - 37 -
- Figure 17 : Les profils d'évolution du pH en fonction du temps pour des échantillons de Semimembranosus SM en contact avec une solution d'acide acétique 0,01 M (pH = 3,39). Mesures aux jours 2 (vert), 4 (bleu) et 6 (rouge). Les étoiles montrent les profils de pH à 2 et 6 jours si la diffusivité apparente de proton était égale à celle dans l'eau. Tiré de Lebert et Daudin 2014. \_\_\_\_\_ - 38 -
- Figure 18 : Influence de la teneur en sel dans la viande sur la solubilité des protéines myofibrillaires (Wirth, 1974). \_\_\_\_\_ - 40 -
- Figure 19 : Formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) indicatrices de l'oxydation des lipides après un ajustement du pH pendant le stockage à 5°C. Résultats obtenus pour des échantillons témoins avec et sans malaxage, pour des échantillons injectés par une solution d'acide citrique 300 mM, puis malaxés dans une solution d'acide citrique 300 mM pendant 30 min (avec pH final 3,5) et pour des échantillons ayant subi un traitement complet (échantillons traités à l'acide tel injectés avec par du tri-polyphosphate de sodium 250 mM puis malaxés dans du tri-polyphosphate de sodium 250 mM pendant 30 min (avec un pH final de 5,5). Tiré de (Ke et al., 2009) \_\_\_\_\_ - 42 -
- Figure 20 : Effet du marinage et de la cuisson sur le ratio de gonflement, estimé par la variation du poids, et sur la tendreté des échantillons de muscle Triceps Brachii de bœuf en fonction du pH de ces échantillons modulé par immersion dans des solutions d'acide acétique. \_\_\_\_\_ - 44 -

Figure 21: Influence de la teneur en sel dans la viande sur la perte de poids à la cuisson en équilibre de cubes de muscle Semimembranosus de porc (30 x 30 x 30 mm). Cuit emballé sous vide dans un bain d'eau à 50°C, 60°C, 70°C ou 90°C. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes ( $p < 0,05$ ) à une température de cuisson constante.	- 46 -
Figure 22 : Effet du temps d'immersion et du type de solution sur la dureté de la viande marinés avant la cuisson, évalués par analyse du profil de texture. Ctrl : viande non marinée cuite (contrôle) ; 5, 20 et 360 sont les temps d'immersion, b : solution binaire (eau-acide acétique) et t : solution ternaire (eau-acide acétique-sel).	- 48 -
Figure 23 : Effet du pH sur le taux de croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A à 30°C (Petran et Zottola, 1989).	- 50 -
Figure 24 : Exemple d'une baratte industrielle 0,8 x 1,2 x 1 m et charge maximum 2800 litres. Tiré de (avecnord.com).	- 51 -
Figure 25 : Effet du malaxage et des ultrasons sur l'évolution de la teneur en sel moyenne d'échantillon au cours du temps (Siro et al., 2009).	- 55 -
Figure 26 : Evolution de la quantité de protéines solubles dans le limon en fonction du pH et du taux de sel (Ripoche, 2000).	- 58 -
Figure 27 : Les différents essais effectués avec des muscles Semimembranosus de porc ou des échantillons tirés de ces muscles pour estimer la diffusivité apparente du NaCl sans ou avec malaxage.	- 64 -
Figure 28 : Bioréacteur Labfors (Infors HT, Suisse) utilisé pour les essais de saumurage-marinage.	- 64 -
Figure 29 : Découpe des échantillons cylindriques de tissu musculaire à l'aide d'un emporte-pièce d'un diamètre 27 mm	- 68 -
Figure 30 : Porte échantillon permettant un saumurage uni-directionnel et un contrôle de la découpe des tranches avant analyse.	- 68 -
Figure 31 : Le simulateur de malaxage.	- 70 -
Figure 32 : La cuve de simulateur contenant le muscle	- 70 -
Figure 33 : L'aire hachurée délimitée par la courbe force-déplacement correspond à l'énergie dissipée lors de la déformation de la pièce de viande due à un aller-retour du piston pour le cycle N°160 prélevé de l'essai (RF-C-5-C30-22-02-12).	- 73 -
Figure 34 : Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage.	- 74 -
Figure 35 : Prélèvement les quatre sections orthogonales à l'axe principal du muscle à la fin d'un essai de saumurage-malaxage.	- 74 -
Figure 36 : Prélèvement d'une languette sur chaque section de muscle, ainsi que des flèches montrent les directions de pénétration de NaCl.	- 76 -
Figure 37 : Localisation des échantillons prélevés d'une languette pour les analyses : près de la surface, au 'centre' et à une position intermédiaire	- 76 -
Figure 38 : Le microtome.	- 82 -
Figure 39 : Les étapes suivies pour effectuer la coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES) des coupes histologiques.	- 82 -
Figure 40 : Les étapes suivies pour effectuer la coloration Rouge Sirius (RS) des coupes histologiques.	- 84 -
Figure 41 : Représentation du type d'analyse par le logiciel Image J ainsi que le résultat obtenu.	- 86 -
Figure 42 : Un exemple d'un profil expérimental lissé en utilisant la solution analytique de la deuxième loi de Fick pour calculer D (cas 4, $D = 17,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ).	- 86 -
Figure 43 : Example of variable pH marinating conditions used to set meat sample pH (slices of about 15 g, 2 mm thick) at 4.3 in 24 hours: pH of the marinating solution (solid line), measured meat pH (dots).	- 96 -
Figure 44 : Figure 2. Examples of histological images (2290 x 1720 $\mu\text{m}$ ). NaCl content (w/w) in samples at the end of marinating: 0.9% (left) and 2% (right).	- 98 -
Figure 45 : ANOVA results for the two microstructural descriptors; effect of pH and NaCl content (11 g/L: circle and dotted line, 27 g/L: square and continuous line). The vertical bars indicate the confidence interval ( $p < 0.05$ ) with the model in Equation 3.	- 100 -

Figure 46 : ANOVA results for four of the six biochemical parameters measured; effect of pH and NaCl content (0.9%: circle and dotted line, 2%: square and continuous line). The vertical bars indicate the confidence interval ( $p < 0.05$ ) with the model in Equation 3. The observed pH effect is not surprising because low pH favours myoglobin oxidation (Gotoh & Shikama, 1976; Renner, Anton, & Gatellier, 1992) with a release of oxygen, previously bound to haeminic iron, in the form of hydroperoxide ( $HO_2^{\bullet}$ ) and superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) radicals (Giddings, 1977; Sugawara & Shikama, 1980) which are very reactive towards lipids and proteins. Superoxide radicals can be dismutated into hydrogen peroxide. Also, pH decrease leads to the release of iron from iron-carrying proteins (ferritin and transferrin) (Kanner & Doll, 1991; Kanner, Hazan, & Doll, 1988). This “free iron”, also called “catalytic iron”, can react with hydrogen peroxide to give hydroxyl radicals ( $OH^{\bullet}$ ) which are also involved in lipid and protein oxidation. \_\_\_\_\_ - 100 -

Figure 47 : Sketch of [A] the cross-section of a typical tumbler (black arrows indicate deformation directions) and [B] the tumbling simulator used to control and characterize muscle deformation. \_\_\_\_\_ - 111 -

Figure 48 : Six images of the cross-section of a cut Rectus femoris pork muscle at the end of a 25 cm fall. The images were extracted at typical times from a slow-motion film (1000 images/s), and the cross-section was manually highlighted in white. \_\_\_\_\_ - 114 -

Figure 49 : Deformation kinetics of a Rectus femoris muscle for two fall heights: 25 cm (diamonds) and 100 cm (squares). Bars indicate standard deviation over 3 repetitions. \_\_\_\_\_ - 114 -

Figure 50 : Compression rate versus fall height for the two muscles (RF, diamonds; SM, squares). Bars indicate standard deviation over 3 repetitions. Solid line is the linear regression calculated with all the data. \_\_\_\_\_ - 116 -

Figure 51 : Example of recordings during two compressions of RF muscle and a target compression rate of 30%: (At and Bt) force versus time and (Ad and Bd) force versus piston position. Grey rectangles indicate the time period used to define force baseline (horizontal red line in At and Bt). Black arrows show the time and piston position corresponding to contact with meat. \_\_\_\_\_ - 119 -

Figure 52 : Examples force–strain curves charting 6 successive compressions: RF muscle and a target compression rate 30%. \_\_\_\_\_ - 120 -

Figure 53 : Example of the compression characteristics calculated from 80 successive compressions during one test with the RF muscle (target compression rate 30%, 45 min and 350 compressions): maximum force (star), strain energy (circle), and actual compression rate (square) are shown. \_\_\_\_\_ - 122 -

Figure 54 : The 4 treatments tested to investigate potential mechanisms to explain NaCl diffusion enhancement in tumbling. \_\_\_\_\_ - 132 -

Figure 55 : Photograph of a Semimembranosus muscle cross-section. Dotted lines delimit the area where a strip was taken to measure NaCl profile along the X-axis. \_\_\_\_\_ - 133 -

Figure 56 : Six NaCl content profiles in the reference SM meat tissue samples (Case 1). The curve and dots of the same colour correspond to one trial, and curves show fitted profiles. \_\_\_\_\_ - 136 -

Figure 57 : Six NaCl content profiles in meat tissue samples taken from SM muscle that was massaged prior to static brining (Case 2). The curve and dots of the same colour correspond to one trial, and curves show fitted profiles. \_\_\_\_\_ - 137 -

Figure 58 : Examples of histological sections stained using a rabbit anti-laminin antibody. Detachment areas between cells were coloured manually in white. \_\_\_\_\_ - 139 -

Figure 59 : NaCl profiles along the ‘diameter’ within cross-sections of SM muscles brined for 5 h in the tumbling simulator: empty symbols (measurements; case 4), plain symbols (measurements; case 3), and their respective fitted curves. \_\_\_\_\_ - 140 -

Figure 60 : Comparison of predicted spatial distributions of NaCl in meat cubes ( $2 \times 2 \times 2$  cm) for static-brining versus brining-tumbling. Each curve corresponds to the NaCl content profile along the line of the same colour and type as in the bottom-right diagram. The thick light-green curve corresponds to the straight line from cube vertex to cube centre. \_\_\_\_\_ - 143 -

Figure 61: Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage. - 152 -

Figure 62 : Courbes de référence de l’augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire (moyenne sur 4 muscles et SEM) en fonction de la teneur en sel ajouté; une teneur en sel nulle correspond à une force

ionique égale à 0.24 M dans le tampon de broyage et une teneur en sel égale à 4,4 % en masse correspond à une force ionique de 1 M. \_\_\_\_\_ - 157 -

Figure 63 : Courbes de référence de l'augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire (moyenne sur 4 muscles et SEM) en fonction de la teneur en sel ajouté ; une teneur en sel nulle correspond à une force ionique égale à 0.24 M dans le tampon de de broyage et une teneur en sel égale à 4,4 % en masse correspond à une force ionique de 1 M. \_\_\_\_\_ - 160 -

Figure 64 : Augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire des échantillons M et I, dont la teneur en NaCl était négligeable, en fonction du traitement mécanique par rapport aux échantillons témoins non malaxé. Les barres correspondent aux SEM calculées sur 6 essais (3 répétitions x 2 Csel) \_\_\_\_\_ - 162 -

Figure 65 : Comparaison de l'augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire des échantillons S par rapport aux échantillons témoins non saumuré-malaxé, avec l'augmentation de la solubilité due uniquement à l'augmentation de la teneur en sel (courbes de références) (Rouge pour TC 30 % et vert pour TC 10%). Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 ou 4 répétitions. \_\_\_\_\_ - 164 -

Figure 66 : Evolution de la concentration en protéines dans l'exsudat de malaxage en fonction du temps de saumurage-malaxage (Vert RF et Rouge SM, carré TC 30% et disque TC 10%). Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 répétitions. \_\_\_\_\_ - 166 -

Figure 67 : Augmentation de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires des échantillons M et I, dont la teneur en NaCl était négligeable, en fonction du traitement mécanique par rapport aux échantillons témoins non malaxé. Les barres correspondent aux SEM calculées sur 6 essais (3 répétitions x 2 Csel). \_\_\_\_\_ - 167 -

Figure 68 : Augmentation l'hydrophobie des protéines myofibrillaires des protéines du tissu musculaire des échantillons S par rapport aux échantillons témoins non saumuré-malaxé en fonction de la force ionique du tampon (Rouge pour TC 30 % et vert pour TC 10%). Une teneur en sel nulle correspond à une force ionique égale à 0.24 M dans le tampon et une teneur en sel égale à 4,4 % en masse correspond à une force ionique de 1 M Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 répétitions. \_\_\_\_\_ - 168 -

Figure 69 : Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage. \_\_\_\_\_ - 178 -

Figure 70 : Exemple d'images de coupes histologiques colorées au Rouge Sirius relatives au muscle Semimembranosus. (A) échantillon témoin avant traitement, (B) après saumurage-malaxage 'léger', soit un traitement court (350 déformations) avec un taux de compression TC 10 % et une teneur en sel dans la saumure Csel 5 %, et (C) après saumurage-malaxage 'intense', soit un traitement long (2500 déformations), TC30% et Csel 13 %. Les lettres S, I et M correspondent aux emplacements des prélèvements dans le muscle SM. \_\_\_\_ - 183 -

Figure 71 : Représentation des étapes de l'analyse d'image automatisée (ImageJ<sup>®</sup> et Matlab<sup>®</sup>) allant de l'image originale jusqu'à l'histogramme du nombre "d'éléments séparés" par classe de surface. \_\_\_\_\_ - 185 -

Figure 72 : Comparaison des histogrammes du nombre "d'éléments séparés" par classe de surface ( $\mu\text{m}^2$ ), calculés sur 12 images pour chacun des 4 échantillons (Témoin, Surface, Intermédiaire et Milieu), obtenus avec le muscle SM : (A) traitement 'léger' et (B) traitement 'intense'. Les barres présentent les valeurs min et max sur 2 répétitions. \_\_\_\_\_ - 187 -

Figure 73 : Comparaison des classes 'surface > 15000  $\mu\text{m}^2$ ', selon le pourcentage de surface dégradée, relatives aux saumurages-malaxages des muscles SM: (A) les 4 échantillons T, S, I et M ; les barres représentent les valeurs min et max sur deux répétitions et (B) seulement les échantillons T, I et M après regroupement des essais réalisés avec les 2 niveaux de Csel ; les barres correspondent aux écarts-types sur 4 répétitions. \_\_\_\_ - 187 -

Figure 74 : Correspondance entre l'énergie de déformation cumulée (échelle log) pendant un essai saumurage-malaxage d'un muscle SM et le pourcentage de surface dégradée ; échantillons I et M après regroupement des essais réalisés avec les 2 niveaux de Csel ; les barres correspondent aux écarts-types sur 4 répétitions. \_\_\_\_ - 189 -

Figure 75 : Différence du pourcentage de la surface dégradée (Echantillon i - Témoin du même muscle) pour les traitements longs des muscles SM et RF et pour les trois positions (S, I et M). Les barres présentent les valeurs min et max sur deux répétitions. \_\_\_\_\_ - 190 -

Figure 76 : Différence du pourcentage de la surface dégradée (Echantillon i - Témoin du même muscle) pour les traitements longs des muscles SM et RF et pour les trois positions (S, I et M) après regroupement des essais réalisés avec les 2 niveaux de Csel. Les barres présentent les écarts-types sur 4 répétitions. Les significativités

*des différences entre 2 valeurs moyennes ont été évaluées pour les combinaisons deux par deux ; une lettre identique signifie qu'il n'y a pas de différence ( $p > 0,05$ ). Les lettres minuscules n'ont de sens qu'au sein d'un groupe type d'échantillons (T ou I ou M). Les lettres majuscules correspondent aux comparaisons entre les 3 échantillons d'un même traitement (une couleur correspond à un taux de déformation). \_\_\_\_\_ - 191 -*

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition de 100 g de tissu musculaire bovin (Souci et al., 2008). .....	- 4 -
Tableau 2 : Caractéristiques principales des quatre types de fibres musculaires, d'après Lefaucheur (2010)....	- 8 -
Tableau 3 : Les principales bactéries de la flore saprophyte et les modifications qu'elles provoquent sur les viandes fraîches.....	- 12 -
Tableau 4 : Durée limite de conservation (DLC) des aliments en fonction de la valeur pasteurisatrice. Selon la synthèse de Cornier et al., (1994).....	- 20 -
Tableau 5 : La composition des filets de poulet (g/100 g) avant et après marinage (Barbanti et Pasquini, 2005). - 39 -	
Tableau 6 : Les différentes études citées dans ce chapitre avec les différentes conditions de malaxage. ....	- 53 -
Tableau 7 : Summary of the marinating conditions and mean values of pH and NaCl contents in marinated samples. ....	- 96 -
Tableau 8 : Calculation of the increase in global cross section area from the two histological parameters (mean Fiber Cross Sectional Area and Extra-Cellular Space) measured in the control (i) and marinated samples (t). Statistical differences among $\Delta A / A_i$ calculated values are noted a-d ( $p < 0.05$ ) .....	- 98 -
Table 9 : Regularity of the measured compression rate and of the calculated deformation parameters during a trial (350 compression cycles – 45 min) with a pork Rectus femoris muscle when target compression rate was 30%.....	- 123 -
Table 10 : Mean and standard deviation of the mechanical treatment characteristics for 6 repetitions with each type of muscle and the two extreme target compression rate values. ....	- 124 -
Table 11 : Characteristics of the mechanical treatments applied in cases 2 and 4 to SM muscles. Standard deviation in case 4 was calculated from means of three repetitions. ....	- 138 -
Table 12 : Detachment area between cells in samples taken at different distances from the meat surface (trial case 2; 12 images in each sample) .....	- 141 -
Table 13 : Comparison of salt contents in samples taken at 0.5 mm distance from the meat surface according to brine salt concentration and massaging intensity (3 repetitions). All trials lasted 5 h. ....	- 142 -
Tableau 14 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles Rectus femoris et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.....	- 155 -
Tableau 15 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles Semimembranosus et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations. ....	- 155 -
Tableau 16 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles Rectus femoris et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.....	- 181 -
Tableau 17 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles Semimembranosus et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations. ....	- 182 -

Mon travail de recherche de doctorat s'est effectué au sein de deux équipes : « *Imagerie et Transferts* » animée par Pierre-Sylvain Mirade et " *Biochimie et Protéines du Muscle* " (BPM) animée par Véronique Santé-Lhoutellier. Ces équipes appartiennent à l'Unité de recherches *Qualité des Produits Animaux* (QuaPA), dirigée Alain Konjoyan, du centre INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Clermont-Ferrand-Theix (63).

Les procédés de transformation des produits carnés (cuisson, salaison, marinage, saumurage, malaxage) induisent des modifications biochimiques et structurales au sein du tissu musculaire. Ces modifications qui ont des conséquences importantes au niveau technologique, sensoriel et nutritionnel font l'objet de divers projets recherches dans l'unité QuaPA.

Dans ce contexte, mes travaux ont abordé le marinage et le saumurage qui sont utilisés pour favoriser la conservation, aromatiser et améliorer la tendreté et la jutosité de la viande et du poisson. Dans le cas des produits carnés cuits, notamment du jambon cuit, un malaxage ou « barattage » est souvent appliqué préalablement à la cuisson, soit par simple immersion dans la saumure quand les pièces de viandes sont petites, soit après une injection au moyen de dispositifs multi-aiguilles. C'est alors une étape clé de la fabrication. En effet, le malaxage impose des sollicitations mécaniques aux pièces de viande qui favorisent la pénétration des ingrédients et provoquent des modifications biochimiques et structurales ; ceci est reconnu pour affecter le rendement de cuisson et les qualités sensorielles des produits finis.

Les relations entre, d'une part, les conditions de marinage et saumurage, d'autre part, les modifications structurale et biochimiques, et enfin les propriétés des produits finis sont mal connues. Le but principal de cette étude a donc été d'évaluer l'impact des conditions de traitement sur les modifications du tissu musculaire ; une grande partie concerne le malaxage.

Dans un premier temps, j'ai poursuivi des travaux, initiés lors de mon master 2 portant sur le marinage des viandes de bœuf en approfondissant l'effet du pH et du NaCl sur les modifications histologiques et sur l'état physicochimique des lipides et des protéines.

Dans un deuxième temps, j'ai défini les conditions opératoires permettant de reproduire au mieux les sollicitations mécaniques subies par les pièces de viande lors du malaxage. J'ai utilisé pour cela un appareil conçu par mon laboratoire d'accueil qui permet d'imposer et de contrôler des cycles simplifiés et répétables de déformation, ou de contraintes, à des muscles ou pièces de viande. J'ai alors cherché à caractériser l'effet du malaxage sur la diffusivité apparente du NaCl dans le tissu musculaire.

Enfin dans un troisième temps, j'ai exploité ce simulateur de malaxage pour estimer les effets respectifs du NaCl et des sollicitations mécaniques sur la dégradation de l'endomysium, et, sur l'hydrophobie et la solubilité des protéines, lors du saumurage-malaxage des viandes de porc destinées à la fabrication du jambon cuit.

# **Chapitre 1. Synthèse bibliographique**

Tableau 1 : Composition de 100 g de tissu musculaire bovin (Souci *et al.*, 2008).

Composants	Unité	Moyenne	Variation
Macroéléments			
Eau	g	74,1	
Protéines	g	22,0	20,6 - 22,7
Matières grasses	g	1,90	1,55 - 3,00
Micro-éléments			
Minéraux	mg	1,23	1,20 - 1,27
Sodium	mg	66	58 - 66
Potassium	mg	358	355 - 426
Magnésium	mg	23	21 - 23
Calcium	mg	5,7	4,0 - 5,9
Manganèse	µg	17	9,3 - 20
Fer	mg	2,1	1,7 - 2,3
Cobalt	µg	143	100 - 273
Cuivre	µg	87	70 - 120
Zinc	mg	4,3	3,2 - 4,9
Nickel	µg	5,9	1,1 - 19
Chrome	µg	5,3	4,4 - 5,3
Molybdène	µg	28	10 - 45
Aluminium	µg	5,0	-
Phosphore	mg	189	-
Chlorure	mg	52	34 - 91
Fluorure	µg	2,3	4,5 - 100
Iode	µg	5,4	1,7 - 6,8
Bore	µg	45	10 - 144
Sélénium	µg	5,4	3,0 - 10
Vitamines	mg	9,6	-
Acides			
Acide lactique	mg	700	-
Acide succinique	mg	50	-
Acide glycolique	mg	100	-
Purines	mg	133	-
Phospholipides	mg	827	-

# 1 Les caractéristiques de la viande

Les informations générales récapitulées dans les parties (1.1, 1.2 et 1.3) ont été tirées de diverses synthèses et ouvrages relatifs à la viande et au tissu musculaire (Dumont, 1986 ; Pearson et Young, 1989 ; Ouali, 1991 ; James et James, 2000 ; Abi-Nakhoul, 2006 ; Kondjoyan *et al.*, 2006 ; Bauchart *et al.*, 2008 ; Souci *et al.*, 2008 ; Lefaucheur, 2010 ; Lee *et al.*, 2010).

## 1.1 La composition et la structure du tissu musculaire

Le muscle est une des principales parties de l'animal consommée par l'homme, à l'issue d'une série de préparations, qui lui permettent de devenir viande et d'acquérir ainsi l'ensemble des qualités attendues : tendreté, jutosité et goût en particulier.

La composition des muscles est variable entre animaux et, chez un animal, d'un muscle à l'autre. La viande contient des nutriments indispensables pour notre alimentation (Tableau 1). Concernant les macronutriments, le tissu musculaire a une teneur en protéines élevée et assez constante en fonction du muscle, de l'animal et de l'espèce, alors que la teneur en lipides est assez variable ; elle peut aller de 1% dans les muscles blancs de poulet à 8 % dans certains muscles de mouton.

L'unité de base du tissu musculaire est la fibre musculaire, cellule plurinucléée de plusieurs centimètres de long et de 0,01 à 0,1 mm de diamètre. Outre un squelette cellulaire, cette cellule contient un appareil contractile constitué de filaments protéiques disposés parallèlement à l'axe de la cellule. Chaque cellule musculaire est délimitée par le sarcolemme, une triple membrane d'environ 75 nm d'épaisseur et composée majoritairement de phospholipides et glycoprotéines.

Chaque muscle est constitué de nombreuses fibres musculaires regroupées en faisceaux et séparées les unes des autres par des enveloppes de tissus conjonctifs hiérarchisées (*l'endomysium*, le *perimysium* et *l'épimysium*) renfermant des vaisseaux et capillaires sanguins ainsi que des connections nerveuses vitales au fonctionnement du muscle chez l'animal vivant.

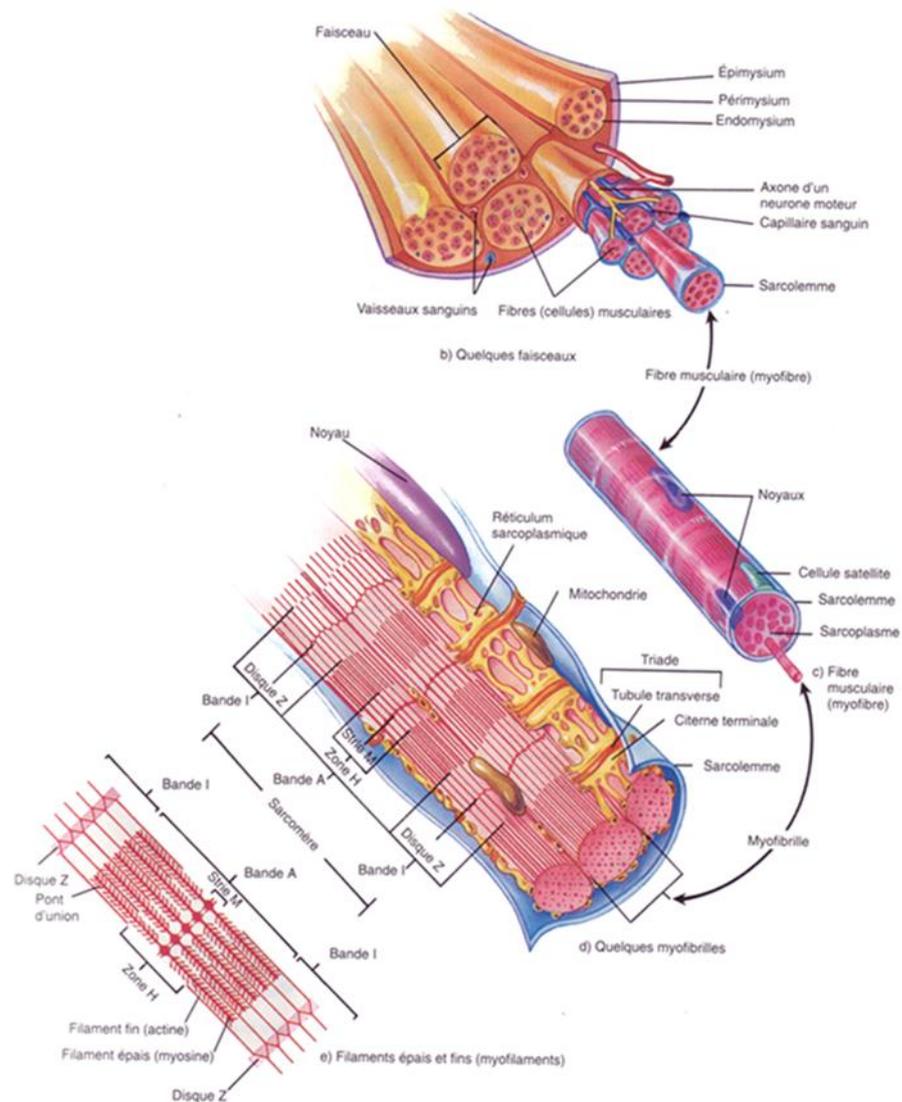


Figure 1 : Organisation d'un muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique.  
Tiré de Camirand (2004).

L'observation d'une fibre permet de mettre en évidence une succession de structures striées alternativement sombres (bande A) et claires (bande I) dont l'unité est le sarcomère.

La viande est un matériau faiblement résistant et très largement déformable. Son comportement mécanique est généralement attribué (i) aux structures myofibrillaires, (ii) aux tissus conjonctifs et (iii) aux interactions entre ces deux structures (Figure 1).

Trois groupes de protéines ont été définies :

- les protéines du tissu conjonctif (collagène, réticuline et élastine) : elles représentent moins de 10 % du total des protéines, le collagène est la protéine majoritaire du tissu conjonctif. Les protéines conjonctives sont des protéines fibreuses insolubles situées dans l'*épimysium*, le *périmysium* et l'*endomysium*. L'*endomysium* est constitué d'un fin réseau de fines fibrilles de collagène faiblement ondulées qui présentent une orientation plus ou moins aléatoire mais qui s'orientent au cours de la contraction musculaire. Le *périmysium* est constitué de fibres de collagène épaisses (5-10  $\mu\text{m}$ ) d'orientation bien précise et fortement ondulée.
- les protéines sarcoplasmiques : elles sont situées dans le sarcoplasme des cellules et représentent environ 30 % du total. Elles sont solubles dans l'eau ou en solution saline diluée (< 50 mM) et comprennent plus de 100 protéines. Parmi les protéines sarcoplasmiques se trouvent de nombreuses enzymes du métabolisme cellulaire et la myoglobine, pigment responsable de la couleur de la viande.
- les protéines myofibrillaires : elles sont situées dans les cellules et représentent un peu plus de 60 % des protéines totales. Elles ne sont solubles qu'en solution saline à haute force ionique (0,6 M). Elles sont divisées en trois sous-classes : les protéines contractiles (actine et myosine majoritairement), les protéines régulatrices (tropomyosine,  $\alpha$ -actinine, etc.) et les protéines du cytosquelette (titine, desmine, etc.). Dans la viande, la myosine et l'actine peuvent être combinées : elles forment alors l'actomyosine.

Il existe quatre types de fibres musculaires : les fibres I, IIa, IIx et IIb. Elles peuvent être identifiées sur des coupes histologiques par histochimie (Figure 2), la proportion de ces fibres est variable d'un type de muscle à l'autre. Ces fibres diffèrent en fonction de leurs propriétés structurales, contractiles, métaboliques et physiologiques ; le tableau 2 récapitule leurs principales caractéristiques. La vitesse de contraction augmente dans l'ordre suivant : I < IIa < IIx < IIb (Tableau 2).

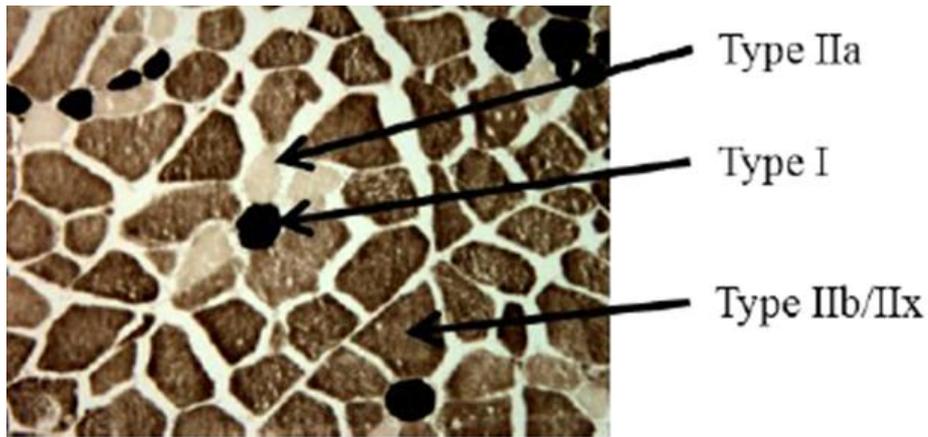


Figure 2 : Caractérisation du type de fibres par histochimie du muscle longissimus dorsi de porc. L'activité ATPasique de l'actomyosine a été caractérisée après pré-incubation acide à pH 4,45. Tiré de Promeyrat *et al.* (2013).

Tableau 2 : Caractéristiques principales des quatre types de fibres musculaires, d'après Lefaucheur (2010).

	I	IIa	IIx	IIb
Vitesse de contraction	+	+++	++++	+++++
ATPase myofibrillaire	+	+++	++++	+++++
Métabolisme oxydatif	+++++	++++, +++++	+, ++	+
Métabolisme glycolytique	+	++++	++++	+++++
Vascularisation	+++++	+++	+, ++	+
Myoglobine	+++++	++++	++	+
Diamètre des fibres	++	+, ++	++++	+++++

+, très faible, ++, faible, +++ moyen, ++++ élevé, +++++, très élevé

Chez l'animal vivant, deux voies métaboliques existent pour régénérer l'ATP nécessaire à la contraction musculaire : une voie aérobie ou oxydative et une voie anaérobie ou glycolytique. Les fibres de type I sont majoritairement oxydatives, celles de type IIb et IIx sont majoritairement glycolytiques et les fibres de type IIa sont oxydo-glycolytiques. Dans la littérature, on retrouve communément les termes de fibres lentes oxydatives pour les fibres de type I, rapides oxydo-glycolytiques pour le type IIa et rapides glycolytiques pour les IIx et IIb. Les types de fibres ont aussi des vascularisations, teneurs en myoglobine, quantité de mitochondries, teneur en lipides et diamètres différents (Tableau 2). Même si tous les types de fibres sont représentés dans la majorité des muscles, la composition relative des fibres détermine la prédominance des propriétés métaboliques du muscle. La composition relative en fibres varie également en fonction de la sélection génétique, du sexe et de l'âge de l'animal, de son activité physique et de son alimentation.

## 1.2 Les qualités de la viande

### Nutritionnelle :

Le rôle primordial de la viande est d'apporter beaucoup de protéines du fait de sa teneur élevée en cet élément et, en particulier, d'apporter des acides aminés indispensables : histidine, lysine, leucine, isoleucine, les acides aminés soufrés (méthionine + cystéine)... Ceci confère à cet aliment une valeur nutritionnelle ajoutée permettant de compléter les protéines d'autres types d'aliments moins bien pourvus en acides aminés essentiels. Par exemple, les protéines des céréales, base de notre alimentation, sont très pauvres en lysine. Les acides aminés soufrés sont très importants pour notre corps, notamment la cystéine qui joue un rôle de précurseur du glutathion, élément important dans les défenses de l'organisme.

La viande est une bonne source de vitamine B, surtout la vitamine B12 qui intervient dans le métabolisme du fer. La viande rouge est une source privilégiée de vitamine B12 ; par exemple, 100 g d'entrecôte cuite permet de couvrir 50% des besoins journaliers en cette vitamine.

La viande est encore une source de certains minéraux comme le fer, qui est un élément indispensable à la fabrication de l'hémoglobine. La viande rouge est riche en fer héminique, cette forme est la mieux assimilée par notre organisme.

La meilleure source alimentaire de zinc est la viande rouge, les besoins journaliers en zinc sont à 15 mg par jour pour un homme et 12 mg pour une femme : 150 g de bavette grillée couvrent les besoins journaliers des femmes.

Le sélénium joue un rôle de premier plan dans la lutte contre les radicaux libres ; 100 g de viande de bœuf cuite apportent entre 5 et 25 µg de sélénium pour des besoins journalier compris entre 20 et 25 µg.

La viande est riche en acide gras saturés (41 à 52 % des lipides) qui sont associés aux risques cardio-vasculaire par les enquêtes épidémiologiques, mais elle apporte aussi des acide gras mono insaturés (31,5 à 46,6 %) et une proportion significative d'acide gras polyinsaturés (0,7 à 6 %) qui favorisent une baisse du LDL-cholestérol et de ce fait réduisent les risques cardio-vasculaires.

#### Microbiologique :

La viande est un milieu très favorable pour la croissance des micro-organismes car les teneurs en protéines et en eau sont très élevées. Ceci implique d'une part un milieu nutritif très riche et d'autre part une activité de l'eau élevée.

L'activité de l'eau prend des valeurs de 0 à 1, elle mesure la disponibilité en eau du milieu dans lequel se trouve la microflore. Plus elle est proche de 1, plus le développement de la microflore est rapide. L' $a_w$  de la viande fraîche est de l'ordre de 0,993 et donc jamais un facteur limitant la croissance microbienne, quelle que soit l'espèce.

La grande fragilité de ce produit vis à vis du développement bactérien impose donc des précautions particulières :

- précautions hygiéniques lors des opérations d'abattage et de découpe,
- obligation de la réfrigération des carcasses dès la fin de l'abattage,
- maintien d'une chaîne du froid pendant la distribution,

Deux types de flores peuvent se développer en surface des produits : les bactéries pathogènes qui peuvent provoquer des infections intestinales entraînant des vomissements, des diarrhées et des fièvres et des bactéries d'altération qui dégradent le produit pendant la distribution et limitent la durée de conservation.

La microflore pathogène des viandes recouvre sept principaux germes : Clostridium perfringens, Salmonella, Shigella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Escherichia coli vérotoxino-gène. Les Salmonelles sont les principales responsables des toxi-infections alimentaires. Les produits carnés, et en particulier les viandes hachées, sont mis en cause dans environ 10% des cas.

Les germes saprophytes des viandes comportent une trentaine de germes bactériens. Parmi ceux-ci les bactéries d'altération entraînent des modifications de l'odeur et de la couleur (Tableau 3) ; Pseudomonas qui est un germe psychrotrophe est le plus important du fait de l'utilisation des basses températures de l'abattage jusqu'à la consommation. Les Lactobacilles sont sans action néfaste sur la viande. Au contraire, en produisant de l'acide lactique à partir des sucres disponibles, ils inhibent le développement de la flore d'altération lors d'une conservation sous-vide.

On peut réduire la contamination microbiologique de la viande par un traitement thermique. La surface des carcasses de viande peut aussi être décontaminée partiellement en appliquant des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique, ou des combinaisons d'acides organiques.

#### Organoleptique :

Les qualités organoleptiques correspondent aux qualités perçues par le consommateur, il s'agit de la couleur, de la flaveur, de la jutosité et de la tendreté.

La couleur est le plus souvent le premier critère de sélection du produit par le consommateur lors de l'achat. La couleur rouge de la viande dépend principalement de la teneur en myoglobine et de son état d'oxydation. La figure 3 indique les trois états d'oxydation qui modulent cette couleur : l'oxymyoglobine (rouge vif recherché par le consommateur) quand le fer hémérique de la myoglobine est sous forme ferreuse et fixe l'oxygène, la désoxymyoglobine (rouge pourpre) qui résulte de la désoxygénation, lors d'une conservation sous vide par exemple, et la metmyoglobine (brun) du fait de l'oxydation du fer hémérique. Sur la viande crue, n'ayant pas subi de traitement, les 3 formes du pigment coexistent.

La flaveur correspond pour l'essentiel à l'arôme dégagé lors de la cuisson. La flaveur est due à la formation de composés volatils tels que des aldéhydes et des cétones. L'oxydation des lipides dégrade la flaveur de la viande et peut à l'extrême entraîner une odeur rance.

Tableau 3 : Les principales bactéries de la flore saprophyte et les modifications qu'elles provoquent sur les viandes fraîches.

Type d'altération	Bactéries	Mécanisme
<i>Putréfaction</i> profonde	Clostridium perfringens	protéolyse
<i>Putréfaction</i> superficielle	Pseudomonas / Acinetobacter	protéolyse
<i>Production d'odeurs</i> acide fromage soufrée	Bactéries lactiques Brochotrix thermosphacta S. Liquefaciens/Alteromonas	glucidolyse AG volatils AA soufrés
<i>Altération de couleur</i> verdissement	Pseudomonas Brochotrix thermosphacta Lactobacilles	production H <sub>2</sub> S  production H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

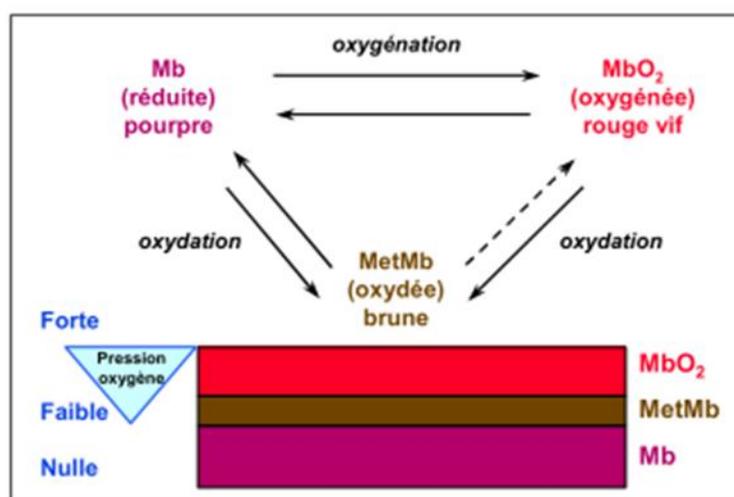


Figure 3 : Les trois formes chimiques de la myoglobine.

La jutosité correspond à l'impression d'humidité perçue au moment de la mastication. Elle est due à une libération rapide du jus de la viande et peut-être renforcée par l'effet stimulant des gras sur la salivation. Cette jutosité, inséparable de la succulence, est ressentie en fonction de son abondance et de sa durée lors de la mastication.

La tendreté est le critère de qualité le plus important pour le consommateur lors de la mastication et correspond à la facilité avec laquelle la viande se laisse trancher ou broyer ; on parle à l'inverse de dureté pour décrire la résistance au tranchage. La tendreté peut être estimée par de nombreuses méthodes instrumentales. Ces méthodes évaluent différents

paramètres qui dépendent des propriétés mécaniques des deux structures composant le tissu musculaire et de leurs interactions : le tissu conjonctif et les fibres musculaires.

Plus la quantité de tissu conjonctif est grande, plus la dureté de la viande est grande (Figure 4) ; outre la quantité, un degré de réticulation du collagène élevé renforce la dureté. Ces deux composantes dépendent de l'espèce, de l'animal, des conditions d'élevage, du muscle, ce qui explique la grande variabilité de la dureté observée pour un même type de muscle sur la figure 4. Le tissu conjonctif n'évolue pas au cours du temps après l'abattage ; il fixe la dureté de base de la viande et définit la destination culinaire du morceau puisque le collagène est dénaturé par la chaleur ; le collagène dénaturé produit la gélatine. Ainsi, les muscles qui contiennent peu de collagène sont à cuisson rapide tandis que ceux qui en contiennent beaucoup sont à cuisson lente.

Contrairement au collagène, les fibres musculaires subissent des transformations enzymatiques et physico-chimiques après la mort de l'animal. Leur résistance se modifie au cours du temps lors de la transformation du muscle en viande (Cf 1.3).

La méthode instrumentale la plus couramment utilisée pour évaluer la tendreté est la mesure de la force de cisaillement. Elle consiste à mesurer la force nécessaire pour couper au moyen d'une lame un échantillon de viande, généralement cuit.

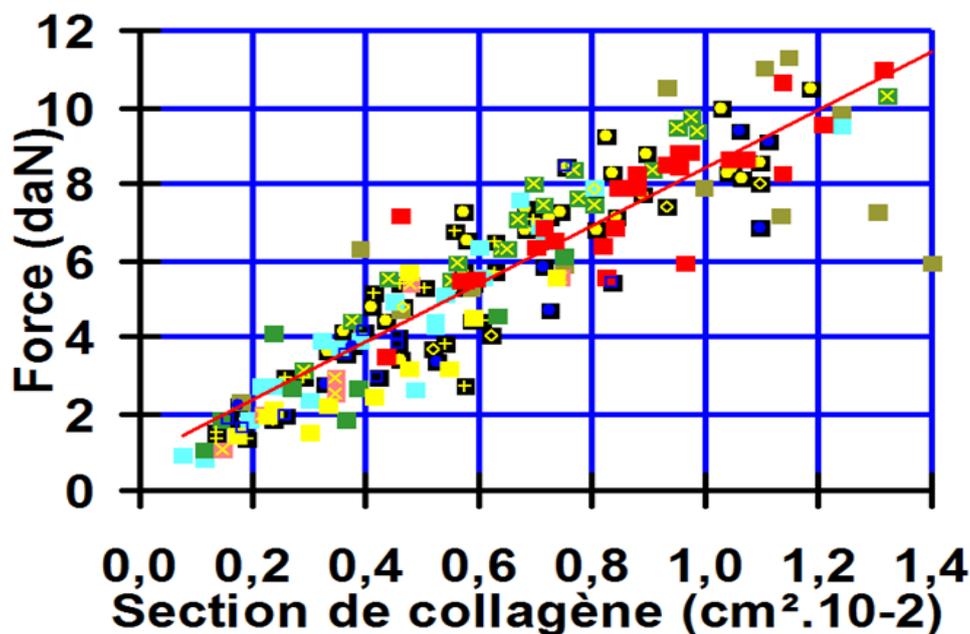


Figure 4 : La force maximale de cisaillement de muscle maturés crus rapportée à la section de collagène intramusculaire. 7 muscles de bovins d'âge variant de 3 à 24 mois (Dumont, 1986).

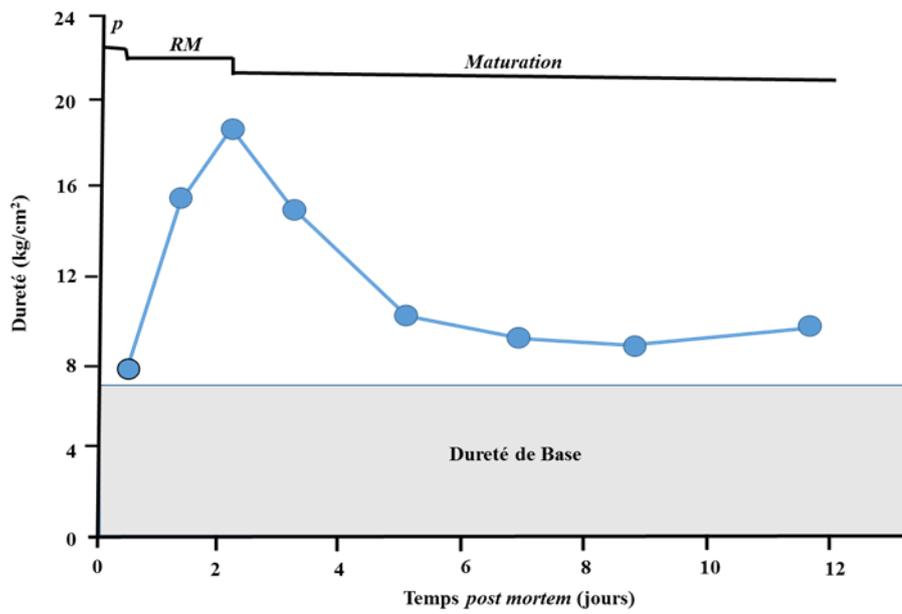


Figure 5 : Evolution de la dureté de la viande de la viande bovine après abattage (Ouali, 1991). P : état pantelant ; RM : *rigor mortis*.

### 1.3 La transformation du muscle en viande

La viande est le résultat de l'évolution *post-mortem* du muscle. Ce processus se déroule en trois phases, plus ou moins longues selon les espèces (Figure 5). Les durées indiquées ci-dessous correspondent aux viandes bovines ; ce sont les plus longues :

- L'état pantelant (20 minutes) : dans les secondes qui suivent l'abattage, le tissu musculaire est flasque.
- La phase d'entrée en *rigor mortis*, ou rigidité cadavérique, (10 à 48 heures) : le muscle devient progressivement raide et inextensible. La rigidité cadavérique est le résultat de la liaison irréversible entre la myosine et l'actine, due à la diminution de la teneur en ATP qui entraîne une accumulation des ions  $Ca^{++}$  dans le réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires. Du fait du manque d'oxygène au niveau du muscle, provoqué par l'arrêt de la circulation sanguine, l'ATP est régénéré par la glycolyse jusqu'à épuisement des réserves en glycogène. Ce processus s'accompagne d'une production d'acide lactique qui entraîne une baisse du pH de 7 jusqu'à une valeur ultime. Les valeurs normales de pH ultime selon les espèces sont : de 5,5-5,7 pour le porc, 5,6 pour le taurillon, 5,5-5,6 pour le veau, 5,6-5,7 pour le poulet et 5,6-5,7 pour le lapin. Dans certains cas des valeurs plus basses (viandes acides ; pH < 5,4) ou plus élevées (viandes DFD Dark Firm Dry ; pH > 6,2) peuvent être retrouvées avec des conséquences négatives sur les qualités.
- La maturation (10 à 12 jours) : cette phase correspond à l'amélioration de la tendreté grâce à l'action d'enzymes protéolytiques endogènes sur le compartiment myofibrillaire. Ces enzymes sont : les calpaines qui désorganisent les stries Z et dégradent les protéines myofibrillaires, les cathepsines qui fragmentent les protéines myofibrillaires au niveau de la bande I, de la bande M, ainsi qu'à la jonction entre les bandes A et I. La maturation dépend principalement de la température, de l'espèce de la race, du sexe de l'animal et du type du muscle. A titre d'exemples, les durée de maturation à 4°C sont de 2 jours pour les volailles et lapin ; 4-6 jours pour le porc, l'agneau et le veau et 10-12 jours pour le bovin.

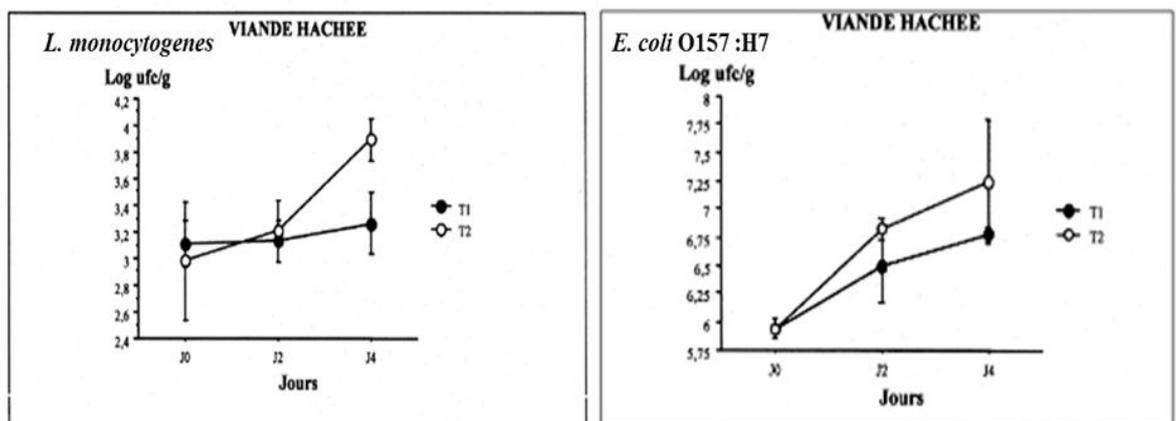


Figure 6 : Evolution de deux types de bactérie au cours du stockage en fonction de la température (T1 = 0-3°C et T2 = 7-8°C) (Christieans, 2003).

## 1.4 La transformation de la viande et des produits carnés

Il existe plusieurs procédés de transformations :

*La réfrigération ( $0^{\circ}\text{C} < T < 7^{\circ}\text{C}$ )*

Du fait de la fragilité de la viande vis à vis de la croissance des micro-organismes évoquée précédemment, la réglementation impose le recours au froid dès la fin de la ligne d'abattage et après la cuisson. La réfrigération ne détruit pas les microorganismes. Elle permet une conservation des viandes fraîches allant de quelques jours (conservation à l'air) à quelques semaines (conservation sous vide) à une température légèrement supérieure à  $0^{\circ}\text{C}$ . La majorité des bactéries pathogènes ont une température limite de croissance supérieure à

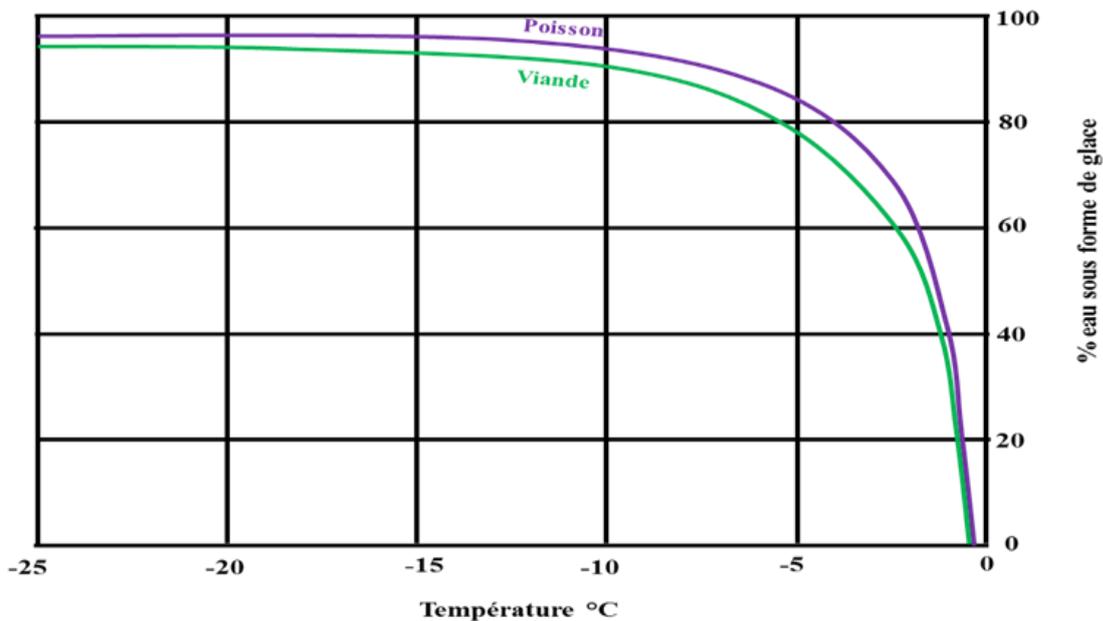


Figure 7 : Le pourcentage d'eau transformée en glace en fonction de la température. D'après (Jul, 1984).

$7^{\circ}\text{C}$ . La figure 6 montre cependant que deux pathogènes peuvent se développer au-dessous de cette température avec une différence nette entre 1 et  $7^{\circ}\text{C}$ .

L'abaissement de la température entraîne des désordres métaboliques et des lésions cellulaires pouvant être importantes ; en particulier une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques et une modification des fonctions membranaires telles que le transport des ions ou des nutriments. Il en résulte une diminution du développement microbien. Cependant, la réfrigération a des limites puisque divers micro-organismes (les bactéries psychrotrophes)

altérant la couleur ou l'odeur des viandes et produits carnés sont capables de proliférer à des températures inférieures à 7°C (Tableau 3).

Selon la réglementation, la température interne des viandes et abats doit être abaissée le plus rapidement possible à une température inférieure ou égale à 7°C pour les carcasses et à 3 °C pour les abats, puis maintenue à ces niveaux jusqu'à la consommation.

Si le refroidissement des carcasses est trop lent, le niveau de température permet la prolifération bactérienne avec un risque de putréfaction de la viande. Cependant, si la réfrigération est trop rapide, en dessous de 10°C avant que le niveau d'ATP ne soit suffisamment réduit, il apparaît une contraction des fibres musculaires irréversible appelée contracture au froid (cryochoc ou cold shortening) ayant pour conséquence une viande particulièrement dure après cuisson, même après une maturation prolongée. En pratique, les viandes dites « rouges » (ovins et bovins) ne doivent pas atteindre cette température de 10°C avant 12 h de refroidissement. Les viandes dites "blanches" (porc et volaille) autorisent des vitesses de réfrigération beaucoup plus rapide.

#### *La congélation*

La viande peut se conserver pendant plusieurs mois en abaissant la température nettement au-dessous de 0°C (en général à -18°C). La congélation inhibe totalement la protéolyse mais elle ne limite que partiellement les oxydations des lipides et des protéines. L'oxydation des lipides qui altère la saveur est le phénomène limitant la durée de conservation.

Une proportion non négligeable de l'eau est fortement adsorbée au substrat et par conséquent seulement 88 à 92% de l'eau se transforme en glace ; le reste de l'eau est dit 'incongélable'. Il existe une relation entre la teneur en glace et la température (Figure 7), à -7°C déjà 80% de l'eau congelable est cristallisée ; à -18°C cette proportion s'élève à environ 99 %.

Les cristaux de glace endommagent toujours des parois cellulaires et le principal effet d'un cycle congélation/décongélation est une exsudation importante qui rend le produit très sensible au développement microbien. Les éventuelles dénaturations des protéines dues à la congélation n'ont pas de répercussion sur la qualité nutritionnelle de la viande (Jul, 1984).

Une congélation lente favorise la destruction d'une partie de la population microbienne du fait de l'augmentation de la force ionique de la phase liquide, importante entre -2 et -7°C, qui est à l'origine des réactions de dénaturation des protéines membranaires et enzymatiques.

Toutefois, cette destruction est trop limitée pour que l'on puisse considérer la congélation comme un procédé d'assainissement.

Selon la synthèse de Girard (1988) les conséquences relatives à la vitesse de congélation peuvent être résumées ainsi :

Une vitesse élevée entraîne la formation de petits cristaux de glace et un moindre endommagement de la structure microscopique du produit. Cette vitesse n'a d'influence ni sur la flaveur, ni sur la couleur lorsque celle-ci est jugée après décongélation, mais une vitesse de congélation élevée a un effet sur l'aspect du produit congelé où les petits cristaux réfléchissent intensément la lumière et confèrent au produit une couleur pâle, favorable dans le cas du poulet mais à éviter pour la viande rouge. Les conclusions relatives à la tendreté sont contradictoires que ce soit à propos des viandes rouges, des viandes blanches ou du poisson ; c'est en fait la préparation des viandes avant congélation qui est déterminante.

Enfin, la congélation de muscles contenant encore de l'ATP, entraîne à la décongélation une contraction très brutale «*rigor* de décongélation » et une exsudation importante. Ce phénomène est surtout marqué lors de la cuisson directe à l'état congelé, il peut être limité par une décongélation lente.

#### *Le traitement par la chaleur ou la cuisson*

La cuisson consiste à chauffer puis maintenir un produit alimentaire à des températures généralement supérieures à 50°C ; ceci provoque des modifications physico-chimiques, biochimiques et structurales qui confèrent au produit cuit ses caractéristiques organoleptiques typiques. Les modifications dépendent du type de produit, du niveau de température, du temps de cuisson et du mode de traitement thermique mis en œuvre. Ces modifications affectent aussi la qualité nutritionnelle, l'aptitude au tranchage des produits après refroidissement et le rendement de transformation qui dépend de la perte de jus.

Tableau 4 : Durée limite de conservation (DLC) des aliments en fonction de la valeur pasteurisatrice. Selon la synthèse de Cornier *et al.*, (1994).

catégorie	1	2	3
valeur pasteurisatrice	< 100	> 100	"plats pasteurisés" > 1000
température à coeur	57°C < $\theta$ < 65°C	$\theta$ > 65°C	$\theta$ > 70°C
DLC maximum	14 jours	21 jours	42 jours

La cuisson s'accompagne d'une destruction plus ou moins importante des micro-organismes initialement présents dans les produits, ce qui favorise leur conservation et peut-être assimilé à une pasteurisation. Un critère d'efficacité, analogue à la valeur stérilisatrice utilisée dans le secteur des produits appertisés pour garantir la sécurité et la stabilité des produits pour une longue durée à température ambiante.

La valeur pasteurisatrice  $VP = p^Z_{70(T)}$  d'un traitement thermique est la durée nécessaire, en minutes, à 70°C, pour diviser le nombre de germes non sporulés par  $10^{12}$ . Pour un traitement à une température (T en °C), il est possible de calculer le temps nécessaire t pour obtenir le même effet qu'à 70°C en utilisant la relation suivantes :

$$p^Z_{70(T)} = t \times 10^{(T-70)/Z}$$

t = durée de maintien (en minute) à la température T (°C)

z = variation de température qui entraîne une variation du temps de réduction décimale d'un facteur 10.

Selon la synthèse de Durand (1999) la valeur pasteurisatrice pour des pièces entières, telles que des rôtis et des jambons, est de l'ordre de 40 minutes. Par sécurité, il est préférable notamment pour les pièces prétranchées de rechercher une valeur supérieure, pouvant aller jusqu'à 80 minutes. La température maximale "à cœur" est très souvent utilisée en technologie des produits carnés et des plats préparés ; elle est complémentaire de la valeur pasteurisatrice qui détermine leurs durées de conservation. Le tableau 1.4 indique quelques couples (valeur pasteurisatrice/température maximale à cœur) pour 3 catégories en fonction de la durée limite de conservation de plats cuisinés (Tableau 1.4).

Les produits carnés, ou les plats cuisinés comportant de la viande, appertisés sont aussi des produits cuits, mais dans ce cas c'est la valeur stérilisatrice qui détermine la stabilité de la

conserve. La température de référence est alors 121°C et la durée de traitement à cette température supérieure est de 3 minutes.

La valeur 'cuisatrice' a été construite par analogie avec la valeur pasteurisatrice. Elle permet de quantifier globalement les effets de la chaleur pendant un temps donné sur les modifications qualitatives moyennes et donc sur les qualités organoleptiques finales (flaveur, couleur, texture, etc.) d'un produit. Ceci permet de s'affranchir de la diversité des effets constatés sur les nombreuses catégories de produits pour définir des barèmes de cuisson.

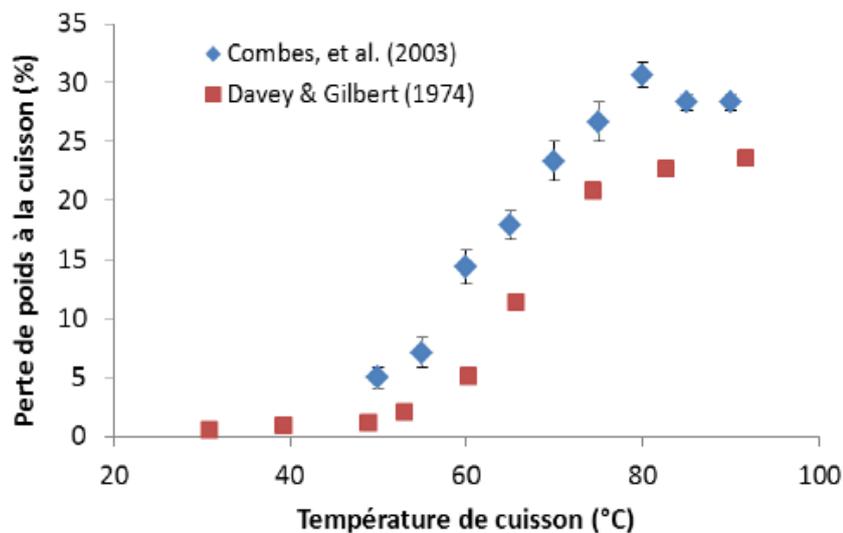


Figure 8 : Evolution de la perte de poids à la cuisson en fonction de la température. Tiré de Davey et Gilbert (1974) et Combes, Lepetit *et al.*, (2004). Davey et Gilbert (1974 : muscles *Sternomandibularis* bovins cuits 1 h au bain marie entre 25 et 100°C. Combes *et al.*, (2004) : muscles *Longissimus Lumborum* de lapin cuits 1h au bain marie entre 50 et 90°C (moyenne  $\pm$  SEM).

La température de référence doit correspondre à un maximum de types de cuisson possibles. Elle est en général proche des températures de cuisson appliquées à un produit donné, en général (100°C), pour le jambon (70°C) et pour le poisson (80°C).

Lors de la cuisson, on observe une modification de la structure des protéines, une perte de pouvoir de rétention d'eau et une augmentation modérée du pH de la viande. Certains auteurs supposent que la perte de pouvoir de rétention d'eau est due à la modification des liaisons eau-constituants de la viande tandis que d'autres auteurs attribuent cette perte à des modifications des tissus lors de chauffage. La conséquence est une perte de jus qui détermine le rendement technologique.

La perte du jus de la viande pendant la cuisson conduit à une perte du poids totale de la viande, la perte de poids à la cuisson augmente avec la durée de cuisson jusqu'à atteindre un état d'équilibre où le poids de la viande n'évolue plus pour une durée de cuisson plus longue. La température de cuisson a aussi un impact prédominant sur la perte de poids à la cuisson : cette dernière augmente avec la température à partir de 50°C et atteint un maximum, de l'ordre de 30 %, vers 80°C (Figure 8). Cette perte de jus à la cuisson qui définit le rendement technologique est cruciale pour la rentabilité économique de l'opération ; aussi de nombreux auteurs ont étudié les facteurs jouant sur cette perte (Bouton *et al.*, 1982 ; Dzudie et Okubanjo, 1999 ; Shanks *et al.*, 2002 ; Aaslyng *et al.*, 2003 ; Jeremiah *et al.*, 2003 ; Rhee *et al.*, 2004 ; Baublits *et al.*, 2006 ; Barbera *et al.*, 2006 ; Carballo *et al.*, 2006 ; Graiver *et al.*, 2006 ; Oillic *et al.*, 2011 ; Tomaszewska-Gras et Konieczny, 2012 ; Villamonte *et al.*, 2013). Le marinage et le malaxage qui influent sur ce critère sont abordés dans la partie 3.

#### *Les charcuteries et les salaisons*

Les charcuteries et salaisons concernent une grande variété de produits fabriqués à part de viande de porc en utilisant le NaCl comme ingrédient principal. Ce dernier favorise la conservation en inhibant partiellement le développement des microorganismes. Il contribue aussi au développement de l'arôme typique de cette famille de produits que l'on peut diviser en deux catégories :

Les salaisons sèches ou les salaisons à sec : le séchage des produits carnés salés est un procédé de conservation traditionnel, dans lesquels le NaCl est éventuellement utilisé avec d'autres additifs.

Ce séchage s'effectue à basse température et sur de longues durées pendant lesquelles le produit mûrit : la fermentation et des réactions de lipolyse et de protéolyse confèrent à ces produits leur typicité. L'objectif premier du séchage est de réduire l'activité de l'eau pour stabiliser le produit. La figure 9 montre l'importance de la flore microbienne en fin de fabrication d'une viande saumurée puis séchée en fonction de l'activité de l'eau finale atteinte.

En France, ce procédé est utilisé pour différents produits de salaison crus. Les deux principaux sont le saucisson sec, les ingrédients sont alors incorporés au produit broyé avant étuvage puis séchage, et le jambon sec pour lequel le sel est déposé en surface en début de fabrication.

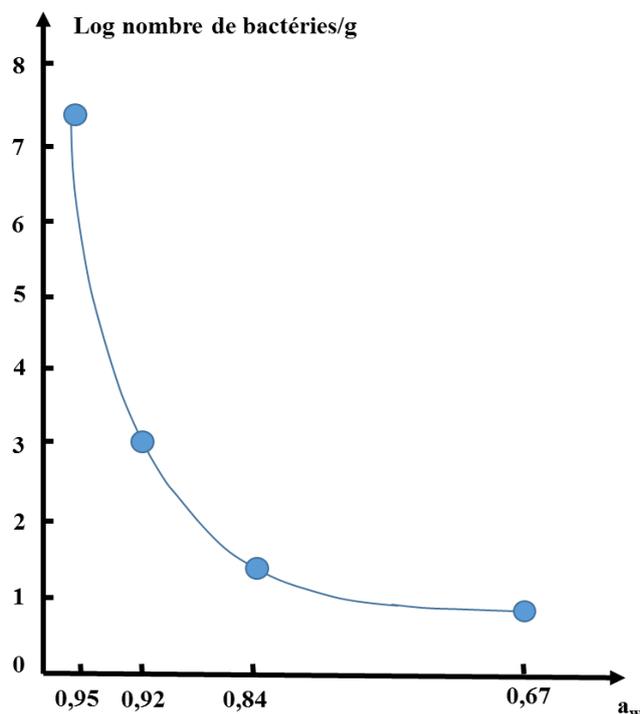


Figure 9 : Importance de la flore totale en fin de fabrication en fonction de l' $a_w$  de viande saumurée puis séchée à 60°C. D'après Omoloshô (1982).

Un autre exemple de salaison sèche est le «Pastirma»; c'est est une charcuterie fabriquée à partir de viande de bœuf fortement pressée et séchée à l'air dans la cuisine arménienne ou des anciens pays ottomans. Akköse et Aktaş (2014) ont suivi les changements d'activité de l'eau ( $a_w$ ) et de teneur en eau des échantillons de pastirma pendant cette fabrication. Ils ont observé une diminution des valeurs de l' $a_w$  de 0,985 à 0,943 et la teneur en eau moyenne des échantillons est passée de 74,56 % à 66,64 %.

L'évolution de la distribution spatiale de l'eau et du sel au sein des produits pendant le séchage détermine leur évolution biochimique et leur qualité organoleptique finale. Par exemple, dans le cas du jambon sec une protéolyse excessive conduit à des produits ayant une mauvaise texture. Arkous (2014) a proposé un modèle de transfert d'eau et de sel permettant d'estimer le temps de repos après salage pour obtenir une répartition homogène des teneurs en eau et en sel. Puis il a couplé celui-ci à un modèle de protéolyse afin de tester des scénarios d'étuvage-séchage par simulation numérique.

Les charcuteries cuites : en France le jambon cuit est la principale fabrication.

Plusieurs types de produits carnés cuits subissent une étape de salage avant le traitement thermique. Les pièces de viande sont soit immergées dans une saumure ou une marinade qui contient du NaCl, soit injectées d'une saumure au moyen d'une injecteuse multi-aiguilles.

Une étape de malaxage est nécessaire afin d'homogénéiser la teneur en sel au sein du muscle. Le malaxage peut se faire soit en même temps que le saumurage, dans le cas de l'immersion, soit après l'injection. Cette opération est pratiquée dans des barattes qui peuvent être mises sous vide pour en améliorer l'efficacité, elle sera détaillée dans la partie malaxage de la viande.

On applique ensuite une cuisson telle que décrite précédemment. Dans le cas du jambon ce traitement est long (9 à 24 h) et réalisé à température assez basse ( $T < 70^{\circ}\text{C}$ ). Le refroidissement dure entre 6 h et 3 j, Le traitement thermique dure au total entre 14 h et 3,6 j. Il a un rôle de pasteurisation et permet également la gélification des protéines du limon, produit lors du malaxage des muscles, qui assure l'adhésion des muscles entre eux dans les moules de cuisson. Il permet aussi la formation et la stabilisation de la couleur et le développement du goût.

Les préparations précédentes sont de plus en plus appliquées aux viandes de volaille et de bœuf.

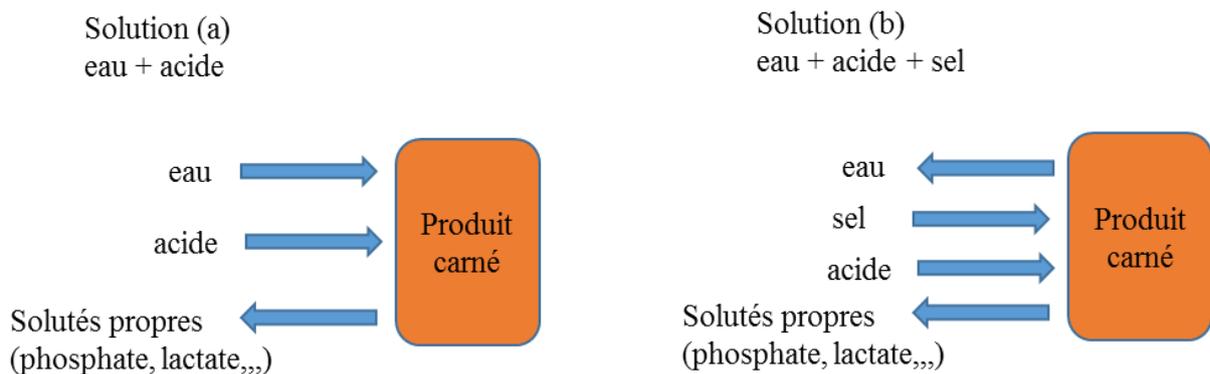


Figure 10 : Représentation schématique des transferts de matière dans le cas de saumurage à  $60^{\circ}\text{C}$ . D'après Omolosh (1982).

## 2 Les transferts de matière

Lors des opérations de transformation, en particulier lors de la préparation des charcuteries et salaisons, les transferts d'eau et de solutés dans les produits et les interactions de l'eau avec les solutés et la matrice solide conditionnent la structure, la texture et la stabilisation des produits. Les solutés peuvent être ajoutés au produit par immersion en solution concentrée (déshydratation osmotique, marinage), par injection directe dans le produit ou par mise au contact du produit avec des solutés anhydres (salage sec).

Dans le cas des viandes et des poissons, les principaux transferts de matière concernent l'eau, les ions et de petits molécules solubles (acides, glucides, peptides, ...).

Lors de la cuisson le transfert d'eau et des solutés vers l'extérieur du produit est le phénomène principal. Son intensité dépend de la déliaison de l'eau à la matrice protéique et des gradients de pression au sein des produits qui dépendent eux-mêmes de profil de température. Le rendement technologique qui a déjà été abordé en parti 1 en dépend.

Lors des autres opérations (salage, saumurage, séchage, déshydratation-osmotique, fumage.....), les transferts de matière se font par diffusion en fonction des gradients de concentrations qui s'établissent dans les produits.

### 2.1 Les cas types qui provoquent des transferts de matière

#### *Cas 1 : saumurage, marinage et déshydratation osmotique*

Dans ces diverses situations technologiques, le produit est au contact d'une solution. Il se produit des flux croisés d'eau, selon les gradients d'activité de l'eau, et de solutés en fonction des concentrations respectives de chacun des composés dans le produit et dans la solution. Par exemple, la figure 10 illustre les transferts de matière qui s'opèrent dans le cas du marinage par immersion dans une solution sel-acide. Cette figure montre que, dans le cas d'un marinage acide, il se produit en général une entrée d'eau et d'acide vers le produit et une perte en solutés propres du produit alimentaire. La situation est plus compliquée quand la solution est formulée avec un sel ; on peut alors observer une perte en eau du produit vers la solution, principalement du fait de la différence d'activité de l'eau, et le sel entre dans le produit.

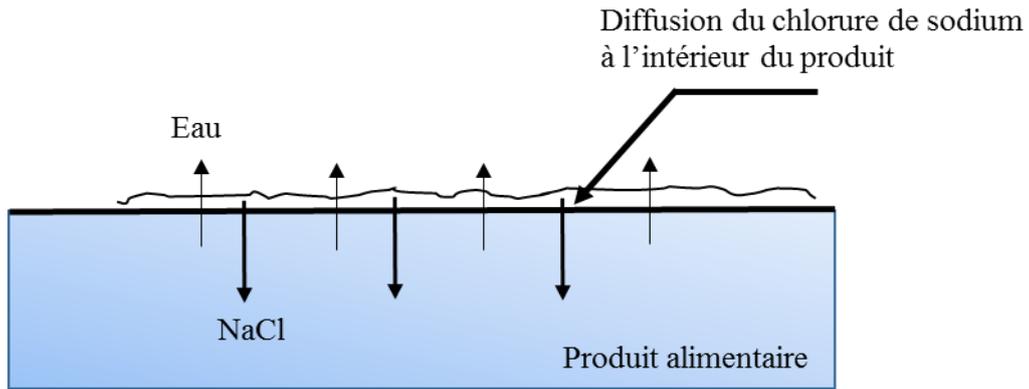


Figure 11 : Les transferts de l'eau et de NaCl au cours du salage sec.

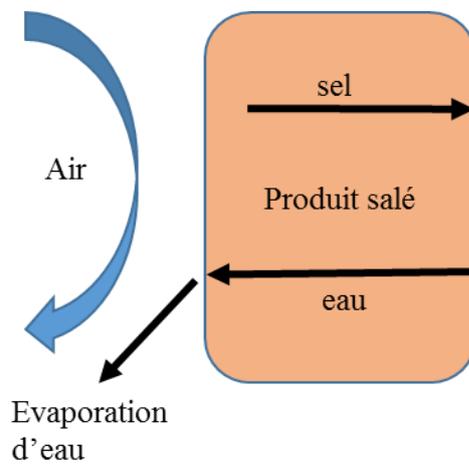


Figure 12 : Les transferts de matière dans le cas du séchage d'un produit salé.

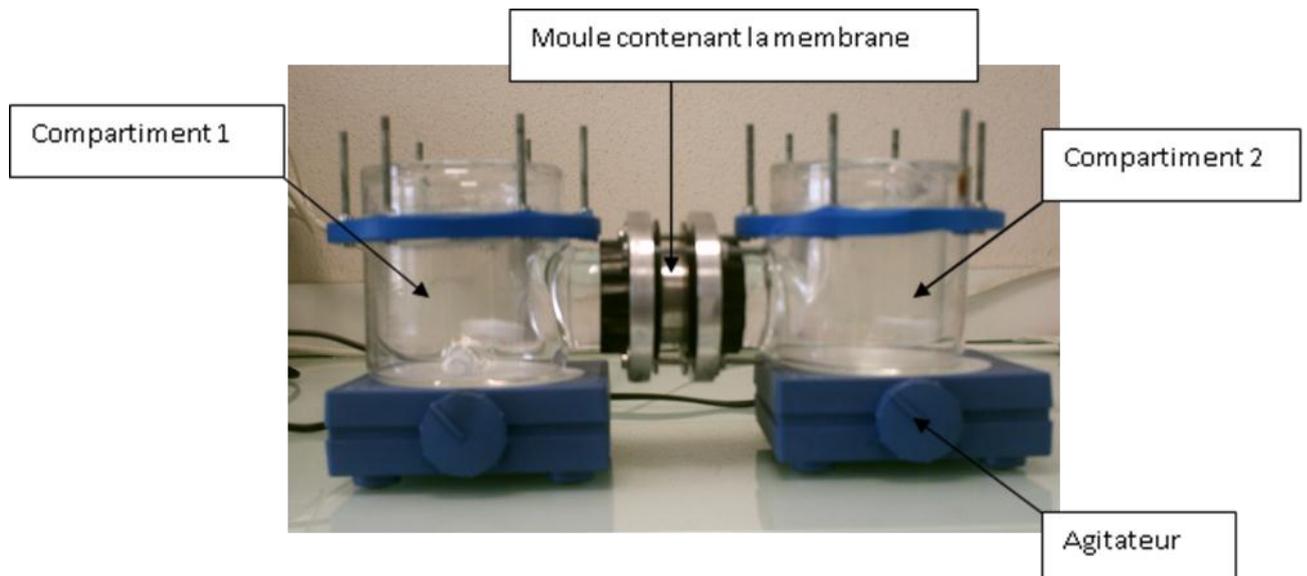


Figure 13 : Exemple de cellule de la diffusion. La membrane est constituée par le produit au sein duquel est estimée la diffusivité apparente.

Dans le cas particulier de la déshydratation osmotique le produit est au contact d'une solution binaire (eau-sel) ou ternaire (eau-sel-glucide) concentrée. Il s'en suit une perte d'eau du produit vers la solution qui s'accompagne de l'imprégnation du produit en solutés. Certaines substances solubles (acides, minéraux) sont entraînées avec l'eau vers la solution.

*Cas 2 : le salage par dépôt de sel (Figure 11)*

Pendant le salage avec du sel sec le processus est initié par l'hydratation du sel par l'eau du produit. Tant qu'il y a du sel, l'activité de l'eau de la solution sursaturée en surface (égale à 0,76) continue de provoquer une diffusion de l'eau de l'intérieur du produit vers la surface. En parallèle la différence de concentration en chlorure de sodium entre la surface et l'intérieur du produit induit la diffusion de celui-ci vers l'intérieur du produit.

*Cas 3 : le séchage d'un produit salé (Figure 12)*

Pendant un séchage convectif l'eau migre sous forme liquide pour s'évaporer à la surface au contact de l'air de séchage. Bimbenet *et al* (1970) ont observé une accumulation des solutés à la surface des produits due à un entrainement par l'eau ; ce cas correspond cependant à des conditions de séchage intenses inhabituelles dans la filière viande. La figure 12 illustre le cas du séchage de faible intensité d'un produit salé. On observe que le sel qui se concentre vers la surface suite au départ de l'eau, diffuse des couches superficielles vers l'intérieur du produit.

## 2.2 Les lois de diffusion

La première loi de Fick exprime, dans un milieu isotrope, immobile et à volume constant, que la quantité de matière diffusante par unité de temps est liée au gradient de concentration par un coefficient de proportionnalité appelé coefficient de diffusion ou diffusivité. Lors d'un mouvement monodirectionnel cette loi s'écrit :

$$N_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \quad (1)$$

$N_A$  est le flux du composé A par unité de surface et de temps,  $D_{AB}$  est la diffusivité du composé A dans le mélange A-B,  $C_A$  représente la concentration du composé,  $dz$  la distance de diffusion. Le flux de matière est donc proportionnel au gradient de concentration et au coefficient de diffusion et s'effectue toujours dans le sens des concentrations décroissantes ; c'est la base de la méthode de la cellule de diffusion (Figure.13).



Le principe de conservation de la matière conduit à la seconde loi de Fick qui exprime la variation de la concentration en un point dans un système en régime transitoire ; toujours dans le cas d'un mouvement monodirectionnel, elle s'écrit :

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left( D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \right) \quad (2)$$

La diffusivité  $D_{AB}$  est une propriété physique du système qui dépend en outre, de la forme et de la charge électrique de la molécule qui diffuse et de la composition et de la structure de la matrice alimentaire. Une prédiction théorique de cette valeur n'est pas possible et des données expérimentales sont indispensables à sa détermination (Saravacos et Maroulis, 2001).

### 2.3 Les méthodes d'estimation des diffusivités apparentes

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer ce coefficient (Cussler, 2009). Compte tenu des nombreux phénomènes, autre que la diffusion stricte, qui influent sur la migration des molécules dans les matériaux alimentaires, il faut parler de diffusivité apparente.

Les principales méthodes de laboratoire faciles à mettre en œuvre sont récapitulées ci-après. Le traitement des données suppose toujours que les conditions suivantes soient respectées :

- La diffusivité apparente est constante,
- Le matériau est uniforme et isotrope,
- La concentration initiale dans les échantillons est homogène,
- Pas de variations des dimensions de l'échantillon au cours du temps,
- La concentration en surface est brusquement modifiée au temps = 0, puis elle est constante.

#### *La méthode 'des cinétiques de sorption' (a)*

Elle consiste à immerger des morceaux d'aliments ayant la même forme et les mêmes dimensions dans une solution. Ces morceaux sont retirés successivement à des intervalles de temps connus afin de mesurer le gain moyen, ou la perte moyenne, en solutés en fonction du temps.

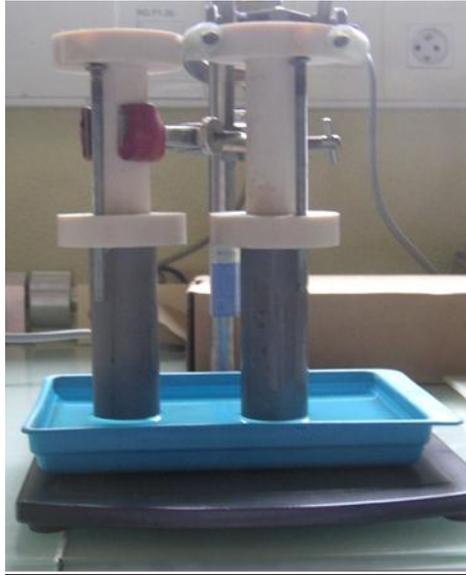


Figure 14 : La méthode des cylindres en contact avec une solution ; ici des cylindres de viande insérés dans des portes-échantillons sont en contact avec la marinade déposée dans le bac inférieur.

Un ajustement des courbes expérimentales avec une solution analytique de la seconde loi de Fick dans une plaque infinie, permet d'estimer la diffusivité apparente  $D$ .

*La méthode des cylindres accolés (b)*

Elle consiste à accoler au temps  $t_0$  deux cylindres ayant chacun une concentration homogène, mais différente, en soluté dont on veut déterminer la diffusivité apparente. Après une certaine durée de contact les cylindres sont séparés et découpés en tranches orthogonales à la direction du transfert. Des dosages permettent d'établir un profil de concentration en soluté en fonction de la position par rapport à la jonction. La méthode des cylindres accolés a été utilisée pour déterminer la diffusivité apparente du NaCl dans des gels de gélatine et dans des fromages (Gros et Rûegg, 1987 ; Rougier, 2006). Par exemple, Rougier (2006) a observé les transferts monodirectionnels d'eau et/ou de NaCl en accolant une gélatine salée à une gélatine pure ou une génoise. Elle a montré que dans ces systèmes la diffusivité apparente de l'eau diminue lorsque la teneur en matière grasse dépasse un seuil de 30 % ; à l'opposé, alors que la diffusivité apparente du NaCl restait constante. Boudhrioua (2004) a montré que la diffusivité apparente du NaCl est relativement constante dans des gels de gélatine et inférieure à la diffusivité mutuelle sel-eau. En parallèle, la diffusivité apparente de l'eau dépendait de la teneur en eau initiale du gel et l'ajout de NaCl provoquait une augmentation de la diffusivité apparente de l'eau.

*La méthode des cylindres en contact avec une solution (c)*

Elle est semblable à la précédente du point de vue du traitement des mesures mais la condition limite imposée en surface de l'échantillon est fixée par la teneur en solutés dans la solution. Ce traitement repose sur les mêmes hypothèses que celles formulées à propos de la méthode des cylindres accolés. Le dispositif du laboratoire utilisé avec des échantillons de tissu musculaire est pris comme exemple (Figure 14).

Chaque cylindre est placé dans un porte-échantillon. La base du cylindre est mise en contact avec la solution contenue dans un bac de façon à promouvoir des transferts de matière unidirectionnels. Le système est placé dans une enceinte climatisée. La durée des expériences varie de quelques heures à quelques jours. A la fin d'une expérience, le cylindre est découpé en fines tranches de 2 à 3 mm orthogonales à la direction du transfert. On mesure ensuite la concentration en solutés afin d'établir leurs profils de concentration en fonction de la distance par rapport à la surface de contact.

Une solution analytique de la seconde loi de Fick est utilisée pour ajuster ces profils expérimentaux en faisant varier la valeur de D. Dans le cas d'une plaque infinie dans laquelle diffuse du sel, l'équation 3 est utilisée (Bimbenet et Loncin, 1995).

$$\left( \frac{C_{surf} - C(x,t)}{C_{surf} - C_0} \right) = \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos\left(\frac{(2n-1)\pi(1-X/l)}{2}\right) \exp\left[-(2n-1)^2 \frac{\pi^2 D t}{4l^2}\right] \quad (3)$$

Avec  $C_{(x,t)}$  la teneur en sel à l'abscisse x au temps t (kg sel /kg viande),  $C_{surf}$  la teneur en sel «d'équilibre» en surface (kg sel /kg viande), D la diffusivité apparente ( $m^2/s$ ), X la distance par rapport à la surface de marinage (m), l l'épaisseur de l'échantillon (m) et t le temps de marinage (s).

*La méthode de la cellule de diffusion (d)*

Elle a été utilisée par Djelveh et Gros (1989). Il s'agit d'une cellule composée de deux compartiments de même volume séparés par une membrane du matériau à étudier (Figure 13). Le premier compartiment est rempli par la solution tandis que le deuxième contient le même volume d'eau déminéralisée. Les deux compartiments sont agités. Pendant une expérience, le pH ou la concentration du soluté étudié sont enregistrés dans le compartiment 2 à intervalles réguliers.

La diffusivité apparente est déterminée en régime permanent à partir du bilan matière entre les deux compartiments. L'accumulation d'un composé dans le compartiment 2 pendant une période de temps est égale à la masse de ce composé qui a traversé la membrane ; cette masse est égale au produit de la section de passage (S) par la densité de flux (équation 4) qui, en régime permanent peut s'écrire en fonction de la différence de concentration entre les deux compartiments :

$$V_2 \frac{dC_2}{dt} = \frac{D_e (C_1 - C_2) S}{h} \quad (4)$$

$C_1$  et  $C_2$  sont les concentrations dans les compartiments 1 et 2 de la cellule,  $V_2$  est le volume du compartiment 2, S est la surface de la membrane et représente la surface d'échange, h est son épaisseur,  $D_e$  est la diffusivité apparente et t le temps.

La solution de l'équation 4 s'écrit :

$$\ln \frac{C_{10} - 2C_2}{C_{10}} = - \frac{2}{V_2} \frac{D_e S}{h} t \quad (5)$$

$C_{10}$  et  $C_{20}$ , représentent les concentrations initiales dans les compartiments 1 et 2.

Si t est assez court, ce qui signifie que l'on est encore loin de l'équilibre, et par application d'un développement limité de la relation 5, on obtient l'expression de la cinétique de variation de la concentration dans le compartiment 2 en fonction du temps qui permet de déduire  $D_e$ .

$$C_2 = \frac{D_e C_{10} S}{V_2 h} t \quad (6)$$

## 2.4 Les valeurs des diffusivités apparentes dans le tissu musculaire

Lors d'un marinage ou d'un saumurage la diffusion des ions  $Cl^-$  et  $Na^+$  dans la viande est identique (Lebert et Daudin, 2014), Pour cette raison la concentration en NaCl peut être calculée indifféremment à partir du dosage de l'ion chlorure ou sodium.

La valeur de la diffusivité apparente de NaCl dans la viande a été largement étudiée (Djelveh et Gros, 1989 ; Graive *et al.*, 2006 ; Vestergaard *et al.*, 2007 ; Hansen *et al.*, 2008 ; Villacis *et al.*, 2008 ; Siro *et al.*, 2009).

Lebert et Daudin (2014) ont trouvé une valeur de  $D$  du NaCl égale à  $5,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  en utilisant la méthode (c) sur les muscles *Semimembranosus* (SM) et *Semitendinosus* (ST) de bœuf. Djelveh et Gros (1989) ont trouvé la même valeur avec le muscle *Semitendinosus* de bœuf et le muscle *Longissimus Dorsi* de porc pour des disques de 30 mm de diamètre et 3,5 d'épaisseur en utilisant la cellule de la diffusion.

D'autres auteurs ont rapporté des valeurs de coefficients de diffusion du NaCl dans le tissu musculaire. Fox (1980), par exemple, a trouvé un coefficient de diffusion de NaCl de  $2,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  à  $5^\circ\text{C}$  pour le muscle *Longissimus Dorsi* de porc avec une saumure qui contient 180 g/L de NaCl. Vestergaard *et al.* (2007) ont trouvé une valeur de  $D$  égale à  $4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  pour le muscle *Longissimus Dorsi* de porc. Les différences entre les estimations des différents auteurs proviennent, d'une part, du fait que les conditions listées en début de parties 2.3 sont imparfaitement respectées, et d'autre part de la variabilité du produit..

Lebert and Daudin (2014) ont mesuré le profil de pH dans des cylindres de la viande de bœuf en contact des solutions acides (acide acétique plus ou moins concentré) à une de ses extrémités en utilisant la méthode b. Ils en ont déduit des diffusivités apparentes des protons après 2 jours et 6 jours de marinage, respectivement de  $2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  et de  $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ , près de 100 fois inférieures à celle qui est connue en milieu aqueux ( $5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), traduisant les interactions fortes des protons provenant de l'acide de marinage avec la matrice protéique et une probable modification structurale du tissu au cours du temps.

### **3 Le marinage et le saumurage des viandes**

Le marinage et le saumurage sont des procédés traditionnels de conservation des aliments qui consistent à mettre en contact des produits alimentaires tels que des légumes, des fruits ou des produits animaux (viande ou poisson), avec une solution aqueuse contenant le plus souvent du chlorure de sodium comme ingrédient principal. Son pH peut s'écarter nettement de la neutralité dans le cas du marinage. Dans le cas de la viande, le marinage et le saumurage conduisent à des changements physicochimiques et biochimiques importants dus à la migration des ions ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ....) mais aussi à celle des composés solubles (protéines, acides aminés, lactate, phosphates, ...) de la viande vers la solution d'immersion.

Le pH et la teneur en sel sont les deux paramètres qui jouent principalement sur : *i) la qualité sanitaire* du produit en réduisant éventuellement l'activité bactérienne responsable de

l'altération de ces produits à haute teneur en eau, *ii) les rendements massiques* de fabrication liés à la capacité de rétention d'eau du tissu musculaire et au gonflement des cellules. *iii) la tendreté du produit après cuisson* du fait des modifications précédentes et de la fragilisation des protéines myofibrillaires et conjonctives *iv) la flaveur* du produit en modulant les saveurs acide et salée, plus ou moins marquées et typiques des produits marinés et/ou saumurés.

Les synthèses d'Offer et Knight (1988), Gault (1991), Durand (1999), Abi-Nakboul (2006), Puolanne et Halonen (2010) et Goli (2012) ont servi de support à cette partie.

### 3.1 Les différentes techniques et les ingrédients de la saumure

En pratique, il existe différents procédés pour faire pénétrer les ingrédients des saumures ou des marinades dans les muscles ou les morceaux de viande.

Le premier est l'immersion du produit dans la solution, les temps de contact et de diffusion sont alors assez longs car les coefficients de diffusivités apparents du NaCl et des protons sont petits. Cette technique est très souvent utilisée dans les études de laboratoire et, dans l'industrie, elle est donc réservée à des produits de petites dimensions.

Une seconde technique est l'injection de la préparation directement à cœur du produit afin de réduire le temps de fabrication. Ceci se fait au moyen d'injecteuses multi-aiguilles en utilisant des solutions concentrées. Les ingrédients sont alors déposés dans le tissu musculaire selon des lignes d'injection dont la distance est comprise entre 1 et 2 cm. Le contrôle de la quantité de solution réellement injectée se fait par différence de pesée des pièces avant et après injection ; cette mesure sert à régler la pression d'injection. Du fait de l'élasticité du tissu musculaire, une partie de la solution sort et enduit la surface externe.

Dans les deux cas, cette étape est souvent suivie d'un malaxage dans une baratte afin de répartir les ingrédients dans le produit. Enfin une dernière technique consiste à effectuer un attendrissage, avant l'injection de saumure ou le malaxage, au moyen d'un système composé de lames qui cisailent la viande et en particulier les fibres du tissu conjonctif.

Le principal ingrédient d'une saumure est le chlorure de sodium. D'autres ingrédients, tels que des nitrates et des nitrites, sont ajoutés aux produits de viande pour deux raisons principales : (i) ils participent à la formation de la couleur typique des produits de salaison et (ii) ils réduisent le développement de certains micro-organismes (Durand, 1999)

Le marinage acide est réalisé avec de nombreux composés permettant d'abaisser le pH. Des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide lactique et l'acide citrique, sont ajoutés et/ou leurs sels tels que l'acétate de sodium, le citrate de sodium, l'ascorbate de sodium (Sheard *et al.*, 2005), le chlorure de calcium (Pérez *et al.*, 1998). On peut aussi trouver du vin, du vinaigre, des jus ou pulpes de fruits ou d'extraits végétaux et du lait fermenté (Oreskovich *et al.*, 1992 ; Bjorkroth, 2005).

Le marinage peut être réalisé avec des phosphates qui sont ajoutés à la marinade sous différentes formes : phosphate de sodium, triphosphate de sodium, hexamétophosphate de sodium (Xiong, 2005). Ces polyphosphates provoquent une légère élévation du pH (Ergezer et Gokce, 2011) et ont un effet positif sur le pouvoir de rétention d'eau. L'ajout des di et tripolyphosphates a également un effet positif sur la stabilité de couleur et sur la solubilité des protéines myofibrillaires en générale et sur la myosine en particulier (Durand, 1999).

Afin de limiter l'oxydation des lipides et d'aromatiser les produits, on peut aussi ajouter dans les marinades des antioxydants, des conservateurs, des polysaccharides, des protéines de soja hydrolysées, de l'amidon modifié, des épices, des sucres comme le lactose, des alcools et des aromates.

### 3.2 L'effet de marinage sur le pouvoir de rétention d'eau et les variations de volume

La capacité de rétention d'eau est le terme utilisé pour qualifier la capacité du muscle à fixer l'eau. La variation de la teneur en eau se traduit par une variation de volume des échantillons due à des modifications de structure à l'échelle microscopique. Cette propriété est au final déterminante vis-à-vis de certaines propriétés sensorielles de viande : la jutosité, la texture et dans une moindre mesure la saveur.

La rétention d'eau dans le tissu musculaire cru a été expliquée par les forces électrostatiques et osmotiques (Offer et Knight, 1988) en fonction du pH et de la teneur en chlorure de sodium. Puolanne et Halonen (2010) ont repris ces aspects théoriques dans leur revue. La répulsion électrostatique entre les protéines myofibrillaires cause leur éloignement, d'où un gonflement des myofibrilles. Les molécules d'eau remplissent alors l'espace libéré et se lient aux groupements polaires des acides aminés de surface (représentant ~80% des acides aminés) par des forces de van der Waals. En plus du gonflement électrostatique, Offer et Knight (1988) ont suggéré que, dans la viande, la fixation préférentielle de certains ions aux

protéines myofibrillaires, notamment les ions  $\text{Cl}^-$ , entraînerait la répulsion des myofibrilles en engendrant une pression pseudo-osmotique. Cette dernière serait responsable d'un flux d'eau vers les myofibrilles. La rétention d'eau serait limitée par les liaisons moléculaires fortes entre les actomyosines, qu'Offer et Knight (1988) ont nommées 'pression élastique'.

Finalement, dans ces deux théories, la quantité d'eau retenue dans le muscle est fonction de la charge électrique nette des protéines causant leur répulsion, qui augmente la liaison à l'eau, et le nombre et la force des liaisons entre actomyosines qui limitent le gonflement. Par définition, au point isoélectrique (pI), la charge électrique globale de la protéine est nulle. Le pH est alors égal à 5,5. Quand le pH s'éloigne de cette valeur, les protéines se chargent positivement ou négativement, des forces de répulsions entre les protéines apparaissent et entraînent un écartement du réseau protéique, offrant ainsi de la place à l'eau.

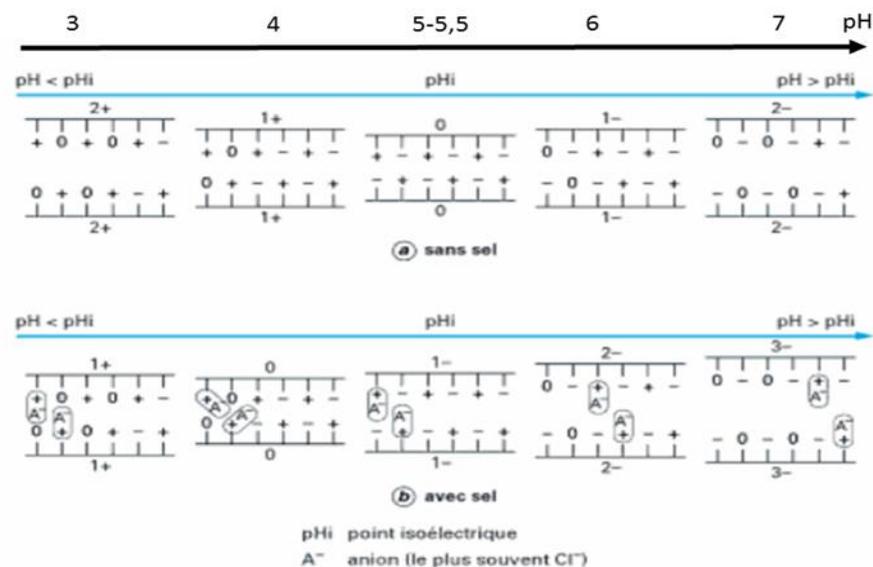


Figure 15 : Représentation schématique de l'influence du pH et du NaCl sur la charge protéique. Tiré de Solignat et Mangin (2003).

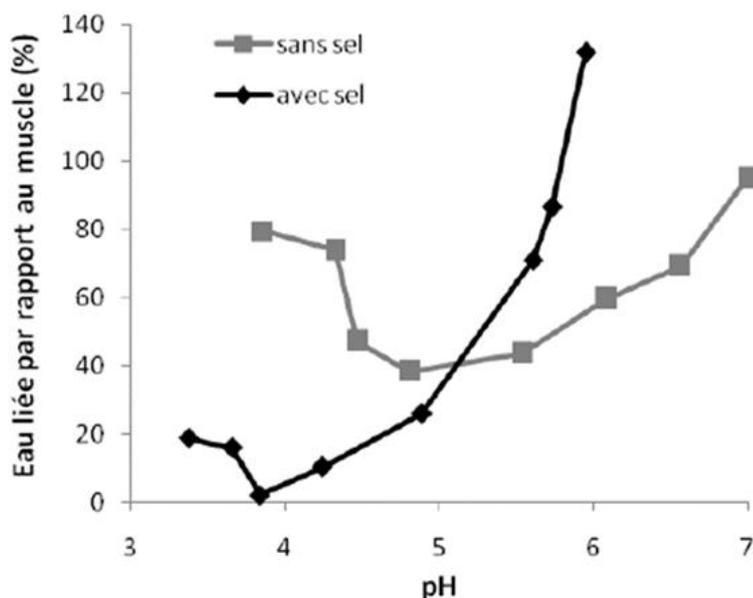


Figure 16 : Influence du pH et du sel (0,22 M) sur le pouvoir de rétention d'eau de la viande de bœuf crue. D'après Hamm (1960), repris notamment par Laroche (1978) et Offer et Knight (1988).

En absence de chlorure de sodium, le minimum de rétention d'eau est donc logiquement atteint au point isoélectrique (Figure 15). De nombreux travaux portant sur divers muscles de toutes les espèces ont confirmé cela en mesurant soit la capacité de rétention d'eau, soit le gonflement. Par exemple, un gonflement maximum d'échantillons de tissu musculaire de bœuf à l'équilibre avec une solution acide a été observé lorsque la viande est à pH 3,5 (Rao *et al.*, 1989). Plus récemment, Yusop *et al.* (2010) ont mariné des filets de poulet dans une solution d'acide citrique à pH de 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4 et 4,2 à 4 °C pendant 30, 60, 120 et 180 minutes. Ils ont montré que ces traitements conduisent à une augmentation du poids final de l'ensemble des échantillons traités. Cette augmentation était plus importante à pH 3,8, 4 et 4,2.

L'effet du chlorure de sodium dépend de sa concentration dans la saumure. Par exemple, Villacís *et al.*, (2008) ont observé un gonflement du tissu musculaire quand la concentration de NaCl est supérieure à 50 g/L. Graiver *et al.* (2006) ont montré que, pour des concentrations de NaCl entre 5 et 200 g/L, après un saumurage pendant 48 heures, le gonflement des fibres et la capacité de rétention d'eau étaient maximum entre 70 et 140 g/L. Alors qu'à des concentrations plus élevées que 200 g/L en NaCl le phénomène s'inverse : les fibres diminuent de volume et le tissu musculaire perd son eau. L'ajout de chlorure de sodium dans une viande diminue son point isoélectrique (Figure 16) en modifiant la répartition des

charges électriques sur les chaînes protéiques par fixation préférentielle des ions  $\text{Cl}^-$  sur les groupements positifs des protéines (Figure 15). Dans la gamme de pH ultime des viandes, à savoir 5,5 à 5,7, l'ajout de sel augmente donc la capacité de rétention en eau (Figure 16) par rapport à une viande non salée. Cet effet a été constaté pour d'autres sels que le chlorure de sodium. Par exemple, Pérez *et al.*, (1998) ont observé une augmentation de poids de l'ordre de 8% avec des échantillons de 100 g de viandes de bœuf, de cheval, de poulet et de lapin suite à une immersion dans une solution de chlorure de calcium à deux concentrations, 75 ou 150 mM, pendant 48 heures à 4°C.

Les effets conjugués du pH et du sel sur la capacité de rétention d'eau du tissu musculaire sont résumés sur la figure 16 pour une teneur en sel égale à 0,22 M (équivalent à une teneur en sel égale à 1,3 % dans la viande). Il est toutefois difficile de tirer une règle générale permettant de prédire la 'capacité de rétention d'eau' et le 'gonflement' en fonction de ces deux paramètres pour diverses teneurs en sels car dans la plupart des études relatives au marinage et au saumurage des viandes c'est le pH des marinades, et non celui des échantillons qui est utilisé pour faire des comparaisons.

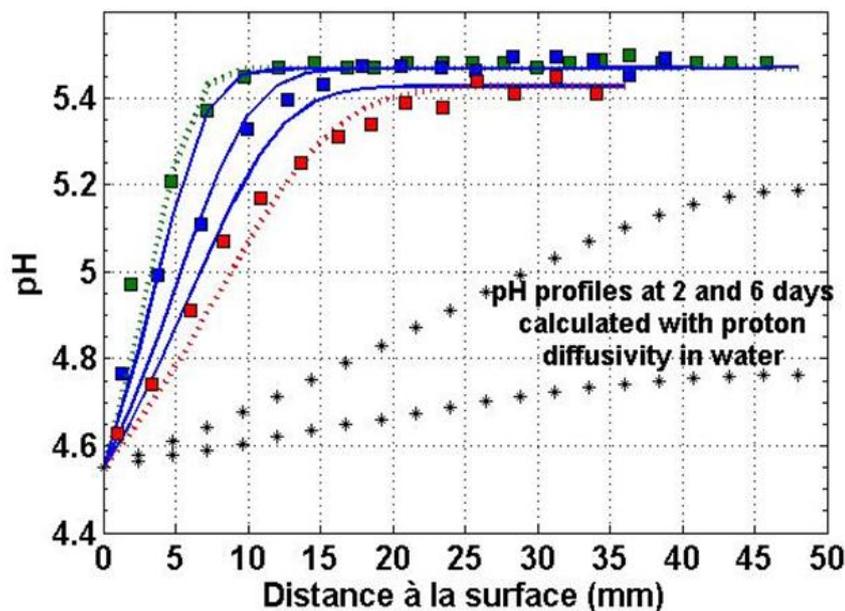


Figure 17 : Profils d'évolution du pH en fonction du temps pour des échantillons de *Semimembranosus* SM en contact avec une solution d'acide acétique 0,01 M (pH = 3,39). Mesures aux jours 2 (vert), 4 (bleu) et 6 (rouge). Les étoiles montrent les profils de pH à 2 et 6 jours si la diffusivité apparente de proton était égale à celle dans l'eau. Tiré de Lebert et Daudin (2014).

De plus, à quelques exceptions près, le pH des échantillons n'était probablement pas homogène compte tenu de la taille des échantillons et des temps d'immersion. En effet, les profils de pH présentés sur la figure 17 (Lebert et Daudin, 2014) obtenus par immersion dans une solution d'acide acétique à pH 3,4 en fonction du temps pour des échantillons du muscle *Semimembranosus* de porc montrent que le pH est loin d'être homogène après plusieurs jours de marinage. Enfin, chaque étude de marinage correspond à un taux de sel particulier.

### 3.3 L'effet du marinage et du saumurage de la viande sur la composition chimique et sur la structure de la viande

La viande est caractérisée par la présence de substances ayant un pouvoir tampon (phosphates, protéines, lactate,...) ; elles agissent comme accepteurs ou donneurs de protons. Les substances tampons limitent les modifications de pH provoquées par l'ajout d'acides organiques ; c'est aussi la cause de l'hétérogénéité de pH au sein des échantillons évoquée précédemment lorsque le temps de traitement est insuffisant. Lors du marinage, le pH diminue et des changements irréversibles dans les protéines se produisent, ce qui influence le pouvoir tampon de la viande.

Tableau 5 : Composition des filets de poulet (g/100 g) avant et après marinage-malaxage dans une solution de chlorure de sodium, de sucres, de farine de blé et de protéines de lait pendant 2,5 h (Barbanti et Pasquini, 2005).

Tranche de poitrine de poulet	% eau (g/100 g)	% de protéines totales (g/100 g)	% de lipides totales (g/100 g)	% de cendres totales (g/100 g)
Avant marinage	76,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	21 ± 1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
Après marinage	81 ± 1 <sup>b</sup>	16 ± 2 <sup>b</sup>	1 ± 0,7 <sup>a</sup>	2 ± 0,2 <sup>b</sup>

De plus, au cours du traitement, l'eau et les ions présents dans la solution migrent dans la viande et certains composés solubles présents dans la viande migrent vers la solution de marinage. Gault (1985) a mis en évidence une perte de solutés présents initialement dans la viande tels que des peptides, des protéines, des matières minérales et du lactate. Barbanti et Pasquini (2005) ont quantifié les variations de teneurs en eau, protéines et lipides lors du marinage de viande de filets de poulet dans une solution de chlorure de sodium, de sucres, de farine de blé et de protéines de lait : les mesures relatives à la viande crue indiquent que les

teneurs en eau, en minéraux et en protéines totale sont significativement différentes de celles de la viande avant marinage (Tableau 5).

*Action de l'acide sur la texture de la viande*

Selon la synthèse bibliographique réalisée par Abi-Nakboul (2006), l'acidification provoque la rupture des liaisons intermoléculaires qui réticulent le collagène, ce qui peut modifier profondément son comportement mécanique et diminue sa résistance à la dénaturation thermique lors de la cuisson. Par ailleurs, Aktas (2003) a montré que le collagène était renforcé et stabilisé par le renforcement des liaisons hydrogènes pour des forces ioniques élevées ( $> 0,7$  M).

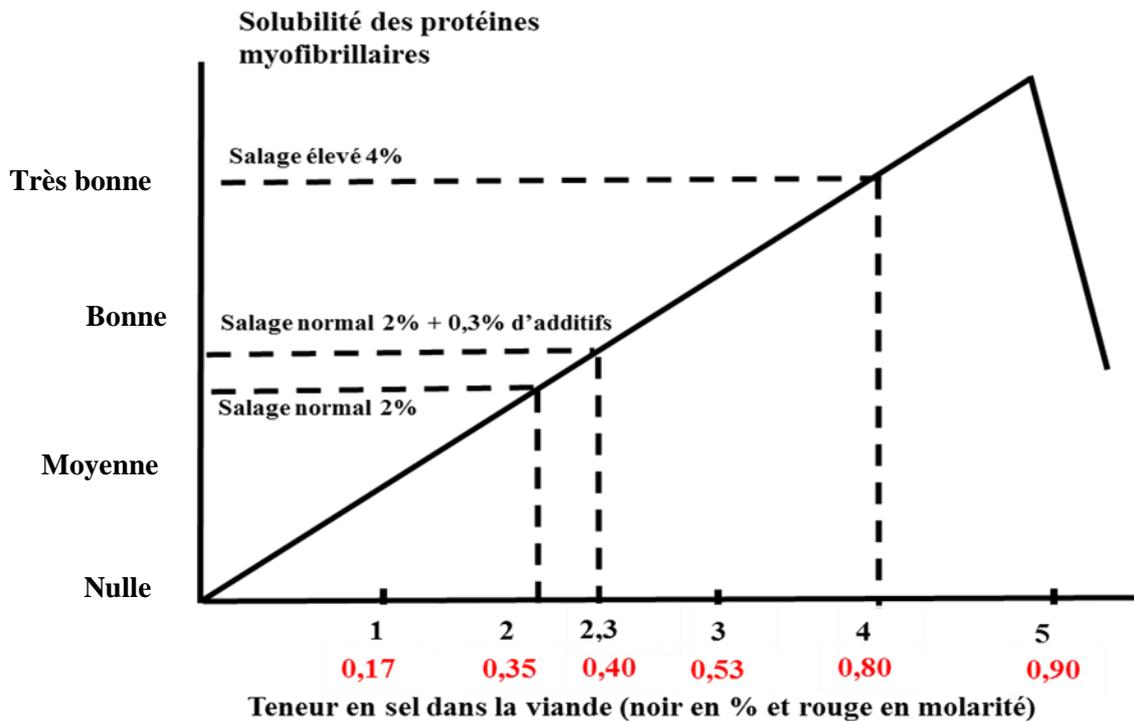


Figure 18 : Influence de la teneur en sel dans la viande sur la solubilité des protéines myofibrillaires (Wirth, 1974).

Toutefois, en comparant des échantillons de muscles de bovin contenant des quantités très différentes de tissu conjonctif Gault (1991), a montré qu'il est nécessaire que le pH du tissu musculaire descende au-dessous de 4,5 pour que le tissu conjonctif soit significativement affecté. Il a aussi montré à partir de coupes histologiques que c'est le *perimysium* qui est affecté et pas l'*endomysium* qui entoure les fibres musculaires. Lorsque le pH est abaissé brutalement juste après l'abattage, il y a une accélération des réactions protéolytiques, affaiblissant les fibres musculaires en favorisant l'activité des protéases endogènes (Berge *et al.*, 2001), en particulier les protéases acides des lysosomes (cathepsines). Toujours selon la synthèse de Goli (2012), l'acidification provoque une dépolymérisation et une solubilisation des filaments épais de myosine, qui se traduit par un relâchement des structures de maintien transversal des fibres. Ce relâchement est en synergie avec l'augmentation des forces de répulsion électrostatiques pour favoriser l'hydratation.

#### *Action combinée du sel et de l'acide sur la texture de la viande*

Lorsque du sel et de l'acide sont ajoutés simultanément, la situation est très dépendante du pH que l'on atteint durant le traitement et dépend des phénomènes qui ont été décrits à propos de la capacité de rétention d'eau et du gonflement du tissu musculaire.

La solubilisation des protéines myofibrillaires due à l'augmentation de la force ionique, elle-même provoquée par l'ajout de NaCl, joue certainement aussi un rôle. Toutefois il est difficile de distinguer son effet de celui du gonflement déjà décrit. En fait l'action du NaCl dépend de la concentration en sel dans la solution d'immersion. Par exemple, des échantillons traités avec une concentration en sel élevée 8 % (m/m) sont plus fermes que ceux traités avec 2 % (m/m) de sel, dû au fait que les teneurs élevées en NaCl favorisent un aspect plus compact des structures myofibrillaires.

### **3.4 L'effet du marinage et du saumurage de la viande sur les modifications biochimiques**

Le marinage et le saumurage peuvent entraîner des modifications biochimiques dans la viande crue avec des répercussions sensorielles et nutritionnelles.

La solubilisation des protéines myofibrillaires est fortement dépendante de la teneur en NaCl. La courbe moyenne présentée sur la figure 18 qui a été établie à partir d'un ensemble de résultats de travaux anciens sert souvent de référence. La solubilité de ces protéines est très faible pour une teneur en sel nulle, elle augmente d'une façon linéaire avec la teneur en sel.

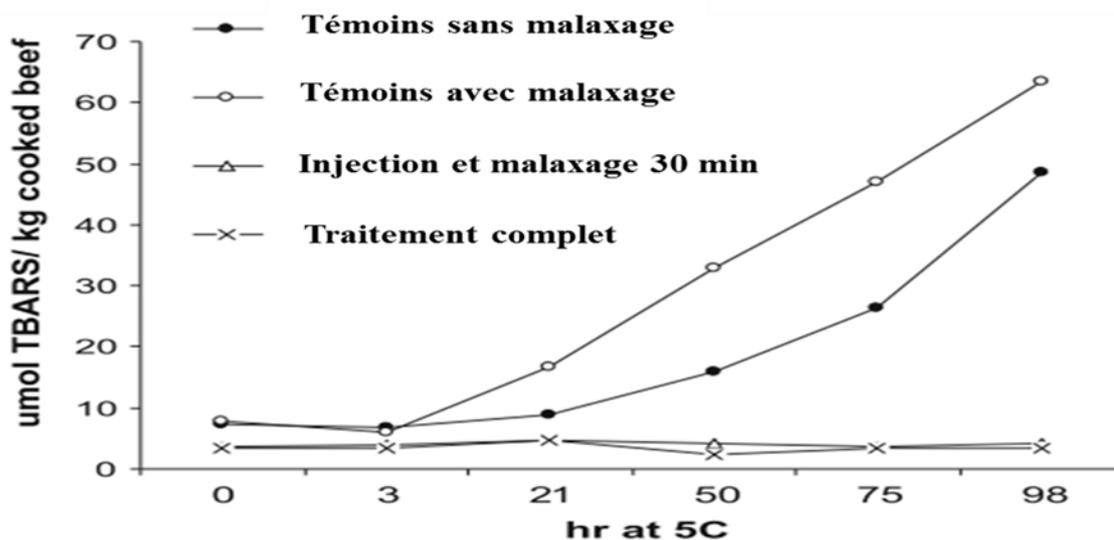


Figure 19 : Formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) indicatrices de l'oxydation des lipides après un ajustement du pH pendant le stockage à 5°C. Résultats obtenus pour des échantillons témoins avec et sans malaxage, pour des échantillons injectés par une solution d'acide citrique 300 mM, puis malaxés dans une solution d'acide citrique 300 mM pendant 30 min (avec pH final 3,5) et pour des échantillons ayant subi un traitement complet (échantillons traités à l'acide tel injectés avec par du tri-polyphosphate de sodium 250 mM puis malaxés dans du tri-polyphosphate de sodium 250 mM pendant 30 min (avec un pH final de 5,5). Tiré de Ke *et al.* (2009)

Cette augmentation atteint une valeur maximale à une molarité égale à 0,9 M (équivalent à une teneur en sel égale à 5 % dans la viande). La solubilité diminue à partir de cette molarité (Wirth, 1974). Cependant, à notre connaissance, la variabilité de cette courbe en fonction de l'animal et du type de muscle n'est pas connue.

La plupart des études relatives au marinage concernent l'oxydation des lipides. Sallam *et al.*, (2007) ont étudié l'effet du marinage sur l'oxydation des lipides de filets de Saury Pacifique en mesurant la valeur de l'index TBA au cours de la conservation. Pour les poissons n'ayant subi aucun traitement cette valeur était égale à 0,37 (mg MDA/kg de viande). Après un stockage pendant 70 jours à 4°C sous vide, la valeur était égale à 2,82 et 1,61 pour les échantillons traités dans les saumures contenant respectivement, (0 % d'acide acétique + 12 % NaCl) et (3 % d'acide acétique + 12 % NaCl).

Le sel est pro-oxydant sur les lipides pour des teneurs en sel dans la viande comprises entre 0,7 et 2,5 % (Lee *et al.*, 1997 ; O'Neill *et al.*, 1999 ; Hernandez *et al.*, 2002 ; Devatkal et Naveena, 2010 ; Gheisari et M, 2010). Ceci est dû à l'action inhibitrice du sel sur les enzymes

anti-oxydantes que sont la catalase, le superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GSH-Px). Ces enzymes anti-oxydantes de la viande s'opposent à l'action des radicaux libres ( $O_2^\circ-$ ,  $OH^\circ$ ) ou des produits de peroxydation ( $H_2O_2$ ) sur les protéines et les lipides. Le sel peut aussi contenir des traces de métaux lourds pouvant participer à l'oxydation. Le sel peut au contraire dans certains cas protéger les lipides contre l'oxydation (Sarraga, Carreras et Regueiro, 2002). Cet effet protecteur serait dû à une diminution de la solubilité de l'oxygène dans les milieux à haute force ionique.

Le changement de l'état physico-chimique des protéines a été bien étudié lors de la cuisson de la viande (Haak *et al.*, 2006 ; Chelh *et al.*, 2006 et 2007 ; Astruc *et al.*, 2007 ; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008 ; Gatellier *et al.*, 2009 ; Gatellier *et al.*, 2010 ; Promeyrat *et al.*, 2010 a et b), lors de l'irradiation (Rowe *et al.*, 2004), et lors du stockage avec un niveau élevé d'oxygène (Lund *et al.*, 2007 ; Zakrys *et al.*, 2008). Cependant peu d'informations sont disponibles sur le saumurage et le marinage. Ce manque d'information nous a conduit à approfondir cette question pendant mon étude.

Il est raisonnable de supposer que l'action du sel est semblable sur l'oxydation des lipides et des protéines. En effet, Wang *et al.* (2011) ont montré que l'étape de salage lors de la fabrication du jambon sec (3,5 à 5,4 % de sel) entraîne une oxydation protéique.

Ke *et al.* (2009) ont recherché une solution technologique permettant de limiter l'oxydation des lipides lors d'un marinage acide en combinant ce dernier avec un malaxage des échantillons de  $3 \times 3 \times 2$  cm prélevés des muscle *Semitendinosus* de bœuf en utilisant l'acide citrique avec le tripolyphosphate (TPP). Ils ont montré que l'acide citrique est très efficace pour améliorer la texture tout en limitant l'oxydation des lipides par rapport aux échantillons témoins (Figure 19).

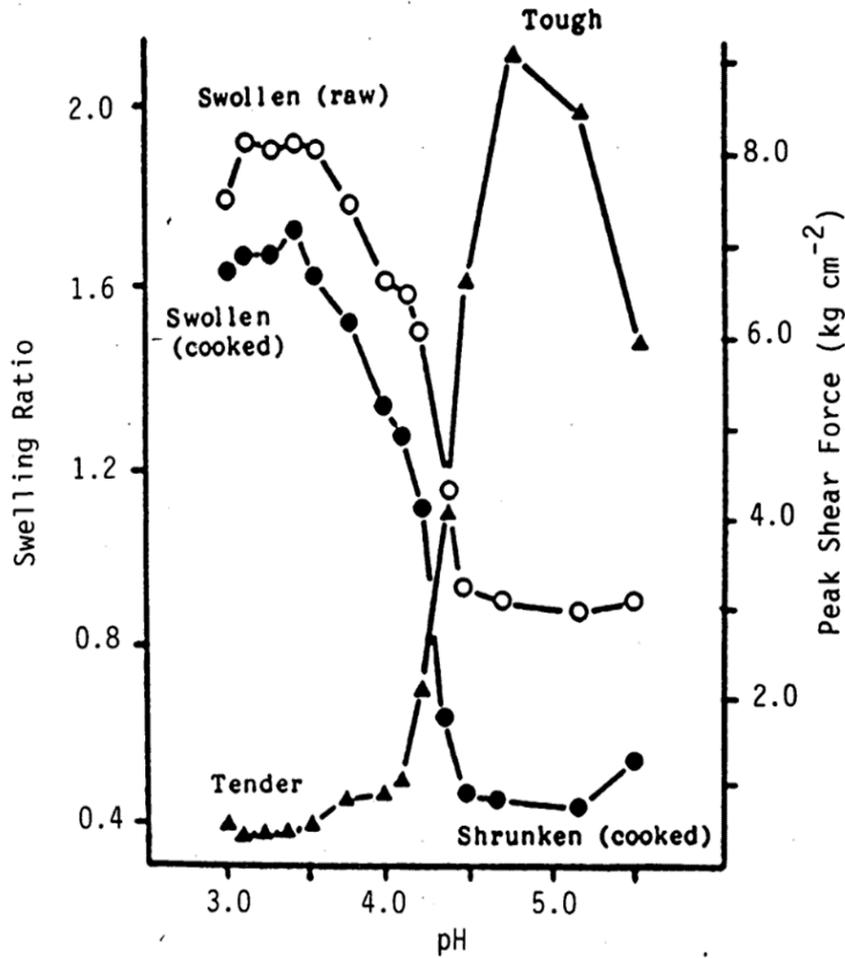


Figure 20 : Effet du marinage et de la cuisson sur le ratio de gonflement, estimé par la variation de masse, et sur la tendreté des échantillons de muscle *Triceps Brachii* de bœuf, en fonction du pH de ces échantillons modulé par immersion dans des solutions d'acide acétique. Tiré de Gault (1991)

### 3.5 L'effet de marinage et saumurage de la viande sur le rendement de cuisson

Le gain en eau lors du marinage se maintient lors de la cuisson. La figure 20 montre que pour une large gamme de pH du tissu musculaire les courbes de 'ratio de gonflement' déduites des mesures de masse des échantillons après marinage ou après cuisson sont parallèles. Ceci suggère que le rendement de cuisson est peu modifié par une variation du pH. Sheard et Tali (2004) se sont intéressés au rendement de la viande de porc marinée, évalué après cuisson pour deux muscles *Longissimus thoracis* et *lumborum*. Ils ont testé sept solutions de marinage : NaCl (5 %), polyphosphate (5 %), bicarbonate (3 %) et leurs différentes combinaisons. Chaque muscle a été divisé en huit morceaux, ces derniers ont été immergés pendant 24 h à 1°C dans les solutions. Tous les échantillons présentaient un rendement supérieur à celui du témoin (immergé dans l'eau) à l'exception de celui traité par la solution de chlorure de sodium qui ne différait pas significativement du témoin. La combinaison optimale était (tripolyphosphate de sodium à 5 % et bicarbonate de sodium à 3 %). Le rendement de cuisson qui était de 70 % pour les échantillons témoins, était de 85 % pour les échantillons traités avec cette combinaison.

Bombrun (2014) a montré que la présence de sel entraîne une diminution des pertes de masse à la cuisson. Mais, dès que du sel est ajouté, l'effet de sa concentration sur la perte de masse est négligeable (Figure 21). La température est le facteur prépondérant sur la perte de masse à la cuisson, et masque celui des autres facteurs dès qu'elle dépasse le seuil de contraction du collagène (60-70°C). Ainsi il serait possible de réduire la teneur en sel dans le jambon cuit jusqu'à 0,9 % sans affecter fortement le rendement de l'opération de cuisson.

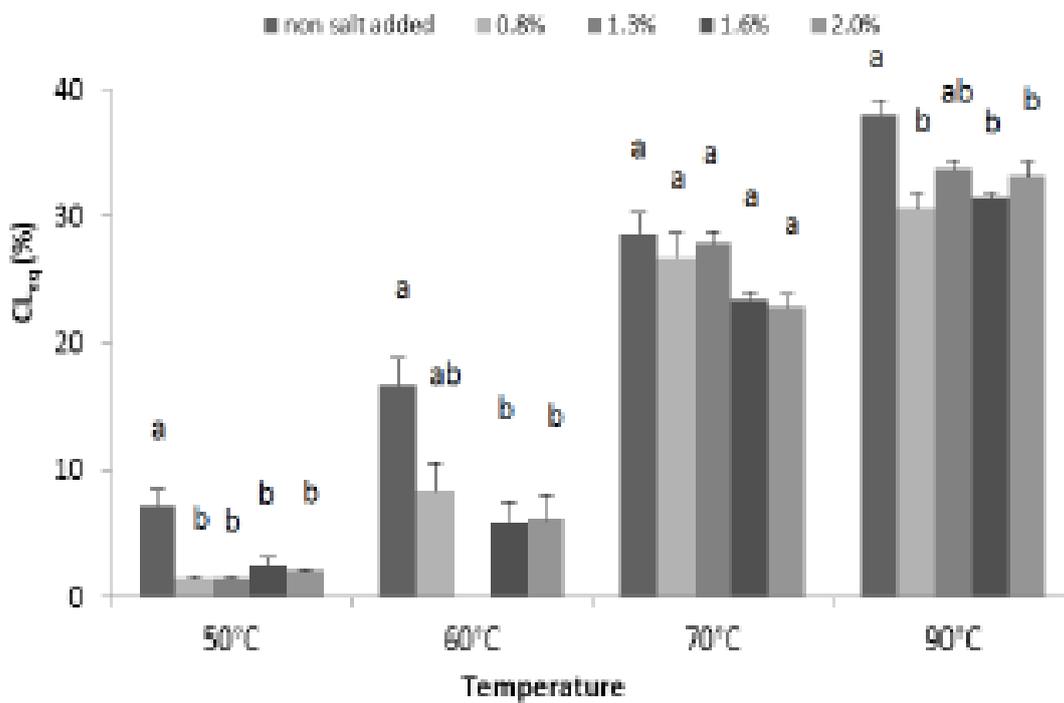


Figure 21: Influence de la teneur en sel dans la viande sur la perte de masse maximale à la cuisson de cubes de muscle *Semimembranosus* de porc (30 x 30 x 30 mm). Cuisson en emballage sous vide dans un bain d'eau à 50°C, 60°C, 70°C ou 90°C. Les lettres indiquent des valeurs significativement différentes ( $p < 0,05$ ) à une température de cuisson constante. Bombrun (2014)

### 3.6 L'effet de marinage et saumurage de la viande sur la qualité organoleptique

#### *Amélioration de la tendreté et jutosité*

De nombreuses études ont cherché à évaluer l'impact d'un marinage, avec ou sans sel, sur la tendreté en évaluant cette dernière, soit par un jury de dégustation, soit par la force de cisaillement. Les plus récentes sont évoquées ci-dessous. Il est toutefois difficile de tirer de cet ensemble d'études un enseignement général. Les conclusions de Gault (1991) sur les mécanismes fondamentaux à la base de cet attendrissement constaté après cuisson, étayées sur des travaux plus anciens restent d'actualité :

- L'attendrissement constaté après cuisson résulte principalement du gonflement des fibres avant cuisson, ce qui permet à ces dernières de résister à la contraction du tissu conjonctif qui les entoure pendant la cuisson,
- Du pH ultime (environ 5,5) jusqu'à un pH égal à 4,3 la variation de volume du tissu musculaire est dominée par celle des fibres, elle-même causée par les phénomènes évoqués au paragraphe 3.2,
- La variation de volume du tissu musculaire cru diffère d'un muscle à un autre sur la plage de pH allant de 5,5 à 5, mais elle est semblable pour de nombreux muscles de bovins ayant une teneur en tissu conjonctif variable au-dessous de pH 5,
- Pour des pH inférieurs à 4,3 une proportion du *perimysium* s'hydrolyse plus facilement lors de la cuisson, réduisant ainsi sa contraction.

Ergezer et Gokce (2011) ont montré que des marinages alcalins (phosphates, augmentation de pH de 0,4) ou acides (acides organique, réduction de pH de 1,2) d'échantillons de viande de dinde, en présence de sel et suivis d'un malaxage, permettent de réduire sensiblement la force de cisaillement après cuisson par rapport à un témoin traité avec de l'eau distillée.

Sheard et Tali (2004) et Ke *et al.* (2009) ont montré qu'un traitement acide pendant 20 h permet de diminuer la force de cisaillement mesurée après la cuisson. Ils ont aussi montré que l'acide citrique est plus efficace que l'acide acétique ou lactique.

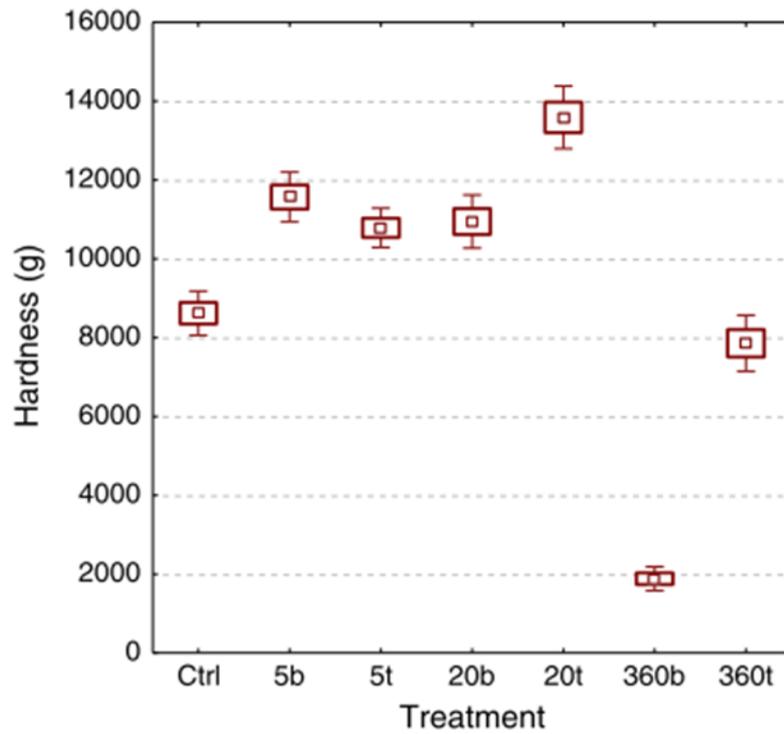


Figure 22 : Effet du temps d'immersion et du type de solution sur la dureté de la viande marinée avant la cuisson, évalués par analyse du profil de texture. Ctrl : viande non marinée cuite (contrôle) ; 5, 20 et 360 sont les temps d'immersion, b : solution binaire (eau-acide acétique) et t : solution ternaire (eau-acide acétique-sel) (Goli *et al.*, 2012).

Burke et Monahan (2003) ont montré que lors du marinage dans du jus de citron à 31% (w/w), qui abaisse le pH de la viande à 3,1, les proportions de collagène soluble par rapport au collagène total dans deux types de muscle *Psoas major* (PM) et *Semimembranosus* (SM) de bœuf, initialement égales à 13,5 et 4 % , augmentent à 34 et 24 %, respectivement.

Goli (2012) a immergé des cubes (1,2 cm d'arrête) de filets de dinde pour des temps allant de 5 à 20 ou 360 minutes, dans une solution soit ternaire contenant de l'eau, du NaCl (0,25 M) et de l'acide acétique (0,25 M), soit binaire, ne comprenant que de l'eau et de l'acide acétique (0,25 M). Il a trouvé que la baisse du pH, indépendamment de l'imprégnation en sel, provoque un durcissement des échantillons après cuisson, dès les premières minutes d'immersion. Pour des durées plus importantes, mais uniquement en absence de sel, il a aussi observé un attendrissement significatif par rapport au témoin non mariné (Figure 22).

Zochowska-Kujawska *et al.* (2012) ont mariné à 4°C des échantillons de 10 x 10 x 5 mm de muscle *Longissimus* de cerf dans une solution contenant du vin rouge, du kéfir, du jus de citron et du jus d'ananas. Après marinage, les échantillons étaient cuits dans de l'eau à 85°C, jusqu'à ce que la température à cœur atteigne 68°C. Par comparaison à un témoin, les dégustations ont montré qu'après 7 jours de marinage, la dureté de muscle avait diminué de 19 à 50 % et que la jutosité était nettement améliorée. Les auteurs ont interprété la grande variation de dureté par les différences de teneur en calcium et de pH entre les saumures (3,5 à 5,0 dans la viande en fin de traitement) qui modulaient l'activité protéolytique des cathepsines.

Pérez *et al.* (1998) ont observé une amélioration de la tendreté et de la jutosité, jugée par un jury de dégustation, après marinage d'échantillons de viandes de quatre espèces (bœuf, cheval, poulet et lapin) dans une solution de chlorure de calcium.

#### *Amélioration et de la flaveur et de la couleur*

L'effet du marinage sur la flaveur dépend principalement de la composition de la marinade, en particulier des aromates plus que du pH et de la teneur en sel. Il n'est donc pas possible de dégager des règles générales à partir des nombreuses études technologiques qui ont été faites à cause de la grande diversité des ingrédients utilisés.

L'étude de Scanga *et al.*, (2000) peut être citée comme exemple. Les auteurs ont cherché à optimiser la composition d'une marinade pour de la viande bovine en modulant les quantités de chlorure de calcium, de chlorure de sodium, de protéines de soja, de maltodextrine, d'épices et d'aromates.

Ils ont montré que le chlorure de calcium apporte de l'amertume mais que celle-ci peut être masquée par les autres ingrédients. On peut aussi évoquer l'étude de Sindelar *et al.*, (2003) qui ont essayé d'optimiser des marinades contenant du bicarbonate de sodium et du triphosphate de sodium en modulant leurs concentrations et le volume de marinade, dans le but de réduire ou d'éliminer des saveurs atypiques, qui sont essentiellement l'arôme métallique et l'arrière-goût métallique et aigre.

Yusop *et al.*, (2010) ont montré qu'une marinade acide pendant 180 minutes améliore la saveur des pièces de poitrine de volaille et conduit à une couleur plus intense après cuisson.

### 3.7 L'effet de marinage et saumurage de la viande sur la durée de conservation

La réduction du pH et l'ajout de sel contribuent à la stabilisation des aliments en réduisant la croissance et l'activité bactérienne. Le traitement acide agit sur les bactéries principalement par réduction du pH (Figure 23).

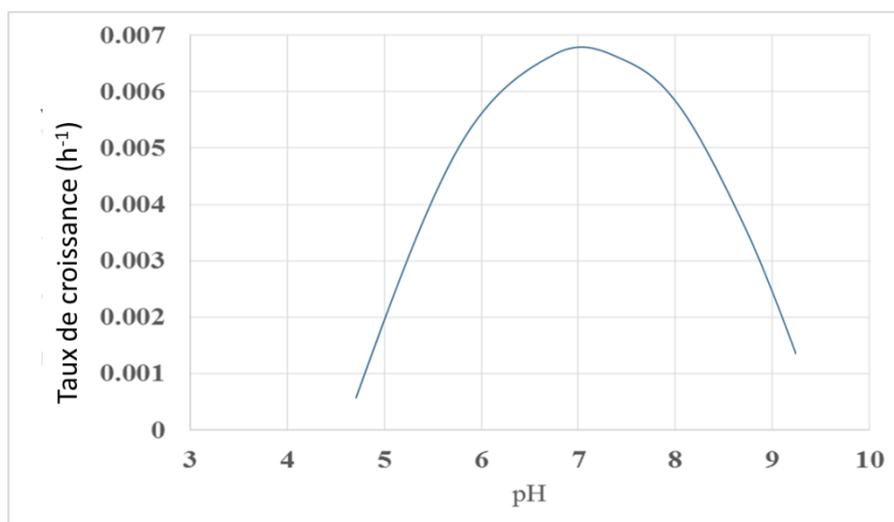


Figure 23 : Effet du pH sur le taux de croissance de *Listeria monocytogenes* Scott A à 30°C (Petran et Zottola, 1989).

Une acidification à des pH inférieurs à 4,5 permet d'inhiber le développement des principaux germes pathogènes. Le marinage permet ainsi de prolonger la durée de conservation de produits carnés de quelques semaines à quelques mois (1-3) au froid (4°C) (Knockaërt, 1989). La figure 23 montre les valeurs approximatives du taux de croissance de *Listeria monocytogenes* au-dessus de cette valeur limite de pH. Il apparaît clairement qu'un

marinage alcalinisant est pénalisant si le pH reste inférieur à 7, ce qui généralement le cas lors de l'ajout de polyphosphates.

Drosinos *et al.* (2006) ont étudié l'effet du lactate de sodium, de l'acétate de sodium et du sorbate de potassium sur la croissance microbienne d'un produit à base de viande cuite, le « Pariza », pendant la conservation à 4°C. Ils ont observé que l'activité antimicrobienne la plus élevée dans le cas d'une combinaison de lactate de sodium (2 %, 3 % ou 4 %), d'acétate de sodium (0,5 %) et de sorbate de potassium (0,15 %) avec pour conséquence une extension de la durée de conservation de 10 jours. Sallam *et al.* (2007) ont montré qu'ajouter 2% ou 3% d'acide acétique à une saumure contenant 12 % de NaCl permet de retarder la croissance microbienne dans le poisson de Saury, lors d'un stockage à 4°C, avec pour conséquence de faire passer la durée de conservation de 60 à 90 jours.



Figure 24 : Exemple d'une baratte industrielle 0,8 x 1,2 x 1 m et charge maximum 2800 litres.

Tiré de (<http://www.avec nord.com/> )

## 4 Le malaxage de la viande

### 4.1 Définition et technologie du malaxage

Le malaxage de la viande est une opération mécanique encore appelée barattage qui consiste à malaxer, ou masser, des muscles ou des morceaux de viande destinés à la cuisson dans une machine industrielle appelée baratte (Figure 24). En France ce procédé est particulièrement important dans le cas de la fabrication du jambon cuit.

Le malaxage se pratique souvent sous vide. Le principe est de faire tourner la baratte pendant 1 à 24 heures, à raison de plusieurs tours par minute, pour malaxer et mélanger les morceaux ; les pales, qui sont disposées sur la paroi intérieure de la baratte, font remonter ces morceaux jusqu'en haut et ces derniers chutent par gravité sur ceux qui sont présents dans le bas de la cuve. Comme dans le cas du saumurage-marinage il existe deux façons de procéder en fonction de la taille des morceaux : soit on place ensemble la viande et la saumure-marinade en début d'opération, et on fait tourner jusqu'à ce que la marinade soit absorbée, soit on malaxe la viande après injection avec une injecteuse multi-aiguilles, en particulier pour les pièces de taille importante. Les marinades utilisées dans les machines à injecter doivent être très fluides et ne pas contenir de particules en suspension car elles risqueraient d'obturer les conduits des aiguilles d'injection ou d'adhérer à la surface de ces aiguilles, ce qui poserait des problèmes d'hygiène et de nettoyage

Cette opération est effectuée préalablement à la cuisson dans le but d'améliorer la pénétration et l'homogénéisation spatiale des ingrédients dans la viande. Le traitement mécanique subi par les morceaux est connu pour provoquer aussi des changements biochimiques et histologiques qui améliorent la capacité de rétention d'eau et favorisent la solubilisation des protéines myofibrillaires par le sel puis leur extraction à la surface des morceaux. Ces changements vont affecter le rendement de cuisson, la tenue de tranche et les qualités sensorielles de produit. Toutefois, il n'existe à notre connaissance aucune étude ayant cherché à caractériser ce traitement mécanique ; ceci rend difficile la comparaison des résultats des études entre elles. Bien que les phénomènes précédents ne soient pas indépendants nous les examinerons successivement.

Tableau 6 : Les différentes études citées dans ce chapitre avec les différentes conditions de malaxage.

Référence	Type de baratte	Capacité de baratte	Vitesse de rotation tour/min	Repos	Temps de malaxage	Type de muscle	Types d'échantillons	Vide
Krause <i>et al.</i> , 1978	Pilote	50 kg	12	-	18 h	Muscles de jambon	Muscles entiers	-
Siegel <i>et al.</i> , 1978	Pilote	45 kg	3,5	non	1, 2, 4, 8 et 24 h	Muscles de jambon	Pièces de 0,25 kg	-
Theno <i>et al.</i> , (1978)	Pilote	45 kg	3,6	-	1, 2, 4, 8 et 24 h	Muscles de jambon	Pièces de 0,5 kg	-
Solomon <i>et al.</i> , 1980	Industrielle	-	-	oui	24 h	<i>Biceps femoris</i> , <i>Quadriceps</i> et <i>Semimembranosus</i> de porc	Muscles entiers	Altérence avec et sans sous-vide
Gillett <i>et al.</i> , 1981	Pilote	50 kg	5	oui	4, 8, 12, 16, 20 et 24	Muscles de jambon	Muscles entiers	-
Olkiewicz <i>et al.</i> , 1995	Industrielle	-	19	oui	-	Muscles de jambon	Muscles entiers	-
Dzudie <i>et al.</i> , 1999	Industrielle	-	28	-	2, 4 et 6 h	Arrière de jambes de chèvres	Pièces de 0,7 kg	-
Ripoche, 2000	Pilote	200 L	7,5	oui	8 h	<i>Semimembranosus</i> de porc	Cubes de 80 g	Oui
Dolata <i>et al.</i> , 2004	Industrielle	2000 kg	6	non	7 h	Muscles de porc	Muscles entiers	-
Pietrasilc et Shand, 2004	Industrielle	-	8,5	oui	2 et 16 h	<i>Semimembranosus</i> de bœuf	Pièces de 0,7 kg	Oui
Szerman <i>et al.</i> , 2007	Pilote	45 kg	2,5 et 5	-	1.5 et 3 h	<i>Semitendinosus</i> de bœuf	Muscles entiers	Oui
Siro <i>et al.</i> , 2009	Industrielle	-	7	-	30, 90 et 180 min	<i>Longissimus dorsi</i> de porc	Pièces de 5x5x3 cm	Oui
Bombrun, 2014	Pilote	200 L	7,5	oui	15 h	<i>Semimembranosus</i> de porc	Des cubes de 3 cm	Oui

Les différentes études technologiques citées dans cette partie ont été faites au moyen de barattes industrielles ou pilotes dont les caractéristiques de conception (dimensions, taux de charge....) et les conditions d'utilisation principales sont indiquées dans le tableau 6. Il apparaît que ces caractéristiques sont très variables et ne sont pas toujours complètement décrites, ceci rend encore plus difficile la comparaison des résultats de ces études entre elles. Toutefois les parties suivantes tentent de faire ressortir les tendances principales relatives aux effets du malaxage.

#### 4.2 L'effet du malaxage sur les modifications structurales et la pénétration des ingrédients

Le malaxage facilite la pénétration des ingrédients, en particulier du sel qui est l'ingrédient principal des marinades et des saumures. Nous pouvons estimer cet effet en examinant la valeur de la diffusivité apparente (D) qui rend compte de la rapidité de l'homogénéisation de sa distribution spatiale dans la viande.

Siro *et al.* (2009) ont comparé la valeur de référence de D estimée lors d'un saumurage statique, à celles estimées lors de saumurages accompagnés d'un traitement mécanique. Celui-ci était réalisé soit avec des ultrasons de puissance, soit dans une baratte industrielle (Tableau 6). Dans ce dernier cas la saumure avait une concentration de 40 g/L et le rapport du poids de la viande par rapport au poids de la saumure était, comme en pratique, égal à 0,1. Dans ces conditions particulières, D est 17 fois plus grand avec le malaxage :  $D = 2,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour le saumurage statique et  $D = 42 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour des échantillons malaxés. Pour le marinage avec ultrasons, la valeur de D s'accroît régulièrement avec le niveau de puissance des ultrasons : D varie de  $4,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  à une puissance de  $2 \text{ W/cm}^2$  jusqu'à  $30 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la puissance atteint  $4 \text{ W/cm}^2$  (Figure 25)

L'examen histologique des échantillons a révélé que dans tous les cas le traitement mécanique entraîne une augmentation de l'espace entre les fibres musculaires par rapport aux échantillons saumurés sans traitement mécanique ; toutefois ce descripteur de la structure n'a pas été quantifié. D'après l'interprétation de Siro *et al.* (2009), cet espace permettrait à l'eau de rentrer plus facilement dans le tissu musculaire provoquant ensuite le gonflement des fibres musculaires. Cet effet a été aussi constaté par Theno *et al.* (1978) après malaxage, dans une petite baratte (3 tours/min), de pièces de viande porcine (0,25 kg) immergées dans une saumure contenant du sel (0, 1, 2, et 3 %) en présence ou absence de phosphate (0,5) %.

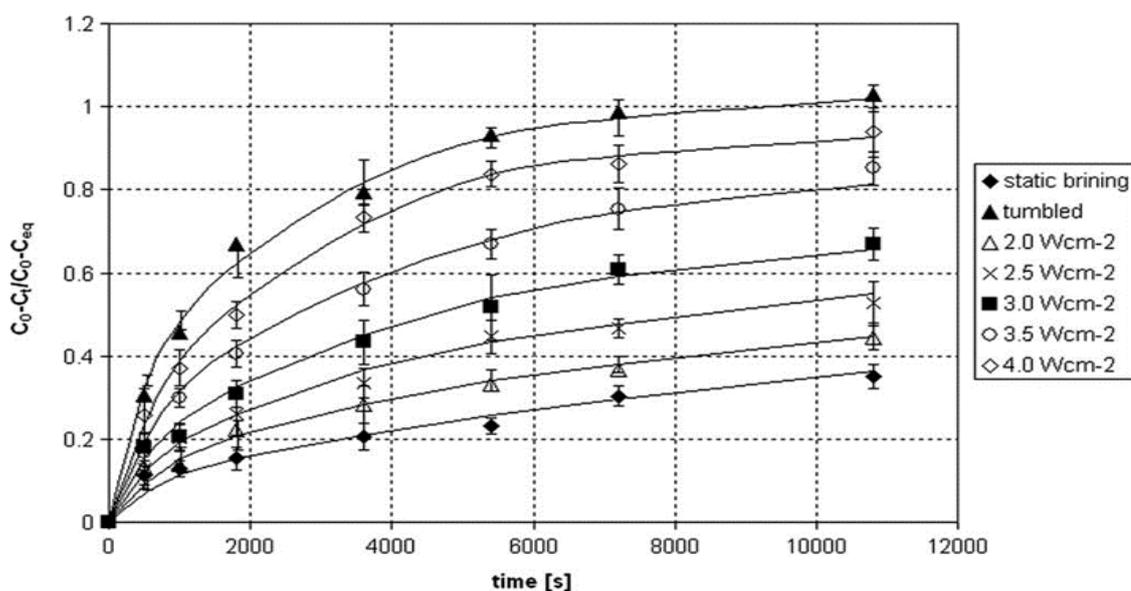


Figure 25 : Effet du malaxage et des ultrasons sur l'évolution de la teneur en sel moyenne d'échantillon au cours du temps (Siro *et al.*, 2009).

Les observations de ces auteurs en microscopie ont montré que les myofibrilles qui sont initialement bien serrées et alignées se séparent après quelques heures de malaxage, ceci augmentant la surface de contact entre les composants de la viande et le sel.

Ripoche (2000) a réalisé son étude sur le malaxage avec une baratte de laboratoire de petite capacité (200 L). Des cubes de 80 g prélevés de deux groupes de muscles *Semimembranosus* de porc ayant des pH ultime différents (5,56 et 5,66) ont été saumurés dans des sachets contenant des solutions de NaCl (ratio viande/ saumure égal à 0,1 ; teneur en NaCl 27,5 et 16,5 % pour avoir des concentrations finales dans la viande égales à 1,5 ou 2,5 %). Ces sachets étaient malaxés à 4°C avec une vitesse de rotation (7 tours/min) pendant 8 heures (2800 tours après 8 heures) avec des cycles de 25 minutes de travail alternant avec des périodes de 5 minutes de repos. Elle a constaté, pour le taux de sel le plus élevé, une meilleure pénétration de la saumure à pH bas qu'à pH plus élevé.

Le malaxage de la viande peut se faire aussi 'sous-vide', en réduisant fortement la pression gazeuse dans la baratte. Solomon *et al.*, (1980) ont montré que la pénétration du NaCl dans des muscles *Semimembranosus* de porc malaxés pendant 24 h sous vide alternant avec des périodes sans vide est plus importante. Cette augmentation est de l'ordre de 20 % par rapport aux échantillons témoins

### 4.3 Effet du malaxage sur la capacité de rétention d'eau et le rendement de cuisson

Le malaxage accroît la capacité de rétention d'eau (CRE) du tissu musculaire par rapport au marinage statique. Siro *et al.* (2009) ont observé un doublement de cette CRE après un malaxage de 3h comparé à un saumurage statique de même durée ; toutefois ni l'intensité ni la durée du traitement par l'ultrason n'a eu un effet significatif sur la CRE. Il semble donc que les déformations qui sont différentes entre ces deux traitements mécaniques, le malaxage engendrant plutôt des grandes déformations peu fréquentes et les ultrasons de petites déformations très fréquentes, aient des répercussions différentes.

Dolata *et al.* (2004) ont trouvé une augmentation de la capacité de rétention d'eau des muscles de jambon, ces muscles étaient injectés par un saumure (NaCl à 60 %) et malaxés dans une baratte de grande capacité pendant 7 h avec une rotation de 6 tours par minute. La teneur en eau dans la viande était 74,4 % avant malaxage et 78,5 % après malaxage.

Il est cependant impossible dans cette étude de faire la part entre l'effet de la présence de sel et celui du traitement mécanique.

Dzudie *et al.* (1999) ont malaxé pendant 2, 4 et 6 heures dans un malaxeur industriel à 28 tours/min, des pièces de viande de chèvre (0,7 kg) après injection d'une marinade contenant 10 % de sel nitrité, 2,5 % de dextrose et 2,5 % de phosphate. Ils ont montré qu'en augmentant le temps de malaxage, la perte à la cuisson (à 85°C jusqu'à 72°C à cœur) diminue et la capacité de rétention d'eau augmente. Là encore il n'est pas possible de séparer l'effet de la présence des ingrédients dont la teneur augmente en fonction du temps et celui du traitement mécanique.

Szerman *et al.* (2007) ont malaxé sous vide des muscles *Semitendinosus* de bœuf après injection d'une marinade (3,5 % de protéines de lactosérum et 0,7 % de NaCl). Le malaxage était pratiqué soit avant injection (0, 1,5 et 3 h à 2,5 tours/min), soit après (0, 2 et 10 h à 5 tours/min). Ils ont observé une perte de masse à la cuisson (70°C à cœur) de 28,2 % dans le premier cas et de 7,2 % dans le deuxième. Ceci suggère qu'il y a un effet du traitement mécanique à condition que le sel soit présent.

Enfin, deux études ont montré qu'il y a un temps de barattage optimum du point de vue du rendement de cuisson. Gillett *et al.* (1981) ont effectué des malaxages à 4°C de jambons injectés avec une saumure contenant 8% de sel dans une baratte pilote (charge 50 kg,

5 tours/min, périodes de repos de 30 min alternant avec des périodes de malaxage de 30 min) pendant 4, 8, 12, 16, 20 et 24 h) ; le rendement de cuisson augmente entre 4 à 8 h, puis diminue au-delà de 12 h. Le rendement le plus bas a été obtenu après 24 h de malaxage. Ripoche (2000) a montré, dans ses conditions expérimentales (Cf. 4.2), que le rendement de cuisson maximum était obtenu pour un nombre de tours d'environ 2200 ou 1800 quand la teneur en sel de la saumure était respectivement 2,5 ou 1,5.

#### 4.4 L'effet du malaxage sur la solubilité des protéines et leur extraction

Le « limon » est un exsudat protéique se trouvant en surface des morceaux à la fin du malaxage. Il permet de coller entre eux les morceaux qui ont été malaxés pendant la cuisson, ce qui est déterminant pour la tenue de tranche.

Le limon est composé de 80 % d'eau, de 10 à 14 % de protéines qui sont majoritairement des protéines myofibrillaires (Bombrun, 2014), et de lipides en quantité assez variable allant de 0,2 % à 5 % (Siegel *et al.*, 1978 ; Kerry, Morrissey *et al.*, 1999 ; Kerry, Stack *et al.*, 1999). Certains auteurs ont observé des fragments de fibres musculaires (Theno *et al.*, 1978 ; Katsaras et Budras, 1993).

Olkiewicz *et al.* (1995) ont montré que la teneur en protéines myofibrillaires dans le limon augmente de 0,6 à 1,2 % avec la durée de malaxage. La viscosité du limon augmente au cours du malaxage (Lachowicz *et al.*, 2003) du fait de son enrichissement en protéines.

Krause *et al.*, (1978) ont malaxé pendant 18 heures des jambons désossés dans une baratte pilote (capacité de 50 kg, 12 tours/min) à 5°C et 15°C ; ils ont montré que dès 3 heures de malaxage, l'extraction des protéines est suffisante pour que la qualité du jambon cuit soit acceptable. Avec une baratte pilote de même capacité, mais en utilisant une vitesse de rotation beaucoup plus lente (3,5 tours/min.), Siegel *et al.* (1978) ont malaxé pendant 0, 1, 2, 4, 8 et 24 h des pièces de viande porcine (0,25 kg) préalablement saumurées pendant 15 h dans des solutions ayant diverses compositions : 0, 1, 2 ou 3 % de sel et/ou sans 0,5 % de phosphate. Ils ont montré que les teneurs en graisse et en protéine dans le limon augmentent avec la durée de malaxage et que la meilleure tenue de tranche du produit correspond à un limon composé de 80 % d'eau, 10 % de protéines et de 5 % de lipides, après 8 h de malaxage. En accord avec cette étude, Theno *et al.* (1978) ont remarqué que la quantité de protéines solubilisées dans le

limon augmente avec le temps de malaxage entre 4 et 8 heures puis diminue. Ils ont aussi observé la présence de fragments de protéines myofibrillaires.

En cohérence avec observations relatives aux changements de composition du limon précédents, la tenue de tranche s'améliore régulièrement avec la durée de malaxage jusqu'à atteindre un plateau. Selon les études, la durée nécessaire pour atteindre ce plateau est définie en fonction de la durée de malaxage ou du nombre de rotations. Toutefois il est actuellement impossible de formuler une règle générale car cette durée dépend des conditions de traitement et du matériel utilisé (Theno *et al.*, 1978 ; Gillett *et al.*, 1981 ; Reichert *et al.*, 1985).

Bombrun (2014) a malaxé des cubes (3 cm d'arrête) de muscles de porc *Semimembranosus*. Les cubes ont été placés dans des sacs sous vide contenant 10 %, par rapport à la masse initiale de l'échantillon, de saumure à 0, 11,2, 16,5 ou 22 % de NaCl, afin d'obtenir des teneurs en sel variables en fin de malaxage dans la gamme 0,8 - 1,9 %.

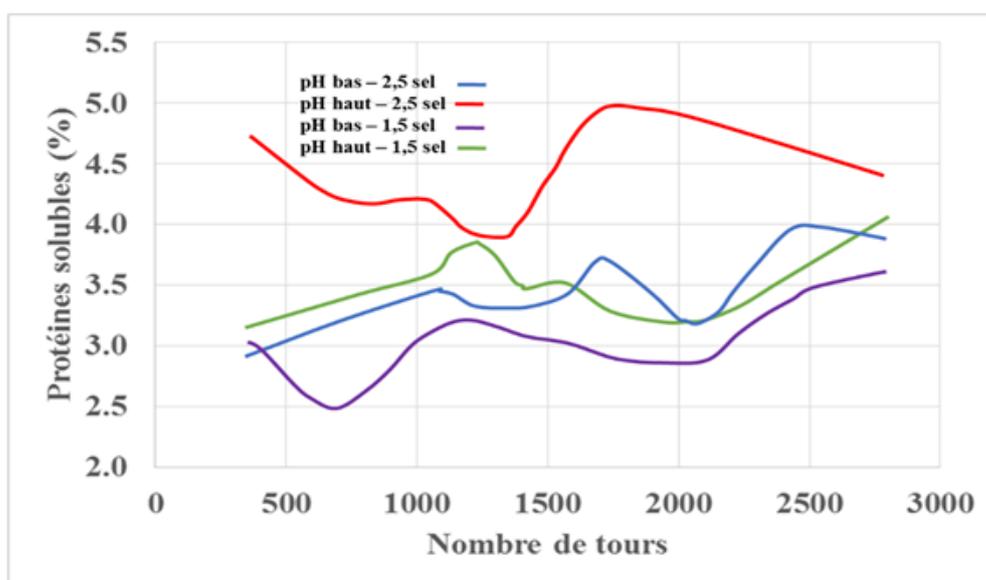


Figure 26 : Evolution de la quantité de protéines solubles dans le limon en fonction du pH et du taux de sel (Ripoche, 2000). Ph bas = 5,56 / Ph haut = 5,66.

Les échantillons ont été malaxés (7,5 tours par minute) dans une baratte pilote (diamètre de 47 cm) pendant 15 h à 4°C en alternant des périodes de travail de 5 min et des périodes de repos de 10 minutes. Un test mécanique a permis d'évaluer la force nécessaire pour séparer deux morceaux ayant été cuits ensemble dans des conditions standardisées avec du limon entre eux. Cette force ne dépendait pas de la variation des caractéristiques physico-chimiques du limon générées par les différentes conditions de malaxage. Elle était toutefois plus faible pour la viande non salée qu'à 0,8 % de sel.

L'étude de Ripoché (2000) déjà évoquée en 4.2 a montré une solubilisation plus importante des protéines à pH ultime haut (5,66) qu'à pH bas (5,56). En cohérence avec les observations relatives à la pénétration du sel, le taux de solubilisation le plus élevé correspondait à 1800 tours pour les viandes salées à 2,5 % de sel et à 1300 tours pour celles salées à 1,5 % (Figure 26).

#### 4.5 Maitrise de l'opération de malaxage

Compte tenu de la diversité des produits traités et des conditions de malaxage utilisées dans les études qui ont été évoquées dans ce chapitre, il n'est pas possible de tirer des conclusions précises sur les meilleures conditions de traitements. Seules quelques tendances générales sont indiquées ci-dessous.

##### *Qualités organoleptiques*

Ces qualités sont très dépendantes des types de produits et des ingrédients utilisés. A partir des études s'intéressant aux qualités organoleptiques, on peut conclure que le malaxage accompagné d'un saumurage-marinage permet d'améliorer certaines de ces qualités, notamment la tendreté et la jutosité (Krause *et al.*, 1978 ; Ghavimi *et al.*, 1987 ; Dzudie *et al.*, 1999 ; Lachowicz *et al.*, 2003 ; Pietrasilc et Shand, 2004) . Il reste cependant impossible d'identifier les conditions de barattage qui permettent de maximiser ces effets.

##### *Actions synergique du NaCl et du traitement mécanique*

La présence de sel a en elle-même une action sur la solubilisation des protéines myofibrillaires. Cette action est renforcée par le malaxage ; ce dernier paraît aussi indispensable pour extraire suffisamment de protéines solubilisées pour constituer le limon. D'autre part, un malaxage du tissu musculaire sans présence de sel semble peu efficace. Par ailleurs, Bombrun (2014) a observé des différences de rendement de cuisson entre des viandes malaxées non-salées et salées, mais pas en fonction de la teneur en sel.

Plusieurs études ont cherché à définir la teneur en sel optimale de la saumure par rapport au rendement de cuisson et à la tenue de tranche (Theno *et al.*, 1978 ; Siegel *et al.*, 1978 ; Ripoché, 2000). On peut seulement conclure de ces études qu'une teneur en sel d'environ 2 % permet une bonne liaison entre les morceaux et une bonne gélification du limon, et donc une bonne tenue de tranche, et un bon rendement de cuisson.

### *Température de malaxage*

Selon plusieurs auteurs (Siegel *et al.*, 1978 ; Ripoche, 2000), dans le cas du jambon cuit, une température de malaxage basse (0 à 2°C) est requise pour obtenir un bon rendement de cuisson et une bonne cohésion des muscles entre eux après cuisson. Cependant, Gillett *et al.* (1982) montrent qu'une température de malaxage entre 4°C et 10°C est optimale pour obtenir une bonne couleur et un meilleur rendement.

### *Interaction entre malaxage et traitement thermique*

L'effet du malaxage est souvent jugé après cuisson, notamment les qualités organoleptiques évaluées par un jury de dégustation. La tenue de tranche est un exemple typique d'une propriété finale qui dépend à la fois du malaxage et de la cuisson : la première opération détermine la fabrication et l'extraction du limon alors que la deuxième détermine sa gélification et l'adhésion des morceaux entre eux.

Reichert *et al.* (1985) indiquent que la tenue de tranche est optimale pour une température de cuisson de 65-70°C. Orsingher *et al.*, (1974), à partir d'une analyse multidimensionnelle sur 18 productions industrielles, ont montré qu'une bonne tenue de tranche était obtenue avec un refroidissement lent (au moins 2 h à température ambiante avant la mise en chambre froide). Kerry *et al.* (1999) ont montré que la rigidité des gels de limons issus du malaxage de muscle *Semimembranosus* de porc augmente lors du chauffage jusqu'à 70°C, ne varie plus pour une température plus élevée (80°C), puis augmente de nouveau lors du refroidissement. Ceci montre l'importance du refroidissement sur la gélification du limon.

### *Le traitement mécanique*

La conception des barattes présente une grande hétérogénéité. En premier lieu les dimensions qui déterminent la hauteur de chute des morceaux, sont très différentes. Les diamètres vont de quelques dizaines centimètres, pour les appareils pilotes, à 2 mètres pour les appareils industriels (Figure 24). De plus, le nombre et la forme des pales que comportent les barattes sont aussi très variables (de 1 à 3 pales ou plus, avec des formes courbes ou inclinées, etc.).

Les conditions de fonctionnement varient d'une étude à l'autre. Les deux principaux critères sont la vitesse de rotation des barattes qui est comprise entre 2 à 12 tours/min. et la durée du malaxage qui va de 1 à 24 h. Le taux de remplissage, ou taux de charge, est souvent proche de 60 % mais peut varier sensiblement. L'existence de périodes de repos parfois imposées entre des périodes de fonctionnement ajoute un degré de liberté supplémentaire.

Selon certains auteurs, ces périodes de repos donneraient le temps aux protéines myofibrillaires solubilisées de migrer à la surface des muscles (Krause *et al.*, 1978 ; Ripoché, 2000).

La masse des muscles ou des pièces de viande malaxés est très variable. Dans le cas de la fabrication du jambon cuit la masse des muscles varie de 400 à 1500 g, mais dans le cas du marinage-saumurage de petites pièces de viande ou dans les études de laboratoires la variation de la masse des morceaux est beaucoup plus grande : de 10 g à quelques kilogrammes.

Tous les paramètres évoqués dans les trois paragraphes précédents influent probablement sur le traitement mécanique dont la principale composante est l'énergie dissipée en déformation en fin de chute des morceaux. Cette dernière doit dépendre de la hauteur de chute (diamètre de la baratte et taux de charge), du poids des morceaux et de leur comportement rhéologique propre. En fin de malaxage « l'énergie de déformation » cumulée au cours du traitement doit probablement dépendre de la durée effective et de la vitesse de la rotation.

En absence de caractérisation du traitement mécanique, il n'est alors pas surprenant que la littérature indique de résultats contradictoires concernant la durée et la vitesse de malaxage à appliquer. Il apparaît donc qu'en expérimentant avec des barattes industrielles ou pilote, les conclusions des essais ne sont valables que pour un produit et une baratte. La pratique montre qu'il est aussi très difficile de transposer des résultats obtenus avec des barattes pilotes à des barattes de même conception mais de plus grandes tailles.

A notre connaissance aucune étude n'a tenté de caractériser les modifications du tissu musculaire en relation avec les sollicitations mécaniques subies par les pièces de viande. Ce sera l'objet principal de notre étude.



## **Chapitre 2. Matériels et Méthodes**

Les matériels et méthodes sont déjà présentés et dispersés dans chacun des chapitres 3 à 7 du fait de la présentation des résultats sous la forme d'articles et de projets d'articles. Afin de faciliter la lecture de ce rapport, ils ont aussi été décrits en français et rassemblés dans ce chapitre.

Par ailleurs, certaines détails techniques et les résultats des mises au point de méthodes sont présentés en complément dans les annexes 1 à 6.

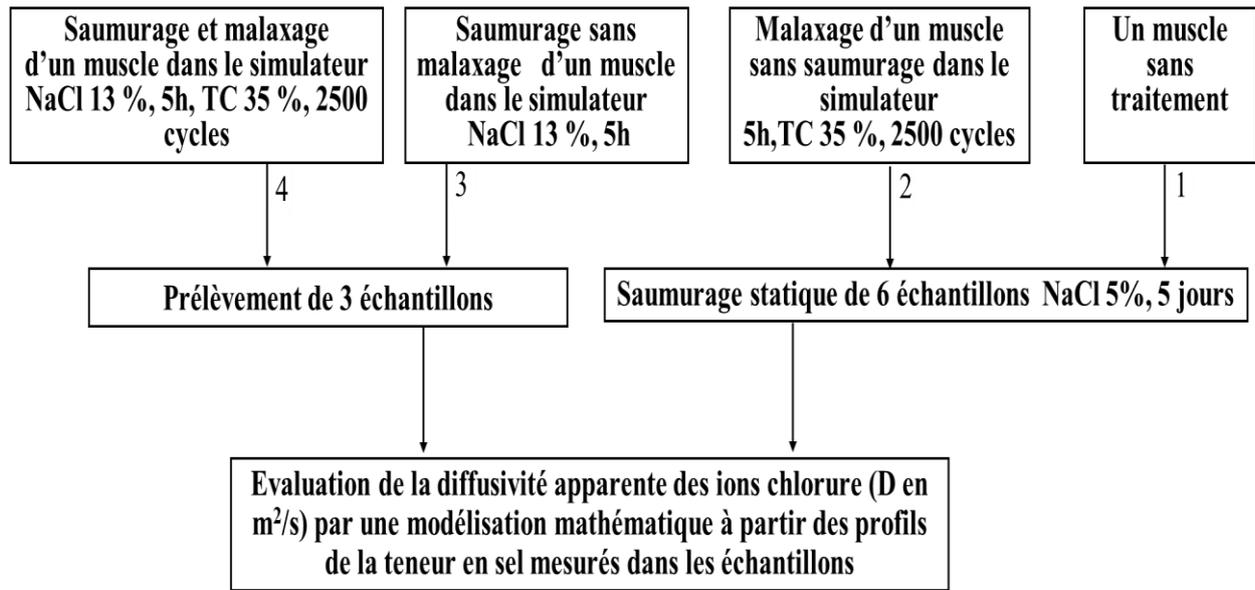


Figure 27 : Les différents essais effectués avec des muscles *Semimembranosus* de porc ou des échantillons tirés de ces muscles pour estimer la diffusivité apparente du NaCl sans ou avec malaxage.

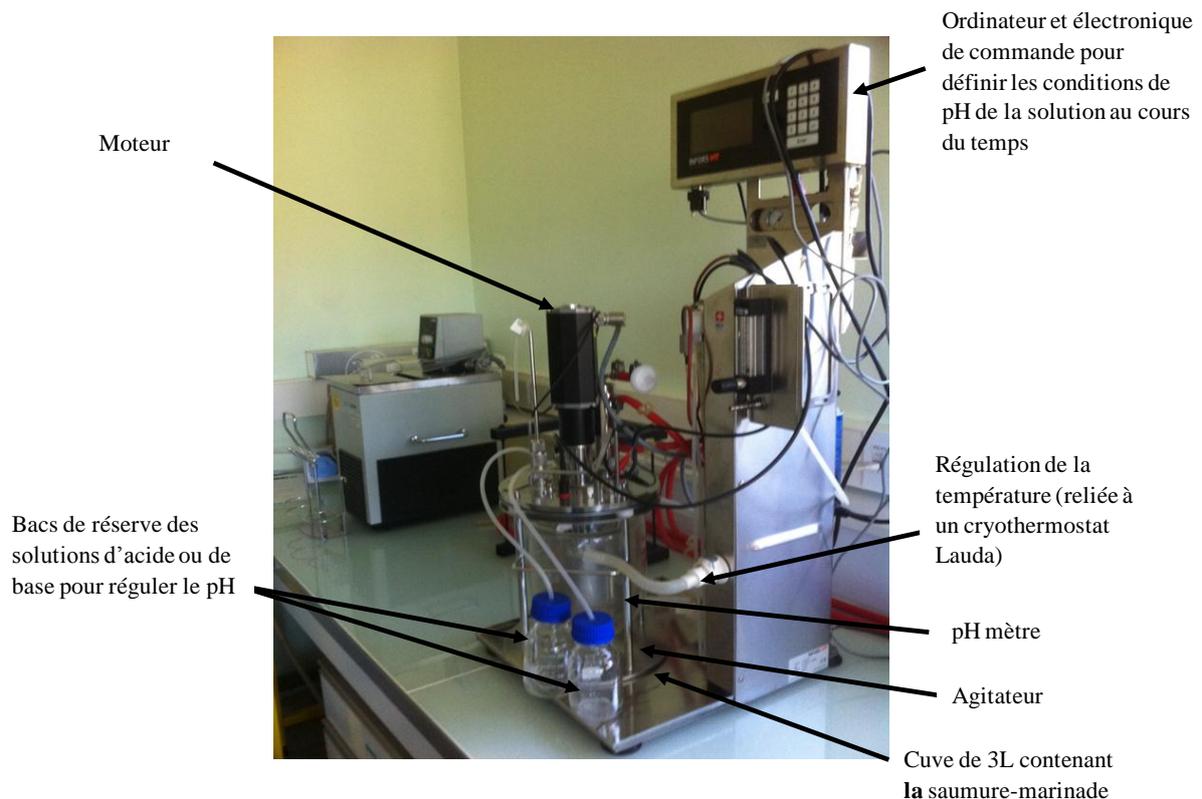


Figure 28 : Bioréacteur Labfors (Infors HT, Suisse) utilisé pour les essais de saumurage-marinage.

Les ‘matériels et méthodes’ sont décrits, parfois succinctement, dans les 5 articles qui constituent la partie « résultats » de ce mémoire. Pour faciliter la lecture, nous avons regroupé dans ce chapitre 2 les descriptifs des matériels, en précisant certains points techniques, les protocoles expérimentaux, les modes préparatoires, les méthodes d’analyses et certains points relatifs aux traitements des données et des images histologiques. Les chapitres correspondants sont indiqués entre crochets ; par exemple, s’il s’agit d’une analyse effectuée dans les travaux présentés dans les chapitres 3 et 5 [Ch 3, 5]

## **1 Les expériences de marinage, saumurage et malaxage**

Les expériences ont eu comme principale finalité d’évaluer les modifications biochimiques et structurales en fonction des traitements appliqués. Certaines expériences, réalisées avec du tissu musculaire du muscle *Semimembranosus* de porc, ont servi à établir des profils de teneur en NaCl afin d’estimer la diffusivité apparente du NaCl lors de saumurages pratiqués dans des conditions différentes. Ces conditions qui sont décrites à plusieurs endroits de ce paragraphe 1 correspondent aux cas regroupés sur la figure 27 : (cas diffusion 1) saumurage unidirectionnel d’échantillons de tissu musculaire n’ayant subi aucun traitement, (cas diffusion 2) saumurage unidirectionnel d’échantillons prélevés sur un muscle préalablement malaxé, (cas diffusion 3) saumurage d’un muscle entier et (cas diffusion 4) saumurage-malaxage d’un muscle entier.

### **1.1 Marinage-saumurage par immersion [Ch 3]**

Le but de ces essais était de fixer en moins de 24 h le pH et la teneur en NaCl des échantillons de tissu musculaire à des valeurs cibles définies à l’avance. En se référant à la bibliographie, les niveaux suivants ont été choisis :

- pour le pH 3 niveaux : 6,5, qui correspond au maximum que l’on peut observer en pratique avec l’ajout de polyphosphates, 5,4 qui correspondait au pH ultime de nos échantillons et 4,3 qui est le symétrique acide du pH 6,5, sachant que le maximum de changement relatif au gonflement du tissu et à l’attendrissement de la viande se fait entre pH 5 et pH 4

- pour la teneur en NaCl 2 niveaux : 2 % en masse qui correspond à la valeur courante des produits carnés (hors produits secs) et 0.9 % qui correspondait à un produit très peu salé.

Les essais ont été réalisés avec un bioréacteur (Labfors, Infors HT, Suisse) (Figure 28) équipé d'une électronique de commande et d'un ordinateur permettant de définir la valeur du pH de la solution au cours de chaque traitement. En fonction de cette valeur désirée et de la valeur mesurée, des pompes ajoutent soit HCL (0,5 M) pour baisser le pH, soit NaOH (0,5 M) pour l'augmenter. Cet appareil comporte aussi un serpentin qui permet de réguler la température par une circulation d'eau grâce à un cryothermostat.

Enfin, il assure l'homogénéité de la solution d'immersion dans la cuve (3 L) grâce à son système d'agitation. Cette agitation maintient aussi la pression partielle d'oxygène dans la solution à la valeur de celle de l'air.

Les expériences ont été menées sur des échantillons d'un muscle *Semitendinosus* de jeune bovin (Charolais de 2 ans) ayant un pH ultime de 5,5. Toutes les expériences ont été réalisées sur le même muscle du même animal afin de réduire la variabilité initiale des échantillons. Ce muscle a été retiré de la carcasse 24 heures après l'abattage de l'animal, immédiatement emballé sous vide, puis stocké pendant 12 jours à 4°C jusqu'à atteindre un pH ultime de 5,5. Il a alors été découpé en morceaux qui ont été congelés à -18°C jusqu'à utilisation. Chaque morceau était ensuite décongelé à 4°C pendant une nuit avant l'essai. Six tranches d'environ 15 g et 2 mm d'épaisseur ont été incubées pendant 20 h à 10°C dans le bioréacteur sous agitation dans des solutions de saumure-marinage en faisant varier le pH au cours du temps pour que le pH final des échantillons soit égal à la valeur fixée. Des essais préliminaires ont permis de définir par tâtonnement ces cinétiques de variation du pH. D'autres essais préliminaires ont montré que des concentrations respectives en NaCl dans la saumure de 11 et 27 g/L permettaient d'obtenir les niveaux bas et haut désirés.

A la fin de l'essai, chaque tranche était coupée en deux parties, la première pour l'analyse histologique et la deuxième pour les analyses biochimiques. Les échantillons orientés vers les analyses biochimiques (oxydation des lipides, oxydation des protéines, hydrophobie des protéines myofibrillaires et l'agrégation de ces protéines) étaient congelés à -80°C jusqu'aux analyses.

Les échantillons orientés vers l'analyse histologique (surface moyenne des fibres musculaire (FCSA) et pourcentage de l'espace extracellulaire (ECS)) étaient cryofixées dans

de l'isopentane, refroidi à  $-160^{\circ}\text{C}$  par de l'azote liquide, puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en attendant les analyses.

## **1.2 Saumurage statique unidirectionnel d'échantillons [Ch 5]**

Les expériences ont été faites avec des échantillons cylindriques prélevés sur un muscle *Semimembranosus* (SM) de porc. Celui-ci a été conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours après l'abattage, puis congelé à  $-18^{\circ}\text{C}$  en emballage sous vide. Avant l'essai, ce muscle a été décongelé pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis sorti de son emballage et coupé en deux morceaux : le premier a servi pour les expériences sans traitement mécanique préalable (cas diffusion 1) et le deuxième pour celles correspondant au cas 2, après traitement mécanique préalable sans saumurage (cas diffusion 2, Figure 27) sur le simulateur de malaxage décrit au paragraphe 1.3 suivant. Dans ce deuxième cas, les caractéristiques du traitement mécanique étaient : une série de 2500 compressions de 0,5 secondes chacune pendant 5 heures et un taux de compression de 30 %.

La méthode de Lebert et Daudin (2014) appliquée dans le cas du marinage de tissu musculaire de bœuf a été utilisée. Une solution de saumure simplifiée a été utilisée avec une concentration de 5 % en masse de NaCl.

Les cylindres de tissu musculaire (6 cylindres du morceau malaxé et 6 du morceau non malaxé) étaient extraits du muscle à l'aide d'un emporte-pièce d'un diamètre 27 mm (Figure 29) de façon à ce que les fibres musculaires soient approximativement perpendiculaires la direction principale des transferts de matière pendant les expériences de migration. Ces cylindres avaient des longueurs entre 25 et 40 mm (36 mm en moyenne). Chaque cylindre était ensuite placé dans un porte-échantillon (Figure 30).

Afin que le cylindre de tissu musculaire ne sorte pas du porte échantillon du côté exposé à la saumure une bague finement grillagée était fixée à l'extrémité du porte échantillon. La base du cylindre était mise en contact de 300 mL d'une solution de NaCl (5 %) contenue dans un bac de façon à promouvoir des transferts de matière unidirectionnels. Le système était placé dans une enceinte climatisée à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 5 jours.

A la fin d'une expérience de migration, la bague grillagée était enlevée, le cylindre était poussé de quelques millimètres à l'aide du tube plein en vissant la tige filetée (Figure 30) et la partie sortant du porte-échantillon était découpée à l'aide d'un couteau. Chaque tranche, d'une épaisseur de 4 à 5 mm, était pesée immédiatement et sa teneur en NaCl était mesurée.



Figure 29 : Découpe des échantillons cylindriques de tissu musculaire à l'aide d'un emporte-pièce d'un diamètre 27 mm.

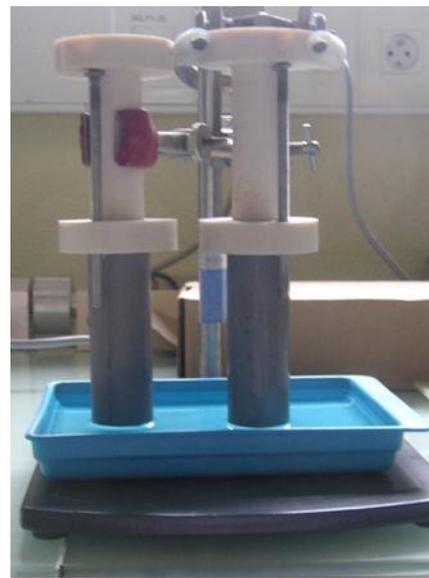
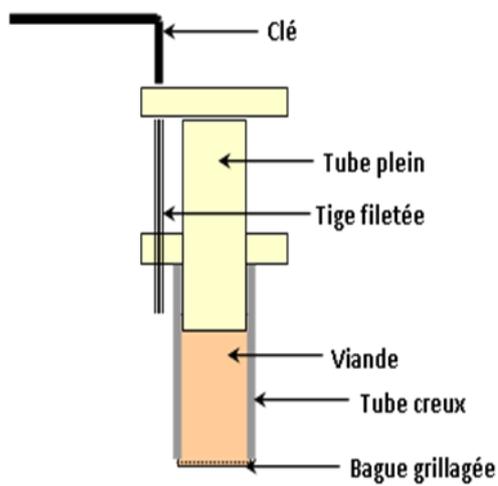


Figure 30 : Porte échantillon permettant un saumurage uni-directionnel et un contrôle de la découpe des tranches avant analyse.

### 1.3 Analyse de la dynamique de déformation des muscles lors du malaxage [Ch 4]

Deux types de muscles de porc ayant a priori des comportements mécaniques différents ont été utilisés ; le *Semimembranosus* a une élasticité 20 % plus grande que celle du *Rectus femoris* ([www.porcine.unl.edu](http://www.porcine.unl.edu)).

Trois muscles *Rectus femoris* (RF, 450 g  $\pm$  20 g) et 3 muscles *Semimembranosus* (SM, 1250 g  $\pm$  180 g), ayant un pH moyen égal à 5,7  $\pm$  0,15 pour le SM et 6,1  $\pm$  0,24 pour le RF, 4 jours après l'abattage, ont été parés tels qu'habituellement lors de la préparation des jambons, puis congelés et conservés à  $-18^{\circ}\text{C}$  en emballage sous vide. Ils ont été décongelés en une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis sortis de leur emballage avant les essais.

Un essai consistait à laisser tomber un muscle d'une hauteur HC : 25, 50, 75 ou 100 cm sur une surface rigide de façon à couvrir les hauteurs de chute pouvant exister dans des barattes industrielles de dimensions variées. Le muscle était positionné pour qu'au moment du contact avec la surface rigide cette dernière soit approximativement parallèle à l'axe de plus grande dimension du muscle.

Les films ont été réalisés avec une caméra rapide (HighSpeedStar 4G, Lavisio<sup>®</sup>), munie d'un objectif 105, à 1000 images/s avec une résolution de  $1024 \times 1024$  pixels ; la résolution spatiale était de 0,34 mm/pixel. La capacité mémoire de 4 Goctets permettait de stocker 2,7 s de film en noir et blanc. Aussi, la prise de vue était déclenchée environ 0,5 s avant que le muscle n'entre en contact avec la plaque rigide. Chaque muscle a été filmé lors de 3 répétitions pour chacune des hauteurs de chute, soit 24 films.

Quelques essais complémentaires ont été faits avec des muscles tranchés par le milieu afin d'examiner sur des coupes transversales la répercussion de la compression dans la direction verticale sur l'extension dans le sens horizontal.

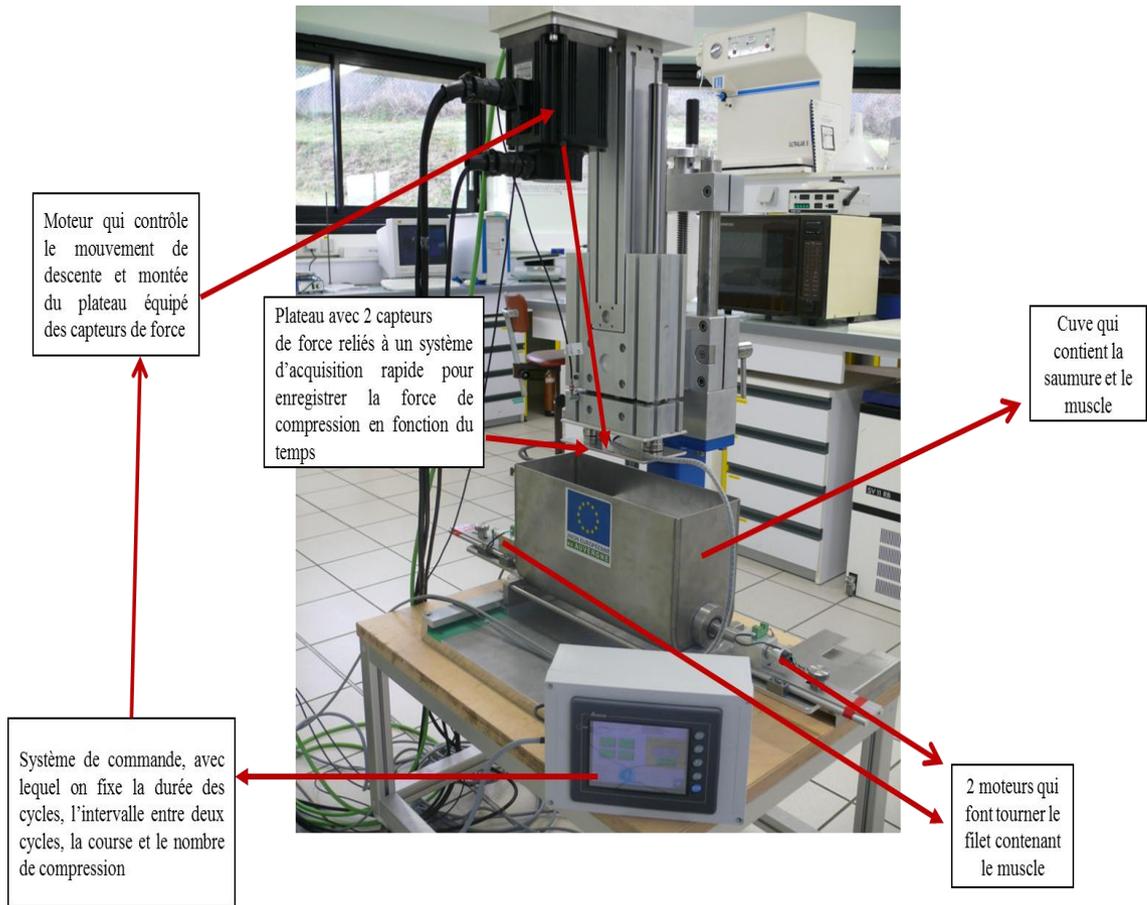


Figure 31 : Le simulateur de malaxage.

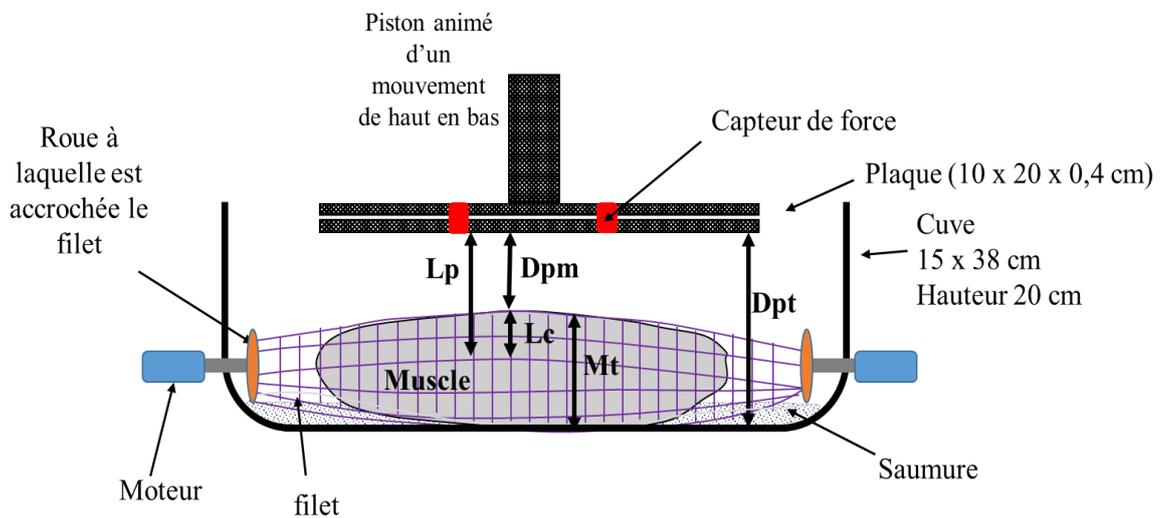


Figure 32 : La cuve de simulateur contenant le muscle

Lors du traitement, la partie du film concernant la déformation était extraite, puis examinée image par image. Pour chaque image, le taux de compression (TC) vertical, égal au ratio de l'épaisseur par rapport à l'épaisseur juste avant le contact, était calculé relativement à 3 sections, orthogonales à l'axe principal du muscle et séparant ce dernier en quatre parties d'égales longueurs. La durée de déformation (Dd) correspondait au temps nécessaire pour que le muscle retrouve son épaisseur initiale.

#### **1.4 Saumurage-malaxage de muscles [Ch 4, 6 et 7]**

##### *Le simulateur de malaxage du laboratoire (Figure 31)*

Tous les essais de saumurage-malaxage ont été faits avec l'appareil présenté sur la figure 31. Cet appareil a été développé par mon équipe afin, d'une part, de reproduire les sollicitations mécaniques subies par les viandes dans les barattes industrielles, et d'autre part, de caractériser le traitement mécanique par des mesures sachant que cela est impossible dans les barattes.

Les conditions d'utilisation permettant de s'approcher au mieux de ce qui se passe dans les barattes ont été définies pendant mon étude à partir des résultats des essais présentés dans le paragraphe 1.3. De plus une série d'essais de mise au point a été réalisée avant d'arriver au protocole définitif résumé ci-dessous ; les résultats de ces travaux préliminaires sont regroupés dans l'annexe 3 (correction des durées de commande en fonction des mesures, définition de la vitesse de rotation par rapport à la fréquence des compressions, traitement des mesures d'un cycle et calcul du taux de compression réel,...).

Le principe consiste à saumurer un muscle dans la cuve tout en lui appliquant des centaines de déformations successives. Un muscle est placé dans un filet qui est attaché à deux roues situées aux deux extrémités de la cuve (Figure 32). Le filet est mis en rotation à raison de quelques tours par minute dans le bac de saumurage grâce aux deux moteurs. Cette rotation est nécessaire, d'une part, pour enduire régulièrement la surface du muscle avec de la saumure déposée au fond du bac, et d'autre part, pour appliquer au muscle une déformation selon des positions angulaires qui varient d'un coup à l'autre. Au cours d'un essai le muscle est comprimé plusieurs centaines de fois, perpendiculairement à son axe principal. Chaque compression correspond à un aller-retour du piston.

Le mode de fonctionnement principal simule le phénomène de la déformation brève en fin de chute dans une baratte ; la durée de compression est inférieure à 0,5 s. Un autre mode

de fonctionnement peut être utilisé pour provoquer un écrasement pendant plusieurs secondes, selon une force fixée, dans le but de simuler la compression d'un muscle situé sous une couche d'autres muscles entre le moment où il est au fond de la cuve et celui où il est remonté par une pale; il n'a pas été utilisé pendant cette étude. La durée, l'amplitude et la fréquence des mouvements du piston sont définies à l'avance et peuvent être modulées sur de larges plages. Enfin, dès le déclenchement d'une compression, la position du piston et la force de réaction du produit sont mesurées à une fréquence d'environ 160 Hz.

L'appareil (Figure 31) est relié à un système de commande programmable permettant de fixer les conditions du traitement mécanique : nombre, durée, fréquence et amplitude des allers-retours du piston. L'ensemble est relié à un ordinateur muni d'un système d'acquisition MP85A (HBM, Mennecy, France) auquel sont reliés deux types de capteurs. La position du piston est donnée par un codeur rotatif ERN240 (Heidenhain, Sèvre, France) fixé sur l'axe de la vis à bille déterminant le déplacement linéaire du piston ; il donne une précision de  $\pm 0,1$  mm sur ce déplacement.

La force est mesurée par les deux capteurs de force U93-5kN (HBM, Mennecy, France) montés en parallèle entre le piston et la plaque mise en contact avec le muscle ; la précision est de  $\pm 1$  N. Le diagramme force-déplacement permet de caractériser chaque compression (Figure 33). Deux critères ont été retenus : (1) la force maximale et (2) l'aire délimitée par la courbe force-déplacement qui correspond à l'énergie transmise à la pièce de viande.

Un muscle n'étant pas rond, la plaque du piston au repos est positionnée plusieurs millimètres Dpm au-dessus de la hauteur correspondant à l'épaisseur moyenne de la plus grosse section du muscle (Mt). Si la course imposée au piston est égale à Lp, le taux moyen de compression (TC) est alors égal à (Figure 32) :  $TC = (Lp - Dpm)/Mt$ .

#### *Les essais de saumurage-malaxage*

Un lot de 120 muscles triés en fonction du pH ultime a été acheté à un fabricant de jambon cuit. Il était constitué pour moitié de muscles *Rectus femoris* (RF) et pour moitié de muscles *Semimembranosus* (SM) de porc. Ces deux types de muscle ont été choisis car ils diffèrent par leur composition en fibres musculaires : le muscle RF contient majoritairement des fibres de type oxydatif, rouges, alors que le muscle SM contient surtout des fibres de type glycolytique, blanches. Leurs pH ultimes étaient  $5,7 \pm 0,15$  pour le SM et  $6,1 \pm 0,24$  pour le

RF. Ils ont été emballés sous vide 4 jours après l'abattage et conservés à  $-18^{\circ}\text{C}$ . Avant un essai, un muscle était décongelé en une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis sorti de son emballage.

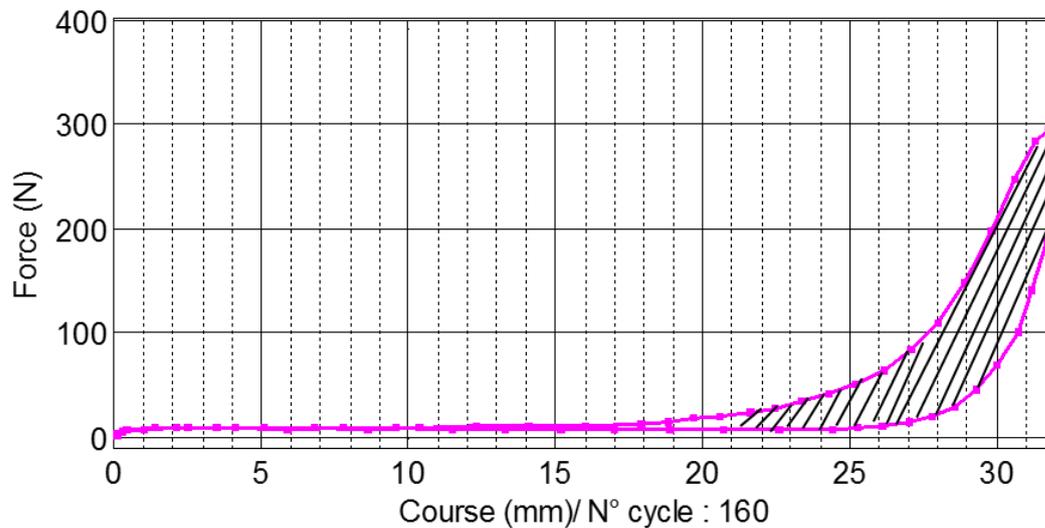


Figure 33 : L'aire hachurée délimitée par la courbe force-déplacement correspond à l'énergie dissipée lors de la déformation de la pièce de viande due à un aller-retour du piston pour le cycle N°160 prélevé de l'essai (RF-C-5-C30-22-02-12).

La saumure contenait uniquement du NaCl. Deux concentrations (5 et 13 %) ont été retenues afin de promouvoir une variété de couples « traitement mécanique-teneur en sel finale » dans les échantillons prélevés à la fin d'un traitement. La saumure était préparée la veille de l'essai et était conservée à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le rapport entre la masse de saumure et la masse de viande était égale 1/1 et par conséquent la hauteur de la saumure dans la cuve était d'environ 6 mm dans le cas du muscle RF et 15 mm dans le cas du SM.

Pour faire un malaxage avec une imprégnation en NaCl très réduite, une troisième concentration de NaCl (0,9 %) a été utilisée pour avoir une force ionique initiale dans la saumure égale à celle du tissu musculaire.

Chaque compression durait 0,5 s et deux compressions étaient séparées par une période de repos de 6,7 s. Pour chaque type de muscle et chaque concentration de saumure 4 traitements mécaniques ont été appliqués :

- (i) deux taux de compression TC (10 ou 30 % de l'épaisseur moyenne du muscle),
- (ii) deux couples « nombre de compressions et durée du traitement » (L pour 5 h et 2500 compressions) ou (C pour 42 min et 350 compressions).

Chacune des 16 combinaisons (muscle x concentration de la saumure x TC x durée) a été répétée 3 fois. Le malaxage avec une concentration en NaCl de 0,9 % a été fait sur les

deux types de muscle, pendant 5 h (2500 compressions) avec un taux de compression de 30 %.

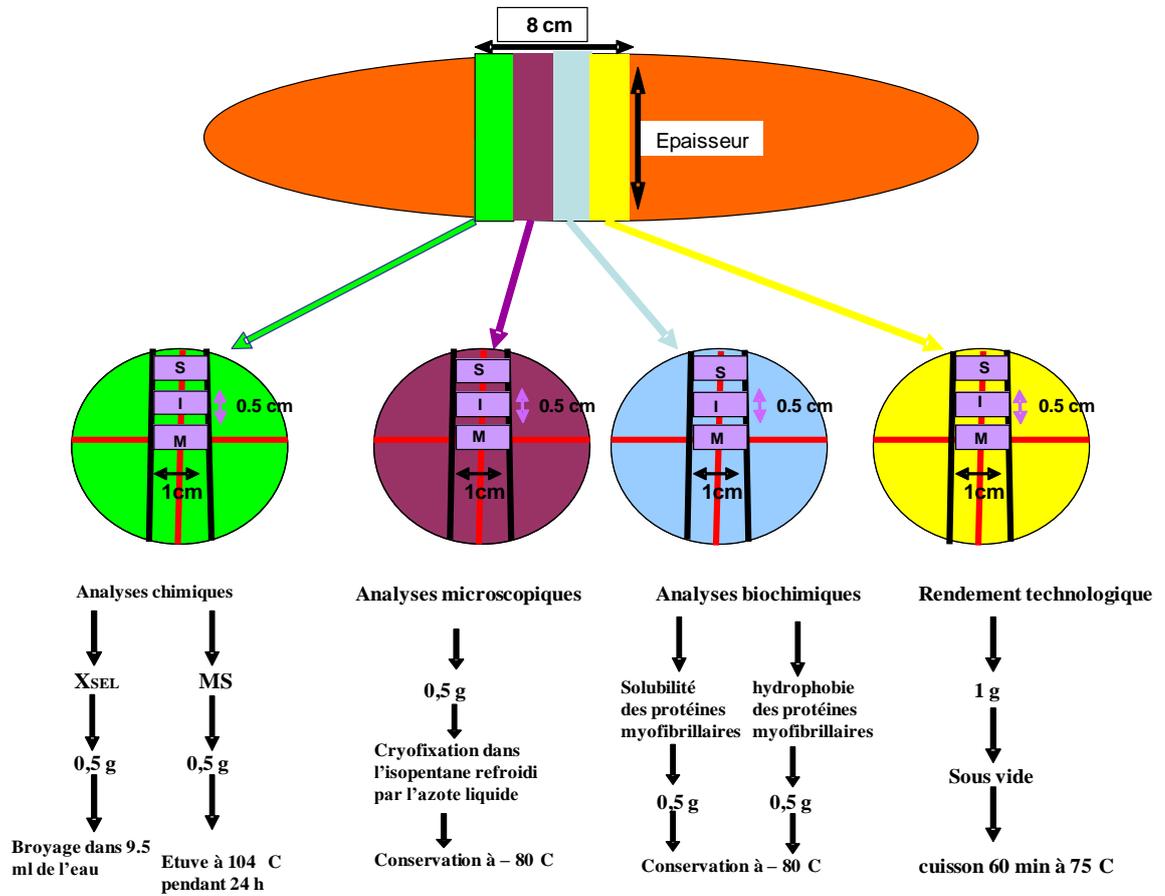


Figure 34 : Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage.

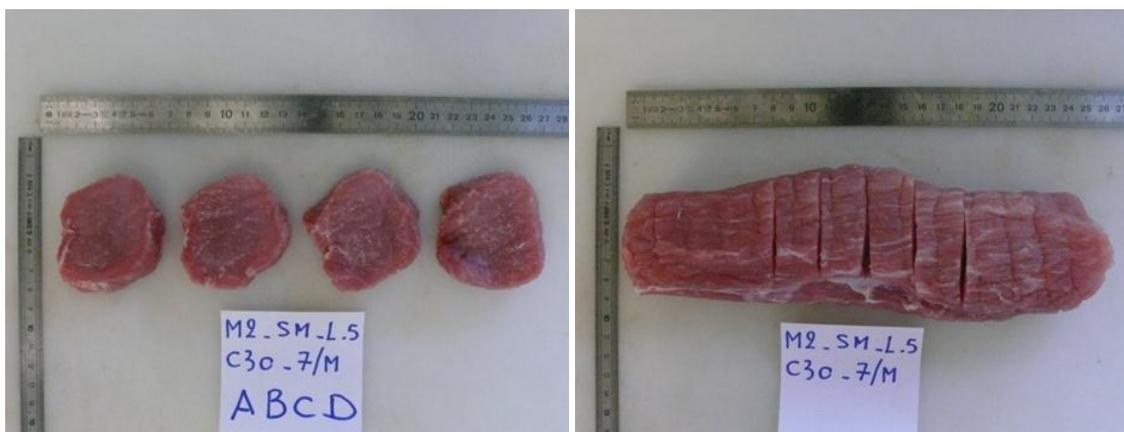


Figure 35 : Prélèvement les quatre sections orthogonales à l'axe principal du muscle à la fin d'un essai de saumurage-malaxage.

Quelques millilitres de saumure étaient récoltés à 15, 30 et 45 minutes lors des essais courts, et aussi à 120, 210 et 300 minutes lors des essais longs afin de suivre d'évolution de la concentration en NaCl et en protéines. Chaque dosage était répété 3 fois.

*L'organisation du prélèvement des échantillons à la fin d'un saumurage-malaxage*

Cette organisation est synthétisée sur la figure 34. Chaque muscle a été découpé en quatre sections orthogonales à l'axe principal du muscle (Figure 35). Deux de ces sections ont été utilisées pour les mesures physicochimiques et microscopiques. Les deux autres ont été utilisées pour les analyses biochimiques et le rendement de cuisson. Une languette d'une largeur d'environ 1 cm a été découpée sur chacune de ces sections (Figure 36), puis des parallélépipèdes de dimensions 1 x 1 x 0,5 cm ont été prélevés à 3 positions : près de la surface du muscle (S), au milieu (M) du muscle et à une position intermédiaire (I) entre les deux premières (Figure 37). De plus 3 prélèvements de même taille ont été faits sur chaque muscle avant le traitement afin d'avoir des mesures témoins lors des analyses.

Les prélèvements orientés vers les mesures biochimiques (l'hydrophobie et la solubilité des protéines) ont été stockés à -80°C jusqu'aux mesures. Les échantillons destinés aux analyses histologiques ont été cryofixés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

*Essais complémentaires relatifs à l'estimation de la diffusivité apparente du NaCl*

Un muscle *Semitendinosus* de porc était coupé en deux dans le sens de la longueur. Chaque moitié était saumurée dans une saumure ayant une concentration en NaCl de 13 % dans l'appareil décrit précédemment avec un ratio saumure/muscle de 1/1.

Dans le 'cas diffusion 3', le demi muscle était simplement enduit de saumure par rotation et dans le 'cas diffusion 4' un malaxage était aussi appliqué. Le traitement mécanique avait alors les caractéristiques suivantes : TC de 30 % ; durée de 5 heures et 2500 compressions ; durée d'une compression 0,5 s et période de repos de 6,7 s.

A la fin de l'expérience un cylindre de tissu musculaire était prélevé avec un emporte-pièce sur la totalité de la section au milieu du muscle. Le cylindre était alors découpé comme expliqué en fin de paragraphe 1.2 afin d'établir le profil de concentration en NaCl.

Ces essais ont été répétés 3 fois.

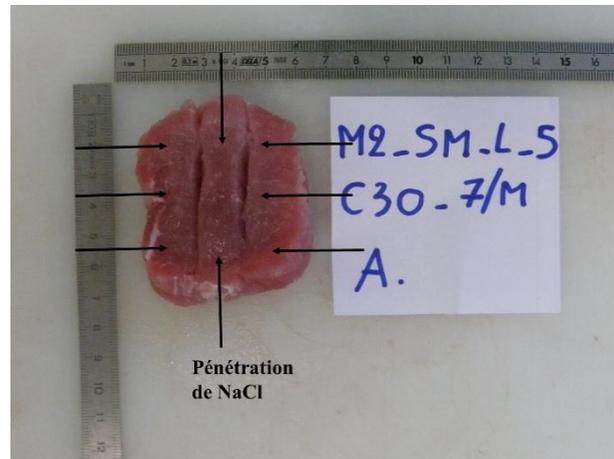


Figure 36 : Prélèvement d'une languette sur chaque section de muscle, ainsi que des flèches montrent les directions de pénétration de NaCl.

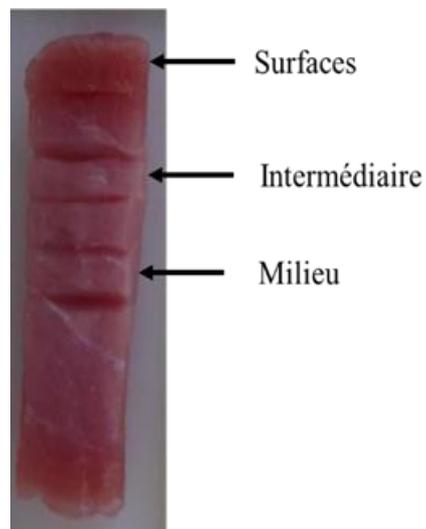


Figure 37 : Localisation des échantillons prélevés d'une languette pour les analyses : près de la surface, au 'centre' et à une position intermédiaire

## 2 Les analyses physicochimiques et biochimiques

### 2.1 Les analyses physicochimiques [Ch 3, 5, 6, 7]

#### *Teneur en NaCl*

La teneur de chlorure de sodium a été mesurée sur des prélèvements d'environ 0,5 g. Cette prise d'essai était approximativement diluée au 1/20 dans d'eau distillée, puis broyée. Une partie de ce broyat était réparti dans un tube Eppendorf (2 mL) qui était centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 tr/min. La teneur en NaCl était déduite de la mesure de teneur en ions chlorure (mg/mL) dans le surnageant au moyen d'un chloruromètre Chloride Analyser 926 (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK).

#### *Teneur en matière sèche*

La teneur en matière sèche a été obtenue sur un échantillon d'environ 2 g par différence de pesée avant et après passage dans une étuve à 104°C pendant 24 heures.

#### *Mesure de pH*

Environ 0,6 g d'échantillon était mis dans un tube et broyé à l'aide d'un micro broyeur Polytron PT 2100 (Glen Mills Inc, Clifton, USA) en présence de 3 mL d'eau. Le pH était mesuré à l'aide d'un pH mètre MA 235 (Mettler toledo, Viroflay, France) muni d'une électrode compensée en température et préalablement étalonnée.

#### *Rendement de cuisson*

Les échantillons (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) étaient placés dans des petits sachets mis sous vide. La cuisson était réalisée par immersion de ces sachets pendant 60 minutes dans un bac d'eau thermostaté à 70°C. Ils étaient ensuite refroidis en les plongeant pendant 5 minutes dans un bain d'eau à 0°C qui contenait des glaçons. Les échantillons étaient ensuite sortis des sachets, essuyés par des papiers absorbants. Le rendement de cuisson était calculé à partir des pesées avant et après cuisson ; il est égal à la masse après cuisson divisée par la masse initiale.

## 2.2 Les analyses biochimiques [Ch 3, 6]

*Oxydation des lipides* : L'oxydation des lipides a été évaluée sur un extrait brut ; l'échantillon était broyé pendant 30 secondes (Ultra-Turax) dans une solution de saline de KCl 0,15 M dont la concentration en NaCl était ajustée à celle de l'échantillon. L'oxydation est évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thio-barbiturique (TBARS) selon la méthode de Mercier *et al.* (1998). Le Malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finaux de la décomposition des hydroperoxydes lipidiques lors de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. En milieu acide et chaud, les aldéhydes comme le MDA peuvent réagir avec l'acide thio-barbiturique (TBA) pour former un complexe TBA-MDA-TBA coloré en rose qui présente un maximum d'absorbance à 535 nm (DO535). Une correction de turbidité est réalisée par une autre mesure de densité optique à 760 nm (DO760), car à cette longueur d'onde le complexe TBA-MDA-TBA n'absorbe pas. La densité optique corrigée est telle que :

$$\text{DO corrigée} = \text{DO535} - \text{DO760}$$

Les résultats sont exprimés en unité TBA (mg MDA par kg de viande) à partir d'une courbe étalon, reliant cette valeur TBA et la DO corrigée, qui avait été établie au préalable avec du MDA pur.

*Solubilité des protéines* : L'indice de solubilité est égal au rapport de la masse de protéines solubles présentes dans un échantillon par rapport à celle des protéines totales. Un échantillon de 0,2 g d'un prélèvement issu des essais de saumurage-malaxage était broyé dans 4 mL de tampon phosphate 40mM (force ionique 0,24 M, pH 6) dont la concentration en NaCl était égale à la teneur en NaCl du prélèvement. Deux extraits de 200 µL étaient réservés pour mesurer la quantité de protéines totales. Le reste du broyat était agité pendant 30 minutes, puis centrifugé (4000 rpm) à 4°C pendant 15 min. Deux autres extraits de 200 µL étaient prélevés dans le surnageant pour mesurer la quantité de protéines solubles. Les quantités de protéines des quatre extraits étaient mesurées par la méthode du Biuret (Annexe 1)

Des courbes de références de solubilité des protéines du tissu musculaire de porc ont été établies en fonction de la teneur en sel ; 4 pour le muscle RF et 4 pour le muscle SM. Chacune des 8 courbes correspond à des échantillons ayant été prélevés sur le même muscle.

Le protocole précédent a été utilisé en broyant 0,2 g de tissu musculaire en présence d'une certaine quantité de NaCl. Une gamme de teneur en sel par rapport à la masse de

l'échantillon allant de 0,1 à 10 % en masse, a été prospectée. Cela correspond à une gamme de force ionique dans le broyat allant de 0,24 et 1,98 M.

#### *Agrégation des protéines*

La mesure de l'agrégation des protéines a été évaluée sur des extraits bruts ; l'échantillon était broyé pendant 30 secondes (Ultra-Turax) dans une solution saline de KCl 0,15 M dont la concentration en NaCl était ajustée à celle de l'échantillon. Cette mesure a été évaluée selon la méthode développée par Promeprat *et al.* (2010). Les mesures ont été faites avec un granulomètre (Sysmex FPIA-3000).

Deux paramètres ont permis de caractériser la granulométrie des suspensions en utilisant les techniques d'imagerie automatisées disponibles sur cet appareil : le diamètre du cercle équivalent et la circularité des particules ; ils ont été utilisés pour comparer les différents traitements de saumurage-marinage.

Toutes les déterminations ont été effectuées en double.

#### *Analyses relatives aux protéines myofibrillaires*

Les analyses relatives aux modifications des protéines myofibrillaires (oxydation et hydrophobie de surface) nécessitaient au préalable une étape d'extraction ; elle a été réalisée en suivant la méthode de Martinaud *et al.* (1997). Un échantillon de 1 g était homogénéisé dans 10 mL de tampon phosphate dont la concentration en NaCl et le pH étaient ajustés pour être égaux à ceux des échantillons. Le pH était ajusté par ajout de solution acide (HCl 0,5 M) ou basique (NaOH, 0,5 M). Les tubes étaient centrifugés, puis le culot était lavé 3 fois avec le tampon correspondant. Plusieurs échantillons de 1 mL étaient conservés à -80°C jusqu'aux analyses.

#### Mesure des groupements carbonyles

Lors de l'oxydation des protéines, il y a apparition de fonctions carbonyles sur les chaînes latérales des acides aminés basiques tels que la lysine, l'histidine ou l'arginine.

Les groupements carbonyles des protéines myofibrillaires ont été mesurés par la méthode de Oliver *et al.* (1987) avec des modifications légères (Mercier *et al.*, 1998). Le protocole détaillé est présenté en annexe 1.

Les groupes carbonyles ont été détectés par la réactivité avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former le 2,4 dinitrophénylhydrazone. Le composé jaune qui en résulte était dosé par spectrophotométrie d'absorption à 370 nm.

Les résultats sont exprimés en nanomoles de DNPH fixés par milligramme de protéine. La détermination des groupes carbonyles a été réalisée en double.

#### Mesure des groupements sulfhydriles libres ou thiols libres

Lors de l'oxydation des protéines, les groupements sulfhydriles des résidus cystéines sont oxydés avec formation de ponts disulfures, selon la réaction suivante :



Où R-SH est une cystéine présentant un groupement sulfhydrile libre ou thiol libre

Le dosage a été réalisé selon la méthode de Morzel *et al.* (2006) qui utilise le réactif 2,2'-Dithiobis (5-nitropyridine) (DTNP). En milieu alcalin, ce réactif se fixe sur les groupements thiols libres et forme un complexe qui absorbe à 386 nm. Le protocole détaillé du dosage est présenté en annexe 1. Les dosages ont été réalisés en double

Les résultats sont exprimés en nanomoles de thiols libres par milligramme de protéine.

#### Mesure de l'hydrophobie de la surface

L'hydrophobie de surface a été mesurée en utilisant une sonde qui se fixe aux sites hydrophobes des protéines myofibrillaires (Chelh *et al.*, 2006), le bleu de bromophénol (BBP).

La concentration en myofibrilles était ajustée à 1 mg/mL pour tous les échantillons avec le tampon mère. Une solution de BBP à 1 mg/mL était ajoutée à raison de 40 µL dans chaque tube. Après 30 minutes d'agitation, les échantillons étaient centrifugés afin de sédimenter les protéines ainsi que le BBP qui leur était fixé. Après une dilution au 1/5ième dans de l'eau distillée et agitation, la densité optique était mesurée à 595 nm. Chaque mesure était répétée 2 fois.

Un tube témoin contenant 1 mL de tampon phosphate était utilisé comme référence (DOtémoin).

La quantité de BBP fixée est donnée par la formule :

$$\text{BBP adsorbé} = 40 \times (\text{DOtémoin} - \text{DOéchantillon}) / \text{DOtémoin}.$$

Les résultats d'hydrophobie sont exprimés en pourcentage de BBP fixé.

### 3 Méthodes histologiques [Ch 3, 5, 7]

Les coupes histologiques ont été faites à partir des prélèvements qui étaient cryofixés juste après un traitement. L'échantillon était fixé sur une platine par du milieu d'enrobage. Des coupes de 10 µm d'épaisseur orthogonale par rapport au sens des fibres étaient réalisées à l'aide d'un microtome HM 560 (Microm, Franceville, France - Figure 38) et déposées par adsorption sur des lames de verre. Les coupes étaient déshydratées 15 minutes à l'air libre et à température ambiante.

Deux types de colorations ont été utilisés :

- La coloration à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES) permet de visualiser la structure générale ; les noyaux des cellules apparaissant en violet bleuté (colorés par l'hématoxyline, basique), le cytoplasme en rose (coloré par l'éosine) et le tissu conjonctif en orangé (coloré par le safran). Le protocole appliqué pour cette coloration est détaillée sur la figure 39
- La coloration au Rouge Sirius (RS) révèle le collagène du *périmysium* et de l'*endomysium* en rouge et les fibres musculaires en jaune. Le protocole appliqué pour cette coloration est détaillé sur la figure 40.

#### *Analyse des images histologiques*

Après coloration, les lames sont montées avec le support de montage Eukitt (KIndler GmbH & Co, Friburg, Germany) qui est une résine synthétique et qui permet d'assurer une protection des coupes dans le temps.

Les images des coupes ont été faites avec un microscope optique à transmission Olympus BX61 équipé d'une caméra numérique couleur Olympus DP71 et du logiciel Cell F. Pour chaque coupe, des images ont été acquises avec l'objectif x 20 pour la coloration HES et l'objectif x 10 pour la coloration RS.

Les images sont analysées à l'aide du logiciel libre Image J. Avant d'effectuer les traitements spécifiques exposés ci-dessous, chaque image couleur a subi deux traitements : (1) elle est séparée en ses 3 composantes monochromatiques (rouge, vert et bleu) et seule la composante verte qui permet de fournir le meilleur contraste est conservée et (2) une correction de luminosité est faite en utilisant une image blanche prise au cours de la même séance de prise de vues.

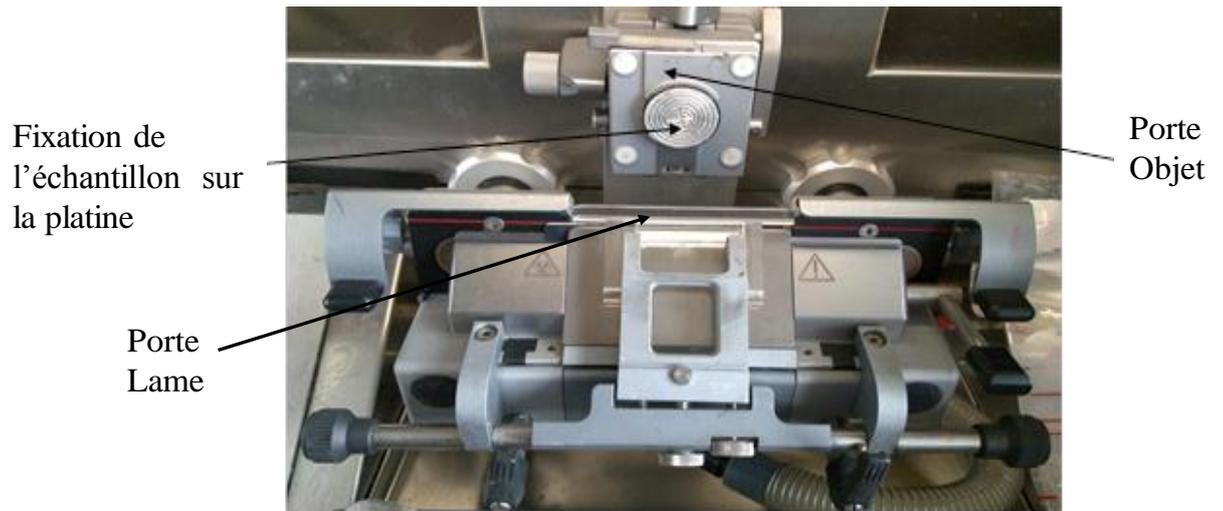


Figure 38 : Le microtome HM 560 (Microm, Franceville, France.

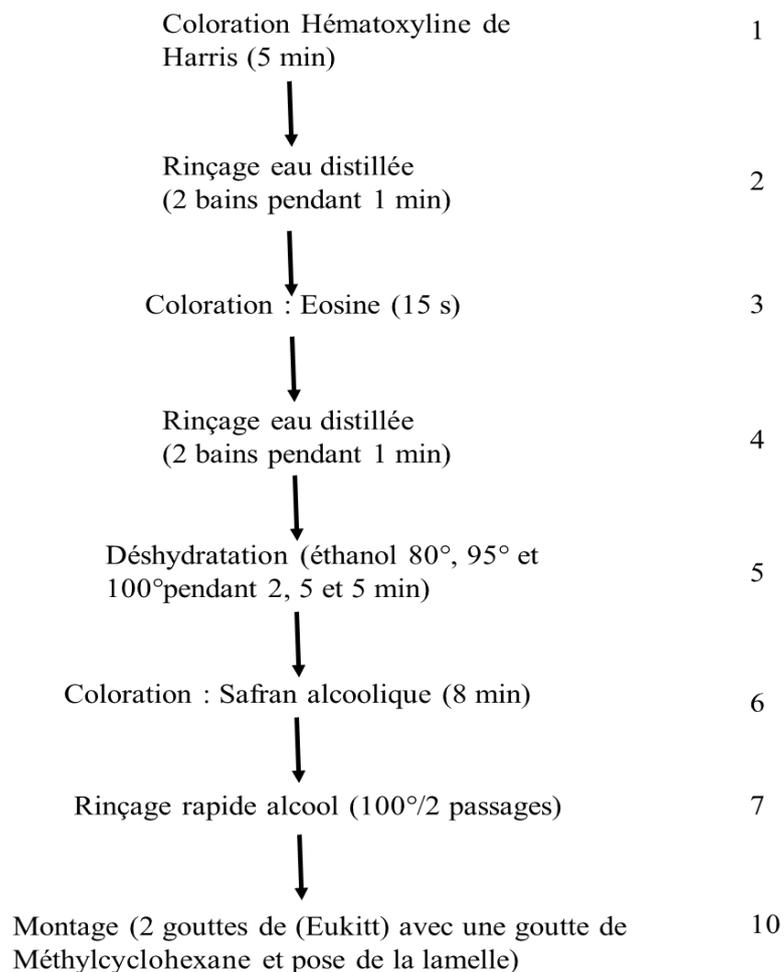


Figure 39 : Les étapes suivies pour effectuer la coloration à l'Hématoxyline Eosine Safran (HES) des coupes histologiques.

Marinage et coloration HES : une vingtaine d'images ont été analysées pour chaque condition de marinage : 4 échantillons x 5 images par coupe histologique. Le traitement permet d'extraire l'espace extracellulaire par segmentation de l'image après un seuillage sur les niveaux de gris. Une seconde étape permet d'extraire les fibres musculaires, de les individualiser sur l'image binaire en noir et blanc et de mesurer leurs surfaces (70 à 100 par coupe) ; les fibres non-entières situées au bord de l'image sont éliminées. Toutes ces opérations sont automatisées mais supervisées par l'opérateur qui réalise les retouches nécessaires, notamment pour l'individualisation des fibres, par comparaison entre l'image d'origine et l'image noir et blanc.

Deux descripteurs ont été évalués : la surface moyenne des fibres musculaires (FCSA, en  $\mu\text{m}^2$ ) et le pourcentage de surface occupé par l'espace extracellulaire (ECS).

Saumurage-malaxage et coloration RS : une dizaine d'images ont été faites pour chaque échantillon. L'analyse consiste à évaluer la dégradation de l'*endomysium* qui se traduit par une impossibilité de séparer visuellement les fibres entre-elles. Compte tenu du grand nombre d'échantillons un traitement totalement automatisé, sans aucune retouche, a été retenu. Après un seuillage adaptatif basé sur la moyenne du niveau de gris de l'ensemble des pixels, 3 opérations d'érosion-dilatation sont appliquées sur l'image binaire en noir et blanc. Puis la surface de chacun des objets individualisés est mesurée. Ces objets sont appelés « éléments séparés » dans ce rapport ; ils correspondent à des fibres, ou groupe de fibres n'ayant pu être séparées du fait de la dégradation de l'*endomysium*. La figure 41 illustre cette procédure qui fournit comme résultat l'histogramme des surfaces des « éléments séparés ». Dans le cas des échantillons saumurés-malaxés il apparaît une classe d'éléments ayant une surface bien supérieure à celle des fibres ( $> 15\ 000\ \mu\text{m}^2$ ). Les « éléments séparés » situés sur les bords des images sont conservés. En effet, s'il s'agit d'une fibre non-entière située sur le bord de l'image, la surface de l'élément correspondant est inférieure à celle d'une fibre, alors que s'il s'agit d'un groupe de fibres endommagées, l'élément séparé correspondant, même non-entier, peut avoir une surface proche de l'indicateur de dégradation retenu.

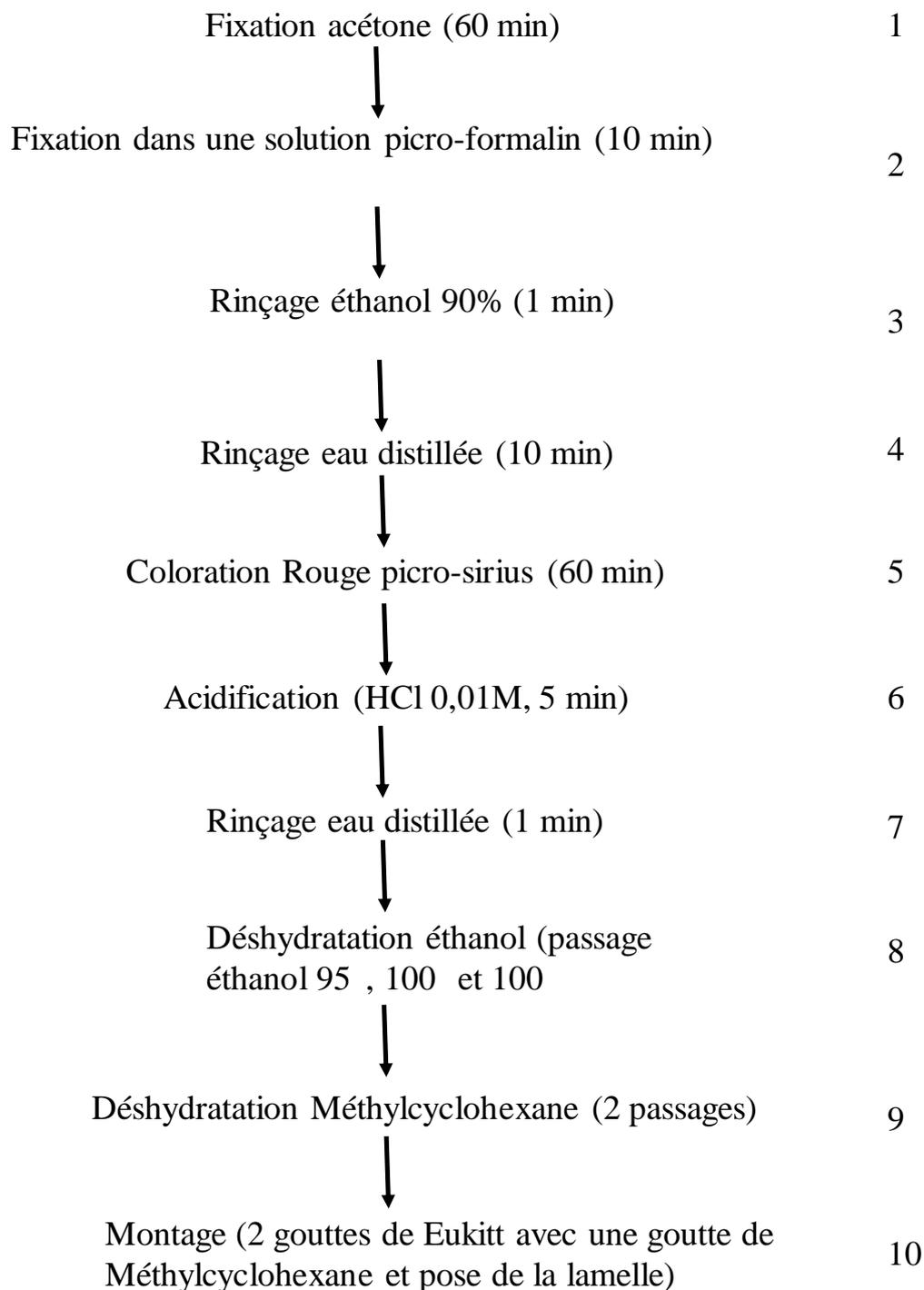


Figure 40 : Les étapes suivies pour effectuer la coloration au Rouge Sirius (RS) des coupes histologiques.

## 4 Estimation de la diffusivité apparente du NaCl (D)

Dans un premier temps les profils de la concentration en NaCl en fonction de la distance ont été établis à partir des mesures. La distance d'une tranche à la surface de saumuration pendant l'expérience ne pouvait pas être mesurée simplement, en particulier dans les cas 'diffusion 3 et 4'. Cette distance a été calculée systématiquement à partir de la masse des tranches en admettant que la section des cylindres était constante ; la masse volumique était modulée en fonction des teneurs en eau et en NaCl mesurées.

La diffusivité apparente D a été estimée en ajustant les profils expérimentaux avec la solution analytique de la deuxième loi de Fick correspondant à une plaque infinie de demi épaisseur  $l$  selon l'équation (Bimbenet et Loncin, 1995) :

$$\left( \frac{C_{surf} - C(x,t)}{C_{surf} - C_0} \right) = \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos\left(\frac{(2n-1)\pi(1-X/l)}{2}\right) \exp\left[-(2n-1)^2 \frac{\pi^2 D t}{4l^2}\right]$$

L'ajustement a été obtenu en minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs mesurées et calculées au moyen de l'outil 'solveur' du tableur 'EXCEL' (Figure 42).

La formule précédente impose que le système corresponde à un transfert unidirectionnel dans une géométrie 'plaque infinie' et que les conditions initiales et limites soient respectivement les suivantes : (1) concentration initiale  $C_0$  homogène au temps  $t = 0$  et (2) concentration en NaCl imposée en surface constante pendant l'essai.

Les cas 1 et 2 ont été construits afin de respecter au mieux ces conditions. La situation est plus compliquée pour les cas 3 et 4. La concentration en NaCl dans la saumure diminuait au cours du temps et surtout le transfert était bidirectionnel comme le montre la figure 36. Afin d'atténuer ces écarts entre réalité expérimentale et modèle d'interprétation nous avons réduit le temps de saumuration. Ceci a permis, d'une part, de limiter la variation de  $C_{surf}$  au cours du temps, et d'autre part, de pouvoir négliger la contribution du transfert dans la direction orthogonale à la languette prélevée. La figure 42 montre que dans le 'cas diffusion 4' la teneur en sel au centre de l'échantillon est effectivement négligeable. Toutefois dans ce cas, la longueur  $l$  à prendre en compte est difficile à définir puisque le muscle subissait des déformations pendant 3 % du temps de saumuration. La demi-épaisseur du muscle

a été conservée, comme dans le ‘cas diffusion 3’ afin d’effectuer le même traitement dans les deux cas.

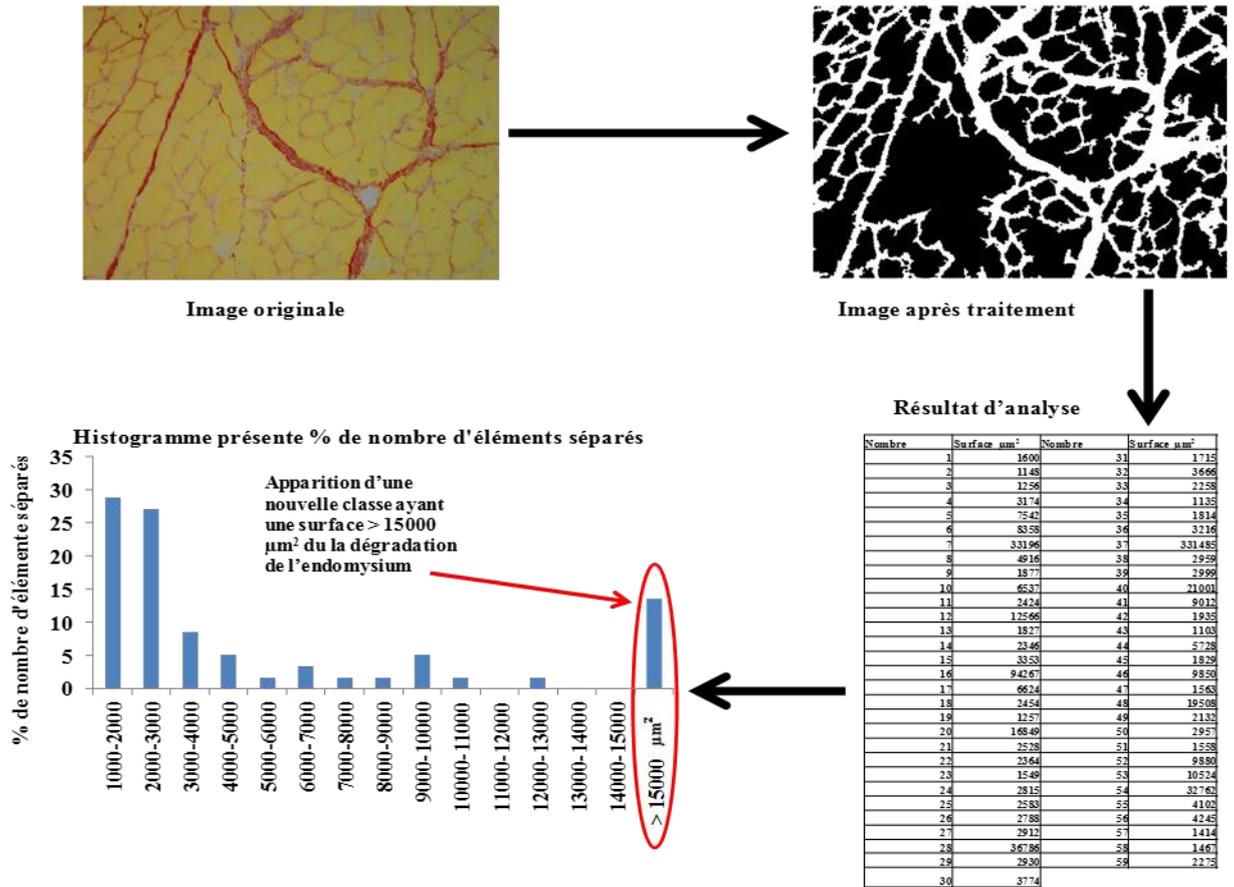


Figure 41 : Représentation du type d'analyse par le logiciel Image J ainsi que le résultat obtenu.

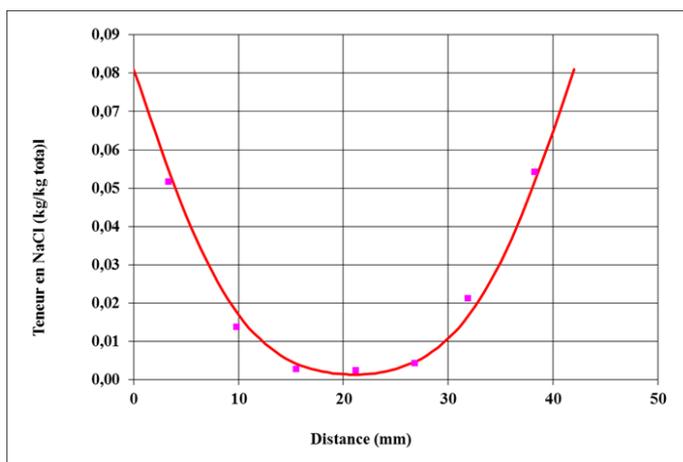


Figure 42 : Un exemple d'un profil expérimental lissé en utilisant la solution analytique de la deuxième loi de Fick pour calculer D (cas 4,  $D = 17,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ).

## **Chapitre 3. Effet du pH et du NaCl lors du marinage de viande bovine sur l'état physico-chimique des lipides et protéines et sur la structure de tissu musculaire**

Les changements de l'état physico-chimique des lipides et des protéines ont été bien étudiés à propos de la cuisson de la viande, de l'irradiation et du stockage. Cependant peu d'informations étaient disponibles sur le marinage.

Cette étude visait donc à clarifier les effets interactifs du pH et de la teneur en NaCl dans la viande après marinage sur la structure de tissu musculaire et sur l'état physico-chimique des lipides et des protéines. La plage de pH a été limitée de 6,5 à 4,3 car la littérature montrait que ce sont les limites dans la pratique. Deux teneurs en NaCl ont été retenues : la valeur habituelle dans les produits carnés (2 %) et une valeur réduite (0,9 %).

## Effects of pH and NaCl levels in a beef marinade on physicochemical states of lipids and proteins and on tissue microstructure

Diaa SHAREDEH, Philippe GATELLIER, Thierry ASTRUC, Jean-Dominique DAUDIN  
INRA UR370 Qualité des Produits Animaux, 63122 St Genès Champanelle, France

### HIGHLIGHTS

- Microstructural changes were assessed by image analysis
- Protein hydrophobicity and extra-cellular space varied concomitantly with pH
- Transverse swelling of meat fibres was affected by both pH and NaCl content
- Dividing the usual NaCl content by two did not affect biochemical changes
- Acid marinating of salted products is not recommended from a nutritional viewpoint

### ABSTRACT

Meat slices were incubated for 24 h at 10 °C in marinade solutions so that their pH reached 6.5, 5.4, or 4.3, and their NaCl contents 0.9% or 2%. The histological modifications were assessed by image analysis using two parameters: mean fibre cross section area (FCSA,  $\mu\text{m}^2$ ) and the ratio of the extra-cellular space (ECS, % area). The changes in lipids and proteins were evaluated through oxidation, protein surface hydrophobicity, and protein aggregation by granulometry (size and shape of particles). ANOVA showed that FCSA decreased linearly while ECS increased when pH decreased from 6.5 to 4.3 at either low or high NaCl salt content. Decreasing pH significantly increased TBARS and carbonyl groups, while increasing NaCl level had a significant protective effect on lipids. No marinating effect was observed on free thiols. Protein surface hydrophobicity and aggregation increased significantly with decreasing pH, but were unaffected by NaCl. The effect of these physicochemical changes on the nutritional value of meat is discussed.

Keywords: marinating, oxidation, hydrophobicity, protein changes, microstructure, beef

Jean-Dominique Daudin

INRA – Centre Clermont-Ferrand/Theix

UR 370 : Qualité des Produits Animaux

63 122 - St Genes Champanelle / France

(33) 473 62 41 92 - [jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr](mailto:jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr)

Soumis à la revue 'Meat Science'

## 1 Introduction

Adding marinade solution to improve the sensory quality of meat products is a well-established practice in many countries, and the main effects on beef have long been known (Wenham and Locker, 1976). Marinating raw meat mainly enhances flavour and improves tenderness of cooked meat cuts, but also affects colour and general acceptance positively or negatively. Tenderization is particularly important to increase the value of muscles rich in connective tissue. In addition, marinating can enhance safety by reducing bacterial development, especially of pathogens (Pathania, McKee, Bilgili, & Singh, 2010; Sabah, Juneja, & Funk, 2004; Shelef, 1984).

The detailed review by Gault (1991) of earlier work examined the basic phenomena that can explain aged meat tissue tenderization by acid marinating according to meat pH. The main conclusions were that (i) above pH 4.3 the swelling/shrinking behaviour of beef muscle tissue is dominated by fibre swelling/shrinking, itself caused by expansion/reduction of the constituent myofilament lattices, and is similar for various muscle types for pH in the range 5.1 to 3.0, (ii) collagen swelling also occurs below pH 4.3 and mostly concerns the *perimysium*, and (iii) on cooking, the swollen muscle fibres maintain a high degree of swelling, which resists the thermal shrinkage due to collagen thermal sensitivity. Beef tenderization can also be improved by early (pre-rigor or 24 h *post mortem*) injection of weak acid into meat tissue (Berge, Ertbjerg, Larsen, Astruc, Vignon & Moller, 2001). This induced a rapid pH drop to around 5.0, but no swelling or moisture content increase were observed that would be consistent with the above explanation. In this case the tenderizing effect was demonstrated to hinge mainly on higher cathepsin activity.

Many other studies have shown that meat sensorial quality, especially tenderness, can be improved by acid marinating of aged meat using various weak acids (acetic, citric, lactic, etc.). The most recent were dedicated to beef (Desmond & Troy, 2001; Burke & Monahan, 2003; Atkas, Aksu & Kaya, 2003; Ke, Huang, Decker & Hultin, 2009), turkey (Goli, Ricci, Bohuon, Marchesseau & Collignan, 2014) and poultry meats (Yusop, O'Sullivan, Kerry & Kerry, 2010). Other authors have considered alkaline marinating; this process increases meat pH from its initial *post-mortem* ultimate value but not necessarily above pH 7. This can also promote tenderization due to fibre swelling related to tissue water holding capacity (WHC). When no NaCl is added, the lowest WHC is observed at pH 5.1,

corresponding to the isoelectric point of proteins, and is more pronounced the farther the meat pH is from this value (Offer and Knight, 1988). When NaCl is added, the minimum in WHC corresponds to a lower pH (Offer and Knight, 1988). This is in favour of alkaline marinating which promotes pH increase (but not necessarily above neutrality). The most usual ingredients in alkaline marinating are polyphosphates. These have been shown to be efficient for beef (Onenc, Serdaroglu & Abdraimov, 2004; Xu, Zhou, Peng, Zhao & Yao, 2009), pork (Sheard & Tali, 2004), and turkey meat (Ergezer & Gokce, 2011).

Fibre swelling prior to cooking has been shown to explain most of the improvement in the tenderness of cooked meat, but it is difficult from prior work to derive any general rules on this parameter according to meat tissue pH and NaCl content because meat pH was rarely homogeneous in samples (short marinating times with regard to sample thicknesses), and NaCl content ranged widely from one study to another. Also, while marinating is recognized as a mean of enhancing sensory and safety qualities of meat, nothing is known about the effect of this process on nutritional quality, and especially on amino acid bioavailability.

Meat proteins are an important source of essential amino acids for humans, especially for the elderly and children, who often present a deficiency in essential amino acids. Changes in the physicochemical state of proteins (oxidation, denaturation and aggregation) can negatively affect their sensitivity to the enzymes of the digestive tract and so can decrease amino acid bioavailability (Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2009; Kamin-Belsky, Brillon, Arav, & Shaklay, 1996; Liu & Xiong, 2000; Santé-Lhoutellier, Astruc, Marinova, Grève, & Gatellier, 2008). Numerous meat processes have been described to induce changes in the physicochemical state of proteins. This has been observed during meat cooking (Astruc, Marinova, Labas, Gatellier, & Santé-Lhoutellier, 2007; Chelh, Gatellier & Santé-Lhoutellier, 2006 and 2007; Gatellier, Kondjoyan, Portanguen, Grève, Yoon & Santé-Lhoutellier, 2009; Gatellier, Kondjoyan, Portanguen, & Santé-Lhoutellier, 2010; Gatellier, Santé-Lhoutellier, Portanguen, & Kondjoyan, 2009; Haak, Raes, Smet, Claeys, Paelinck & De Smet, 2006; Promeyrat, Bax, Traoré, Aubry, Sante-Lhoutellier & Gatellier, 2010 a and b; Santé-Lhoutellier et al., 2008; Astruc, Peyrin, Venien, Labas, Abrantes, Dumas & Jamme, 2012 ), irradiation (Rowe, Maddock, Lonergan, & Huff-Lonergan, 2004), and storage in high levels of oxygen (Lund, Hviid, & Skibsted, 2007; Zakrys, Hogan, O'Sullivan, Allen, & Kerry, 2008). However, little information is available on marinating.

This study set out to clarify the interactive effects of meat pH and NaCl content after marinating on the tissue microstructure and physicochemical state of proteins. The pH range was restricted to 6.5 to 4.3, since the literature shows that these are the limits in practice. Two meat NaCl contents were selected: the usual value in meat products (2%) and a reduced value that conforms to nutritional recommendations (0.9%).

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Animal and samples**

Experiments were conducted on bovine *semitendinosus* muscle. Our objective was to determine the marinating effects on tissue structure and states of lipids and proteins with no confounding effects due to animal variability. Hence all the experiments were performed on the same muscle from the same animal (2-year-old Charolais) with ultimate pH 5.5. The muscle was removed from the carcass 24 h after animal slaughter and immediately vacuum-packaged. After storage at 4 °C for 12 days, the muscle was cut into large pieces, which were frozen at -18 °C and kept at this temperature until use.

### **2.2 Marinating trials**

Six thin slices of about 15 g and 2 mm in thickness were cut from different frozen pieces. Cutting was performed so that the fibres were approximately parallel to the faces. After thawing at 2 °C, the slices were incubated for 20 h at 10 °C under agitation in 2 L of marinade solution using a bioreactor (Infors HT, Labfors, Switzerland) which permitted control of both temperature and pH. Six treatments were performed: 3 levels for pH and 2 for NaCl content. The slices were weighed (+/- 1 mg) before and after marinating. After marinating, a standardized procedure was applied to rapidly eliminate the excess solution from the slice surface: each slice face was placed in contact for 30 s with a paper towel.

During marinating, the pH of the solution was controlled by adding diluted solutions of either HCl or NaOH (0.5 M). Preliminary experiments were carried out to determine the required solution pH kinetics to obtain a final sample pH of 6.5, 5.4 or 4.3.

Two solution NaCl contents (11 and 27 g/L) were used to set the sample NaCl content to either 0.9% or 2% w/w, respectively. We checked that the NaCl production resulting from

acid and base additions to control the solution pH had negligible impact on the NaCl content of the marinated samples.

Mass transfer calculations using the apparent diffusivities of protons and NaCl in muscle tissue estimated by Lebert and Daudin (2014) showed that pH and NaCl contents were homogeneous within the samples at the end of marinating in these conditions.

After incubation, samples were frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use excepted for histological samples that were immediately cryofixed. Non-incubated slices, stored and frozen in the same conditions as the incubated ones, were used as controls.

### **2.3 Physicochemical analysis**

The pH was measured with a MP230 pH meter (Mettler Toledo, Viroflay, France) equipped with a probe with a built-in temperature sensor. A sample 0.6 g in weight was taken from all the slices and the pH was measured after mincing with 3 mL of deionized water.

NaCl content was derived from chloride ion content measured with a chloride analyser MHII-926 (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK.). The samples (0.5 g from each slice) were first thinly minced in 10 mL of deionized water and the supernatant was centrifuged.

### **2.4 Histology and image analysis**

At the end of marinating, 4 samples ( $2 \times 10 \times 10\text{ mm}$ ) were taken from 4 different slices and frozen in cooled isopentane ( $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) chilled with liquid nitrogen ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. One section ( $10\text{ }\mu\text{m}$  thick) was cut perpendicular to the mean fibre direction from each sample using a cryostat at  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Microm, HM 560), mounted on slides and air dried for about 15 min at room temperature. Sections were stained using Hematoxylin-Eosin-Safran (Sheehan & Hrapchak, 1980).

Histological sections were acquired in bright field mode using an Olympus BX61 transmission microscope coupled to a digital camera (Olympus DP 71). The mean area of the fibre cross section (FCSA,  $\mu\text{m}^2$ ) and the ratio of the extra-cellular space to the total image area (ECS, percent area) were estimated by image analysis (Image J). Four images in each section were analysed. One image corresponded to a number of whole cells ranging from 70 to 100.

The main steps in the image analysis process were: correction of luminosity by comparison with a white image, extraction of the green channel image, black and white binarization using a defined threshold to separate fibres from the extra-cellular space, delimitation of all the complete fibres, and measurement of their surface area. The calculations were automated, but the identification of the fibres was supervised manually by comparison of the binarized image with the original one.

The dimension changes across the main axis of the fibres were calculated from the above histological measurements. The whole area ( $A_i$ ) of an image corresponding to a reference sample can be related to  $FCSA_i$  and  $ECS_i$  (Equation 1) measured in this image:

$$A_i = (N \times FCSA_i) / (1 - ECS_i) \quad (1)$$

The area ( $A_t$ ) that would occupy the same number of fibres ( $N$ ) after marinating can be deduced by the same equation from  $FCSA_t$  and  $ECS_t$  measured in the image of the treated sample. Thus the change in cross sectional area can be calculated by Equation 2. This equation is finally independent of the number of fibres observed on the different images. Its advantage is that it shows the respective effects of the fibre mean diameter and extra-cellular space variations, which do not have the same impact on meat tenderization.

$$(A_t - A_i) / A_i = (FCSA_t / FCSA_i) \times ((1 - ECS_i) / (1 - ECS_t)) - 1 \quad (2)$$

## **2.5 Biochemical measurements**

All these measurements were carried out on 6 raw samples, and for each marinating condition on samples taken from the 6 marinated slices.

### *Lipid oxidation*

Lipid oxidation was evaluated on raw and marinated samples by measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). It was measured in duplicate on whole meat extract according to the method of Mercier, Gatellier, Viau, Remignon and Renerre (1998). The results were expressed as mg of malondialdehyde (MDA) per kg of meat (TBA units).

### *Purification of myofibrillar proteins*

Changes in protein state (oxidation and surface hydrophobicity) were evaluated on myofibrillar proteins purified according to the method of Martinaud, Mercier, Marinova, Tassy, Gatellier & Renerre (1997) with slight modifications in the case of marinated samples. Protein physicochemical state being very sensitive to pH and ionic strength, to prevent any

artefact due to the purification process, marinated samples were prepared and analysed in the same solutions as used for marinating.

#### *Oxidation of myofibrillar proteins*

Protein carbonyl groups were measured by the method of Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, and Stadtman (1987) with slight modifications (Mercier *et al.*, 1998). Carbonyl groups were detected by reactivity with 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form protein hydrazones. The results were expressed as nanomoles of DNPH fixed per milligram of protein. Each measurement was duplicated.

Cysteine oxidation was evaluated by the decrease in free thiols. Free thiols were measured by a modification of Ellman's method using 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) DTNP (Morzel, Gatellier, Sayd, Renerre, & Laville, 2006). The results were expressed as nanomoles of free thiols per milligram of protein. Each measurement was duplicated.

#### *Surface hydrophobicity of myofibrillar proteins*

This was determined using a hydrophobic probe (bromophenol blue, BPB) according to the method of Chelh *et al.* (2006). The results were expressed as the percentage of BPB bound to protein ( $[\text{bound BPB}/\text{total BPB}] \times 100$ ). Each measurement was duplicated.

#### *Protein aggregation*

Protein aggregation was evaluated on meat extracts with a Sysmex FPIA-3000 granulometer (Malvern Instruments, Malvern, UK), which enabled reliable and reproducible characterization of particle number, size, and shape distribution using automated imaging techniques. Meat extracts were prepared and analysed by the method previously described by Promeyrat *et al.* (2010 a and b) with slight modifications. For the same reasons as for purification the analyses were carried out in the same solutions as used for marinating. Since the number of particles is difficult to determine accurately in a heterogeneous medium like meat extract, only 2 granulometry parameters were assessed: (i) diameter of the equivalent circle (EC diameter, circle having the same projected area as the particle image) and (ii) particle circularity ( $\Phi$ , ratio between the circumference of the equivalent circle and the peripheral length of the projected image). The circularity varied between 0.4 for a thin long particle like a fibre, and 1 for a sphere. Each measurement was duplicated.

## **2.6 Statistical analysis**

To study the effects of pH and NaCl content on each biochemical or microstructural characteristics ( $X_{i,j,k}$ ) a series of variance analyses (ANOVA; STATISTICA 12) were performed according to the model :

$$X_{i,j,k} = \mu + F1_i + F2_j + F1F2_{(i,j)} + \varepsilon_{i,j,k} \quad (3)$$

where

$X_{i,j,k}$  is one of the studied dependent variables,  $i, j$  are the number of levels for each factor and  $k$  is the number of repetitions), with  $k = 6$  repetitions for biochemical values (TBARS, carbonyls, cysteine oxidation, hydrophobicity, EC diameter,  $\Phi$ ) and 16 repetitions (4 samples  $\times$  4 images) for microstructural values (FCSA and ECS),

$\mu$  is the mean effect

$F1_i$  is the effect of the pH, with  $i = 3$ ,

$F2_j$  is the effect of the NaCl content, with  $j = 2$ ,

$F1F2_{(i,j)}$  is the interaction between pH and NaCl, with  $(i,j) = (6)$ ,

$\varepsilon_{i,j,k}$  is the residual variation.

On the graphs (Figures 2 and 4) that present the two factor effects, the bars indicate the confidence interval ( $p < 0.05$ ) of the model.

For cross section area changes (Eq. 2), the Student  $t$  test was used to assess the significance of the differences between means.

## **3 Results and discussion**

### **3.1 Control of marinating**

The marinade solution pH should be maintained at a much higher or lower level than the pH target during the first 7 h to achieve pH equilibrium in 20 h. An example of solution and meat pH variations with time is shown in Figure 43. The fact that apparent NaCl diffusivity is more than 10 times higher than that of protons (Lebert & Daudin, 2014) guarantees NaCl equilibrium at the same time.

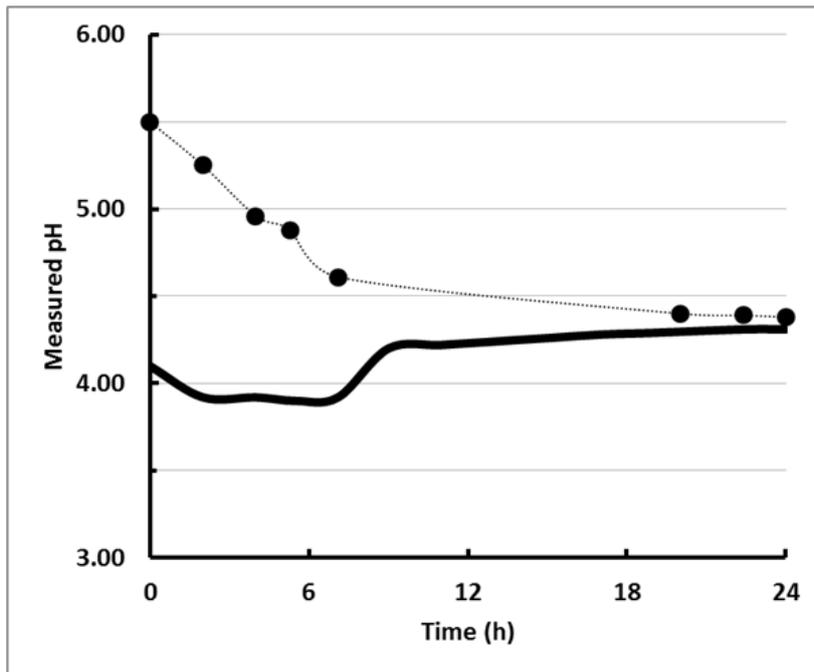


Figure 43 : Example of variable pH marinating conditions used to set meat sample pH (slices of about 15 g, 2 mm thick) at 4.3 in 24 hours: pH of the marinating solution (solid line), measured meat pH (dots).

Table 7 : Summary of the marinating conditions and mean values of pH and NaCl contents in marinated samples (total duration 20h).

Trial name and marinating conditions		Measurements on meat samples	
marinating conditions to control pH	Name	pH	NaCl content (%)
solution at pH=7.3 during 7h, then 6.7 until the end	pH 6.5, NaCl 0.9 %	6.53 ± 0.07	0.84 ± 0.06
	pH 6.5, NaCl 2 %	6.48 ± 0.03	2.29 ± 0.05
solution at pH = 5.5 during whole trial	pH 5.4, NaCl 0.9 %	5.42 ± 0.01	0.86 ± 0.02
	pH 5.4, NaCl 2 %	5.38 ± 0.01	2.02 ± 0.04
solution at pH = 3.9 during 7h, then 4.2 until the end	pH 4.3, NaCl 0.9 %	4.39 ± 0.01	0.97 ± 0.05
	pH 4.3, NaCl 2 %	4.31 ± 0.03	1.96 ± 0.06

Table 7 shows the pH and NaCl contents measured in samples after marinating. For sample pH, both standard deviations and differences between the measured and target values were less than 0.1. Concerning NaCl content, except for the trial 'pH 6.5 – NaCl 2 %' the differences between the measured and target values were lower than 0.1%, and the standard deviation was about 0.05%.

### **3.2 Histological and dimensional changes**

Figure 44 presents one representative histological image of the control sample and of the marinated samples for all the marinating conditions tested. It is clear that all the immersion treatments strongly affected the meat tissue structure compared with the control. The main features that can be assessed visually is that the distance between the cells increased with pH decrease, and that the structure was similar at pH 4.3 for the 2 NaCl contents but very different at pH 6.5.

For FCSA and ECS estimated values, ANOVA indicated a significant effect of both pH and NaCl content ( $p < 0.001$ ), revealing a significant interaction between pH and salt content. When compared with the control sample (i) FCSA of all the treated samples were significantly different ( $p < 0.01$  or  $0.001$ ) and (ii) except for the case (pH = 5.4 and 2%), for which there was no significant difference, all ECS values were significantly different ( $p < 0.001$ ).

The results of the statistical model (Equation 3) are shown in Figure 45. It clearly appears that FCSA decreased while ECS increased when pH decreased from 6.5 to 4.3 at either low or high NaCl salt content. However, these variations were less pronounced at low NaCl content. This is in agreement with the results of Puolanne, Ruussunen and Vainionpaa (2001) who tested the reduction of NaCl in sausages and found a limited increase in water holding capacity due to pH increase at NaCl content equal to 1.0% while it was high at 2.5%. According to the conclusions of Gault (1991), it would be rather difficult to promote tenderization of cooked beef products with reduced salt content, since FCSA increase is limited.

The mean values of the FCSA and ECS of the control samples were respectively equal to  $2350 \pm 250 \mu\text{m}^2$  and  $10 \pm 2\%$ . Table 8 shows the results of the calculations using Equation 2; it indicates the relative contribution of FCSA and ECS changes. At pH 4.3 the global increase in cross sectional area ( $\Delta A_i/A_i$ ) was higher than 20%. However, this increase was the result of marinade infiltration between the cells, since the ECS term increased more than FCSA decreased.

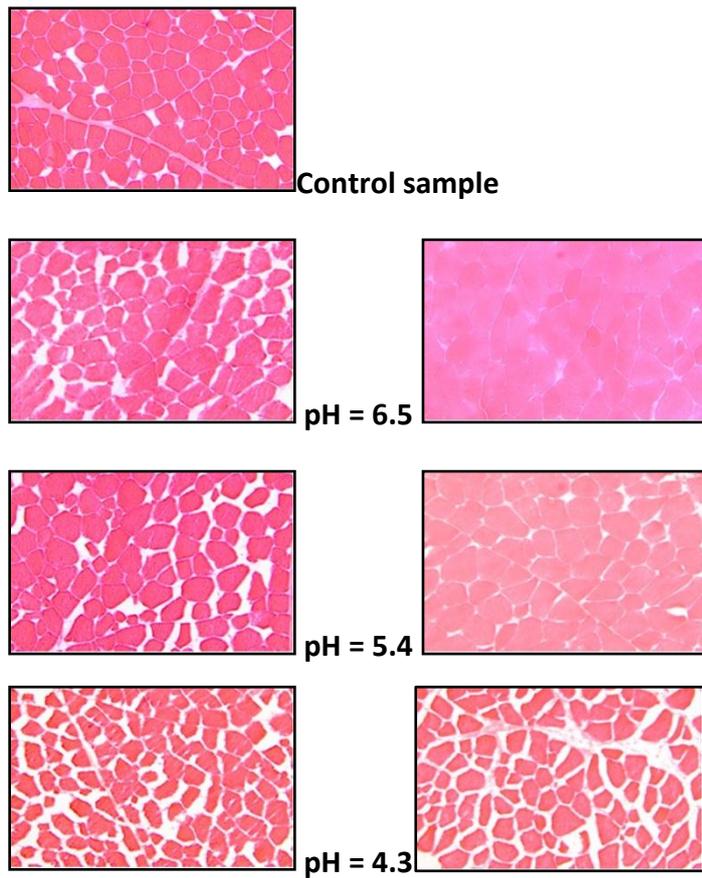


Figure 44 : Examples of histological images (2290 × 1720 μm). NaCl content (w/w) in samples at the end of marinating: 0.9% (left) and 2% (right).

Table 8 : Calculation of the increase in global cross section area from the two histological parameters (mean Fiber Cross Sectional Area and Extra-Cellular Space) measured in the control (i) and marinated samples (t). Statistical differences among  $\Delta A / A_i$  calculated values are noted a-d ( $p < 0.05$ )

Trial	FCSAt / FSCAi		(1-ECSi)/(1-ECSt)		$\Delta A / A_i$	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
pH 4.3 NaCl0.9 %	0.87	0.03	1.37	0.03	0.21 <sup>a</sup>	0.07
pH 4.3 NaCl2 %	0.89	0.02	1.50	0.04	0.35 <sup>b</sup>	0.06
pH 5.4 NaCl0.9 %	1.13	0.02	1.23	0.03	0.40 <sup>b</sup>	0.06
pH 5.4 NaCl2 %	1.60	0.04	1.01	0.01	0.61 <sup>c</sup>	0.06
pH 6.5 NaCl0.9%	1.20	0.03	1.14	0.02	0.37 <sup>b</sup>	0.05
pH 6.5 NaCl2%	2.37	0.06	0.94	0.01	1.21 <sup>d</sup>	0.06

In line with Offer and Knight's theory (1988), the FCSAt/FCSAi ratio is then minimum and less than 1 due to the presence of  $\text{Cl}^-$  ions bound to myofibrillar proteins. At pH 5.4, which is very close to that of the control, the increase in FCSA was, as expected, greater at 2% NaCl content; at this level the FCSA increase explains the entire cross sectional area increase. From a practical point of view, it is interesting to compare 2 cases: 'pH 4.3 – NaCl 2%' and 'pH 6.5 – NaCl 0.9 %'. These both exhibited a global increase in cross sectional area of 35%, but only the second case is likely to promote tenderization.

We attempted to calculate an index of volumetric variation from weight measurements before and after marinating (Gault, 1991). However, this procedure required wiping off the excess of marinade adsorbed on the sample surface before weighing the treated samples. In our case the very high surface-to-volume ratio yielded variable and inaccurate values. Thus only qualitative conclusions could be drawn from the present estimations: volumetric increases ranging from 5 to 20% were observed for all cases except for 'pH 6.5 – NaCl 2 %', in which it was about 50%. This suggests that the dimension along the fibres slightly decreased in all cases. In order to reduce measurement error, new experiments with thicker samples could be performed to confirm this conclusion. However, this would imply much longer marinating times to achieve pH equilibrium, since diffusion is proportional to the square of the thickness.

### **3.3 Lipid and protein oxidation**

#### *Lipid oxidation*

During meat processes, aldehydic products of the lipid peroxidation can react with free amino groups of proteins to form Schiff bases (Gatellier *et al.*, 2010), which are precursors of the Maillard and Amadori reactions. The involvement of divalent aldehydes, such as malondialdehyde, in such reactions could promote the formation of protein aggregates by formation of inter-chain bridges (Gerrard, 2002).

Figure 46a shows the results of the statistical model (Eq. 3). ANOVA revealed a significant effect of pH ( $p < 0.001$ ) and of NaCl content ( $p < 0.01$ ) on lipid oxidation without interaction between the two parameters. None of the TBARS values below 0.5 TBA units are different from that measured in the control samples. This latter value is generally observed in fresh meat (Gatellier *et al.*, 2009; Mercier, Gatellier, & Renerre, 2004; Mercier *et al.*, 1998; Santé-Lhoutellier, Engel, & Gatellier, 2008). All other treatments increased lipid oxidation significantly ( $p < 0.001$ ), especially when pH was 4.3. We note that meat products with reduced NaCl content would lead to higher lipid oxidation.

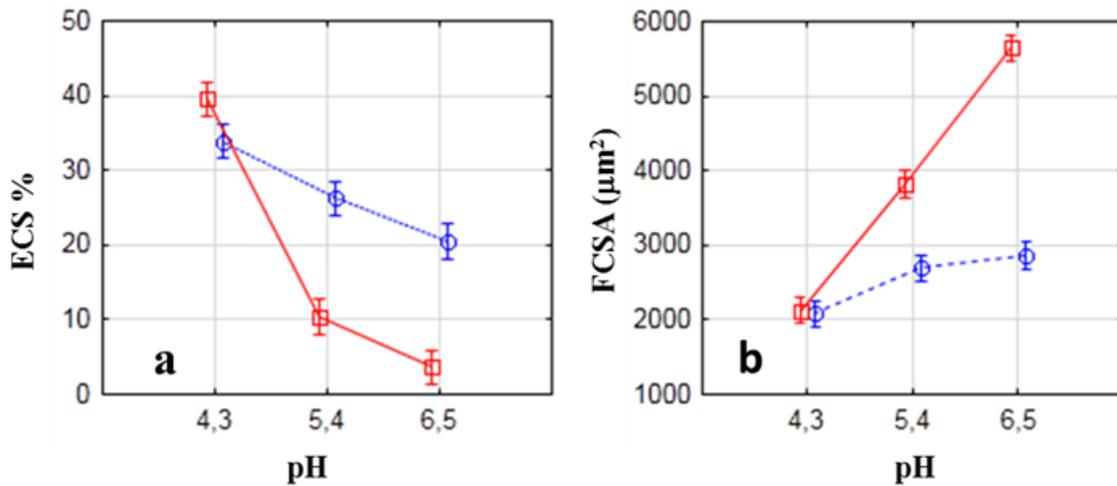


Figure 45 : ANOVA results for the two microstructural descriptors; effect of pH and NaCl content (11 g/L: circle and dotted line, 27 g/L: square and continuous line). The vertical bars indicate the confidence interval ( $p < 0.05$ ) with the model in Equation 3.

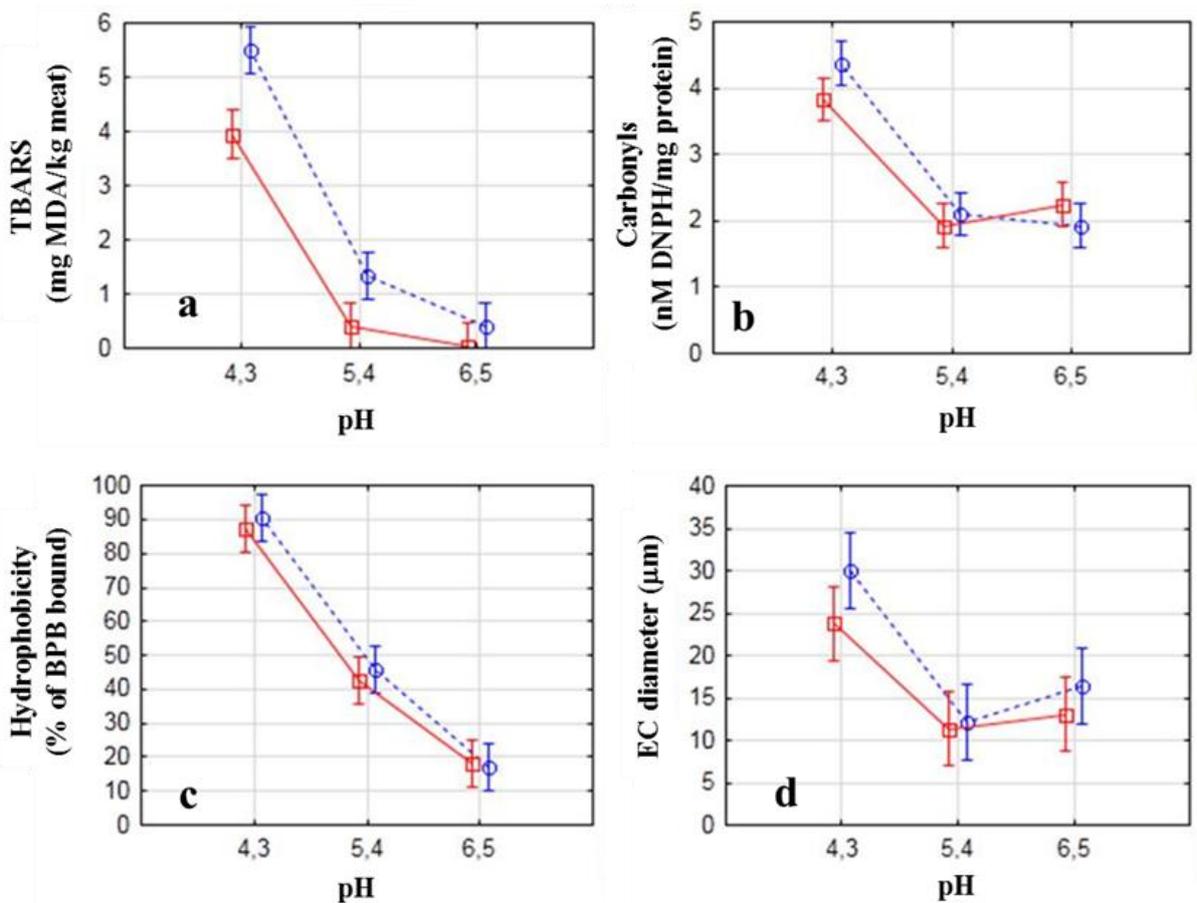


Figure 46 : ANOVA results for four of the six biochemical parameters measured; effect of pH and NaCl content (0.9%: circle and dotted line, 2%: square and continuous line). The vertical bars indicate the confidence interval ( $p < 0.05$ ) with the model in Equation 3.

The observed pH effect is not surprising because low pH favours myoglobin oxidation (Gotoh & Shikama, 1976; Renerre, Anton, & Gatellier, 1992) with a release of oxygen, previously bound to haeminic iron, in the form of hydroperoxide ( $\text{HO}_2^\circ$ ) and superoxide ( $\text{O}_2^\circ$ ) radicals (Giddings, 1977; Sugawara & Shikama, 1980) which are very reactive towards lipids and proteins. Superoxide radicals can be dismutated into hydrogen peroxide. Also, pH decrease leads to the release of iron from iron-carrying proteins (ferritin and transferrin) (Kanner & Doll, 1991; Kanner, Hazan, & Doll, 1988). This “free iron”, also called “catalytic iron”, can react with hydrogen peroxide to give hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\circ$ ) which are also involved in lipid and protein oxidation.

The inhibitory effect of the highest level of NaCl on lipid oxidation is more difficult to explain. Opposing effects have been reported in different meat products, and since this question was reviewed by Lea (1939) and Watts (1954), the situation has remained unclear. For many authors, NaCl may act as a pro-oxidant in meat products due to its ability to release iron from heme binding proteins (Kanner, Harrel, & Jaffe, 1991), to the degradation of the antioxidant enzyme activities (Gheisari & Motamedi, 2010; Hernandez, Park, & Rhee, 2002; Lee, Mei, & Decker, 1997; Sarraga, Carreras, & Regueiro, 2002), or to the presence of oxidant heavy metal trace contaminants in salt. Nevertheless, in some conditions, inhibition of lipid oxidation by NaCl has also been reported. For example, Rhee, Smith and Terrell (1983) reported that NaCl activated lipid oxidation at low concentrations but inhibited it at concentrations greater than 2% in ground pork. In cooked turkey meat, previously prepared with 0 and 2% NaCl, King and Bosch (1990) detected significantly lower TBA values in samples with 2% NaCl than in meat with no added salt. In dry cured porcine loins, Sarraga *et al.* (2002) also observed an antioxidant effect at 3% NaCl. Furthermore, *in vitro* studies have demonstrated an antioxidant effect of NaCl (Mabrouk, & Dugan, 1960; Sarraga, & Garcia-Regueiro, 1998); Mabrouk and Dugan (1960), explained their results by a decreased solubility of oxygen in high ionic strength solutions.

#### *Essential amino acid oxidation*

Oxidation of numerous amino acids leads to the formation of carbonyl groups (Stadtman 1990). Among these, basic amino acids (lysine, histidine, arginine) and threonine are essential amino acids for humans, and their oxidation leads to a marked decrease in the nutritional value of meat. Moreover, carbonyls can react with free amino groups of non-oxidized lysine to form imine bonds (Liu & Xiong, 2000). This reaction leads to aggregate formation, with a negative impact on protein digestibility (Santé-Lhoutellier, Aubry, & Gatellier, 2007).

Figure 46b shows the results of the statistical model (Eq. 3); ANOVA showed a significant pH effect on carbonyl content ( $p < 0.001$ ), but did not reveal any significant salt effect. The samples at pH 6.5 and 5.4 did not differ from their control samples; the value of 2 nanomoles of carbonyl per milligram of protein corresponds to the basal level of carbonyls generally observed in fresh meat (Mercier *et al.*, 2004; Mercier *et al.*, 1998; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008). A twofold increase was observed at pH 4.3 in comparison with all the other samples. It is noteworthy that a much higher value (14) was measured in bovine meat slices cooked at high temperature (above 200 °C – 5 min) by Gatellier *et al.* (2009).

The negative effect of low pH observed on protein oxidation probably had the same causes as those previously described for lipid oxidation. Amino groups (NH or NH<sub>2</sub>), which are the major source of protein carbonyls (Stadtman 1990), are very sensitive to the free oxygenated radicals generated by the pH decrease. The absence of any significant salt effect could be explained by the low extent of protein oxidation induced by marinating when compared with lipid oxidation. This result confirms previous results showing higher sensitivity of lipids than proteins to oxidative stress (Mercier *et al.*, 2003; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008).

#### *Cysteine oxidation*

Cysteine is not an essential amino acid for most human beings, but for some of them the biosynthesis of cysteine from homocysteine is deficient, and in this case this amino acid becomes essential. By the formation of disulphide bridges, cysteine oxidation can promote protein aggregation and thus impact negatively on the nutritional value of meat.

ANOVA showed no significant effect of pH or NaCl on the level of free thiols. Also, no significant difference was observed between control and marinated samples (results not shown). At present we have no clear explanation for this lack of pH and salt effect. We can only state that this result confirms the low extent of free thiol oxidation usually observed in raw meat when compared with carbonyl formation during storage (Martinaud *et al.*, 1997) and cooking (Gatellier *et al.*, 2009; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008).

### **3.4 Changes in protein state**

#### *Surface hydrophobicity*

In view of its capacity to monitor subtle changes in the chemical and physical state of protein, surface hydrophobicity is a suitable parameter to investigate protein denaturation. Also,

increase in protein surface hydrophobicity favours the formation of non-covalent aggregates (Chelh *et al.*, 2006; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2008; Promeprat *et al.* 2010 a and b).

Figure 46c shows the results of the statistical model on myofibrillar protein surface hydrophobicity. ANOVA revealed a significant effect of pH ( $p < 0.001$ ), but no significant impact of NaCl. The samples at pH 6.5 did not differ significantly from the controls, and measured hydrophobicity values were approximately inversely proportional to pH. This was due to conformational changes, i.e. the unfolding of myofibrillar proteins, and exposure of non-polar amino acids to the surface of proteins. The cleavage of hydrogen bonds or electrostatic bonds has been largely described as the major cause of protein unfolding, but oxidative modifications of some amino acids can also be involved.

Chelh *et al.*, (2006) showed that heating myofibrillar proteins at 70 °C for 60 min. promotes a threefold increase in surface hydrophobicity compared with raw samples. In heated actomyosin, Yongsawatdigul and Park (2003) observed a 2.5-fold increase in protein surface hydrophobicity between 30 and 70 °C. The effect of acid marinating was of the same order of magnitude when pH was lowered from 5.5 to 4.3 whatever the NaCl content. Alkaline marinating had the opposite effect: the protein surface hydrophobicity was divided by 2 at pH 6.5 in comparison with the controls.

At pH 4.3, the maximum values of the ECS term in conjunction with the minimum values of the FCSA term (Table 8) corresponds to maximum myofibrillar protein surface hydrophobicity (Figure 46c). Also, high Pearson's coefficient correlations were calculated between this latter protein state descriptor and ECS ( $r = 0.83$ ) or FCSA ( $r = -0.71$ ). The water entrapped within the myofilament lattice is less tightly bound to the myofibrillar proteins in this case. Thus part of the intracellular water left the cells to occupy the extracellular space. Of course, this water binding to the myofilament lattice is also affected by NaCl content, which modifies the protein electric charges, but has almost no effect on hydrophobicity. For example, the FCSA was higher at 2% NaCl content than at 0.9% at both pH 5.4 and 6.5, while no differences in hydrophobicity were observed.

The fact that protein hydrophobicity reached its maximum in the same conditions of pH as carbonyls indicates that oxidation is probably involved in the protein structural change during the marinating process; Pearson's coefficient correlation between these two descriptors was equal to 0.91. Carbonyl formation can impact the protein structures by changing the charge of some amino acids (i.e. the positive group  $-\text{NH}_3^+$  of lysine can be changed by the neutral carbonyl group  $-\text{CHO}$ ) or by the formation of imine bonds in reaction with free amino groups.

### *Aggregation*

Particles observed with the granulometer corresponded to myofibril fragments produced during marinating or by disintegration of the muscle myofibrils during extraction. Although the mechanical homogenization process during extraction can affect the structure of myofibrils, all the samples were prepared in the same conditions, thus allowing comparisons between control and marinated meats. Such model reflects what happens in mincing meats or in patties where myofibrils are cut into fragments which size depends on the severity of the grinding process. Moreover, during the process of mastication, muscle fibres are also submitted to mechanical constraints, cutting and pressure, which could affect in similar way the myofibrillar structures.

ANOVA revealed no significant effect of pH or NaCl level on the mean circularity of particles. Figure 46d shows the results of the statistical model for the mean EC diameter of the particles. ANOVA indicated a significant effect of pH ( $p < 0.001$ ), but no significant effect of NaCl content on this parameter. When compared, EC diameters in samples at pH 6.5 or 5.4 did not differ significantly from that measured with control meat. In these cases, the mean EC diameters ranged from 11 to 16  $\mu\text{m}$ ; these values are of the same order as those previously observed in fresh pork meat by Promeyrat *et al.* (2010 a and b).

The twofold increase in EC diameter from 5.4 to 4.3 can be set in parallel with those of carbonyls (Fig. 46b) and hydrophobicity (Fig. 46c); high Pearson's coefficient correlations were calculated between EC diameter and carbonyls ( $r = 0.95$ ) or hydrophobicity ( $r = 0.81$ ). This correspondence suggests that, by generating covalent or non-covalent inter-chain bridges, changes in the physicochemical state of proteins induced by acid marinating could promote protein aggregation.

We note that the granulometry results gained on marinated meats were discrepant with those previously recorded by Promeyrat *et al.* (2010 a and b) in cooked meat. These authors observed a marked decrease in mean EC diameters and a concomitant increase in circularity attributed to a rolling up of fibres on themselves in the aggregates. This suggests that different mechanisms of protein aggregation take place in these two cases. Increasing temperature generates mostly amorphous aggregates with a circular aspect, while decreasing pH increases particle size while preserving their fibrous state. The differences in physicochemical modifications of proteins induced by temperature increase and by pH decrease (such as cysteine oxidation present in cooked meats and not in marinated meats or level of carbonyls

higher in cooked meat) could explain the differences observed in granulometry between cooking and marinating.

In meat, many studies have demonstrated the negative impact of aggregation on sensitivity of proteins to proteolysis by enzymes of the digestive tract (Kamin-Belsky *et al.*, 1996; Liu & Xiong, 2000; Santé-Lhoutellier *et al.*, 2007). This reduced digestibility of proteins leads to a decrease in bioavailability of amino acids, with a negative impact on the nutritional quality of meat products. Moreover, besides poorer amino acid bioavailability, a reduced protein digestion rate could have an adverse effect on human health by the formation of fermented products, such as phenols and cresols, which can increase the risk of colon cancer (Evenepoel, Claus, Geypens, Maes, Hiele, Rutgeerts & Ghoo, 1998; Geypens, Claus, Evenepoel, Hiele, Maes, Peeters, Rutgeerts & Ghoo, 1997).

## **4 Conclusion**

The specific marinating conditions used in this study allowed homogeneous values of pH and NaCl content to be obtained in the meat tissue. This enabled an analysis of histological images to show that meat tissue swelling can be due to either an increase in extracellular space or a swelling of meat fibres. These two structural changes probably do not have the same impact on meat tenderization, which is the main target of meat marinating. Based on earlier work that mainly explained tenderization by fibre swelling, it can be concluded that acid marinating of salted meat products would not be beneficial, while alkaline marinating would be. Of course, this needs to be confirmed on other beef muscles and on the basis of sensory tests.

From a nutritional point of view, acid marinating of salted beef should also be avoided, while alkaline marinating, which promoted a limited increase in pH (6.5) in this work, has no detrimental impact. Acid marinating induced an extensive oxidation of lipids and proteins and increased protein surface hydrophobicity. These changes in oxidation state and hydrophobicity favoured protein aggregation, reported in the literature to reduce protein digestibility.

There are thus good reasons to conclude that during the preparation of industrial salted meat products the combination of acid marinating and cooking processes may worsen the degradation of nutritional value. To limit this degradation an appropriate antioxidant

protection should be provided by the addition of vitamins (C and E, alone or in combination) or vegetable antioxidants (polyphenols) in the marinade solutions. Such antioxidants have been already used with success in different meat products.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was partly supported by a grant awarded as part of the ProSafeBeef project under the 6th Framework Programme of the European Union. The authors thank S. Portanguen and O. Loison for their technical assistance.

## **Chapitre 4. Analyse, reproduction et caractérisation du traitement mécanique de pièces de viande pendant le malaxage au moyen d'un nouveau simulateur de laboratoire**

Deux annexes complètent les résultats qui sont exposés dans cet article :

- L'annexe 4, montre pour deux essais, les étapes du traitement des mesures Force - Déplacement faites avec le simulateur pendant chaque compression du muscle.
- L'annexe 5, regroupe dans des tableaux l'ensemble des mesures mécaniques effectuées lors des essais de saumurage-malaxage. La synthèse est présentée dans l'article constituant ce chapitre et les conséquences sur les modifications biochimiques et structurales sont présentées respectivement dans les chapitres 6 et 7.

## Design of a new laboratory tumbling simulator for chunked meat: analysis, reproduction and measurement of mechanical treatment

Jean-Dominique DAUDIN, Diaa SHAREDEH, Raphael FAVIER, Stéphane PORTANGUEN  
Jean-Michel AUBERGER, Alain KONDJAYAN,  
INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F- 63122 Saint Genès Champanelle, France

### HIGHLIGHTS

- Kinetics and rates of deformation due to muscle fall were assessed from video films
- Laboratory tumbling simulator was built to control and measure muscle deformation
- Deformation rates in industrial tumblers of various sizes are now reproducible
- Energy dissipated by deformation is 5 to 10% of initial potential energy

### ABSTRACT

Chunked meat is tumbled in large rotating drums, which is known to impact process yield and product quality. These impacts are mainly due to hundreds of falls, but no information is available on the actual mechanics involved. Both kinetics and rates of deformation were estimated from slow-motion films (1000 frames/s) of two types of ham muscles falling, duration and rate of muscle deformation varied from 20 to 120 ms and from a few 4 % to 40%, respectively. A lab-scale device was built to reproduce these mechanical treatments and simulate what happens in industrial tumblers of various designs and sizes. Maximum force, deformation rate and dissipated strain energy of each deformation were calculated from force *versus* strain recordings. Dissipated strain energy was about 100 mJ or 500 mJ when deformation rate was 12 or 30%, respectively.

Keywords: tumbler, deformation, mechanical treatment, simulation, strain energy, meat.

Jean-Dominique Daudin  
INRA – Centre Clermont-Ferrand/Theix  
UR 370: Qualité des Produits Animaux  
63122 St-Genes-Champanelle, France  
+33 (0)4 73 62 41 92 - [jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr](mailto:jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr)

## 1 Introduction

Tumbling is a key step in the manufacture of cured and/or cooked meat products. Curing–tumbling is usually performed in baffled rotating drums, but processing conditions are highly variable due to differences in tumbler design and operating conditions (Martin, 2012). Industrial tumbler diameters range from 0.5 to 2 m whereas pilot-scale tumbler diameters are below 0.7 m. Furthermore, processing time and rotational speed are recipe-dependent, changing with pre-treatment, meat type, piece size, final product properties, and so on. Processing time is typically in the range of 2 to 12 h, and rotational speed varies from 4 to 12 rpm. An intermittent regime is sometimes used that alternates rotating periods with rest periods. The mechanical energy which is transmitted to meat pieces due to falling and striking against the baffles leads to meat deformation.

Studies show that meat tumbling modifies meat tissue structure (Theno *et al.*, 1978; Siro *et al.*, 2009), enhances salt apparent diffusion (Dolata *et al.*, 2004; Siro *et al.*, 2009), promotes protein solubilization and extraction (Ghavimi *et al.*, 1987; Kerry *et al.*, 1999; Olkiewicz *et al.*, 1995), improves cooking yield (Gillet *et al.*, 1981; Dzudie *et al.*, 1999; Szerman *et al.*, 2007), and gives better final product tenderness and juiciness (Ghavimi *et al.*, 1987; Hullberg and Lundstrom, 2004). All these studies on meat curing–tumbling were carried out in industrial or pilot tumblers of various types and sizes, and for a lot of operating conditions. Unfortunately, the results are apparatus-dependent, and, except for the qualitative trends listed above, the quantitative impacts of tumbling cannot be related to the fundamental characteristics of the mechanical treatment undergone by meat chunks. Consequently, these studies cannot be used to tease out quantitative rules to optimize the tumbling protocol, and any attempt to transpose the conclusions from one study to another warrants heavy caution. Industry thus has to rely on a time-consuming trial-and-error approach to determine the best operating conditions for a given type of meat and a given recipe using a given tumbler.

It looks very difficult if not impossible to study the mechanical behaviour of meat pieces in industrial or pilot tumblers. Our aim here was therefore to develop a laboratory device that can simulate this mechanical treatment independently of tumbler design. We carried out a first set of experiments using slow-motion films to analyze meat deformation due to falls.

## 2 Basis of a tumbler simulator design brief

Meat processing inside a tumbler drum is illustrated in Figure 47A. A layer of meat chunks is placed in the drum with either marinade or brine; the brine can also be injected into the meat during a previous step. Due to drum rotation, most of the meat pieces are taken by the baffles from the bottom to the top and fall down on the meat layer at a frequency that depends on rotation speed and number of baffles. Mean fall height is proportional to drum diameter but varies strongly between rotations since a piece of meat can fall before it reaches the top or even just remain in the bottom layer. Mean fall height is also dependent on tumbler fill, which in practice typically varies from 50 % to 100 % of nominal capacity. At the same time, drum rotation promotes mixing and consequently friction between a meat piece surface and either the drum wall or the surfaces of other meat pieces.

The mechanical action undergone by one meat piece is therefore very complex to plot and highly variable with time along tumbling. For the sake of simplicity, this mechanical action can be broken down into two main actions which should be reproduced separately for rational analysis:

### *Action A - Short deformation due to fall*

The kinetic energy accumulated during a fall, equal to the initial potential energy at the start of the fall, promotes a brief deformation of the meat piece on contact with the bottom layer. Since meat tissue does not have a pure elastic behaviour (Lepetit, 1991; Lepetit & Culioli, 1994), the energy is partly dissipated into strain energy and finally into heat. This mechanical action can be assimilated to a very short mechanical compression test. Initial potential energy is proportional to meat-piece weight and fall height, and it varies markedly; to illustrate, initial potential energy is equal to 0.25 J for a 100 g chunk falling from 25 cm but 15 J for a 1.5 kg chunk falling from 1 m.

### *Action B - Compression and friction during the periods between falls*

Within the bottom meat layer, a given meat piece undergoes compression and friction. The pressure exerted on one piece is proportional to the thickness of products above it, and compression duration depends on drum rotation speed. Contrary to action A, the resulting deformation is probably negligible because the same pressure is applied over the whole piece surface.

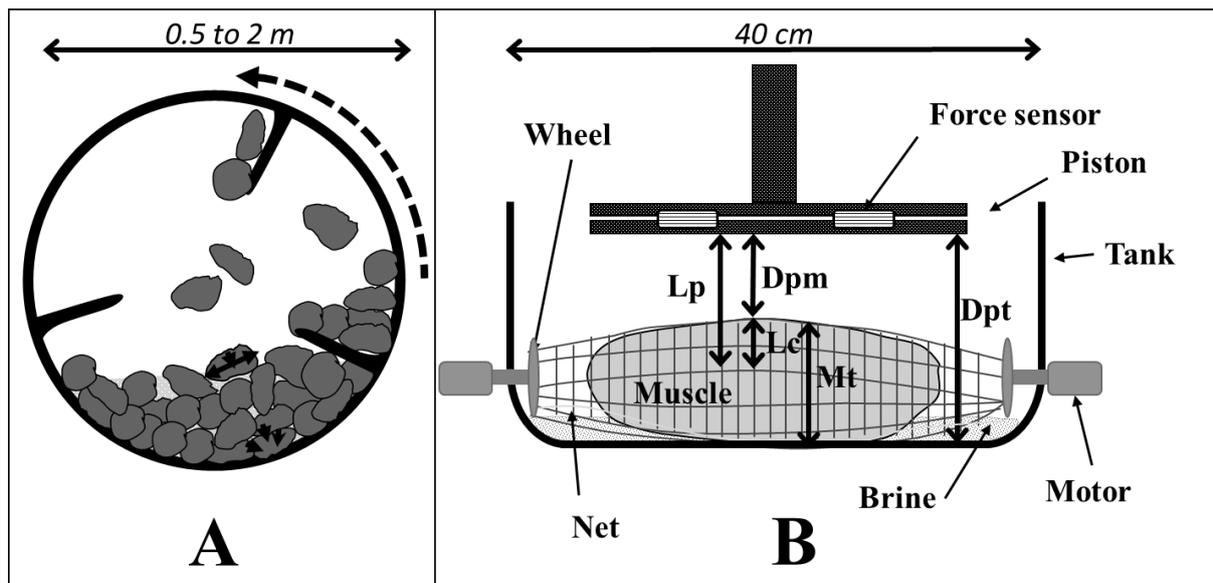


Figure 47 : Sketch of [A] the cross-section of a typical tumbler (black arrows indicate deformation directions) and [B] the tumbling simulator used to control and characterize muscle deformation.

Friction here is rather difficult to define: friction between meat pieces depends on their relative rotational speeds, but friction also occurs against the walls of the drum and the baffles. Both types of friction are probably influenced by contact pressure, and therefore by the position of the meat piece within the product layer.

Based on the studies cited in introduction, we can hypothesize that most of the alterations measured on the products were mainly dependent on the number of rotations imposed during a given experiment using a given device. In this scenario, action A has the biggest effect.

The design brief of a lab-scale tumbler simulator can be summarized in two points: it should provide good control of the mechanical action applied to meat, and have a measurement system to record the force–strain diagrams enabling action A to be characterized.

### 3 Materials and methods

#### 3.1 The two types of muscles used for the tests

The tests used two types of pork muscle widely employed in cooked ham manufacture, i.e. *Rectus femoris* (RF) and *Semimembranosus* (SM) at mean weights of  $450 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$  and  $1250 \text{ g} \pm 180 \text{ g}$ , respectively. The rationale for choosing these two muscles was their meat

tissue elasticities are different: SM muscle is roughly 20% more ‘elastic’ than RF muscle (www.porcine.unl.edu). All muscles were trimmed of their connective tissue envelope, mirroring industry practice.

Endogenous enzymes promote biochemical changes in meat tissue post-slaughter (Monin & Ouali, 1991). The main consequences of these changes are a decrease in pH and variations in mechanical properties of the meat tissue over time (Lepetit *et al.*, 1986). During the first period, which lasts about 24 h for pork meat, pH decreases down to an ultimate value and tissue elasticity increases strongly. During the second ‘ageing’ period, pH stays constant but elasticity decreases and then levels off due to proteolysis. This period lasts 3 days at most in the case of pork meat. The muscles were thus stored for 4 days at 4°C after slaughter and chilling. To restrict biological variability and eliminate abnormal meat, muscles were sorted based on ultimate pH, which was  $5.7 \pm 0.15$  for SM muscles and  $6.1 \pm 0.24$  for RF muscles. Finally, the muscle samples were vacuum-packed in plastic bags, frozen and stored at -18°C until use. The samples necessary for a given trial were thawed over the previous night at 4°C.

### **3.2 Slow-motion films to analyze muscle deformation**

A trial consisted in dropping a muscle on a stiff surface. Heights of fall were 25, 50, 75 and 100 cm so as to cover those existing in industrial tumblers of various diameters. Before the fall, the muscle was positioned so that its longest dimension was approximately parallel to the surface at the time of contact.

Black-and-white slow-motion films were recorded with a high-speed camera (HighSpeedStar 4G, Lavisson ®) equipped with a 105-mm lens, at a speed of 1000 frames/s, with an image resolution of 1024×1024 pixels. Actual spatial resolution in the images was 0.34 mm. For each trial, the camera memory (4 Gb) was able to store a sequence of about 2.5 seconds, so recording was started 0.5 s before muscle-to-surface contact. Each case (muscle type × fall height) was repeated 3 times. A few complementary tests were carried out with RF muscles cut in the middle to be able to examine the deformation on the muscle cross-section.

The sequence of interest of each film was extracted and analyzed image by image. The sequence-of-interest was delimited by the time at muscle-to-surface contact and the time after which the muscle recovered its shape at rest, i.e. the shape adopted by the muscle when gently placed on the surface. For each image, a mean deformation rate, or instantaneous compression rate (Cri), was calculated as the mean of the instantaneous compression rates estimated for 3 cross-sections that separate the muscle into 4 parts of equal length along the main muscle axis

(see photographs in Figure 49). Compression rate was defined as the ratio of vertical height to height of the same section at rest.

### **3.3 Trials to test the simulator**

The aim of these trials was to test the capacity of the simulator to control and characterize the mechanical treatment during a series of simulated falls. During each trial, one muscle underwent 350 simulated falls (8 simulated falls per minute) at a target maximum deformation rate. Two extreme target values were selected from the slow-motion film analysis. Six repetitions were performed for each muscle type  $\times$  target value case.

### **3.4 Statistics**

Student test was used to assess significance of difference between means of two groups of data ( $p < 0.05$ ).

## **4 Results and discussion**

### **4.1 Analysis of muscle deformation**

#### *Deformation dynamic*

Figure 48 shows a typical succession of cross-section images from a film recorded with a cut RF muscle at the end of a fall from 25-cm height. The main information is that the muscle height decreased during the first period, reached a minimum at about 8 ms, then increased until reaching a maximum, which was approximately the same thickness as observed at rest. Muscle volume should stay constant, since meat tissue is an incompressible material. Thus, as the muscle stretched horizontally, the minimum of vertical compression always corresponded to the maximum of horizontal extension. Noted that a second compression sequence systematically followed the first sequence (as presented in Figure 47), but the strain was always less than 2 mm and thus negligible in comparison with that in the first sequence.

Kinetics and intensity of muscle deformation is illustrated in Figure 49. The photographs of the muscle at times of contact and maximum deformation show that muscle extension in the longitudinal direction is negligible in comparison to that observed on the cross-section in Figure 48. The time-course of mean instantaneous compression ratio (Cri) calculated for 3

repetitions with one RF muscle is shown for the lowest and highest fall heights. The whole deformation process lasted about 20 ms in both cases, but maximum compression ratio, or compression rate (Cr), was higher in the second case. The curve is asymmetric: Cr was achieved after about  $\frac{1}{3}$  of the total deformation time. It is also clear that Cr is not proportional to fall height, whereas initial potential energy is theoretically proportional to fall height. This behaviour can be explained by the rheological properties of the meat tissue which is not a pure elastic material but a viscoelastic one, with the viscous component partially absorbing the impact. However, it would be extremely difficult to predict the Cr *versus* time curves of muscles from theoretical calculations using the rheological properties of meat tissue measured from lab compression tests on small samples (Lepetit, 1991). The main difficulties would be, on one hand, to consider huge deformations of a complex-shaped meat piece in 3 dimensions and, on the other hand, the fact that a muscle is made of two interconnected tissues that have different mechanical properties: meat tissue, which has a cellular structure, and sheets of connective tissue enveloping the cells and bundles of cells.

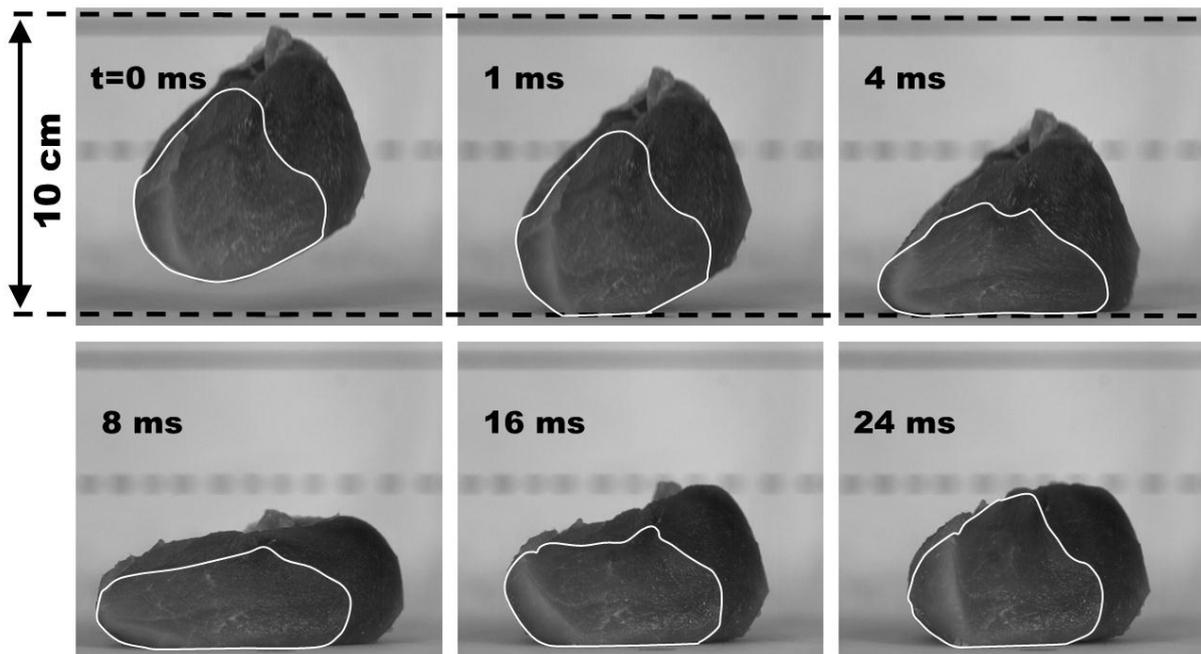
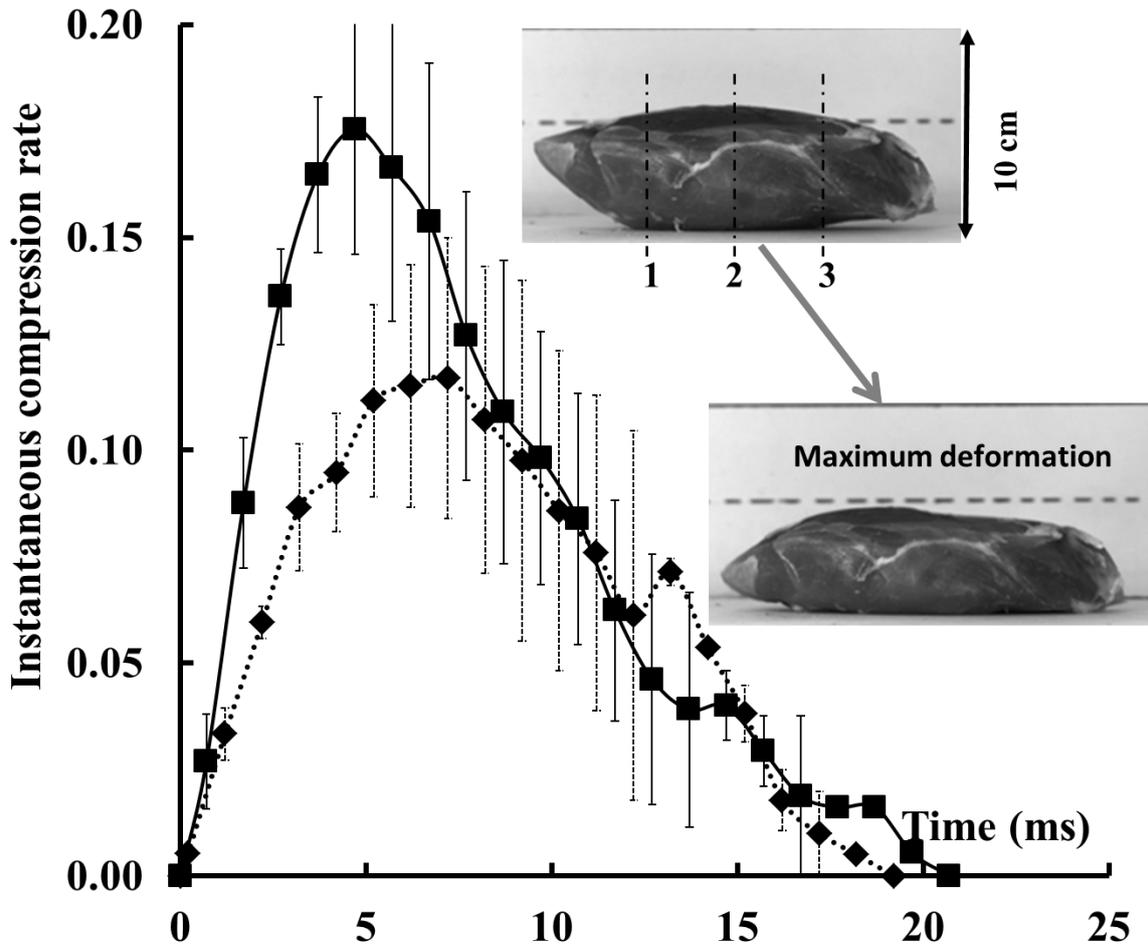


Figure 48 : Six images of the cross-section of a cut *Rectus femoris* pork muscle at the end of a 25 cm fall. The images were extracted at typical times from a slow-motion film (1000 images/s), and the cross-section was manually highlighted in white.

Figure 49 : Deformation kinetics of a *Rectus femoris* muscle for two fall heights: 25 cm (diamonds) and 100 cm (squares). Bars indicate standard deviation over 3 repetitions.



*Two parameters to define deformation*

All the *Cri versus* times curves had the same bell-shape as those in Figure 49. However, the two parameters that characterize the kinetics and intensity of muscle deformation, i.e. (i) deformation duration (Dd) and (ii) Cr, varied greatly.

Mean Dd was longer for SM than RF muscle, at  $59 \pm 19$  ms versus  $28 \pm 7$  ms, respectively. This could be attributed to the difference in weight, as SM muscle is about 3 times heavier than RF muscle. However, Dd values could not be correlated to fall height, whereas the fall height variable affects initial potential energy in the same way as muscle weight. In fact, Dd was highly variable from one test to another; the min–max values were 31 and 127 ms for SM muscle and 17 and 41 ms for the RF muscle, respectively.

Min–max Cr values were 3% and 42%, with no significant difference between the means calculated for two types of muscle, i.e.  $15 \pm 8\%$  for SM and  $14 \pm 5\%$  for RF. All the Cr values are reported in Figure 50 as a function of fall height. Note that the standard deviations are particularly high, likely due to the fact that muscles fell into different positions. As the cross-section is not circular, the vertical compression ratio assessed from the film images was

dependent on cross-section shape and point-of-impact; this variability would certainly be higher in real tumblers since muscle position during falls differs from one rotation to the next. However, notwithstanding this variability, after pooling all the measures with both SM and RF muscles, we found a rough linear correlation between Cr and fall height ( $r^2 = 0.72$ ). This global relationship suggests that the increase in weight that provides more energy for deformation is offset by the fact that the elasticity of SM (0.45) is 16% higher than that of RF (0.38); in other words, SM muscle needs more energy to undergo the same rate of deformation as RF muscle.

The above Cr can be considered as values found in industrial tumblers, since (i) pork muscle elasticity varies in the range 0.34–0.45 (Porcine myology, 2015) and (ii) RF and SM muscle have extreme weights according to the weight of meat pieces treated in tumblers. A lab-scale simulator needs to be able to reproduce the Cr values in Figure 50; as a conservative measure, we considered a larger range and selected two target values, i.e. 10% and 30%, for the tests.

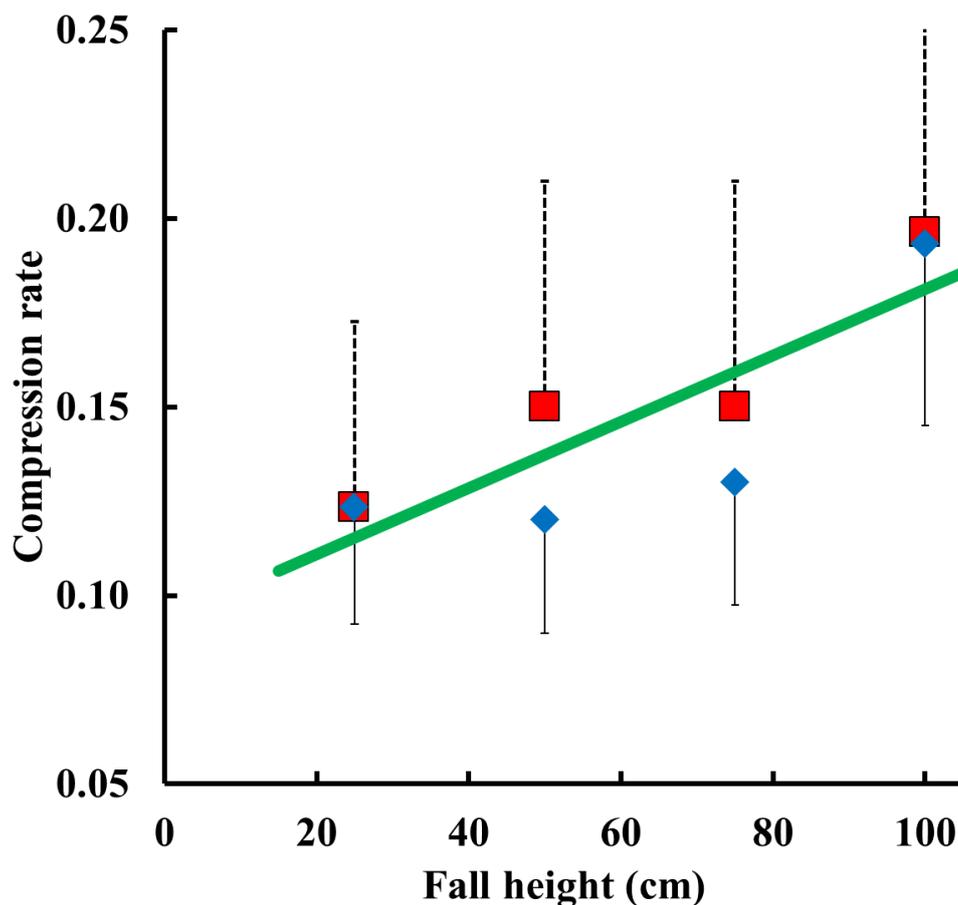


Figure 50 : Compression rate *versus* fall height for the two muscles (RF, diamonds; SM, squares). Bars indicate standard deviation over 3 repetitions. Solid line is the linear regression calculated with all the data.

## **4.2 Reproduction of muscle deformation**

To firmly control the strain applied to a meat piece and be able to record force–strain curves during brief deformations, the lab simulator was designed differently to pilot-plant tumblers (Figure 47B).

Here, one muscle or meat piece is wrapped in a thin elastic net, the mechanical effect of which was checked as negligible by comparing the force of reaction to compression for net-wrapped and non-net-wrapped muscle. This net is tied at each end to motorized wheels to continuously rotate the sample (4 to 12 rpm) in the 40 cm × 15 cm × (h) 35 cm tank. During a trial, a sample is compressed several hundred times by the piston orthogonally to its main length; just like during falls, sample can extend freely in the horizontal plane and the piston dimensions (25 × 12 cm) are large enough to cover the whole sample. A purpose-engineered mechanical system drives the piston linearly for a single down-and-up movement. The piston is placed at the end of a 50 cm-long ball screw jack (KVER, Kinetic-Systems®) whose maximum stroke is 25 cm. To achieve brief compressions and control stroke motion, the jack is connected to a brushless motor ECMA2 (Deltronics Inc, Hoofddorp, NL). An electronic command console is used to set trial parameters: number of compressions, length of piston displacement ( $L_p$ ), duration of the working periods during which the piston completes a down-and-up movement, and duration of the rest periods that alternate with working periods and during which the piston stays in the upper position while the meat piece goes on rotating.

Two force sensors U93-5kN (HBM, Mennecy, France ) are inserted between two steel plates at the tip of the piston to record the sample's force of reaction to compression; the measurement accuracy is  $\pm 3$  N. A rotary encoder ERN 240 (Heidenhain, Sèvre, France) is fixed on the screw jack shaft to give piston position down to  $\pm 0.1$  mm. A measurement sequence of 1 second is started at the beginning of each compression, and measurements of time, force and position are recorded at 160 Hz through an industrial amplifier MP85A FASTpress (HBM, Mennecy, France).

If the tank is brined, then sample rotation ensures regular brine deposition over the sample surface. From a mechanical point of view, sample rotation has two other objectives: (1) it simulates sample surface friction against the bottom tank wall and (2) it simulates the fact that a meat piece does not fall in the same position each time, or in other words the orthogonal compression and extension directions vary from compression to compression.

The rotational speed should therefore be selected as a function of compression frequency to ensure that successive compressions correspond to different muscle positions. Noted that friction is not as well-controlled as deformation.

As the cross-section of a muscle is far from an ideal disk (Figure 48), meat height ( $Mt$  in Figure 47B) varies with muscle rotation, and compression rate varies compression to compression. Indeed, for one compression, compression rate varies along the muscle length. At the beginning of an experiment, a target compression rate ( $Crt$ ) is defined from a mean  $Mt$  value; this value was calculated from 21 thickness measurements, i.e. 7 measurements, regularly distributed around the cross-section, at 3 positions (dotted lines 1, 2 and 3 in Figure 49) regularly distributed along the muscle length. If piston displacement length is  $Lp$  and distance between the piston's top position and the tank's bottom wall is  $Dpt$ , then mean compression length is  $Lc$  (Figure 47) and  $Crt$  is equal to  $Lc/Mt$ .  $Crt$  is set by adjusting  $Lp$  in equation 1:

$$Crt = (Lp - (Dpt - Mt))/Mt. \quad (1)$$

Excluding  $Mt$ , all other distances were measured with an accuracy of 0.1 mm; thus, the main source of inaccuracy is the estimation of mean muscle thickness. Due to motor power limits and mechanical constraints in the system, the minimum period for piston down-and-up movement was 500 ms whereas the observed mean  $Dd$  was about 10 times lower. To limit the difference in deformation kinetics between the actual and simulated falls, distance  $Dpt$  was increased so that the actual meat compression period was shorter than 200 ms.

### **4.3 Test of the simulator**

#### *From target compression rate to measured compression rate*

Figure 51 presents two typical recordings during one down-and-up piston stroke. The measured force increased sharply until about 0.25 s, reached a maximum ( $F_{max}$ ), and then fell back down to its initial value (Figure 51, At and Bt); in these cases, the compression periods lasted 150 and 200 ms. From 0.5 s, the piston stayed in its initial position. Figure 51 (Ad and Bd) charts force as a function of piston position. Since meat is viscoelastic, (i) the maximum force was recorded a few milliseconds before maximum deformation was achieved, and (ii) the parts of the curves which correspond to the down-and-up movements do not superimpose.

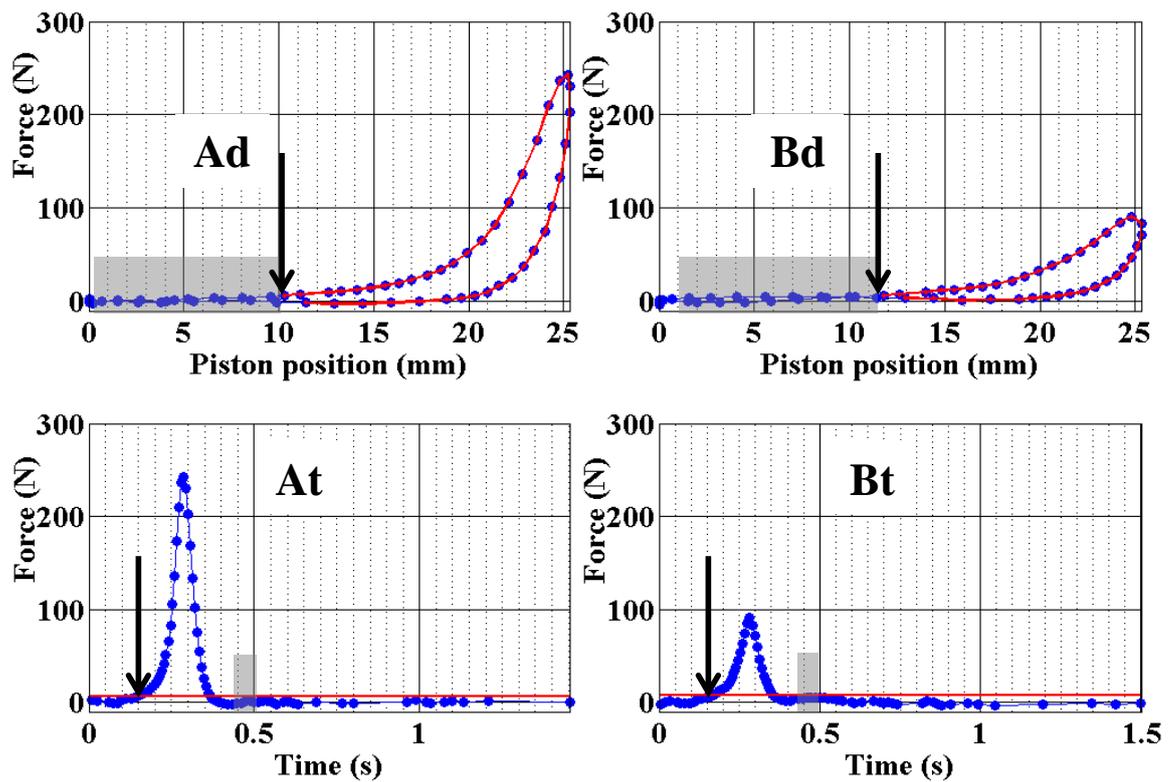


Figure 51 : Example of recordings during two compressions of RF muscle and a target compression rate of 30%: (At and Bt) force versus time and (Ad and Bd) force *versus* piston position. Grey rectangles indicate the time period used to define force baseline (horizontal red line in At and Bt). Black arrows show the time and piston position corresponding to contact with meat.

The measured compression rate could not be calculated for each compression using the mean  $M_t$  value in equation 1.

The particular  $M_t$  corresponding to the specific muscle position was therefore estimated by automatically detecting the rapid increase in recorded force, as indicated by the arrows in Figure 51. Since the piston was always above the meat surface after 0.4 s, an initial force baseline was defined by the mean force value calculated from the recordings between 0.4 and 0.5 s. Mean  $M_t$  value estimated from the 50 first compressions of a trial using this baseline was compared against the mean  $M_t$  value measured at the beginning of the same trial. This initial force baseline was then varied until the two  $M_t$  values converged. For the cases presented in Figure 51,  $M_t$  measured at the beginning of the trial was 40.6 mm, with min–max values of 39 and 43 mm; the initial force baseline was raised by 8 N, as shown by the horizontal red lines in Figure 51 (At and Bt).

The curves of piston position *versus* time (results not shown) were linear and symmetrical around the maximum piston position and therefore around maximum muscle deformation, which marks a change from the curves in Figure 49 which were only roughly linear and not symmetrical.

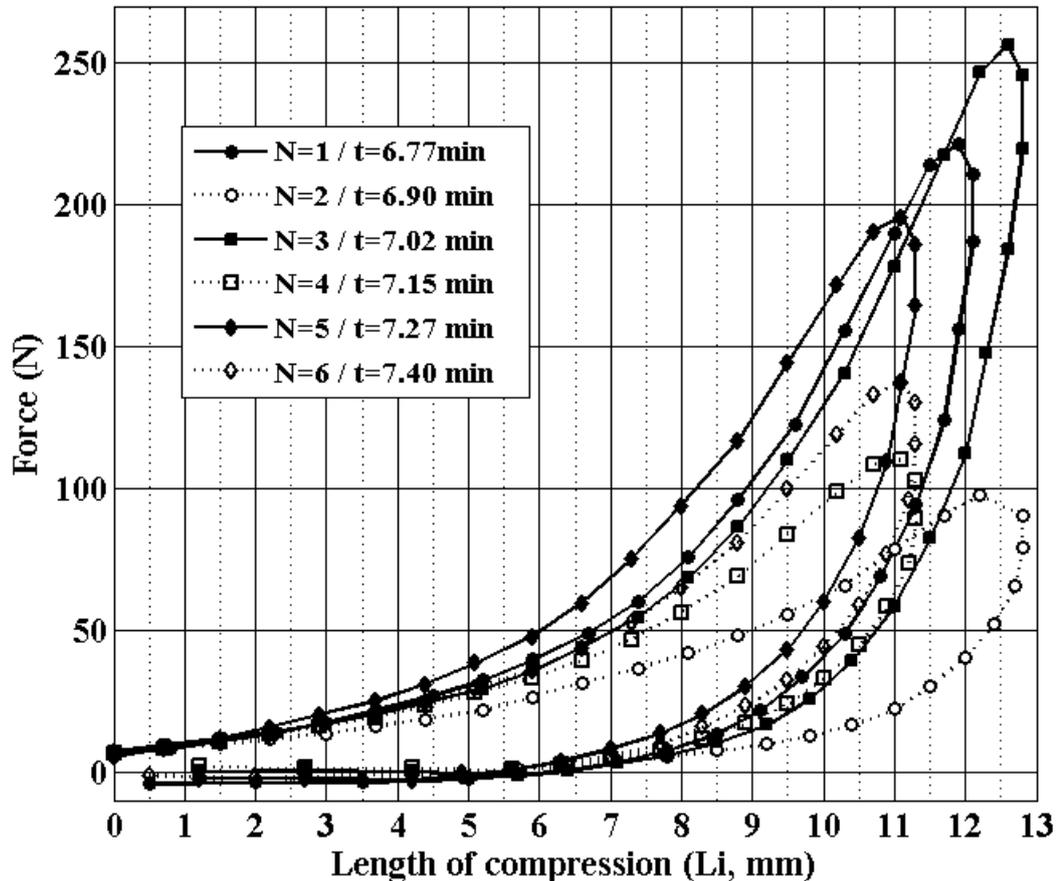


Figure 52 : Examples force–strain curves charting 6 successive compressions: RF muscle and a target compression rate 30%.

*Characterization of the mechanical treatment from the measurements*

Figure 52 shows the results of 6 successive compressions through a long-term test. These compressions were separated by rest periods of about 7 s. The recorded force is plotted against the length of meat compression,  $L_i$ , which was set at 0 at the time of piston contact with the meat surface. The effect of the irregular muscle shape is clear: the maximum length of meat compression  $L_c$  varied from 11.2 to 12.8 mm, leading to  $Cr$  values from 28 to 30%. The variation in  $F_{max}$  is very marked and not correlated to  $Cr$ : for example, the second ( $N=2$ ) and third ( $N=3$ ) compressions corresponded to minimum (97 N) and maximum (256 N)  $F_{max}$

whereas the calculated compression rate was 30% in both cases. This can be explained by the change in contact surface area between the piston and the sample at the  $L_c$ , which depends on muscle shape and position.

The area under the part of the curve corresponding to the downward movement is equal to the work done by the piston to compress the sample, and the area under the part of the curve corresponding to the upward movement is equal to the work released by the muscle. Thus, the internal area delimited by the whole curve corresponds to the energy dissipated by the deformation, or strain energy  $E$ . This energy is less affected by muscle position than  $F_{max}$ , as the ratio of maximum to minimum value here was 1.6 for  $E$  but 2.6 for  $F_{max}$ .

The three indexes  $Cr$ ,  $F_{max}$  and  $E$  characterize the mechanical treatment of each simulated fall. Figure 53 shows an example of their variation with time for 10 min of a long-term trial. Calculated  $Cr$  was approximately equal to target value (30%). In this experiment, the muscle's rotational speed was chosen so that the muscle had approximately the same position every 11 compressions (1.4 min). The fact that the variation of  $F_{max}$  repeats according to this period of time confirms that the strong variation in  $F_{max}$  is really due to a change in the area of contact surface and not to bad measurement repeatability which would have led to random variations. The variation in  $E$  is parallel to that of  $F_{max}$  but is systematically attenuated, as observed in Figure 52.

#### *Long-term tests*

The regularity of the applied mechanical treatment along a trial was examined by calculating the mean, standard deviation and median of the three calculated indexes for 5-minute periods. An example is presented in Table 9 (same trial as in Figure 53). The mean and median values of the actual  $Cr$  are almost equal and very close to the target value (30%). The means of  $F_{max}$  and  $E$  are respectively about 10% and 5% higher than the medians of  $F_{max}$  and  $E$ . This is due to the incidence of a few peak values on the calculated means; in Figure 52 for example, a few  $F_{max}$  values are close to 250 N but most are between 100 and 200 N. This same kind of pattern was observed in all trials.

Whatever the trial, none of the indexes exhibited significant changes along a trial. This is clearly illustrated in Table 9, where means calculated every 5 minutes did not vary over 45 minutes according to the standard deviations calculated for the same periods of time. This proves the simulator works regularly, but it also means that a possible change in mechanical properties of the meat due to repeated simulated falls cannot be detected from measurements.

Table 10 recapitulates the results of the 24 long-term tests. First, the means of the three indexes for the whole test duration were calculated for each trial. Then, to assess the repeatability of the applied mechanical treatment, the standard deviation was calculated for three repetitions of the same condition. Measured Cr was almost equal to target for the highest Cr target. This was true for both muscles even though SM muscle volume was 3 times bigger than RF muscle volume. It was more difficult to achieve this result when Cr target was 10% because the error in the mean Mt measurement had more impact on the accuracy of the piston stroke determined at the beginning of an experiment; in this case, measured Cr was also regular along trials but slightly higher than 10%.

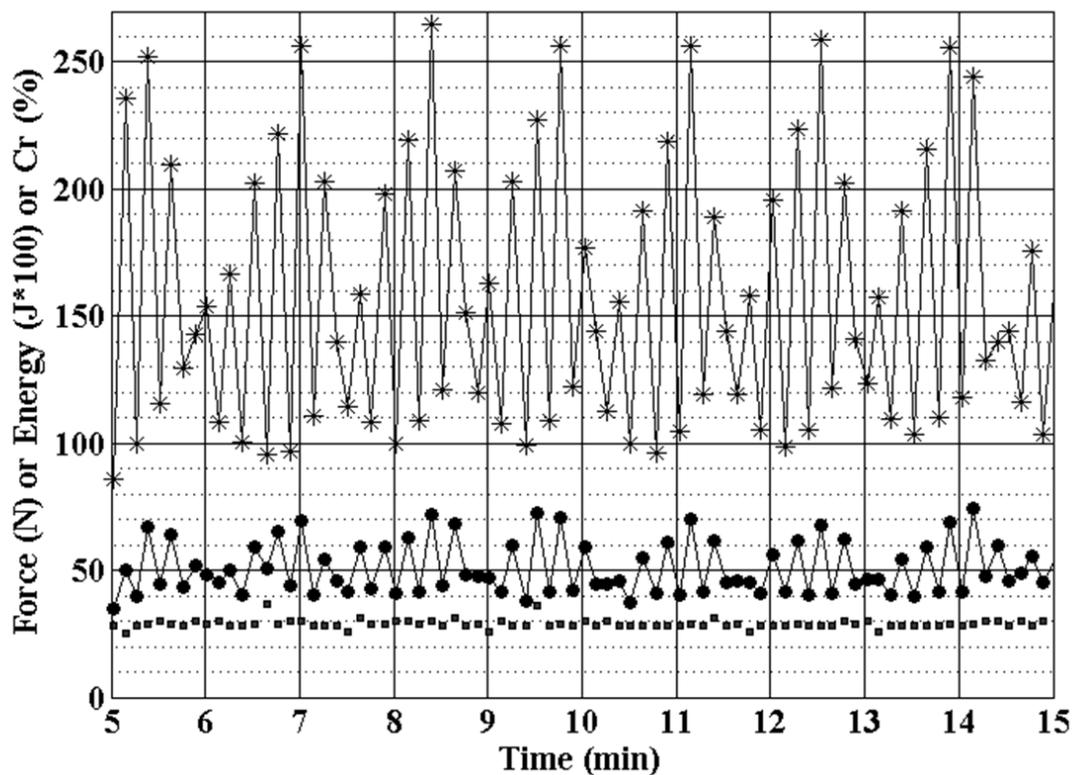


Figure 53 : Example of the compression characteristics calculated from 80 successive compressions during one test with the RF muscle (target compression rate 30%, 45 min and 350 compressions): maximum force (star), strain energy (circle), and actual compression rate (square) are shown.

Table 9: Regularity of the measured compression rate and of the calculated deformation parameters during a trial (350 compression cycles – 45 min) with a pork *Rectus femoris* muscle when target compression rate was 30%.

Period of time (min)	Compression rate (Cr, %)			Maximum force (Fmax, N)			Strain energy (E, mJ)		
	Mean	S.D	Median	Mean	S.D	Median	Mean	S.D	Median
0 to 5	28	2	29	151	63	133	505	125	465
5 to 10	29	2	29	157	56	141	512	110	480
10 to 15	29	1	28	154	50	143	503	100	461
15 to 20	28	2	28	136	51	126	455	103	470
20 to 25	28	1	28	141	52	120	454	109	419
25 to 30	26	1	26	135	49	126	461	93	437
30 to 35	29	2	30	155	52	133	526	110	482
35 to 40	31	1	31	166	53	156	575	104	565
40 to 45	28	2	29	147	51	141	508	112	485
0 to 45	28	2	28	148	54	133	494	111	470

The two mechanical-mean indexes Fmax and E differ strongly according to Cr. The high standard deviations calculated from the three repetitions (Table 10) mean possible muscle-type differences could not be revealed. Note that for both muscle types, Fmax increased fourfold and E increased fivefold when Cr increased from 12% to 30%. The two muscle types appeared to show very similar behaviour, consistently the observations made during the fall experiments (Figure 50).

These mean Fmax values cannot be accurately charted against stress values obtained on meat tissue samples in laboratory compression tests (Lepetit & Culioli, 1994), for three main reasons. In these lab tests, (1) the samples were parallelepipeds ( $1 \times 1 \times 1.5$  cm) cut in meat tissue so that the meat fibres were strictly parallel or orthogonal to compression direction, (2) lateral extension was stopped in one direction by the sample-holder walls, and (3) the area of the meat-piston contact surface was constant ( $1 \text{ cm}^2$ ). Nevertheless, there are insights to be found in the results of the previous work obtained on 7 beef meat muscle types (Lepetit & Sale, 1985; Lepetit & Culioli, 1994):

- In Lepetit's tests with compression direction orthogonal to meat fibres, maximum stress was 3.5 to 4.5 times higher at a 30% Cr than a 10% Cr; this increase is in good agreement with our measurements (Table 10).
- With a compression rate of 30%, Lepetit & Culioli (1994) reported maximum stresses ranging from 14 to 25  $\text{N.cm}^{-2}$ . If we consider a mean stress value of 20  $\text{N.cm}^{-2}$ , then maximum contact surface area in our experiments would be 6.8 and 8.5  $\text{cm}^2$  for RF ( $F_{\text{max}} = 137 \text{ N}$ ) and SM ( $F_{\text{max}} = 171 \text{ N}$ ), respectively. Contact surface area was not measurable in our experiments but was doubtless much higher; visual observations

indicated it was between 40 and 70 cm<sup>2</sup>. The maximum stresses were therefore much lower than in the previous studies, which can be explained by the free lateral extension and the fact that meat fibres in muscles or meat pieces ran in all directions.

- The previous works also gave information about the incidence of deformation kinetics on F<sub>max</sub>. For a Cr equal to 20%, F<sub>max</sub> was twice as high at a compression frequency of 10 Hz (or Dd = 100 ms) than at 0.1 Hz (or Dd = 10 s) due to the viscoelastic nature of the meat tissue, whereas E was only 10% higher. In our experiments, deformation frequency ranged from 4 to 10 Hz but varied from 8 to 58 Hz during muscle fall tests. This suggests that F<sub>max</sub> was probably lower in simulator-based trials than in actual falls and that the strain energy was slightly lower.

Table 10 : Mean and standard deviation of the mechanical treatment characteristics for 6 repetitions with each type of muscle and the two extreme target compression rate values.

Cr target	Compression rate (Cr, %)		Maximum force (F <sub>max</sub> , N)		Strain energy (E, mJ)	
	SM	RF	SM	RF	SM	RF
10%	12.1 ± 2.2	11.8 ± 1.4	42 ± 10	34 ± 10	108 ± 21	103 ± 39
30%	29.3 ± 2.8	29.0 ± 1.5	171 ± 61	137 ± 29	548 ± 208	503 ± 119

To calculate strain energy-to-initial potential energy ratio, we first need to define muscle weight and fall height. A Cr equal to 12% corresponded to a 25 cm fall (Figure 50) and thus to potential energy values of 1.1 and 3.1 J for RF and SM, respectively. Since mean strain energy was about 100 mJ for both muscle types, it therefore represents 9% and 3% of potential energy in RF and SM, respectively.

The mechanical treatment undergone by pieces of meat in tumblers could not be simulated in all its complexity and time-course variability. The results reported here showed for example that the kinetics of deformation promoted by falls is fast, asymmetrical, and not really linear with time. In addition, in the absence of any information on surface friction in tumblers, we had to arbitrarily apply a simple continuous friction. Nonetheless, the long-term tests showed that specific cases can be controlled and compared based on mean F<sub>max</sub> and E. The first key treatment index is Cr, since it was observed to be linearly related to fall height, which makes it possible to estimate the mean effects of treatments in same-design but different-sized tumblers. The literature, including in studies on tumblers, shows that number of falls correlates with salt spatial homogenization and product quality; the simulator reported here demonstrates good enough regularity and repeatability of mechanical treatment to investigate this question independently of tumbler design and size.

## **4 Conclusion**

Meat pieces falling in tumblers experience significant deformation in less than 100 ms. The compression rate in one direction roughly corresponds to an equivalent extension rate in the orthogonal direction. These deformation rates are highly variable and partly dependent on meat-chunk characteristics: weight, shape, rheological properties, and position at end-of-fall. They roughly vary linearly with fall height and therefore with tumbler diameter and yield. These compression rates can thus be used to schematically define the mechanical treatment applied to a given piece of meat.

The lab-scale simulator devised in this study is able to reproduce similar mechanical treatments to those in real-world tumblers. The continuous rotation of the meat chunk simulates meat surface friction against the tumbler wall, and more importantly still, rapid meat deformations can be controlled to simulate the successive falls promoted by tumbler drum rotation. This new device is not an operational and therefore provides, for the first time, means to control and measure the mechanical treatment undergone by meat pieces.

Tests conducted with two different pork muscles for extreme compression rate values observed from slow-motion films showed that regular mechanical treatments can be applied for hours.

Two mechanical indexes are calculated to characterize the mechanical treatment applied at a target compression rate from the hundreds of force–strain recordings, i.e. mean maximum reaction force and mean strain energy. Works are in progress with this tumbling simulator to investigate the mechanisms that enhance in-tumbler salt content homogenization speed and to relate these indexes to biochemical and structural changes in meat tissue. This could help derive the best operating conditions in industrial tumblers from just a few laboratory tests, and to transpose results from studies in pilot tumblers to industrial tumblers.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was partly supported by a grant from “Conseil Régional d’Auvergne”. The authors are especially grateful to the GPAN (IRSTEA) research unit for lending us the rapid camera and the people at Movitecnic for helping design and build the simulator.



**Chapitre 5. Analyse de l'amélioration de la pénétration du sel dans le tissu musculaire par un traitement mécanique en utilisant le simulateur de malaxage**

## Analysis of salt penetration enhancement in meat tissue by mechanical treatment using a tumbling simulator

Diaa SHAREDEH, Pierre-Sylvain MIRADE, Annie VENIEN, Jean-Dominique DAUDIN, INRA, UR370 Qualité des Produits Animaux, F- 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

### HIGHLIGHTS

- NaCl content profiles in meat were measured for various brining conditions.
- NaCl apparent diffusivity  $D_{\text{salt}}$  was assessed using a constant diffusion model.
- Tumbling alone induces a 20% increase in  $D_{\text{salt}}$  due to meat tissue damages.
- Brining-tumbling promotes a 200% increase in  $D_{\text{salt}}$ , possibly through convection.

### ABSTRACT

Brining-tumbling is a key step in cured and/or cooked meat product manufacture. The massaging of meat enhances NaCl homogenization which, in combination with mechanical action, enhances protein solubilization. To clarify the underlying mechanisms and quantify their effects, meat tissue from *Semimembranosus* pork muscles was tested under various brining conditions: static brining (a), static brining after massaging (b), and brining-massaging (c). Using trials performed on a lab-scale tumbling simulator, massaging was controlled and characterized by three mechanical indexes. Apparent NaCl diffusivities ( $D_{\text{salt}}$ ) were estimated from measured NaCl profiles using Fick's diffusion theory. a-vs-b comparison showed a 20% increase in  $D_{\text{salt}}$ , which was explained by observed microstructural changes. a-vs-c comparison showed a 200% increase in  $D_{\text{salt}}$ , possibly due to water movement promoted by meat deformation. Calculations were used to compare spatial distributions of NaCl within small meat cubes during static brining *versus* brining-tumbling.

Keywords: tumbling, brining, structure, diffusivity, salt, meat

Jean-Dominique Daudin  
INRA – Centre Clermont-Ferrand/Theix  
UR 370 : Qualité des Produits Animaux  
63 122 - St Genes Champanelle / France  
(33) 473 62 41 92 - [jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr](mailto:jean-dominique.daudin@clermont.inra.fr)

## 1 Introduction

Sodium chloride (NaCl) is the main ingredient used in meat curing technologies. It acts as a preservative, improves technological yields, and impacts meat tissue properties such as water-holding capacity and protein solubilization that, in turn, determine processed meat texture. In the manufacture of cooked meat products, curing is widely complemented with tumbling in rotating drums, which is known to improve the meat-product properties (Martin, 2012). Tumbling is generally done under vacuum to prevent protein and lipid oxidation. For larger meat pieces, a high-concentration brine is injected into the meat at a rate of about 10% w/w using needles spaced at around 2–3 cm apart. For smaller meat pieces, the brine is simply placed in the tumbler drum at the beginning of fabrication. In all cases, salt content homogenization is a key phenomenon, since local NaCl content is a determinant factor for protein solubilization and water holding capacity (Offer & Knight, 1988).

On top of the above differences in brine-meat contact, many technological process parameters also influence the final product features, such as animal species, complementary additives to NaCl like nitrite, tumbler diameter, rotational speed, tumbling time and whether or not an intermittent regime is used. Studies carried out with pilot tumblers and reviewed by Siro *et al.* (2009), Bombrun *et al.* (2014), Bombrun *et al.* (2015) and Daudin *et al.* (submitted to *jfoodeng*) show that tumbling (i) improves water-holding capacity and texture compared to static brining and (ii) is necessary to produce a protein-containing exudate that determines piece-to-piece adhesion after cooking and thus end-product sliceability. However, the spatial distribution of NaCl content varies along tumbling but is rarely effectively known. The upshot is that the respective effects of mechanical action and local NaCl content cannot be separated in pilot tumbler studies.

NaCl diffusion in meat has been extensively studied in immersion-brining with or without other additives. Recent papers provide data on apparent NaCl diffusivity ( $D_{\text{salt}}$ ) according to meat tissue characteristics, offering a frame of comparison against older studies (Pinotti *et al.*, 2002; Vestergaard *et al.*, 2004; Vestergaard *et al.*, 2005; Graiver *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2008; Villacis *et al.*, 2008; Lebert & Daudin, 2014). However, data on tumbling remains scarce. Solomon *et al.* (1980) compared NaCl penetration by continuous or intermittent tumbling in 3 major ham muscles using an industrial tumbler.

The results showed that salt homogenization is far from achieved after 24h, but  $D_{\text{salt}}$  was not calculated from the spatial distributions of measured NaCl content. To our knowledge, Siro *et*

*al.* (2009) is the only paper that has assessed  $D_{\text{salt}}$  when immersion-brining is assisted by a mechanical (tumbling or ultrasonic) treatment. The authors showed that the constant diffusion coefficient model is able to describe the time-course increase in mean NaCl content in samples of pork loin, and that  $D_{\text{salt}}$  increases exponentially as a function of ultrasonic intensity. They also claim tumbling is the most efficient way to speed up salt homogenization, but the mechanical action could not be characterized since they used a pilot tumbler.

Our aim here was to quantify the impact of the mechanical action on NaCl homogenization speed in meat tissue. Massaging was kept controlled using a new lab-scale tumbling simulator (described in detail in Daudin *et al.*, submitted to *jfoodeng*).

Many terms are used in meat technology to define the type of brining process. In this paper, ‘static brining’ means brining meat tissue by putting the sample surface in contact with brine without mechanical action and ‘brining-massaging’ means that a controlled mechanical action is applied to the sample in addition to ‘static brining’.

The concept of apparent diffusivity was used as a comparison index since it can be calculated from NaCl profiles in meat tissue using a well-accepted theory, even if the underlying mechanisms that promotes NaCl transport is not strictly diffusion.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Samples and physicochemical analysis**

All tests used *Semimembranosus* (SM) pork muscle, which is widely employed in cooked ham manufacture. The muscles were stored for 4 days at 4°C after slaughter and chilling in order to reach their ultimate pH, i.e.  $5.6 \pm 0.15$ . The muscles were then trimmed of their connective tissue envelope, vacuum-packed in plastic bags, frozen and stored at -18°C until use. The muscles necessary for a given trial were previously thawed overnight at 4°C.

### **2.2 Brining or/and massaging trials**

The four conditions used to brine the samples are presented in Figure 54. The brine was a straightforward mixture of water and NaCl only, and salt content ( $C_{\text{salt}}$ ) is expressed as a percentage (g NaCl/100 g brine). In all experiments, contrary to standard practice, we used an

excessive amount of brine in relation to sample weight to ensure only negligible changes in brine composition over time. All trials were performed at 4°C.

Vertergaard *et al.* (2007) assessed NaCl apparent diffusivity during immersion-brining in *Longissimus dorsi* pork muscles and concluded that animal effect is significant. Consequently, in order to evaluate the impact of mechanical action, each type of comparison (cases 1-2 or cases 3-4) was done on two halves of one muscle that had been cut orthogonally to its main length.

#### *Cases 1 and 2*

According to the method proposed by Lebert & Daudin (2014), unidirectional NaCl transfer was promoted along the main axis of a meat cylinder (about 20 g; 300 mL of brine; Csalt 5%) placed in a plastic sample-holder and held in surface contact with brine at one base for 5 days. Meat tissue fibres were approximately orthogonal to direction of mass transfer.

Six cylinders were excised from the non-massaged first muscle half and used as reference. Six cylinders were excised from the second muscle half after massaging (see below) but with no brine in the simulator tank.

#### *Cases 3 and 4*

In these trials, one muscle half was brined in the lab-scale tumbling simulator. Brine-to-meat mass ratio was 10 times higher than in practice (1 instead of 1/10), and the brine NaCl content was much lower, i.e. Csalt was 13% compared to over 25% in practice. These conditions had two advantages: (1) potential structural modifications due to high NaCl content (Pinotti *et al.*, 2001; Graiver *et al.*, 2009) in the outer layer of our samples were limited, and (2) the mass transfer surface-boundary condition was almost constant with time, making it possible to fit the measured NaCl profiles with an analytical solution of Fick's second law (Crank, 1975).

At the end of the trial, a 1 cm-thick cross-section was cut in the middle of the sample and a 1 cm-width strip was removed from this section (Figure 55) to profile NaCl content. In case-3 trials, no massaging was performed but the sample was rotated for 5 hours in the brining tank in the same ways as in case 4. Massaging conditions for case 4 were the same as in case 2, as explained further. Each trial case was repeated three times.

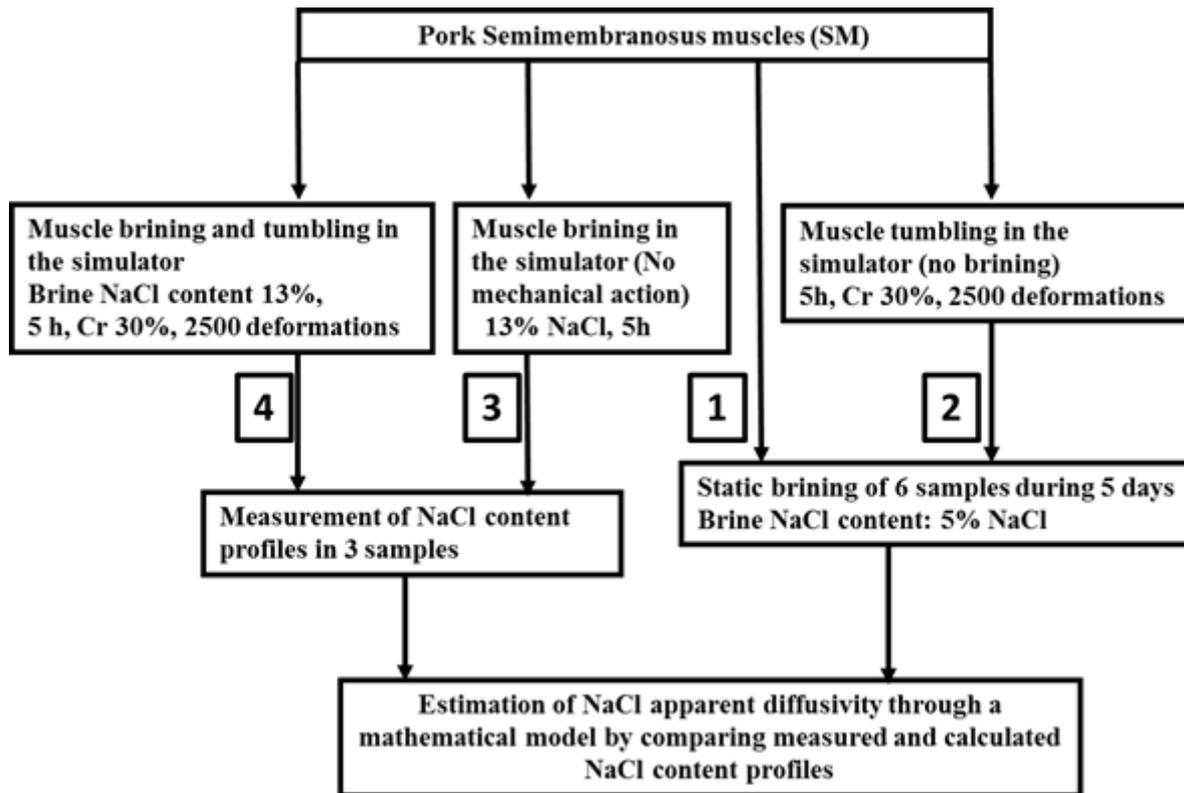


Figure 54 : The 4 treatments tested to investigate potential mechanisms to explain NaCl diffusion enhancement in tumbling.

#### *Control and characterization of massaging*

Massaging (cases 2 and 4) was controlled using a new lab-scale tumbling simulator described in detail in Daudin *et al.* (submitted). Briefly, this lab-scale device is able to reproduce mechanical treatments occurring in real-world tumblers: hundreds of rapid deformations (controlled compression orthogonally to muscle main length and lateral free extension) are applied to one muscle to simulate the successive falls promoted by tumbler drum rotation. Compression rate (Cr) is controlled and the mechanical treatment undergone by the muscle is characterized by two indexes calculated from force *versus* strain recordings: (1) the maximum force recorded during one deformation (Fmax) at a given Cr, and (2) the dissipated strain energy of each deformation (E). The muscle is slowly rotated (at about 8 rpm) in the simulator tank to ensure regular brine deposition over the muscle surface and to vary muscle position from compression to compression.

In case-2 and case-4 trials, target Cr was 30% and each meat compression period was shorter than 200 ms. In the real-world manufacture of cooked hams, 2200 to 2800 tumbler rotations is common practice, which leads to roughly the same number of muscle falls, so number of

deformations was 2500 in all our trials. The time lapse between two successive deformations was set at 7 s, and therefore total trial duration was about 5 hours.

### 2.3 Assessment of salt apparent diffusivity from NaCl profiles

#### *Measurement of in-sample NaCl content profiles*

Whatever the trial case, the sample used to measure the NaCl content profile was cut into slices running orthogonally to NaCl transfer direction. To build the profiles, actual slice thickness was calculated from slice weight in comparison to whole sample weight, assuming a constant sample cross-section.

NaCl contents in the meat slices were derived from chloride ion content as measured using a chloride analyzer (Sherwood, MHII-926). The meat samples (0.5 g) were first thinly minced in 10 mL of deionized water, and the supernatant was centrifuged (for 10 min at 13 000 rpm). Preliminary tests with a known amount of salt in the meat tissue were used for calibration.

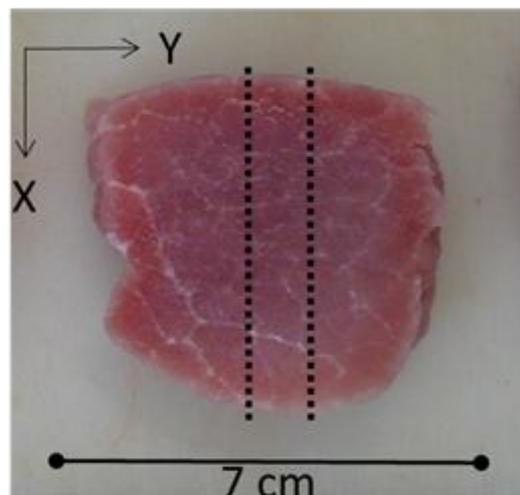


Figure 55 : Photograph of a *Semimembranosus* muscle cross-section. Dotted lines delimit the area where a strip was taken to measure NaCl profile along the X-axis.

There is abundant literature on the theory of mass transport and the methods used to assess apparent diffusivities (Crank, 1975; Cussler, 2009). NaCl apparent diffusivity is shown to be constant in protein gels at various water contents (Broyart *et al.*, 2007), and Siro *et al.* (2009) showed that the constant diffusion coefficient model was able to fit their measurements in

both ultrasonic-brining and brining-tumbling. Thus, since initial NaCl content in the samples was nil, we used the following form of the analytical solution of Fick's second law for unidirectional diffusion in a slab (Equation 1):

$$\left( \frac{C_{(x,t)}}{C_{surf}} \right) = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos\left(\frac{(2n-1)\pi(1-x/l)}{2}\right) \exp\left[-(2n-1)^2 \frac{\pi^2 D_{salt} t}{4l^2}\right] \quad (1)$$

where  $x$  is distance from the meat surface,  $t$  is time,  $C_{(x,t)}$  is measured NaCl content at  $x$  and  $t$ ,  $C_{surf}$  represents the boundary condition,  $l$  is either meat cylinder length (cases 1 and 2) or half-muscle thickness (cases 3 and 4), and  $D_{salt}$  is apparent salt diffusivity.

Equation 1 counted enough terms in its series to ensure that the last term does not affect the relative value of the calculated dimensionless NaCl content by more than 0.001. Equation 1 was used to fit the measured profiles by minimizing the sum of squared differences between measured and calculated NaCl contents with two unknown variables, i.e.  $C_{surf}$  and  $D_{salt}$ .

In cases 3 and 4, it was difficult to choose between slab and infinite cylinder geometry for which analytical solutions of Fick's second law are known. Figure 55 shows the position of the sample taken in a muscle cross-section whose shape is closer to a square than to a disk. Since trial times were short relative to NaCl penetration, it was assumed that NaCl transfer orthogonal to the Y-axis was negligible in comparison with that in the X-axis. In fact, the situation is made far more complex in the theoretical frame of our calculations as thickness  $l$  was not constant during the brief muscle deformations (about 3% of trial time). As sample position varied from deformation to deformation,  $l$  was sometimes lower than its value at rest when the sample was in the compression direction but sometimes higher when it was in the extension direction. Finally,  $D_{salt}$  should be considered as a practical index of salt homogenization speed for comparing 'static-brining' against 'brining-massaging'.

## **2.4 Assessment of microstructural changes**

At the end of massaging (case 2), one 1 cm-thick slice was cut in the middle of the muscle length. Three samples (1 × 1 × 0.5 cm) were taken at the following distances from the muscle surface: close to the surface (S, about 0.5 cm from the surface), at muscle centre (M, about 3 cm from the surface) and at an intermediate location (I, about 1.5 cm from the surface). These samples were taken in line with fibre direction, immediately frozen in cooled isopentane (−160°C), chilled with liquid nitrogen (−196°C), and stored at −80°C until use. Cross-sections (10 μm-thick) cut using a cryostat (Microm, HM 560) were collected on glass slides for

immune-histological staining. The cell outline was stained using a rabbit anti-laminin primary polyclonal antibody (L9393 Sigma) and visualized by fluorescence with a goat anti-rabbit IgG cyanine Cy3-labelled secondary antibody (111-165-008, Jackson). Observations were performed on an Olympus BX61 motorized transmission white field/fluorescence microscope coupled with an Olympus DP-71 cooled digital camera and Cell-F software (Olympus Soft Imaging Solutions). Digital images were acquired at  $\times 200$  magnification in fluorescence mode (550/570). Twelve images of each sample were acquired on the same histological section. The observed “detachment” zones were manually coloured in white and their total area was computed using ImageJ <sup>®</sup> software.

## **2.5 Statistics**

Significant differences between means of two groups of data were determined by a Student's *t*-test. Analyses were performed in Microsoft Excel <sup>®</sup>.

# **3 Results and Discussion**

## **3.1 Comparison of cases 1 and 2**

Figures 56 and 57 present the fitted NaCl content profiles and the measurements for cases 1 and 2, respectively. Cylinder length was dependent on excision location in the SM muscle; mean length of the 12 cylinders was 36 mm, with min–max lengths of 26 and 40 mm. To compare the results, NaCl content profiles were plotted against the dimensionless distance  $x/l$  (Equation 1) from the brined sample surface.

The increase in NaCl content was clearly higher in samples subjected to mechanical treatment before static-brining than that in reference samples (case 1). In Figures 56 and 57, one colour has been attributed to the measured and calculated values of each repetition to facilitate visual comparison. There was good agreement between measurements and calculations in all trials.

Both meat surface NaCl content and  $D_{\text{salt}}$  were adjusted at the same time. The theoretical equilibrium between brine and meat surface is defined by water activity equality in brine and meat. In a high-water-content matrix like meat, this means that NaCl concentration in meat water is very close to that in brine (Rougier *et al.*, 2007). Since water content in our samples was  $74 \pm 2\%$  (w/w) and  $C_{\text{salt}}$  was 5%, this equilibrium value was  $3.7 \pm 0.15\%$ . The fact that

extrapolations of the fitted profiles at the meat surface in Figures 56 and 57 are in this interval demonstrates that brine–meat contact was good. The means of the  $D_{\text{salt}}$  fitted values were  $4.5 \pm 0.3 \text{ m}^2/\text{s}$  for case 1 and  $5.4 \pm 0.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  for case 2.

It is not our purpose to rediscuss the literature data on  $D_{\text{salt}}$  during meat immersion-brining; the interested reader can refer to Graiver *et al.* (2006), Vestergaard *et al.* (2007), Siro *et al.* (2009) or Lebert & Daudin (2014) for reviews. The value related to our reference samples is consistent with most of this literature, and the standard deviation on 6 repetitions is in both cases the same as that calculated by Lebert & Daudin (2014) when marinating beef meat tissue.

The important fact is that mean  $D_{\text{salt}}$  values calculated for cases 1 and 2 were significantly different ( $p < 0.05$ ). The 20% increase in case 2 may be due to structural modifications during massaging. Table 11 gives the means and standard deviations of the two mechanical indexes  $F_{\text{max}}$  and  $E$  that were calculated for each of the 2500 deformations applied to the sample at the 30% target compression ratio. The actual mean compression ratio (Cr) was slightly lower.

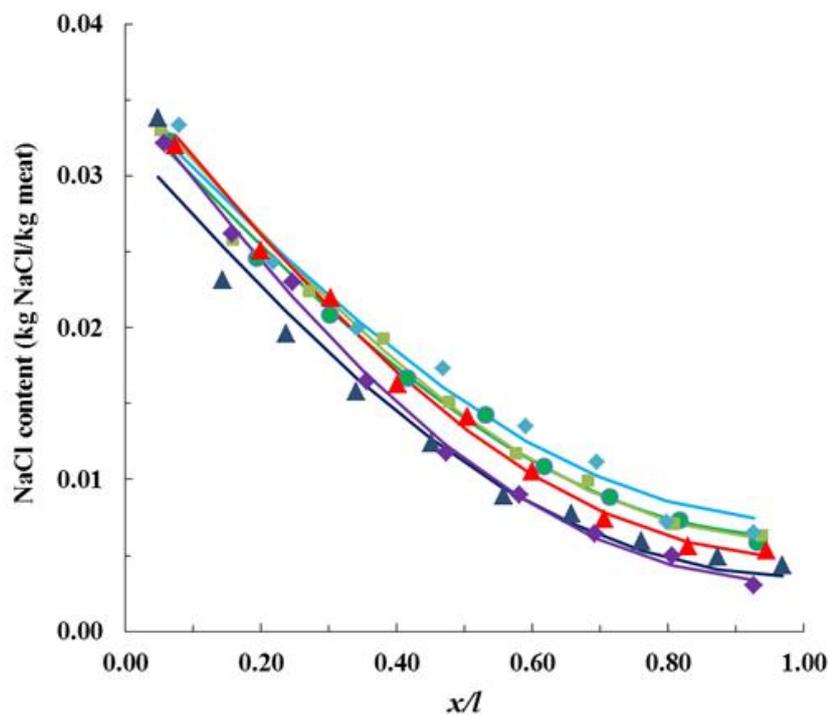


Figure 56 : Six NaCl content profiles in the reference SM meat tissue samples (Case 1). The curve and dots of the same colour correspond to one trial, and curves show fitted profiles.

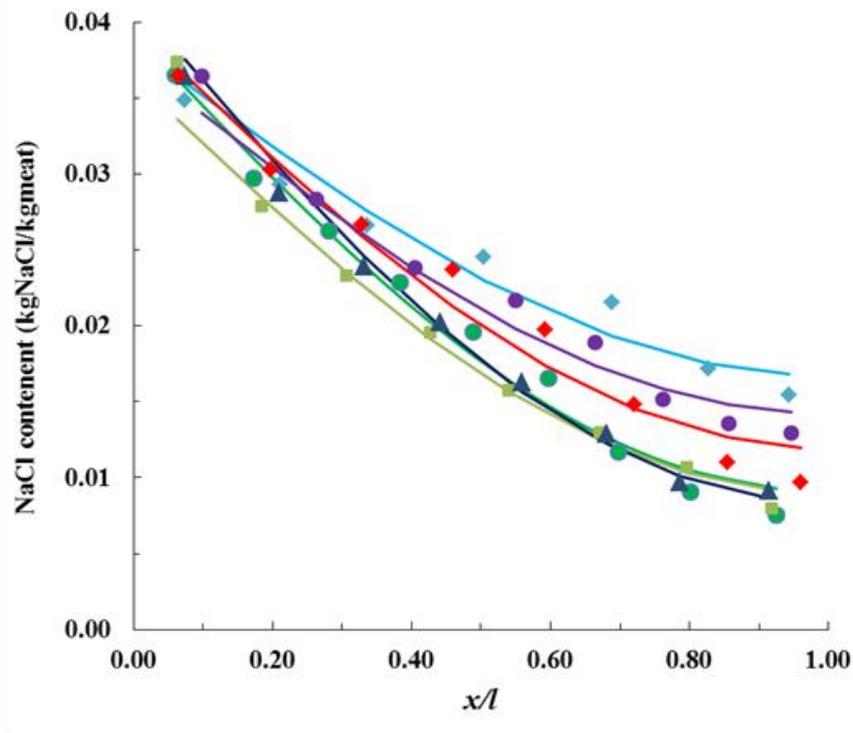


Figure 57 : Six NaCl content profiles in meat tissue samples taken from SM muscle that was massaged prior to static brining (Case 2). The curve and dots of the same colour correspond to one trial, and curves show fitted profiles.

The measured  $F_{max}$  and  $E$  values agree with our previous measurements, and their strong variations from deformation to deformation were explained by the change in muscle position (Daudin et al., submitted to *jfoodeng*). The energy dissipated into the sample during the whole massaging time, calculated as the sum of the 2500 deformation energies, amounts to 1.45 kJ, which is actually rather low. As a point of comparison, the same amount of thermal energy would barely enable a 0.3°C increase in the temperature of a SM muscle weighing 1.2 kg.

#### *Alteration of histological structure*

Figure 58 presents examples of histological images: one for a reference sample (case 1) and one for an S sample taken at 0.5 cm distance from the meat surface after massaging. Laminin is a major component of the basal lamina, one of the layers of the basement membrane (Aumailley et al., 2005). Its orange staining revealed that massaging promoted a thickening of the extracellular space, but unfortunately this could not be quantified by image analysis. Moreover, detachment spots between cells can be observed in places; the clearest detachment areas were coloured manually in white for quantification by image analysis. Table 12 presents the means and standard deviations for 12 fields of observation per sample. The detachment

area in one image was between 0.5 and 8% of the total image area. Due to the high variability between images from the same sample, differences between reference and either M or I samples did not reach significance ( $p > 0.05$ ) but mean M and mean I were both higher than the reference. The S sample differed significantly from the reference ( $p < 0.001$ ), with an approximately 3.5-fold bigger detachment area. These findings are consistent with electron microscopy observations by Siro et al. (2009) who observed that brining-tumbling resulted in a larger distance between muscle fibres, or cells, compared to immersion-brining.

It can be concluded from the comparison of cases 1 and 2 that mechanical treatment promotes an increase in inter-cell spaces due to deformation energy dissipation, but that this process has relatively little effect on  $D_{\text{salt}}$ .

### **3.2 Comparison of cases 3 and 4**

Figure 59 shows that all NaCl content profiles across the section of whole SM muscle were correctly fitted with equation 1. It also clearly shows that mechanical action during brining has a dramatic effect on NaCl penetration in meat. As explained in 2.3, trial time was short enough to prevent a significant effect of NaCl transfer in the Y direction (Figure 55) on salt content increase in excised strips: NaCl content for  $0.35 < x/2l < 0.65$  was always extremely low.

Table 11 : Characteristics of the mechanical treatments applied in cases 2 and 4 to SM muscles. Standard deviation in case 4 was calculated from means of three repetitions.

	Cr %		Fmax (N)		E(mj)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
<b>Case 2</b> <b>Massaging, no brining</b>	28	1.9*	183	77*	578	165*
<b>Case 4</b> <b>Massaging and brining</b>	33.1	1.3	217	96	693	218

\*Standard-deviation corresponds to intra-trial variability (2500 deformations).

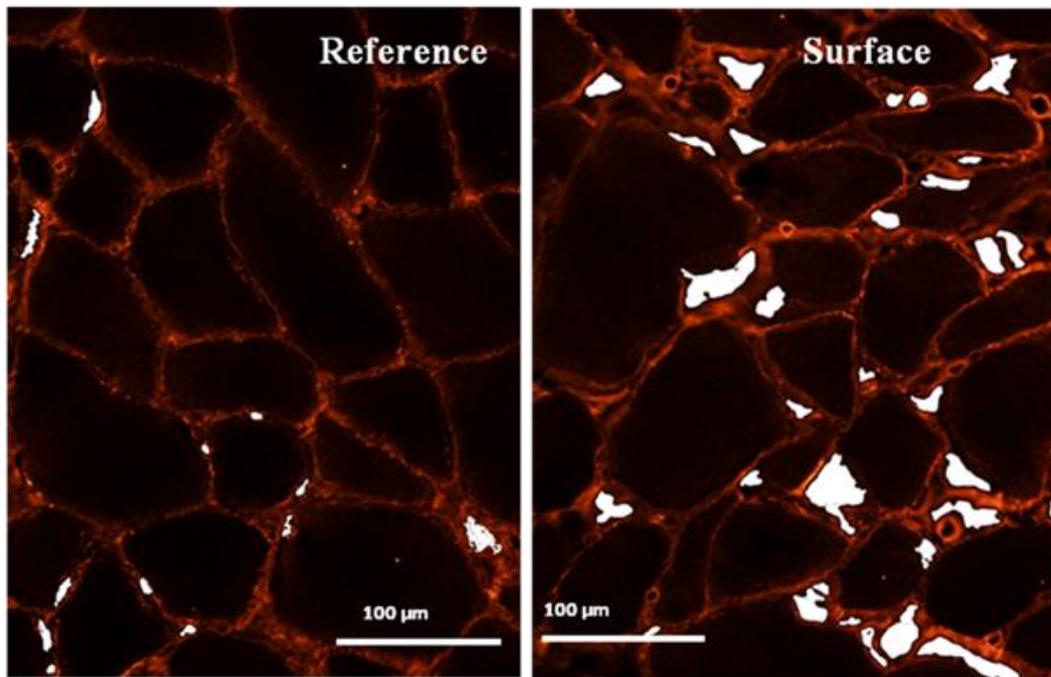


Figure 58 : Examples of histological sections stained using a rabbit anti-laminin antibody. Detachment areas between cells were coloured manually in white.

Mean fitted surface-NaCl contents were 8.1% and 8.4% (w/w) in cases 3 and 4, respectively. These values are thus lower than the theoretical equilibrium: the previous calculations explained in 3.1 would give a value of 9.5% w/w. This discrepancy can be explained by the time-course decrease in NaCl brine content in these trials due to the lower brine-to-meat ratio than in cases 1 and 2. At the end of the experiments, mean  $C_{\text{salt}}$  was 10.5% and 11.2% in cases 3 and 4, respectively, and water content in S samples was not significantly different to initial values; thus, the final theoretical equilibrium values should be 7.8% and 8.3%, respectively, which is in agreement with the fitted values.

#### *Static brining in the lab simulator without massaging (case 3)*

Estimated  $D_{\text{salt}}$  was  $5.0 \pm 0.5 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s. This value is slightly higher than in case 1 despite also being a ‘static-brining’ process, which is nevertheless coherent with the above discussion. Actual equilibrium meat-surface NaCl content decreased from 9.5% to about 8% over the course of the experiment, but our fitting model is theoretically unsuited to this varying boundary condition. The fitting procedure found a mean surface equilibrium condition which underestimated the actual mean value and consequently overestimated  $D_{\text{salt}}$ . The same bias reoccurred when data from case 4 were processed in the same way. This means that the fitted  $D_{\text{salt}}$  values in cases 3 and 4 are ‘very apparent’ diffusivity coefficients.

*Brining–massaging (case 4)*

Estimated  $D_{\text{salt}}$  was  $17.0 \pm 3.7 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s. This mean  $D_{\text{salt}}$  is about 200% higher than in case 3 whereas the two mechanical treatment indexes were not very different to case 2 (Table 11). Note that the standard deviation is much higher than in all other cases, suggesting that mechanical action was more or less pronounced in the 3 trials. To our knowledge, the only available quantitative comparison of  $D_{\text{salt}}$  between static brining and in-tumbler brining is Siro *et al.* (2009) who unfortunately gave no indication on mechanical action intensity in their tumbler. They estimated  $D_{\text{salt}}$  in tumbling to be  $42 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s but they used a higher concentrated brine (20%) than here (13%). Graiver *et al.* (2006) studying static-brining of pork meat showed that  $D_{\text{salt}}$  was multiplied by a factor 2.7 when  $C_{\text{salt}}$  was increased from 14% to 20%, which was interpreted as the effect of observed microstructural changes that were very marked above 14%. We thus conclude that on aggregate, our estimation is in agreement with Siro *et al.*'s results.

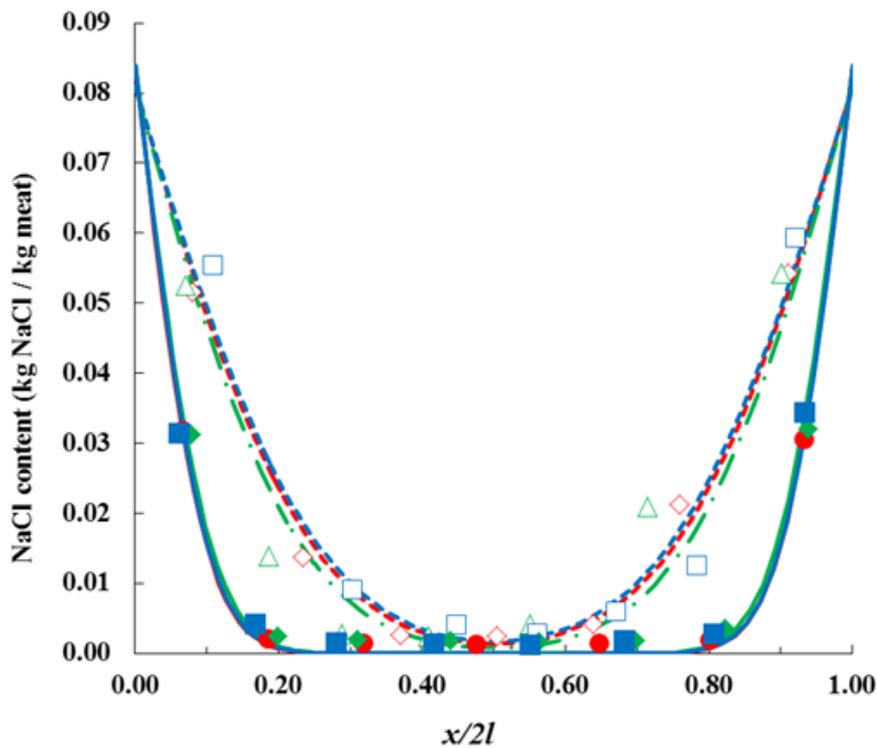


Figure 59 : NaCl profiles along the ‘diameter’ within cross-sections of SM muscles brined for 5 h in the tumbling simulator: empty symbols (measurements; case 4), plain symbols (measurements; case 3), and their respective fitted curves.

Table 12 : Detachment area between cells in samples taken at different distances from the meat surface (trial case 2; 12 images in each sample).

Sample	Detachment area ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Mean	SEM
Reference	2491	671
M	3019	821
I	4484	743
S	8640	1019

The increase in  $D_{\text{salt}}$  due to massaging was only 20% in case 2 yet 200% in case 4. This might be due to water movements promoting internal convection in addition to diffusion. Whatever the mechanism involved, the many brief deformations promoted by repeated falls in tumblers has a major enhancing effect on salt homogenization/penetration in meat.

The above results showed that NaCl content in sample S (see 2.4) provides the most discriminant values for assessing the impact of mechanical action on NaCl transfer. We thus ran complementary experiments with whole SM muscles using two  $C_{\text{salt}}$  levels (5% and 13%) and three massaging levels, i.e. no massaging as in case 3 or brining-massaging as in case 4 with Cr at either 10% or 30%. Each treatment condition was repeated three times. The two target Cr levels were reasonably achieved, and the  $F_{\text{max}}$  and E values recorded in these experiments (Table 13) came out the same as in our previous tests (Daudin *et al.*; submitted jfoodeng). Note that these two Cr levels were shown to correspond to what happens in small-diameter pilot tumblers (Cr 10%) and in the largest industrial tumblers (Cr 30%). Table 13 shows that, for a given  $C_{\text{salt}}$ , NaCl content in S samples increased with massaging intensity. However, the increase is less marked from Cr nil to Cr 10% than from Cr 10% to Cr 30%. This was particularly clear at  $C_{\text{salt}}$  13%, where the difference in S-sample NaCl contents was highly significant between Cr 30% and both other massaging levels. From the point of view of salt homogenization in tumbled meat, these results suggest that experiments in small pilot tumblers are closer to static-brining than to brining–massaging in large tumblers. It would be interesting to refine these results using other Cr values between 10% and 30%.

### **3.3 Prediction of salt homogenization in small meat cubes**

Simulation calculations were carried out to visualize how much mechanical action modifies salt homogenization rate in meat. As an illustrative example, we compared static-brining

( $D_{\text{salt}} = 5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) against brining–massaging (Cr 30% and  $D_{\text{salt}} = 17 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) on small meat cubes (2-cm edges) brined at a constant  $C_{\text{salt}}$  such that equilibrium meat-surface NaCl content was therefore 8.5%. The calculations were performed with Equation 1 for each of the three slabs that define a cube (one slab for each axis); the dimensionless NaCl content at one location ( $x, y, z$  in Figure 60) is equal to the product of the three dimensionless values calculated for each slab (Bimbenet *et al.*, 2002). Spatial variation in NaCl content was calculated over several typical line-segments starting at face  $X = 0$  and for a diagonal line that joins the vertex  $X=Y=Z = 0$  to the cube centre  $X=Y=Z = 1 \text{ cm}$ .

Table 13 : Comparison of salt contents in samples taken at 0.5 mm distance from the meat surface according to brine salt concentration and massaging intensity (3 repetitions). All trials lasted 5 h.

Cr %	Massaging characteristics				Brine salt content (%)			
	Fmax (N)		Energie (mJ)		5%		13%	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
0	-	-	-	-	1.4 ± 0.3		4 ± 0.3	
10	41 ± 5		92 ± 15		1.5 ± 0.1		4.3 ± 0.6	
30	199 ± 65		637 ± 159		1.8 ± 0.2		5.8 ± 0.1	

Figure 60 presents the calculated NaCl content distributions at two process times: 1 and 3.5 h, which equates to about 500 or 1700 deformations if tumbling is performed at 8 deformations per minute. It is logical that heterogeneity is more pronounced in plane  $Y = 10 \text{ cm}$  (dotted lines) than plane  $Y = 5 \text{ cm}$  (continuous lines) which is close to a cube face. At 3.5 h of brining-tumbling, homogeneous NaCl content is not really achieved. The main information from these calculations is that 1 h of brining-tumbling is equivalent to 3.5 h of static-brining.

Equation 1 is ill-suited to simulating the case of brine injection into meat prior to tumbling because (i) the system geometry is complex and (ii) the NaCl content in injection-holes, and therefore the mass transfer boundary condition at the meat surface, vary greatly with time. Finite element methods would be needed here in order to cope with the complexity involved. Nevertheless, in practice, the typical distance between two injection needles is 2-3 cm, which is the same as two cube faces in our present calculations, so we can expect the time differential homogenization between static brining and brining–tumbling to pan out at the same order of magnitude.

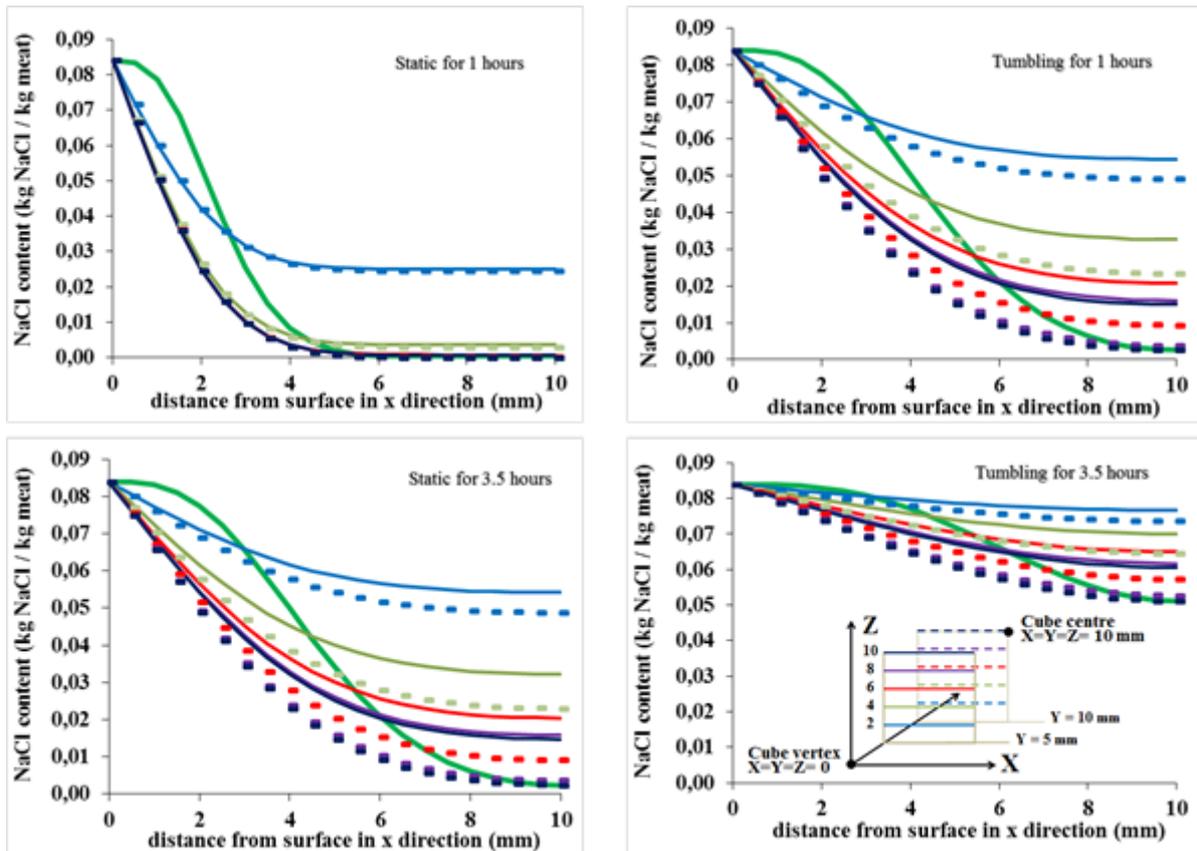


Figure 60 : Comparison of predicted spatial distributions of NaCl in meat cubes ( $2 \times 2 \times 2$  cm) for static-brining *versus* brining-tumbling. Each curve corresponds to the NaCl content profile along the line of the same colour and type as in the bottom-right diagram. The thick light-green curve corresponds to the straight line from cube vertex to cube centre.

## **4 Conclusion**

The concept of apparent diffusion constant can be used to fit all measured NaCl content profiles even when it is not fully appropriate from a theoretical point of view—for example when meat samples underwent numbers of brief deformations—which makes it a good criterion for comparing brining conditions.

Mechanical treatment alone, similar to the process undergone by meat pieces in large industrial tumblers, promoted thickening of the extracellular space and detachment areas between meat fibres, but this action only led to a 20% increase in  $D_{\text{salt}}$ . The same mechanical treatment applied simultaneously with brining had a far greater effect, increasing  $D_{\text{salt}}$  by 200%. This might be due to internal water movement during meat deformations. Our results also suggest that experiments in small pilot tumblers are closer to static-brining than to brining–massaging in large tumblers

It would be interesting to carry out a fresh set of experiments to establish a relationship between  $D_{\text{salt}}$  and the level of massaging intensity using the three mechanical indexes made measurable by the tumbling simulator. Since the standard deviations related to both measured mechanical indexes and estimated  $D_{\text{salt}}$  are rather high, many repetitions will be needed to assess mean trend.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was partly supported by grants from the “Conseil Régional d’Auvergne” and from the French national research agency under the ANR-ALIA program (ANR-09-ALIA-013-01) project titled ‘Na-moins’.

## **Chapitre 6. Impact des sollicitations mécaniques appliquées aux viandes lors du saumurage-malaxage sur le rendement de cuisson, la solubilité et l'hydrophobie des protéines.**

*Ce chapitre est rédigé en Français, sous la forme d'un projet d'article qui sera soumis à la revue 'Food Chemistry' après traduction.*

## Impact des sollicitations mécaniques appliquées aux viandes lors du saumurage-malaxage sur le rendement de cuisson, la solubilité et l'hydrophobie des protéines.

Diaa SHAREDEH, Jean-Dominique DAUDIN, Philippe GATELLIER  
UR370 Qualité des Produits Animaux, INRA, F-63122 Saint Genès Champanelle

### **Résumé**

Le saumurage-malaxage est souvent réalisé avant la cuisson des viandes transformées, telles que le jambon cuit, pour favoriser les modifications de protéines qui elles-mêmes déterminent la texture du produit cuit et le rendement de cuisson. Les effets respectifs du NaCl et du traitement mécanique ont été évalués pour deux types de muscle du jambon de porc (*Semimembranosus* et *Rectus femoris*). Les muscles ont été malaxés en présence de saumure (5 ou 13%) dans un simulateur de malaxage qui, contrairement aux barattes, permet de contrôler et caractériser le traitement mécanique. Le rendement de cuisson dépend principalement de la teneur en sel. Le traitement mécanique provoque en lui-même une augmentation de la solubilité des protéines. Elle est d'autant plus prononcée que le nombre (N égal 350 ou 2 500) et le taux des déformations (TC égal 10% ou 30%) sont grands. Elle varie de 20 à 50% par rapport à des échantillons non malaxés, qu'ils soient salés ou non. L'hydrophobie des protéines myofibrillaires augmente principalement quand la teneur en sel augmente. Cette augmentation est d'environ 80% pour une teneur en sel de 2%. Le traitement mécanique contribue aussi à augmenter l'hydrophobie des protéines myofibrillaires : 15%, quel que soit TC, quand N = 350 et jusqu'à 40% pour le traitement mécanique le plus long et le plus intense.

Mots clés : viande, solubilité, hydrophobie, sollicitations mécaniques

## 1 Introduction

Le malaxage, encore appelé barattage, fait subir aux morceaux de viande un traitement mécanique pendant le saumurage. Cette opération est effectuée avant la cuisson des viandes transformées, telles que le jambon cuit, dans des barattes qui tournent entre 4 et 16 tours par minute pendant plusieurs heures. Les conditions pratiques du malaxage-saumurage sont diverses. Par exemple, des phases de rotation peuvent alterner avec des phases de repos et l'appareil peut être mis sous vide. La saumure peut être mise simplement en contact par immersion avec les pièces de viande, quand leurs dimensions sont petites, ou injectée préalablement au moyen d'une injecteuse multi-aiguilles dans le cas de pièces volumineuses. Dans tous les cas les pales qui sont disposées sur la paroi intérieure d'une baratte font remonter les morceaux déposés au fond de la cuve jusqu'en haut. Les morceaux chutent par gravité sur ceux qui sont encore présents au fond de la cuve ; ceci provoque des déformations brèves selon une fréquence proportionnelle à la rotation de la baratte. Dans le cas de deux muscles du jambon (*Semitendinosus* et *Rectus femoris*) Daudin *et al* (soumis-chapitre 4) ont estimé à partir de films au ralenti que le taux de déformation varie de 4 à 40% selon la hauteur de chute et la position du muscle en fin de chute.

La rotation des barattes industrielles provoque donc des centaines, voire des milliers, de déformations successives pendant une fabrication. Il en résulte un traitement mécanique, plus ou moins intense selon les propriétés rhéologiques des muscles, le diamètre de la baratte et son taux de charge. Les études menées avec diverses barattes pilotes ou industrielles ont estimé les conséquences de l'action combinée du traitement mécanique et du saumurage. Cette action est connue pour accélérer l'homogénéisation de la saumure dans les morceaux (Young & Smith, 2007 ; Siro *et al.*, 2009 ; Sharedeh *et al.*, soumis-chapitre 5). Le malaxage-saumurage provoque des changements biochimiques qui améliorent la capacité de rétention d'eau (Dzudie *et al.*, 1999 ; Dolata *et al.*, 2004 ) et favorisent la solubilisation des protéines myofibrillaires par le sel puis leur extraction à la surface des morceaux (Siegel *et al.*, 1978 ; Kerry *et al.*, 1999). Ces changements affectent le rendement de cuisson (Gillett *et al.*, 1981 ; Krause *et al.*, 1987 ; Dzudie *et al.*, 1999 ; Szerman *et al.*, 2007), la tenue de tranche dans le cas du jambon cuit (Bombrun *et al.*, 2014) et les qualités sensorielles du produit cuit, notamment la texture (Dzudie *et al.*, 1999 ; Szerman *et al.*, 2007).

Dans la fabrication du jambon cuit un des effets principaux du malaxage-saumurage est de produire un exsudat protéique, ou « limon » qui enduit la surface des morceaux malaxés en fin

de traitement et permet de les coller entre eux pendant la cuisson. La cohésion des morceaux après refroidissement détermine la tenue de tranche ; ce critère de qualité est devenu essentiel du fait de l'accroissement des ventes de jambon cuit sous la forme de tranches emballées. Le limon est composé pour l'essentiel d'eau et de protéines qui sont majoritairement des protéines myofibrillaires (Krause *et al.*, 1978 ; Bombrun, 2014) ; MacFarlane *et al.* (1977) ont montré que la myosine et l'actomyosine, issues de ces protéines, confèrent au limon son pouvoir adhésif. Les protéines sarcoplasmiques jouent aussi sur la rigidité des gels de myosine, mais quand la force ionique est faible (De Lamballerie *et al.*, 1993). La teneur en protéines du limon augmente avec la durée du malaxage (Olkiewicz *et al.*, 1995) et peut atteindre en fin de traitement 10 % en masse (Siegel *et al.*, 1978), voire 16% (Bombrun *et al.*, 2014) selon les conditions de malaxage ; ceci induit une augmentation de viscosité du limon (Lachowicz *et al.*, 2003). Le limon contient aussi des lipides en quantité assez variable allant de 0,2 % à 5 % (Siegel *et al.*, 1978 ; Kerry, Morrissey *et al.*, 1999 ; Kerry *et al.*, 1999). A partir d'essais avec une baratte pilote, réalisés sur des cubes de muscles de porc *Semimembranosus* de 3 cm d'arrête, Bombrun *et al.* (2014) ont conclu que, dans la gamme de 11 à 22 %, la teneur en sel de la saumure n'a pas d'incidence sur la qualité adhésive du limon. En cohérence avec les observations relatives aux changements de composition du limon, la tenue de tranche s'améliore régulièrement avec la durée de malaxage jusqu'à atteindre un plateau. La durée nécessaire pour atteindre ce plateau correspond surtout à un nombre de rotations, qui fixe le nombre de déformations des pièces de viandes, mais ce nombre dépend des conditions de traitement et du matériel utilisé (Theno *et al.*, 1978 ; Gillett *et al.*, 1981 ; Reichert *et al.*, 1985 ; Ripoche, 2000).

Tous les travaux précédents ont été réalisés dans des barattes industrielles ou pilotes de diverses conceptions (forme et nombre des pales) et de taille variable (diamètre et longueur) avec un grand nombre de conditions de fonctionnement (vitesse de rotation, temps de traitement, et présence éventuelle de périodes de repos). Le traitement mécanique des pièces de viande ne peut pas être caractérisé dans les appareils industriels. A cause de cela, il reste actuellement très difficile de transposer les conclusions d'une étude à une autre.

Le but de ce travail est de caractériser les effets respectifs du NaCl et du traitement mécanique sur le rendement de cuisson, sur l'hydrophobie et la solubilité des protéines qui sont liées au rendement de cuisson et à la texture finale, et sur l'extraction des protéines solubilisées dans le limon.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Les échantillons

Un lot de 54 muscles, triés en fonction du pH ultime, a été acheté à un fabricant de jambon cuit. Il était constitué pour moitié de muscles *Rectus femoris* (RF) et pour moitié de muscles *Semimembranosus* (SM) de porc. Ces deux types de muscle ont été choisis car ils diffèrent par leur composition en fibres musculaires : le muscle RF a un potentiel glycolytique de 84 ( $\mu$  mole lactate/g de viande) et contient environ 32 % de fibres IIX/IIB, alors que le muscle SM a un potentiel glycolytique de 115 ( $\mu$  mole lactate/g de viande) et contient environ 92 % de fibres IIX/IIB (Carlier et al., 2012). En accord avec ces auteurs, leurs pH ultimes étaient  $5,7 \pm 0,15$  pour le SM et  $6,1 \pm 0,24$  pour le RF. Ils ont été emballés sous vide 4 jours après l'abattage et conservés à  $-18^{\circ}\text{C}$ . Avant un essai, un muscle était décongelé en une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Le simulateur de malaxage du laboratoire

Les essais de saumurage-malaxage ont été faits avec un simulateur de malaxage qui a été présenté en détails par Daudin *et al.*, (soumis-chapitre 4). Sa conception est différente des barattes pilotes. De ce fait, il permet de reproduire des successions de déformations représentatives de celles imposées aux pièces de viandes dans des barattes de différents diamètres, et parallèlement, de caractériser le traitement mécanique par des mesures force-déformation mesurées à une fréquence d'environ 160 hertz pendant les déformations.

Le principe consiste à appliquer des centaines de compressions successives au moyen d'un piston, équipé de capteurs de force, à un muscle placé dans un filet et mis en rotation, à raison de quelques tours par minute, dans un bac contenant de la saumure. Cette rotation permet d'enduire régulièrement la surface du muscle avec la saumure et de lui appliquer des déformations selon des positions angulaires variant d'un coup à l'autre.

Les compressions sont brèves, de l'ordre de 0.25 s, appliquées perpendiculairement à l'axe principal du muscle et séparées par des périodes de 5 à 20 secondes, simulant ainsi des chutes dans le cas de barattes tournant de 12 à 3 tours par minute. Le taux de déformation (variation de l'épaisseur du muscle/ épaisseur initiale) des deux types de muscle considérés dans cette étude qui varie linéairement avec la hauteur de chute dans les barattes (Daudin *et al.*, soumis-chapitre 4) peut être sélectionné entre 5% et 35%.

L'action mécanique subie par les morceaux de viande est caractérisée au moyen de deux critères qui sont calculés à partir des courbes force-déplacement, tel que cela a été fait lors de l'étude de la tendreté du tissu musculaire (Lepetit & Culioli, 1994) : la force maximale (Fmax) appliquée nécessaire pour obtenir le taux de déformation cible et l'énergie de déformation (E) qui correspond à la différence entre le travail utilisé pour déformer le muscle et celui qui est restitué quand ce dernier revient à sa forme initiale.

### **2.3 Les essais de saumurage-malaxage**

La saumure contenait uniquement du NaCl. Deux concentrations (Csel) ont été retenues afin de promouvoir une variété de couples « traitement mécanique-teneur en sel finale » dans les échantillons prélevés à la fin d'un traitement : 5 et 13 % en masse.

Le rapport entre la masse de saumure et la masse de viande était égal à 1/1 (kg saumure/kg viande). Par conséquent, du fait de la différence de masse entre les deux muscles, la hauteur de la saumure dans la cuve du simulateur de malaxage était d'environ 6 mm dans le cas du muscle RF et 15 mm dans le cas du SM.

La fréquence des compressions étaient toujours égale à 8,3 compressions par minute. Quatre traitements mécaniques ont été appliqués à chaque type de muscle, pour chaque concentration en sel dans la saumure :

- (i) deux taux de compression TC : 10 ou 30 % de l'épaisseur moyenne du muscle, ce qui correspond approximativement à des chutes inférieures à 25 cm et supérieures à 1 m,
- (ii) deux couples « nombre de compressions et durée du traitement » (L pour 5 h et 2500 compressions) ou (C pour 42 min et 350 compressions).

Chacune des 16 combinaisons (type de muscle x Csel x TC x durée) a été répétée 3 fois. Pendant un essai 3 millilitres de saumure étaient prélevés dans la cuve à 15, 30 et 42 minutes lors des essais courts, et aussi à 120, 210 et 300 minutes lors des essais longs afin de suivre les évolutions des teneurs en sel et en protéines dans l'exsudat de malaxage. Chaque dosage était répété 3 fois. Quelques essais complémentaires (L, TC 30%, RF et SM) ont été réalisés avec une concentration en NaCl de 0,9 %, ce qui confère à la saumure une force ionique égale à celle du tissu musculaire.

## **2.4 Prélèvement des échantillons à la fin d'un saumurage-malaxage**

Le prélèvement des échantillons au sein du muscle a été organisé afin que les différents type de mesures, effectuées sur des échantillons prélevés à une certaine distance de la surface, soient faites sur des échantillons contigus (Figure 61, tirée de la Figure 34 du chapitre 2). Trois sections de 2 cm d'épaisseur, orthogonales à l'axe principal du muscle, ont donc été découpées et utilisées respectivement pour les mesures physicochimiques (teneurs en eau et en sel), les analyses biochimiques (solubilité des protéines et hydrophobie des protéines myofibrillaires) et le rendement de cuisson. Des languettes ayant une largeur d'environ 1 cm, passant par le 'centre' de chacune de ces sections ont ensuite été découpées, puis des parallélépipèdes de dimensions 2 x 1 x 0,5 cm ont été prélevés à 3 positions : près de la surface du muscle (S), au milieu (M) du muscle et à une position intermédiaire (I) entre les deux premières. Dans le cas où le muscle avait une épaisseur de 6 cm, les distances des centres des prélèvements M, I et S étaient respectivement et approximativement situés à 30, 15 et 5 mm par rapport à la surface du muscle.

Trois prélèvements témoins de même taille que les précédents ont donc été faits sur chaque muscle. Tous les prélèvements ont été gardés à -80°C jusqu'aux analyses.

Les rendements de cuisson et les mesures biochimiques relatifs aux prélèvements après saumurage-malaxage (Atraité) ont été systématiquement comparés aux valeurs obtenues sur les prélèvements témoins du même muscle avant traitement (Ai) de la façon suivante :  $100 * (A_{traité} - A_i) / A_i$ .

## **2.5 Analyses**

*Teneur en NaCl* : la teneur de chlorure de sodium a été mesurée sur des prélèvements d'environ 0,5 g. Cette prise d'essai était approximativement diluée au 1/20 dans de l'eau distillée, puis broyée et centrifugée 10 minutes à 13 000 tr/min. La teneur en NaCl était déduite de la mesure de teneur en ions chlorure (mg/ml) dans le surnageant au moyen d'un chloruromètre (Sherwood MH II Chloride analyser 926) sachant que les ions chlorure et sodium diffusent à la même vitesse dans le tissu musculaire (Lebert & Daudin, 2014).

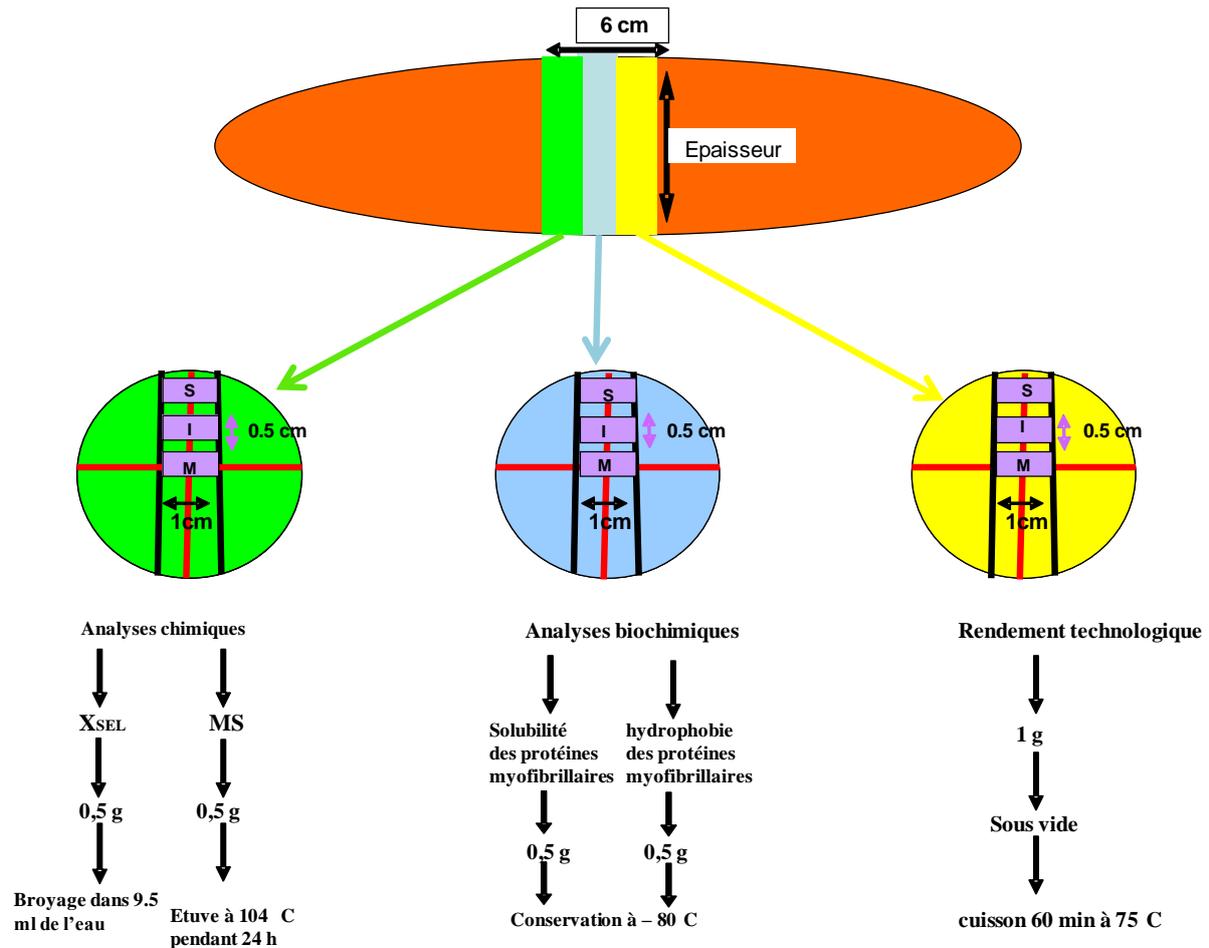


Figure 61: Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage.

*Mesure de pH* : environ 0,6 g d'échantillon était mis dans un tube et broyé à l'aide d'un micro broyeur (Polytron PT 2100) en présence de 3 ml d'eau. Le pH était mesuré à l'aide d'un pH mètre (Mettler toledo MA 235) muni d'une électrode (Titro alpha plus Schott) compensée en température et préalablement étalonnée.

*Teneur en matière sèche* : la teneur en matière sèche a été obtenue par différence de pesée avant et après passage dans une étuve à 104°C pendant 24 heures.

*Rendement de cuisson* : le protocole de Bombrun *et al.* (2015) a été appliqué à des échantillons de 1 g (2 x 1 x 0,5 cm) placés dans des sachets mis sous vide. La cuisson était réalisée par immersion pendant 60 minutes dans un bac d'eau thermostaté à 70°C. Ils étaient ensuite refroidis en les plongeant pendant 5 minutes dans un bain d'eau à 0°C. Les échantillons étaient ensuite sortis des sachets, essuyés par des papiers absorbants, puis pesés. Le rendement de cuisson est égal au poids après cuisson divisé par le poids initial.

*Teneur en protéines* : les quantités de protéines dans les exsudats de malaxage et dans les extraits lors des mesures de solubilité ont été mesurées par la méthode du Biuret (Gornall *et al.*, 1949).

*Solubilité des protéines* : l'indice de solubilité est égal au rapport de la masse de protéines solubles présentes dans un échantillon par rapport à celle des protéines totales ; à l'exception du collagène qui est insoluble dans la soude 10% utilisée lors du Biuret. Un échantillon de 0,2 g, issu d'un prélèvement après saumurage-malaxage, était broyé dans 4 mL de tampon phosphate de sodium (40 mM, pH 6), ce qui donne une force ionique de 0,24 M à peu près représentative de la force ionique du tissu musculaire. La concentration en NaCl de ce tampon était ajustée à la teneur en NaCl du prélèvement. Deux extraits de 200 µL étaient réservés pour mesurer la quantité de protéines totales. Le reste du broyat était agité pendant 30 minutes, puis centrifugé (4000 rpm) à 4°C pendant 15 min. Deux autres extraits de 200 µL étaient prélevés dans le surnageant pour mesurer la quantité de protéines solubles.

La littérature donne une courbe moyenne de solubilité des protéines pour le tissu musculaire (Wirth, 1974) qui croît de 0 à 5 % en masse de sel, puis décroît au-delà de cette valeur, mais elle n'informe pas sur la variabilité relative au type de muscle ou à l'animal.

Des courbes de références de solubilité des protéines du tissu musculaire des deux types de muscles de porc RF et SM ont donc été établies, avant malaxage, en fonction de la teneur en sel : 4 pour le muscle RF et 4 pour le muscle SM. Chacune des 8 courbes a été mesurée avec des échantillons prélevés sur le même muscle. Le protocole précédent a été utilisé en broyant 0,2 g de tissu musculaire dans 4 ml de tampon phosphate de sodium en présence d'une certaine quantité de NaCl. Une gamme de force ionique allant de 0,24 à 1,98 M a été prospectée. Ceci correspond à une gamme de teneur en sel allant de 0 à 10,1 g de NaCl/100 g de viande.

*Hydrophobie de surface des protéines myofibrillaires* : les protéines myofibrillaires ont été extraites en suivant la méthode de Martinaud *et al.* (1997). Un échantillon de 1 g était homogénéisé dans 10 mL de tampon phosphate de sodium (40 mM) dont la concentration en NaCl était ajustée pour être égale à celle de l'échantillon. Le pH était ajusté par ajout de solution acide (HCl 0,5 M) ou basique (NaOH, 0,5 M). L'hydrophobie de surface a été mesurée en utilisant comme sonde le bleu de bromophénol (BBP) qui se fixe aux sites hydrophobes des protéines myofibrillaires selon la méthode de Chelh *et al.* (2006). Les résultats d'hydrophobie sont exprimés en pourcentage de BBP fixé.

## **2.6 Statistiques**

Les résultats sont généralement reportés en indiquant la moyenne  $\pm$  l'écart-type afin de caractériser la variabilité des mesures. Quand l'incertitude sur la valeur moyenne, ou Standard Error on Mean est utilisée, SEM est précisé.

Les ANOVA n'ont pas pu être exploitées du fait du petit nombre de répétitions et de variances trop hétérogènes. Un test de Student a été utilisé pour évaluer la significativité des différences entre les moyennes de deux groupes de données ( $p < 0,05$ ).

Les mesures relatives aux exsudats de malaxage ont été traitées avec un test non-paramétrique de Friedman.

## **3 Résultats et discussion**

### **3.1 Traitement mécanique et répartition du sel et de l'eau dans les muscles**

En accord avec les observations de Sharedeh *et al.* (soumis, chapitre 5) relatives au transfert de sel, quelles que soient les conditions de saumurage-malaxage appliquées, deux types d'échantillons ont été obtenus parmi les prélèvements dans les muscles.

Les échantillons prélevés en positions M et I ont subi le traitement mécanique mais leurs teneurs en eau et en NaCl ne différaient pas significativement des valeurs mesurées dans les échantillons témoins prélevés sur les mêmes muscles avant traitement. Les teneurs en eau moyennes des échantillons témoins étaient égales à  $77,2 \pm 1$  et  $73,5 \pm 1$  % en masse respectivement pour les muscles RF et SM. La valeur supérieure relative au RF s'explique par un pH ultime plus grand, ce qui est connu pour améliorer la capacité de rétention d'eau (Offer et Knight, 1988). Les teneurs en eau de l'ensemble des échantillons M et I n'étaient pas significativement différentes des valeurs initiales ; elles étaient égales à pour le RF de  $76,4 \pm 1$  et pour le SM de  $74,2 \pm 1$  %. Les teneurs en NaCl de ces échantillons étaient toujours inférieures à 0,3 % en masse avec une moyenne sur l'ensemble des essais égale à 0,1 %.

Les tableaux 14 et 15 regroupent les valeurs des deux paramètres caractérisant le traitement mécanique et les teneurs en eau et en NaCl des échantillons prélevés en position S. Leur teneur en eau ne différait jamais significativement de celle des témoins mais leur teneur en

NaCl était toujours significativement plus élevée, avec des valeurs allant de 0,5 à 6 % en masse en fonction la concentration en sel dans la saumure, du taux de déformation et de la durée du traitement mécanique. Du point de vue du transfert de sel, nos mesures ne révèlent pas de différence significative de comportement entre le RF et le SM. Par exemple, si l'on compare le traitement le plus intense (Csel 13 %, TC 30 %, 300 min) à celui le plus doux (Csel 5 %, TC 10 % et 42 min), la teneur en sel en S est pour les deux types de muscle respectivement supérieure à 5 % et d'environ 0,6 %.

Tableau 14 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles *Rectus femoris* et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.

Csel (g NaCl/100 g)	TC %	Durée	Fmax (N)	Energie (mJ)	Teneur en eau %	Teneur en NaCl %
13	10	C	31 ± 3	86 ± 5	77,0 ± 1,0	2,4 ± 0,9
		L	38 ± 5	87 ± 17	76,0 ± 1,0	4,5 ± 0,4
	30	C	130 ± 48	463 ± 181	76,3 ± 1,5	2,8 ± 0,1
		L	129 ± 18	498 ± 134	76,0 ± 0,0	5,1 ± 0,4
5	10	C	37 ± 17	118 ± 60	77,0 ± 1,7	0,6 ± 0,1
		L	37 ± 9	101 ± 12	79,0 ± 3,0	1,8 ± 0,2
	30	C	144 ± 8	543 ± 68	77,0 ± 1,0	0,9 ± 0,1
		L	136 ± 27	497 ± 125	77,7 ± 2,3	2,1 ± 0,1

Tableau 15 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles *Semimembranosus* et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C) correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.

Csel (g NaCl/100 g)	TC %	Durée	Fmax (N)	Energie (mJ)	Teneur en eau %	Teneur en NaCl %
13	10	C	37 ± 10	96 ± 13	75,0 ± 0,0	2,1 ± 0,4
		L	40 ± 1	96 ± 2	72,3 ± 0,6	4,3 ± 0,6
	30	C	153 ± 66	485 ± 197	74,7 ± 1,5	2,4 ± 0,3
		L	238 ± 59	676 ± 159	74,7 ± 1,2	5,8 ± 0,1
5	10	C	48 ± 9	119 ± 27	74,0 ± 1,0	0,7 ± 0,2
		L	42 ± 9	89 ± 28	75,3 ± 1,2	1,5 ± 0,1
	30	C	189 ± 76	610 ± 282	75,0 ± 2,0	0,9 ± 0,1
		L	160 ± 57	598 ± 159	75,3 ± 3,2	1,8 ± 0,2

La position du muscle change à chaque déformation du fait de sa rotation dans la cuve ; la condition d'application de la déformation (taux de compression et surface de contact entre le piston et le muscle) n'est donc pas constante, ce qui est plus représentatif de ce qui se passe dans une baratte que si le muscle avait été maintenu dans une position fixe, mais aboutit à des écarts-types très élevés pour les deux mesures mécaniques ( $F_{max}$  et  $E$ ). Des essais complémentaires ont montré la bonne répétabilité des mesures mécaniques avec des écarts-types inférieurs à 5% de la valeur moyenne pour un même muscle restant dans la même position. Les écarts-types donnés dans les tableaux 14 et 15 correspondent à la variabilité des valeurs moyennes relatives à 3 répétitions avec 3 muscles de même type.

Outre la durée, associée au nombre de déformations, nos essais ont permis d'obtenir deux traitements mécaniques très différents et semblables pour les deux types de muscle. Le premier correspond à un taux moyen de déformation (TC) de 10 % ; les moyennes de la force maximale ( $F_{max}$ ) et de l'énergie de déformation ( $E$ ), calculées sur la totalité d'un essai, étaient alors respectivement d'environ 40 N et 100 mJ. Le deuxième correspond à TC égal à 30% ;  $F_{max}$  et  $E$  étaient alors respectivement compris entre 130 et 190 N, soit environ 4 fois plus grand que dans le premier cas, et entre 460 et 670 mJ, soit 5 à 6 fois plus grand que précédemment. Compte tenu de la grande variabilité des mesures d'un essai à l'autre il n'a pas été possible de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement mécanique entre les deux types de muscle.

### **3.2 Rendement de cuisson**

Les rendements de cuisson des échantillons témoins du RF et du SM, évalués pour chaque type de muscle sur des prélèvements de 24 muscles, étaient égaux respectivement à  $71,5 \pm 1,2$  et  $71,6 \pm 1,2$  %. Ces chiffres correspondent à la perte de jus maximum pouvant être obtenue à la température de chauffage considérée, ou 'perte de jus d'équilibre' définie par Kondjoyan *et al* (2013). Bien que nos échantillons soient petits (1 g), nos résultats sont identiques à ceux obtenus par Bombrun *et al.* (2015) avec des échantillons de muscle SM de 27 g (cube de 3 cm d'arrête) frais ou ayant subi un cycle congélation-décongélation, dans les mêmes conditions de cuisson et de refroidissement.

Les rendements de cuisson des échantillons M et I des deux types de muscle n'étaient pas significativement différents de ceux des témoins, suggérant que le traitement mécanique seul a un effet négligeable sur le rendement.

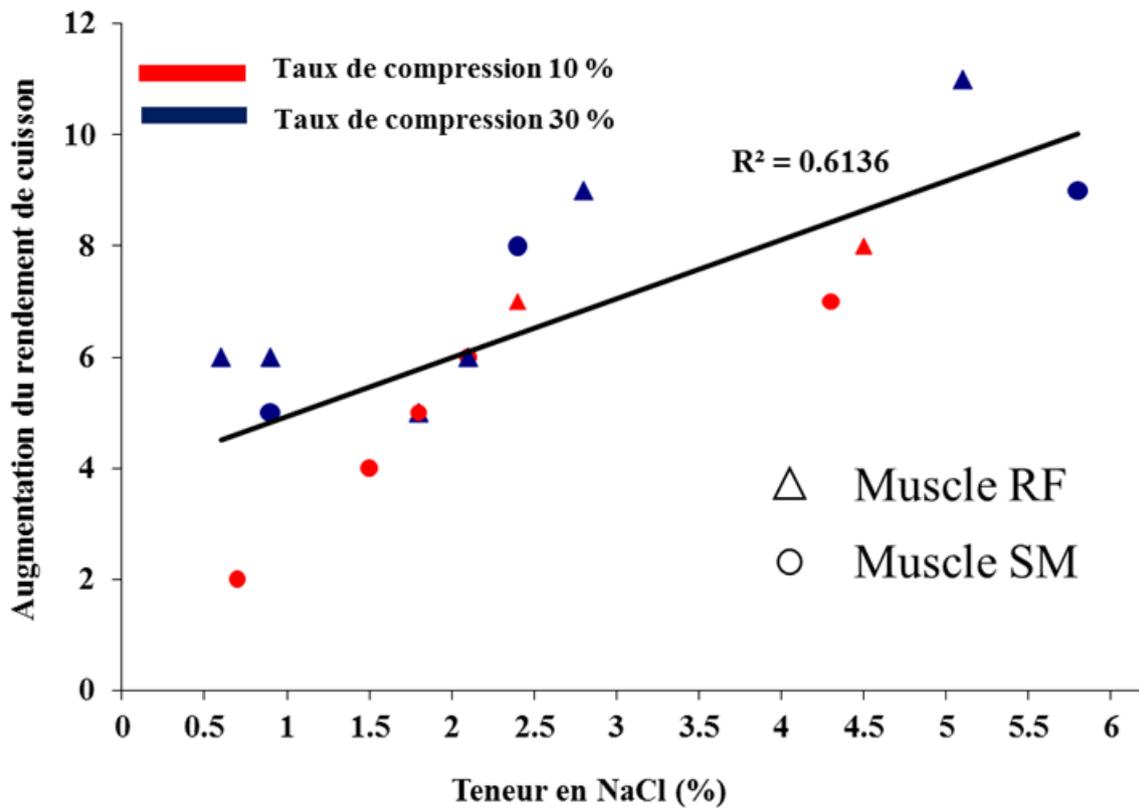


Figure 62 : Augmentation du rendement de cuisson mesuré sur les échantillons prélevés près de la surface (S) par rapport aux témoins prélevés sur les mêmes muscles avant le saumurage-malaxage (RF, triangle et SM, cercle).

La Figure 62 montre l'augmentation du rendement de cuisson mesuré sur les échantillons S par rapport aux échantillons témoins. Cette augmentation varie linéairement en fonction de la teneur en NaCl et s'élève jusqu'à 10 % quand la teneur en sel atteint 6 %. Compte tenu du fait que l'écart-type sur 3 répétitions, relatif à l'augmentation du rendement, était de  $\pm 1,3$  %, aucune différence statistique n'a été mise en évidence, d'une part, entre le RF et le SM, et d'autre part, entre les traitements mécaniques à TC 10% et 30 %. Cependant la Figure 62 suggère qu'une action mécanique intense est plus favorable ; ceci reste à confirmer en augmentant le nombre d'essais.

L'augmentation de 4 % du rendement de cuisson entre des échantillons non salés et ceux ayant une teneur en sel de l'ordre de 1% après saumurage-malaxage dans le simulateur est

conforme à l'augmentation observée par Bombrun *et al.* (2015) entre des témoins, non salés non barattés, et des échantillons de muscle SM saumurés à 0,8 % dans une baratte pilote de diamètre 48 cm (8 tours par minute, 2 000 tours at 2 °C). Ces auteurs ont par ailleurs conclu à l'absence d'impact d'une augmentation de la teneur en sel sur une plage de 0.8 % à 2 % qui couvre en pratique la variation maximum dans des jambons cuits. Dans nos essais, il n'est pas non plus possible de mettre en évidence un tel effet sur cette plage restreinte, mais la tendance à l'augmentation de rendement due à une augmentation de la teneur en sel est nette sur une plage plus large. Cette conclusion est en accord avec deux études relatives au malaxage qui ont conclu qu'une réduction du sel ajouté entre 3% et 0,5% entraîne une augmentation de la perte de poids à la cuisson dans le cas du jambon (Lee & Chin, 2011) et de viande hachée (Ruusunen *et al.*, 2001).

### **3.3 Solubilisation des protéines au sein du tissu musculaire**

La solubilité des protéines dans les échantillons témoins étaient respectivement égale à  $17 \pm 4$  et  $19 \pm 3$  % pour le RF et le SM. Cette solubilité de base correspond aux protéines sarcoplasmiques naturellement solubles. Les courbes moyennes de références relatives à l'augmentation de la solubilité des protéines en fonction de la teneur en sel sont présentées sur la Figure 63 pour les deux types de muscle.

L'allure de ces 2 courbes est en accord avec la courbe générale qui sert souvent de référence Wirth (1974). L'augmentation de la solubilité des protéines est maximum et atteint 60% dans les deux cas pour une force ionique du tampon de broyage égale à 1 M ; le NaCl contribue alors pour 0,76 à cette force ionique, soit une teneur en sel dans la viande égale à 4,4 % en masse.

Il faut aussi remarquer que dans les deux cas la solubilité des protéines est inférieure à celle des témoins non salés quand la force ionique est supérieure à 1,6 M, soit une teneur en sel dans la viande de 7,9 % ; ceci correspond à la précipitation des protéines sarcoplasmiques. Les barres représentant les erreurs standards sur la moyenne (SEM) mettent en évidence une très grande variabilité d'un muscle à l'autre pour un même type de muscle. Cette variabilité peut probablement s'expliquer par le fait que la proportion des différents types de fibres musculaires varie considérablement d'un animal à l'autre pour un même type de muscle (Realini *et al.*, 2013). Néanmoins, l'augmentation de la solubilité pour des teneurs en sel allant

de 0 à 4,4 %, puis la décroissance de cette solubilité au-delà de cette dernière valeur peuvent être toutes les deux représentées par des régressions linéaires ( $R^2$  compris entre 0.96 à 0.99).

Les mesures relatives à l'augmentation de la solubilité des protéines dans les échantillons M et I, après saumurage-malaxage, sont présentées sur la Figure 64. Elles montrent clairement que le traitement mécanique seul, sans présence de sel, a un effet qui est du même ordre de grandeur que celui observé sur la Figure 63. Quel que soit le traitement mécanique (durée et taux de déformation) l'augmentation de la solubilité des protéines est systématiquement légèrement plus grande en M qu'en I et cet écart est significatif pour les deux types de muscle dans le cas des traitements les plus longs à TC 30%. Ceci suggère indirectement que les déformations au sein du muscle sont probablement hétérogènes et plus importantes au centre qu'en périphérie du muscle.

L'augmentation de la solubilité des protéines dans les échantillons M et I est d'environ 25 % lors des traitements comportant 350 déformations, sans que l'on puisse mettre en évidence des différences significatives, ni entre RF et SM, ni entre TC 10% et TC 30%. Ceci indique qu'en pratique, il se produit un accroissement rapide de la solubilisation des protéines en début de malaxage et que cet accroissement est sensiblement le même pour des muscles de types métabolique différents, que ce soit dans des petites ou des grandes barattes.

Lorsque le nombre de déformations correspond à ce qui est habituellement pratiqué lors d'une fabrication de jambon cuit (2500 déformations), l'effet du traitement mécanique est significativement plus prononcé dans le cas du SM que dans celui du RF. De plus, un taux de déformation de 30 % entraîne une nette amélioration de la solubilisation des protéines par rapport à un taux de 10 %. Par exemple, dans le cas du SM, l'augmentation de solubilité passe de 39 % à TC 10% à 52% à TC 30%. Autrement dit, des résultats obtenus dans des barattes pilotes qui provoquent des taux de déformation réduits du fait de leur petit diamètre, ne rendent pas compte de ce qui se passe dans une baratte industrielle de grande dimension.

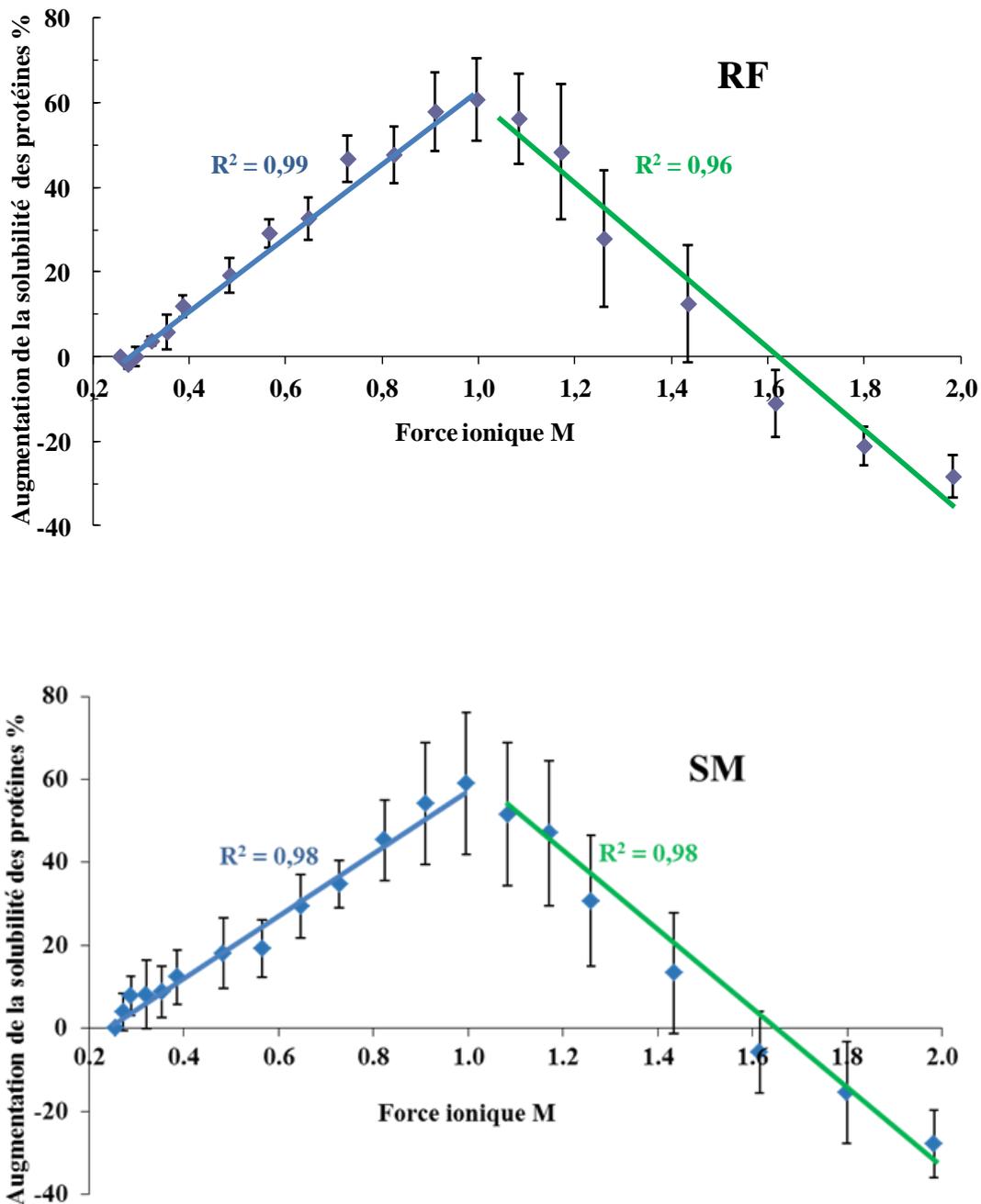


Figure 63 : Courbes de référence de l'augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire (moyenne sur 4 muscles et SEM) en fonction de la teneur en sel ajouté ; une teneur en sel nulle correspond à une force ionique égale à 0.24 M dans le tampon de de broyage et une teneur en sel égale à 4,4 % en masse correspond à une force ionique de 1 M.

Les énergies de déformation cumulées au cours d'un traitement ont été calculées en multipliant les valeurs moyennes de E, indiquées dans les tableaux 14 et 15, par le nombre de déformations. L'augmentation de la solubilité des protéines n'est pas proportionnelle à cette énergie de déformation cumulée. Le nombre restreint de conditions de traitement mécanique testées pendant cette étude ne nous a pas permis de dégager de relation simple entre cette augmentation et les caractéristiques du traitement mécanique. Il faudrait pour cela multiplier les durées et les taux de déformation car cette relation n'est pas linéaire.

La Figure 65 présente les mesures faites sur les échantillons S pour les deux types de muscle. L'effet additionnel du traitement mécanique subi par ces échantillons contenant du sel peut être évalué par comparaison aux courbes de référence précédentes (Figure 63) malgré la grande dispersion des valeurs expérimentales. L'effet d'un traitement mécanique court avec TC 10 % n'est pas discernable mais, pour toutes les autres conditions, quelle que soit la teneur en sel des échantillons en fin de saumurage-malaxage, la solubilité des protéines est nettement plus grande que celle des échantillons non malaxés. Toutefois d'autres répétitions seront nécessaires pour quantifier augmentation.

La zone jaune de la Figure 65 correspond à des échantillons dont la teneur en sel est comprise entre 1 et 2 % (1,8 à 2,2 % étant la valeur dans les jambons cuits commercialisés) ; l'effet additionnel du traitement mécanique est alors du même ordre de grandeur que celui du sel. En pratique, pendant le malaxage des pièces constitutives du jambon, la teneur en sel peut être localement beaucoup plus élevée ; c'est notamment le cas en début de malaxage aux abords des trous dans lesquels est injectée une saumure, ayant une teneur en sel d'environ 25 %, au moyen d'aiguilles.

### **3.4 Extraction des protéines solubilisées dans l'exsudat de malaxage**

La Figure 66 montre l'évolution de la teneur en protéines qui ont été extraites des muscles RF et SM au cours du saumurage-malaxage dans le cas où la saumure avait une teneur en sel initiale égale à 13 %. Elle augmente toujours rapidement au début, puis de moins en moins vite et de la même manière pour les 2 muscles. Ceci est en accord avec les nombreuses études qui montrent que la teneur en protéines dans le limon augmente avec la durée de malaxage (Siegel *et al.*, 1978 ; Theno *et al.*, 1978; Olkiewicz *et al.*, 1995).

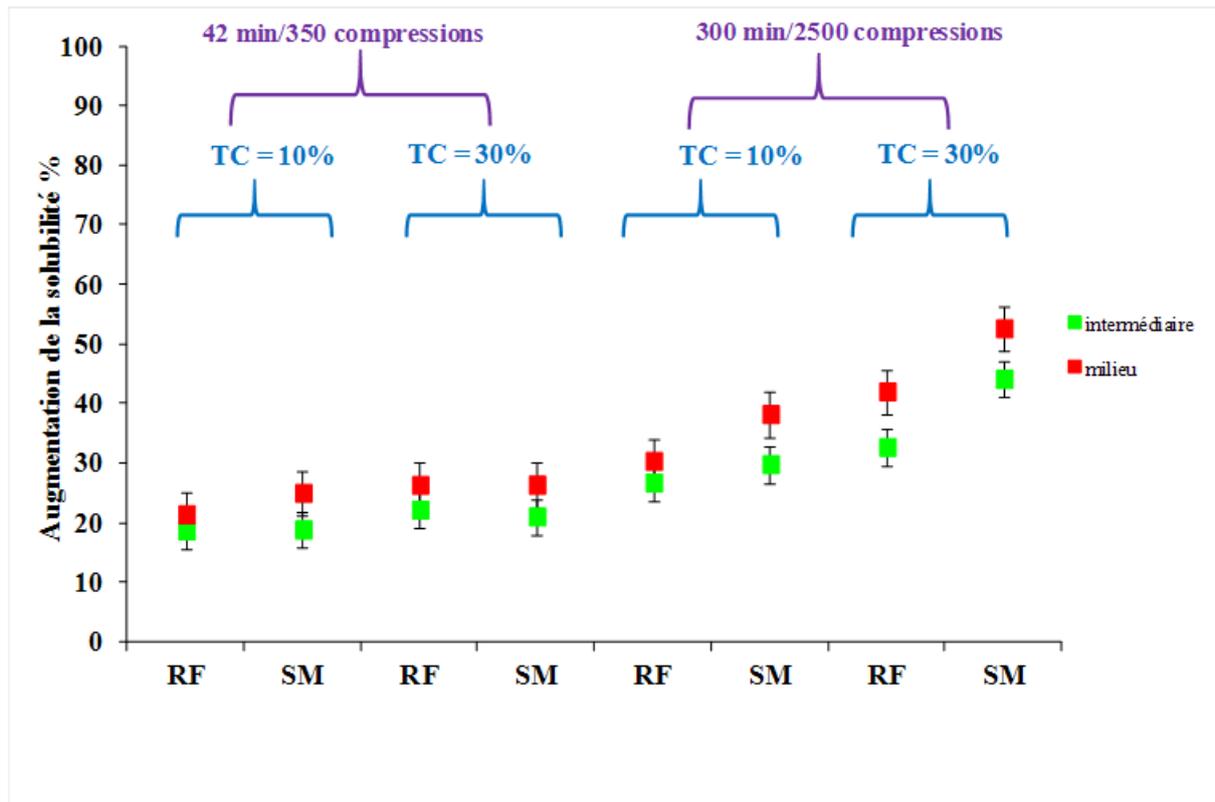


Figure 64 : Augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire des échantillons M et I, dont la teneur en NaCl était négligeable, en fonction du traitement mécanique par rapport aux échantillons témoins non malaxé. Les barres correspondent aux SEM calculées sur 6 essais (3 répétitions x 2 Csel)

En parallèle, nous n'avons pas observé de variation du volume de la saumure dans la cuve susceptible de nous obliger à corriger ces teneurs en protéines. Enfin, nous avons logiquement observé une diminution de la concentration en sel dans la saumure au cours du temps. Cette variation était réduite par rapport à des conditions industrielles de saumurage-malaxage par immersion puisque le ratio initial (masse de saumure)/(masse de viande) était dans nos essais 10 fois plus grand qu'en pratique. Lors des essais longs (i) quand Csel était initialement égal à 13 % les concentrations finales variaient de 10,5 à 11,2 % et (ii) quand Csel était initialement égal à 5 % les concentrations finales allaient de 3,9 à 4,3 %.

Une ANOVA 3 voies avec 2 variables indépendantes (Type de muscle et TC) et une variable répétée (le temps de malaxage) a mis en évidence un effet hautement significatif de TC, plus un effet très significatif de l'interaction TC\*t, mais pas du type de muscle ; cependant, les conditions rigoureuses d'application de l'ANOVA n'étaient pas respectées à cause d'une variance relative à la variable TC significativement hétérogène. Une analyse non paramétrique de Friedman a donc été réalisée ; les conclusions vont dans le même sens, à savoir un effet significatif au seuil de 5% entre les groupes TC 10% et TC30%, que ce soit pour le RF ou le SM.

Le fait remarquable est donc que le niveau d'extraction atteint en fin d'un malaxage long est près de 50% supérieur à TC 30 % (10,5 et 9,5 mg/mL pour le SM et le RF) qu'à TC 10% (6,5 et 7 mg/mL pour le SM et le RF). En revanche, l'incidence de Csel s'est révélée négligeable. Lors de malaxages longs avec TC 30%, si la teneur en sel de la saumure était 13, 5 ou 0,9 %, les quantités de protéines extraites étaient respectivement, en moyenne dans les deux types de muscle, 10, 8,9 et 9,3 mg/mL. Ces résultats sont en accord avec Bombrun *et al.*, 2014 qui n'a pas vu d'effet de la teneur en sel dans la saumure (de 0 à 22%) sur les quantités de protéines totales extraites. Par contre ces auteurs ont remarqué un effet du sel sur la composition en protéines avec une diminution significative du rapport actine/myosine avec l'élévation de la teneur en sel. Il apparaît donc que c'est l'action mécanique qui est déterminante pour l'extraction des protéines dans le limon. Or, Bombrun *et al.* (2014) ont bien montré par des mesures d'adhésion que c'est cette teneur en protéines qui est déterminante pour la tenue de tranche du jambon cuit, confirmant des résultats antérieurs (Orsingher *et al.*, 1974; Olkiewicz *et al.*, 1995).

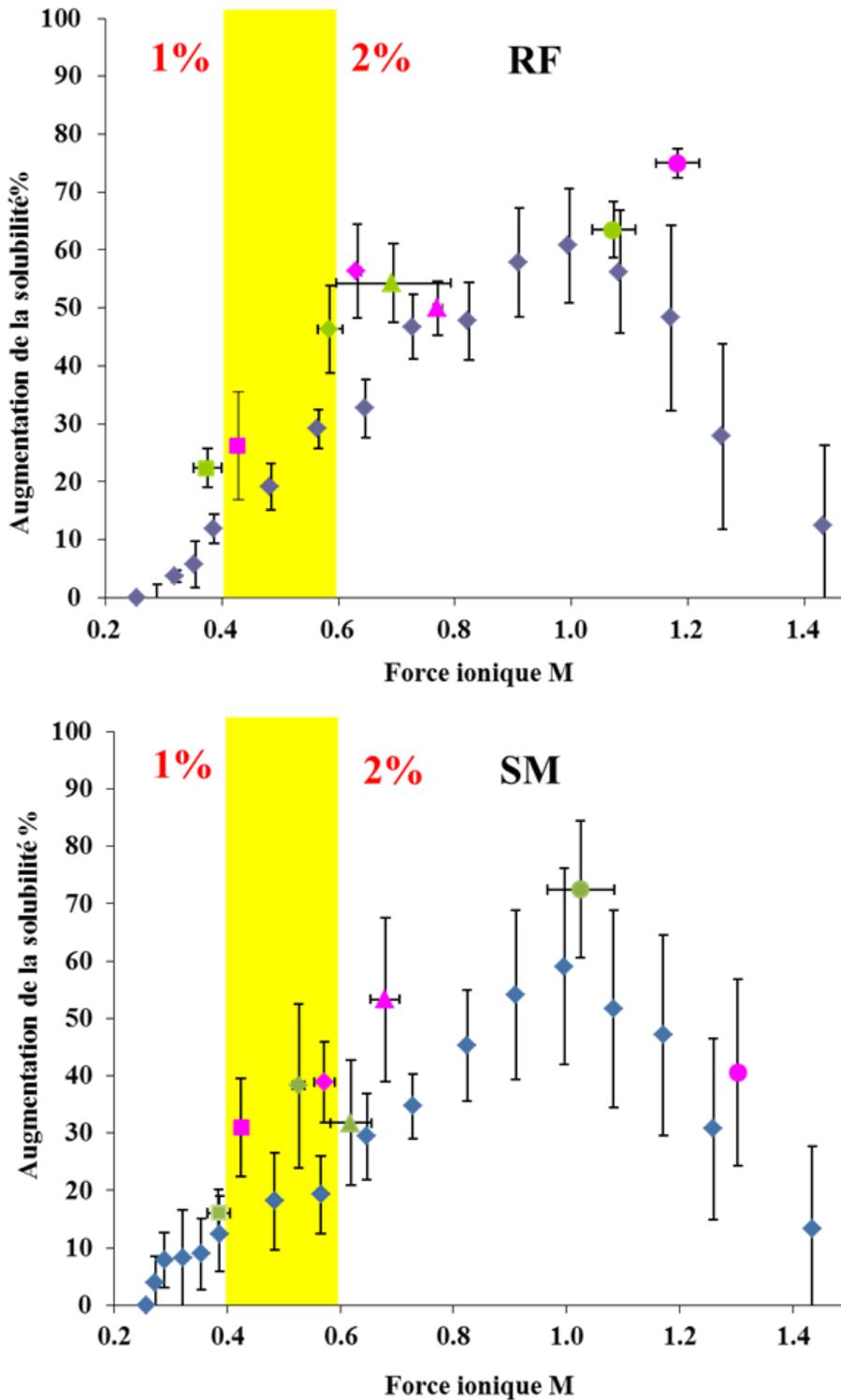


Figure 65 : Comparaison de l'augmentation de la solubilité des protéines du tissu musculaire des échantillons S par rapport aux échantillons témoins non saumuré-malaxé, avec l'augmentation de la solubilité due uniquement à l'augmentation de la teneur en sel (courbes de références) (Rouge pour TC 30 % et vert pour TC 10%). Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 ou 4 répétitions.

L'incidence négligeable de Csel est en accord avec les conclusions de Ripoche (2000) et de Bombrun (2014). Ces deux auteurs ont saumuré-malaxé des cubes de muscles SM de porc dans une baratte pilote (Inject Star MC100, Austria) de 47 cm de diamètre avec un ratio (masse de saumure/masse de viande) de 1/10, dans les conditions suivantes : (i) échantillons de 80g, Csel égal à 15 ou 25 % et 2800 tours (Ripoche, 2000) et (ii) échantillons de 28 g, Csel entre 0 et 22% et 2250 tours (Bombrun, 2014). Si l'on regroupe dans chacune de ces études toutes les mesures relatives aux différents Csel, les teneurs en protéines en fin de saumurage-malaxage étaient respectivement à 4,5 et 7,2 % en masse. Ces deux valeurs peuvent être comparées à nos mesures à TC 10% puisque le taux de déformation correspondait à une chute moyenne de 25 cm (Daudin *et al.*, soumis-chapitre 4), soit la moitié du diamètre de la baratte pilote. En tenant compte du facteur de dilution (x 10), la concentration moyenne mesurée après 2500 déformations dans nos essais est du même ordre de grandeur, soit 6,7 %. En comparaison, cette teneur en protéines était égale à 9,9 % dans nos essais à TC 30% et de 10 % (Siegel *et al.*, 1978) et 15% (Bombun *et al.*, 2015) dans des limons industriels prélevés dans des grandes barattes.

### **3.5 Modification de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires au sein du muscle**

La dénaturation des protéines myofibrillaires modifie le nombre de sites hydrophobes accessibles en surface de ces protéines et donc leur hydrophobie de surface. Ce nombre est proportionnel à la quantité de BBP adsorbé ( $\mu\text{g} / \text{mg}$  protéines). Quand il augmente, d'une part, la capacité des protéines myofibrillaires à se lier avec l'eau diminue, et probablement que le rendement de cuisson sera moins bon, et d'autre part, leur capacité à former des liaisons hydrophobes entre elles lors de la formation d'un gel pendant le chauffage augmente.

Les valeurs d'hydrophobie relatives aux échantillons témoins étaient égales à  $9 \pm 3$  et  $11 \pm 4$   $\mu\text{g}$  BBP/mg protéines, respectivement pour le RF et le SM. Ces valeurs sont proches de celles mesurées par Chelh *et al.* (2006) sur des échantillons d'un muscle *Longissimus dorsi* (LD) de porc :  $12 \pm 1$   $\mu\text{g}$  BBP/mg protéines. Afin de tenir compte de la variabilité entre muscles d'un même type les Figures 67 et 68 présentent l'augmentation de l'hydrophobie mesurée après saumurage-malaxage par rapport au témoin du même muscle.

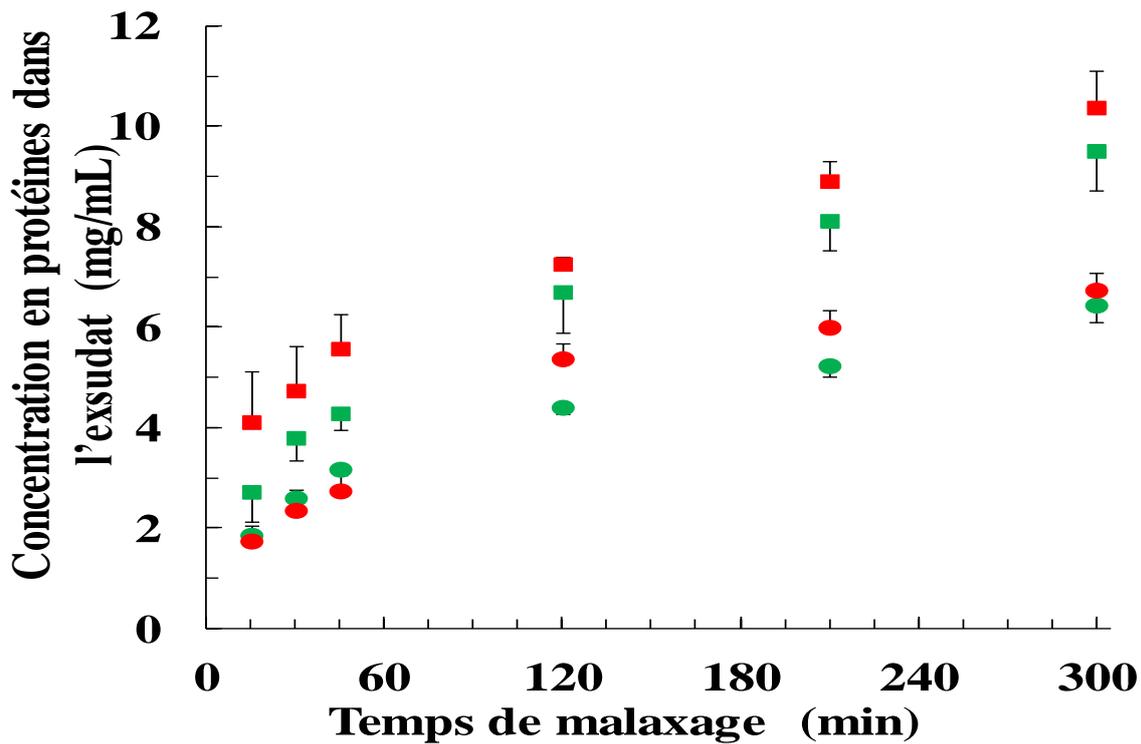


Figure 66 : Evolution de la concentration en protéines dans l'exsudat de malaxage en fonction du temps de saumurage-malaxage (Vert RF et Rouge SM, carré TC 30% et disque TC 10%). Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 répétitions.

La Figure 67 concerne les échantillons prélevés en M et I dont la teneur en sel était négligeable. Un traitement mécanique court, à TC 10 ou 30 %, entraîne une augmentation moyenne de 14 % par rapport aux échantillons témoins, sans qu'il soit possible de faire de différence par rapport au type de muscle ou au taux de déformation. Pour les malaxages longs, l'augmentation d'hydrophobie est du même ordre de grandeur que lors des traitements courts avec le muscle RF et TC 10 %, mais nettement plus accentuée dans les autres cas : en moyenne 29 % pour l'échantillon I et 42 % pour les échantillons M. Comme pour la solubilité des protéines, et malgré la grande variabilité des mesures, ces résultats suggèrent que la conséquence de l'action mécanique est plus marquée au centre qu'en périphérie du muscle.

La Figure 68 concerne les échantillons prélevés en S. Elle présente l'augmentation d'hydrophobie en fonction de la force ionique du tampon d'extraction des protéines myofibrillaires, c'est-à-dire indirectement en fonction de la teneur en sel des échantillons. L'augmentation parallèle de la solubilité et de l'hydrophobie, deux propriétés qui rendent compte de la relation des protéines myofibrillaires avec l'eau, est inhabituelle. Il semble que

l'augmentation de la charge électrique due à la présence des ions du NaCl, qui est déterminante pour la solubilité, s'accompagne d'une dénaturation qui provoque l'extériorisation des sites hydrophobes. La Figure 68 montre, pour les deux types de muscle, que l'impact du saumurage est nettement plus important que celui de l'action mécanique. Pour une force ionique de 0.6 M, l'augmentation atteint 80 % pour le RF et 100 % pour le SM ; ce qui est du même ordre de grandeur qu'un chauffage d'une suspension de myofibrilles à 50°C pendant 15 minutes (Chelh *et al.*, 2006). Pour une force ionique de 1.2 M, l'augmentation atteint 180 % pour les deux types de muscle, ce qui équivaut à un chauffage à 70 °C pendant 60 minutes (Chelh *et al.*, 2006 ). Sharedeh *et al.* (soumis-chapitre 3) ont mis en évidence l'absence d'impact significatif de la teneur en sel lors d'un saumurage sans malaxage de tissu musculaire (*Semitendinosus* de bœuf). Pour des teneurs en sel des échantillons semblables à ceux de l'étude précédente, soit 0,9 et 2 % en masse, l'augmentation d'hydrophobie est ici respectivement égale à environ 40 et 80 % ; ceci suggère une interaction forte entre l'action mécanique et l'augmentation de la teneur en sel. Toutefois, l'impossibilité de contrôler le niveau de teneur en sel des échantillons saumurés-malaxés ne nous a pas permis de faire une analyse de variance.

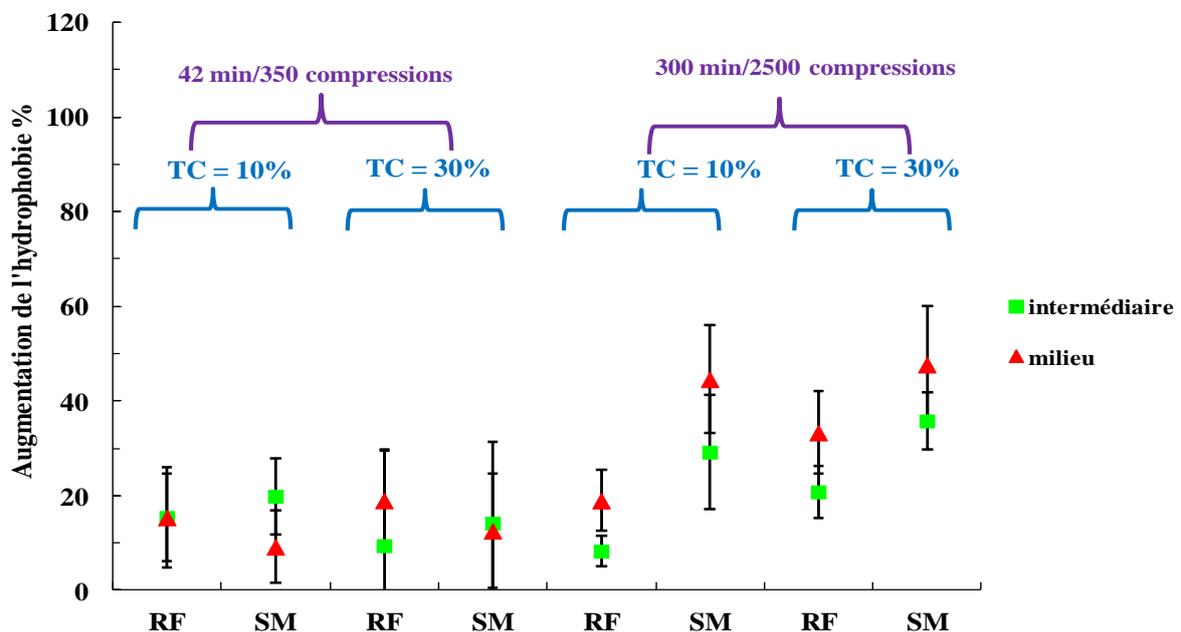


Figure 67 : Augmentation de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires des échantillons M et I, dont la teneur en NaCl était négligeable, en fonction du traitement mécanique par rapport aux échantillons témoins non malaxé. Les barres correspondent aux SEM calculées sur 6 essais (3 répétitions x 2 Csel).

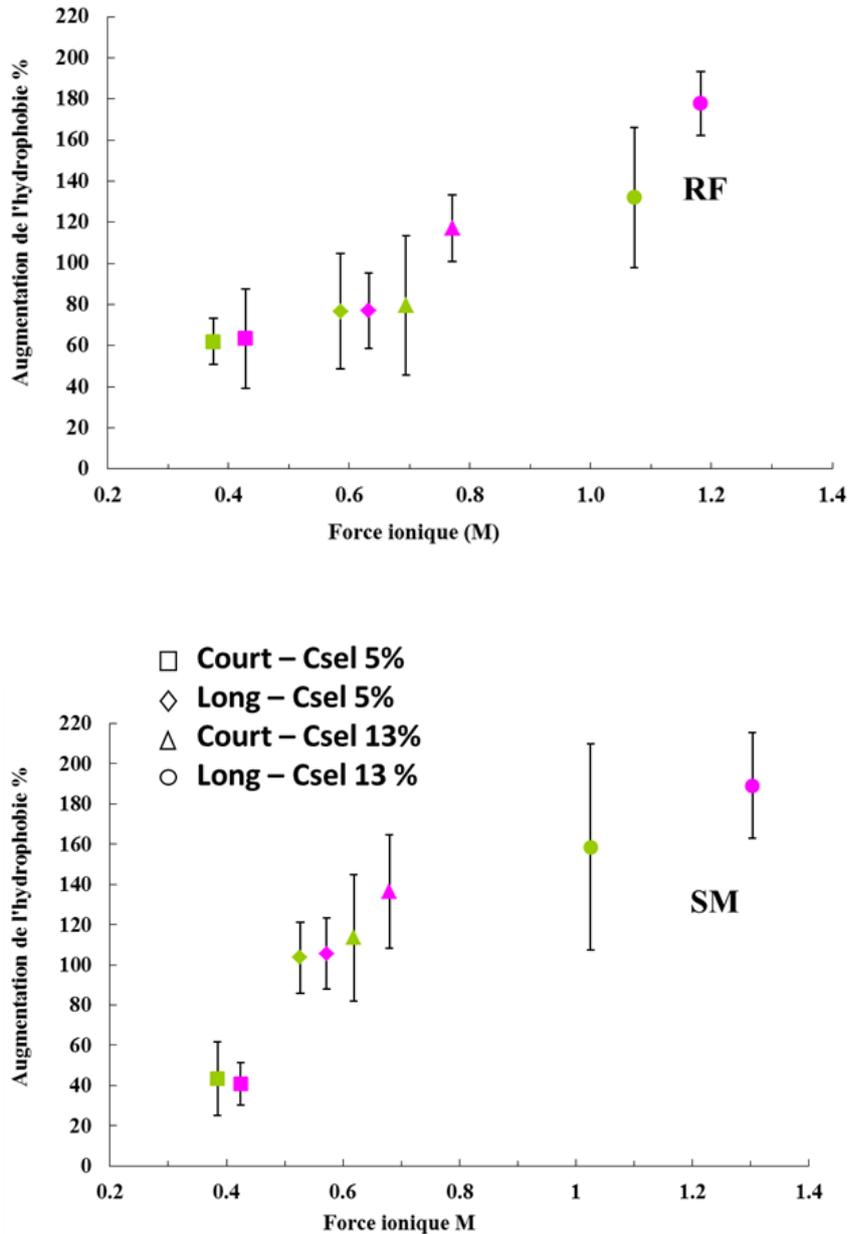


Figure 68 : Augmentation l'hydrophobie des protéines myofibrillaires des protéines du tissu musculaire des échantillons S par rapport aux échantillons témoins non saumuré-malaxé en fonction de la force ionique du tampon (Rouge pour TC 30 % et vert pour TC 10%). Une teneur en sel nulle correspond à une force ionique égale à 0.24 M dans le tampon et une teneur en sel égale à 4,4 % en masse correspond à une force ionique de 1 M Les barres correspondent aux SEM calculées sur 3 répétitions.

## **4 Conclusion**

Nos essais, réalisés sur un simulateur de malaxage, ont permis de contrôler le saumurage-malaxage de deux types de muscle de porc, très différents par leurs caractéristiques métaboliques, entrant dans la fabrication du jambon cuit. Deux niveaux de déformation des muscles, qui correspondent approximativement aux traitements mécaniques dans de petites barattes pilotes et dans des grandes barattes industrielles, ont été combinés avec deux durées de traitement, ou nombres de déformations.

Les résultats permettent d'évaluer, pour la première fois, l'incidence propre de l'action mécanique sur les caractéristiques biochimiques du tissu musculaire lors d'un malaxage. Ils mettent en particulier en évidence son rôle déterminant sur l'extraction des protéines vers le limon, ou exsudat de malaxage, que d'autres auteurs ont montré être un critère essentiel de la tenue de tranche des jambons cuits. Ils montrent aussi son impact, propre, ou en interaction avec la teneur en sel, sur l'augmentation importante de la solubilité des protéines et celle de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires, deux propriétés déterminantes pour la gélification des protéines et la texture du jambon cuit.

Ces premiers résultats ont été obtenus dans une situation très simplifiée par rapport à la pratique industrielle. Le saumurage par immersion de muscles entiers a eu l'avantage de produire des échantillons issus d'un même muscle, ayant subi le même traitement mécanique, certains étant salés et d'autres pas. Ceci était indispensable pour séparer au mieux l'effet de l'action mécanique de celui du salage ; cette séparation est cependant imparfaite puisque nos résultats suggèrent aussi une hétérogénéité du traitement mécanique qui serait plus marqué au centre du muscle qu'en périphérie. En revanche, cette procédure n'a pas permis d'avoir des échantillons suffisamment gros et homogènes en teneur en sel, ni pour obtenir des résultats définitifs sur le rendement de cuisson, ni pour mesurer en parallèle la texture du produit cuit par des mesures instrumentales ou des dégustations. De nouveaux essais sont nécessaires pour cela ; les muscles seront alors saumurés par injection à des niveaux contrôlés.



## **Chapitre 7. Analyse quantitative des modifications structurales du tissu musculaire dues à l'action mécanique lors du saumurage-malaxage.**

*Ce chapitre est rédigé en Français, sous la forme d'un projet d'article qui sera soumis à la revue 'Meat Science' après traduction.*

*Les résultats ont été obtenus à partir des mêmes essais que ceux du chapitre 6 qui concerne les modifications de l'état des protéines. Certains paragraphes de l'introduction, de la partie 'Matériels et Méthodes', relative à la description des essais, et de la partie 'Résultat', relative aux mesure physicochimiques et mécaniques, sont donc identiques.*

## Analyse quantitative des modifications structurales du tissu musculaire dues à l'action mécanique lors du saumurage-malaxage

Diaa SHAREDEH, Raphael FAVIER, Annie VENIEN,  
Thierry ASTRUC, Jean-Dominique DAUDIN

UR370 Qualité des Produits Animaux, INRA, F-63122 Saint Genès Champanelle

### Résumé

Lors du saumurage-malaxage des viandes l'homogénéisation du sel, l'extraction des protéines solubles et la texture du produit fini sont en partie déterminées par des modifications structurales du tissu musculaire. L'incidence du malaxage sur ces modifications a été mesurée par analyse d'images automatisée de nombreuses coupes histologiques colorées au Rouge-Sirius, sur des muscles *Semimembranosus* (SM) et *Rectus femoris* (RF) de porc. Les muscles ont été malaxés en présence de saumure (5 ou 13 %) dans un simulateur de malaxage qui, contrairement aux barattes, permet de contrôler et caractériser le traitement mécanique. Les zones dans lesquelles les fibres ne pouvaient pas être individualisées du fait d'une dégradation de l'*endomysium* ont été délimitées. Le pourcentage de surface occupé par ces zones par rapport à la surface des images a été retenu comme indice de dégradation (Psd). Pour la première fois, l'ampleur des modifications structurales a été mise en relation avec l'intensité et la durée de l'action mécanique appliquée au tissu musculaire. Dans le cas du SM, le Psd atteignait 40% au centre du SM après un essai équivalant à un traitement long dans une grande baratte industrielle. L'énergie mécanique totale dissipée (Et) dans le SM était comprise entre 35 à 1500 J selon le traitement ; Psd varie linéairement avec Log(Et) et plus fortement au centre qu'en périphérie. Dans le cas du RF, les mêmes tendances ont été observées, mais l'algorithme surestimait les mesures de Psd.

Mots clés : tissu musculaire, *endomysium*, structure, barattage, histologie, énergie-de-déformation

## 1 Introduction

Le malaxage, encore appelé barattage, fait subir aux morceaux de viande un traitement mécanique pendant le saumurage. Cette opération est effectuée avant la cuisson des viandes transformées, telles que le jambon cuit, dans des barattes qui tournent entre 4 et 16 tours par minute pendant plusieurs heures. Les conditions pratiques du malaxage-saumurage sont diverses. Par exemple, des phases de rotation peuvent alterner avec phases de repos et l'appareil peut-être mis sous vide. La saumure peut être mise simplement en contact par immersion avec les pièces de viande, quand leurs dimensions sont petites, ou injectée préalablement au moyen d'une injecteuse multi-aiguilles dans le cas de pièces volumineuses. Dans tous les cas, les pales qui sont disposées sur la paroi intérieure d'une baratte font remonter les morceaux déposés au fond de la cuve jusqu'en haut. Les morceaux chutent par gravité sur ceux qui sont encore présents au fond de la cuve ; ceci provoque des déformations brèves selon une fréquence proportionnelle à la rotation de la baratte. Dans le cas de deux muscles du jambon (*Semitendinosus* et *Rectus femoris*). Daudin *et al.*, (soumis-chapitre 4) ont estimé, à partir de films au ralenti, que le taux de déformation varie de 4 à 40 % selon la hauteur de chute et la position du muscle en fin de chute.

La rotation des barattes industrielles provoque donc des centaines, voire des milliers, de déformations successives pendant une fabrication. Il en résulte un traitement mécanique, plus ou moins intense selon les propriétés rhéologiques des muscles, le diamètre de la baratte et son taux de charge. Les études menées avec diverses barattes pilotes ou industrielles ont estimé les conséquences de l'action combinée du traitement mécanique et du saumurage. Cette action est connue pour accélérer l'homogénéisation de la saumure dans les morceaux (Young & Smith, 2007 ; Siro *et al.*, 2009 ; Sharedeh *et al.*, soumis-chapitre 5). Le malaxage-saumurage provoque des changements biochimiques qui améliorent la capacité de rétention d'eau (Dzudie *et al.*, 1999 ; Dolata *et al.*, 2004) et favorisent la solubilisation des protéines myofibrillaires par le sel puis leur extraction à la surface des morceaux (Siegel *et al.*, 1978 ; Kerry *et al.*, 1999). Ces changements améliorent le rendement de cuisson (Gillett *et al.*, 1981 ; Krause *et al.*, 1978 ; Dzudie *et al.*, 1999 ; Szerman *et al.*, 2007), la tenue de tranche dans le cas du jambon cuit (Bombrun *et al.*, 2014) et les qualités sensorielles du produit cuit, notamment la texture (Dzudie *et al.*, 1999 ; Szerman *et al.*, 2007).

Les effets de la teneur en NaCl sur la structure du tissu musculaire ont été étudiés par de nombreux auteurs. La revue de Puolanne et Halonen (2010) a synthétisé ces effets ; pour une plage habituelle de teneur en sel des produits carnés, allant au maximum jusqu'à quelques pourcents, ces effets se résument à une augmentation de la capacité de rétention d'eau du tissu musculaire concomitante à un gonflement des fibres musculaires, lui-même résultant de l'éloignement des myofibrilles causé par les modifications des charges électriques sur les protéines myofibrillaires en présence des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Offer & Knight, 1988). Quand la teneur en NaCl dépasse une certaine valeur ces effets s'inversent et le tissu musculaire se déshydrate et rétrécit. Pinotti *et al.* (2002) et Graiver *et al.* (2006) ont estimé à 10% la teneur en sel à laquelle la capacité de rétention d'eau est maximum, puis diminue, et mis en parallèle le gonflement et le rétrécissement des fibres musculaires par des observations en microscopie électronique.

Plusieurs auteurs ont examiné des coupes histologiques d'échantillons prélevés sur des pièces de viande après un saumurage dans des barattes pilotes ou industrielles. Il est cependant assez difficile de faire la part entre l'effet du NaCl et celui de l'action mécanique. En effet, le barattage intervient indirectement car il accélère l'homogénéisation de la saumure dans les morceaux (Young & Smith, 2007 ; Siro *et al.*, 2009 ; Sharedeh *et al.*, soumis-chapitre 5). Les observations les plus anciennes (Theno *et al.*, 1978 ; Velinov *et al.*, 1990 ; Katsaras et Budras, 1993) ont conclu dans tous les cas que le traitement mécanique entraîne une augmentation de l'espace entre les fibres musculaires, par rapport aux échantillons saumurés sans traitement mécanique, et décrivent une déstructuration au niveau de l'endomysium et du sarcolemme. Plus récemment, Siro *et al.* (2009) ont évalué dans le cas du *Longissimus dorsi* de porc, à partir de quelques images en microscopie électronique, la taille de cet espace inter-fibres qui augmente d'environ 13  $\mu\text{m}$  lors d'un saumurage par immersion à 20, voire 30  $\mu\text{m}$ , après un traitement mécanique par ultrasons ou barattage.

Tous les travaux concernant le barattage ont été réalisés dans des barattes industrielles ou pilotes de diverses conceptions (forme et nombre des pales) et de taille variables (diamètre et longueur) avec un grand nombre de conditions de fonctionnement (vitesse de rotation, temps de traitement, et présence éventuelle de périodes de repos). Le traitement mécanique des pièces de viande ne peut pas être caractérisé dans ces appareils. De plus les conclusions de la littérature, relatives à la structure du tissu musculaire après barattage, repose sur l'observation de quelques images représentatives.

Le but de ce travail est de quantifier, à partir de l'analyse automatisée d'un grand nombre d'images histologiques, les effets respectifs de la présence du NaCl et des sollicitations mécaniques sur les modifications structurales du tissu musculaire. Aussi, un indice de dégradation simple a été recherché dans un premier temps. La procédure qui a été retenue s'appuie sur une technique histologique courante : la coloration de l'*endomysium* par le colorant 'Rouge Sirius' (Flint & Pickering, 1984). De plus, un simulateur de malaxage qui a été présenté en détails par Daudin *et al.*, (soumis-chapitre 4) a été utilisé pour imposer à des muscles des successions de déformations, représentatives de celles imposées aux pièces de viandes dans des barattes de différents diamètres, et parallèlement, caractériser ce traitement mécanique par des mesures force-déformation pendant les déformations.

## **2 Matériels et méthodes**

### **2.1 Les échantillons**

Un lot de 32 muscles, triés en fonction du pH ultime, a été acheté à un fabricant de jambon cuit. Il était constitué pour moitié de muscles *Rectus femoris* (RF) et pour moitié de muscles *Semimembranosus* (SM) de porc. Ces deux types de muscle ont été choisis car ils diffèrent par leur type métabolique dû à leur composition en fibres musculaires : le muscle RF a un potentiel glycolytique de 84 ( $\mu\text{mole equivalent-lactate/g}$  de viande) et contient environ 32 % de fibres IIX/IIB, alors que le muscle SM a un potentiel glycolytique de 115 ( $\mu\text{mole equivalent-lactate/g}$  de viande) et contient environ 92 % de fibres IIX/IIB (Carlier *et al.*, 2012). En accord avec ces auteurs, les pH ultimes des 16 muscles SM étaient  $5,7 \pm 0,15$  et celui des 16 muscles RF était  $6,1 \pm 0,24$ . Ils ont été emballés sous vide 4 jours après l'abattage et conservés à  $-18^{\circ}\text{C}$ . Avant un essai, un muscle était décongelé en une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2 Le simulateur de malaxage du laboratoire**

Les essais de saumurage-malaxage ont été faits avec un simulateur de malaxage qui a été présenté en détails par Daudin *et al.*, (soumis-chapitre 4). Sa conception est différente des barattes pilotes. De ce fait, il permet de reproduire des successions de déformations représentatives de celles imposées aux pièces de viandes dans des barattes de différents diamètres, et parallèlement, de caractériser le traitement mécanique par des mesures force-déformation mesurées à une fréquence d'environ 160 hertz pendant les déformations.

Le principe consiste à appliquer des centaines de compressions successives au moyen d'un piston, équipé de capteurs de force, à un muscle placé dans un filet et mis en rotation, à raison de quelques tours par minute, dans un bac contenant de la saumure ; la compression s'accompagne d'une extension libre dans la direction orthogonale à celle de la compression. Cette rotation permet d'enduire régulièrement la surface du muscle avec la saumure et de lui appliquer des déformations selon des positions angulaires variant d'un coup à l'autre. Les compressions sont brèves, de l'ordre de 0.25 s, appliquées perpendiculairement à l'axe principal du muscle et séparées par des périodes de 5 à 20 secondes, simulant ainsi des chutes dans le cas de barattes tournant de 12 à 3 tours par minute.

Le taux de déformation (variation de l'épaisseur du muscle/ épaisseur initiale) des deux types de muscle considérés dans cette étude qui varie linéairement avec la hauteur de chute dans les barattes peut être sélectionné entre 5% et 35%.

L'action mécanique subie par les morceaux de viande est caractérisée au moyen de deux critères qui sont calculés à partir des courbes force-déplacement, tel que cela a été fait lors de l'étude de la tendreté du tissu musculaire (Lepetit & Culioli, 1994) : la force maximale (Fmax) nécessaire pour obtenir le taux de déformation cible et l'énergie de déformation (E) qui correspond à la différence entre le travail utilisé pour déformer le muscle et celui qui est restitué quand ce dernier revient à sa forme initiale.

### **2.3 Les essais de saumurage-malaxage**

La saumure contenait uniquement du NaCl. Afin de promouvoir une variété de couples « traitement mécanique-teneur en sel finale » dans les échantillons prélevés à la fin d'un traitement 2 concentrations (Csel) ont été retenues : 5 et 13 % en masse.

Le rapport entre la masse de saumure et la masse de viande était égal à 1/1 (kg saumure/kg viande). Par conséquent, du fait de la différence de poids entre les deux muscles, la hauteur de la saumure dans la cuve du simulateur de malaxage était d'environ 6 mm dans le cas du muscle RF et 15 mm dans le cas du SM.

La fréquence des compressions était toujours égale à 8,3 compressions par minute. Quatre traitements mécaniques ont été appliqués à chaque type de muscle, pour chaque concentration en sel dans la saumure :

- (i) deux taux de compression TC : 10 ou 30 % de l'épaisseur moyenne du muscle, ce qui correspond approximativement à des chutes inférieures à 25 cm et supérieures à 1 m,

(ii) deux couples « nombre de compressions et durée du traitement » (L pour 5 h et 2500 compressions) ou (C pour 42 min et 350 compressions).

Chacune des 16 combinaisons (type de muscle × Csel × TC × durée) a été répétée 3 fois afin d'évaluer la répétabilité des mesures relatives aux sollicitations mécaniques : TC, Fmax et E.

## **2.4 Prélèvement des échantillons à la fin d'un saumurage-malaxage**

Le prélèvement des échantillons au sein du muscle a été organisé afin que les échantillons utilisés pour les mesures des teneurs en eau et en sel et ceux utilisés pour les coupes histologiques soient contigus (Figure 69, tirée de la Figure 34 du chapitre 2).

Deux sections de 2 cm d'épaisseur, orthogonales à l'axe principal du muscle, ont été découpées. Des languettes de largeur d'environ 1 cm, passant par le 'centre' de chacune de ces sections ont ensuite été découpées, puis des parallépipèdes de dimensions 2 x 1 x 0,5 cm ont été prélevés à 3 positions : près de la surface du muscle (S), au milieu (M) du muscle et à une position intermédiaire (I) entre les deux premières. Dans le cas où le muscle avait une épaisseur de 6 cm, les distances des centres des prélèvements M, I et S étaient respectivement et approximativement situés à 30, 15 et 5 mm par rapport à la surface du muscle.

Deux prélèvements témoins de même taille que les précédents ont été faits sur chaque muscle.

## **2.5 Coupes histologiques et images en microscopie optique**

Les prélèvements ont été cryofixés dans de l'isopentane refroidi (-160 °C) par l'azote liquide (-196 °C) puis stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Pour réaliser une coupe histologique l'échantillon congelé était fixé sur une platine par du milieu d'enrobage. La coupe, de 10 µm d'épaisseur, orthogonale par rapport au sens des fibres, était réalisée à l'aide d'un microtome (Microm HM 560, Figure 38 - Chapitre 2) et déposée par adsorption sur une lame de verre. Elle était ensuite déshydratée, pendant 15 minutes à l'air libre et à température ambiante, puis colorée avec du Rouge Sirius (RS) afin de révéler le collagène du *périnysium* et de l'*endomysium* en rouge (Flint & Pickering, 1984). Le protocole appliqué pour cette coloration est détaillé sur la figure 40 du chapitre 2.

Les images des coupes ont été faites avec un microscope optique à transmission Olympus BX61, équipé d'une caméra numérique couleur Olympus DP71, et du logiciel Cell F. Toutes

les images ont été faites avec l'objectif x 10. Douze images relatives à des champs différents ont été faites dans une coupe de chaque échantillon.

Deux des 3 répétitions des essais de saumurage-malaxage ont servi à l'évaluation des modifications histologiques. Au total environ 1500 images ont donc été produites.

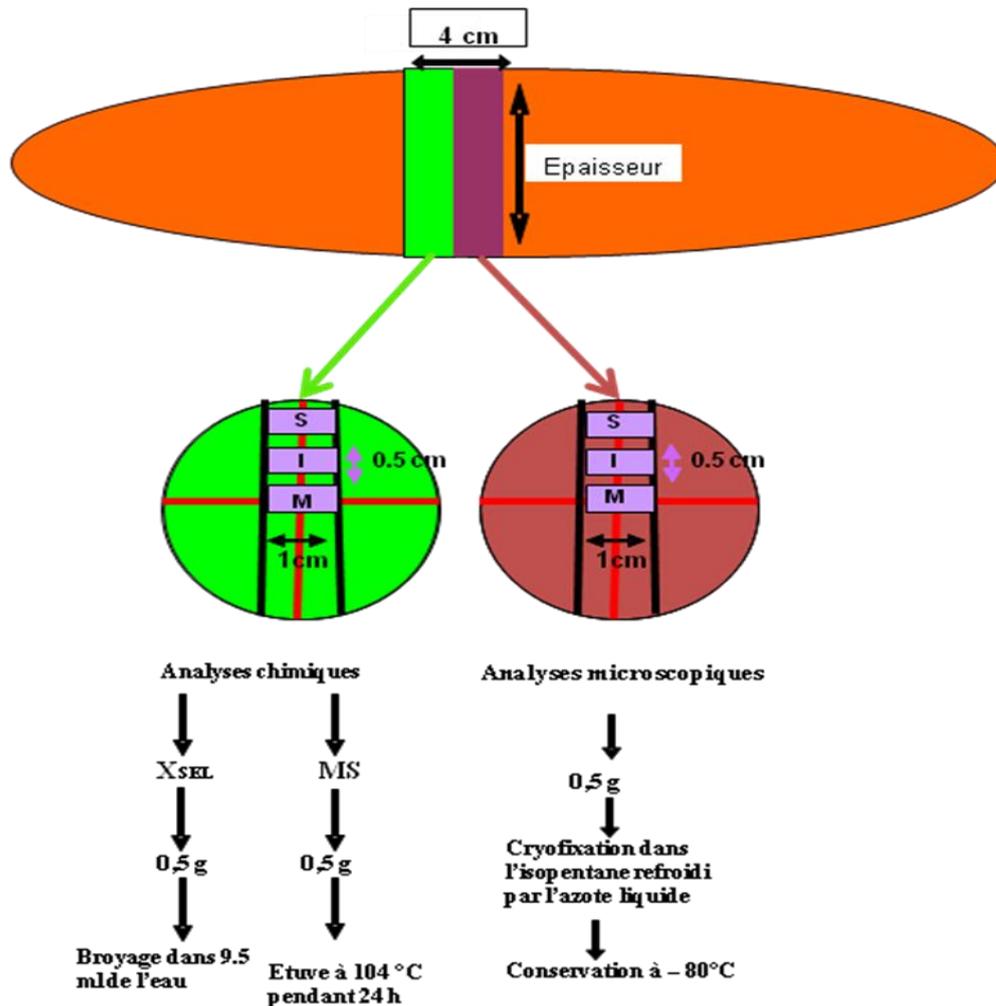


Figure 69 : Répartition des échantillons prélevés sur un muscle à la fin de chaque essai de saumurage-malaxage.

## 2.6 Analyse des images histologiques

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel libre Image J (version 1.43 U). L'analyse consistait à évaluer la dégradation de l'*endomysium* qui se traduisait par une impossibilité de séparer visuellement les fibres entre-elles. Compte tenu du grand nombre d'images un traitement totalement automatisé, sans aucune retouche, s'est imposé. Les traitements successifs suivants ont été appliqués à chaque image couleur :

1. Une correction de luminosité était faite en utilisant une image blanche prise au cours de la même séance de prise de vues,
2. Les 3 composantes monochromatiques (rouge, vert, bleu) étaient séparées et seule l'image relative à la composante verte était conservée sous la forme d'une image ayant 256 niveaux de gris ; les essais préliminaires ont montré que cela permettait d'avoir le meilleur contraste,
3. Un seuillage adaptatif basé sur la moyenne du niveau de gris de l'ensemble des pixels de l'image permettait d'obtenir une image binaire en noir et blanc,
4. Trois opérations d'érosion-dilatation successives étaient appliquées afin d'éliminer les plus petites structures noires isolées.

La surface de chacun des objets noirs individualisés était alors mesurée. Ces objets sont appelés « éléments séparés » dans ce rapport ; ils correspondent soit à des fibres, soit à des groupes de fibres n'ayant pu être séparées. Le résultat final du traitement est un tableau des « éléments séparés » numérotés et de leurs surfaces.

Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes comparatifs, calculés sur Matlab à partir des tableaux précédents. Les classes sont définies par la surface des « éléments séparés » s'étalant sur  $1000 \mu\text{m}^2$ , sachant que la surface de la section transversale d'une fibre musculaire de porc varie de  $1500$  à  $6000 \mu\text{m}^2$  en fonction du type de muscle et du type métabolique des fibres (Realini *et al.*, 2013). L'analyse a été appliquée sur 12 images pour chaque échantillon, soit 700 à 1000 fibres pour les échantillons témoins. Afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, en tenant compte de cette variation du nombre de fibres, l'ordonnée de ces diagrammes est, soit le pourcentage du nombre d'éléments de la classe par rapport au nombre total d'éléments, soit le pourcentage de la surface dégradée par rapport à la surface totale des 12 images.

## **2.7 Analyses**

*Teneur en NaCl* : la teneur de chlorure de sodium a été mesurée sur des prélèvements d'environ 0,5 g. Cette prise d'essai était approximativement diluée au 1/20 dans d'eau distillée, puis broyée et centrifugée 10 minutes à 13 000 tr/min. La teneur en NaCl était déduite de la mesure de teneur en ions chlorure (mg/ml) dans le surnageant au moyen d'un chloruromètre (Sherwood MH II Chloride analyser 926) sachant que les ions chlorure et sodium diffusent à la même vitesse dans le tissu musculaire (Lebert & Daudin, 2014).

*Mesure de pH* : environ 0,6 g d'échantillon était mis dans un tube et broyé à l'aide d'un micro broyeur (Polytron PT 2100) en présence de 3 ml d'eau. Le pH était mesuré à l'aide d'un pH mètre (Mettler toledo MA 235) muni d'une électrode (Titro alpha plus Schott) compensée en température et préalablement étalonnée.

*Teneur en matière sèche* : la teneur en matière sèche a été obtenue par différence de pesée avant et après passage dans une étuve à 104°C pendant 24 heures.

## **2.8 Statistiques**

Les résultats relatifs à un échantillon sont reportés en indiquant la moyenne et les 2 valeurs (min-max) mesurées. Quand des regroupements entre échantillons ont été opérés la moyenne est assortie de l'écart-type. Malgré ces regroupements les ANOVA n'ont pas pu être exploitées du fait du petit nombre de répétitions et de variances trop hétérogènes. Un test de Student a alors été utilisé pour évaluer la significativité des différences entre les moyennes de deux groupes de données ( $p < 0,05$ ).

## **3 Résultats**

### **3.1 Traitement mécanique et répartition du sel et de l'eau dans les muscles**

En accord avec les observations de Shadereh et *al.* (soumis-chapitre 5) relatives au transfert de sel, quelles que soient les conditions de saumurage-malaxage appliquées, deux types d'échantillons ont été obtenus parmi les prélèvements dans les muscles.

Les échantillons prélevés en positions M et I ont subi le traitement mécanique mais leurs teneurs en eau et en NaCl ne différaient pas significativement des valeurs mesurées dans les échantillons témoins prélevés sur les mêmes muscles avant traitement. Les teneurs en eau des échantillons témoins étaient de  $77,2 \pm 1$  et  $73,5 \pm 1$  %, respectivement pour les muscles RF et SM. La valeur supérieure relative au RF s'explique par un pH ultime plus élevé, favorable à la capacité de rétention d'eau (Offer et Knight, 1988). Les teneurs en eau de l'ensemble des échantillons M et I n'étaient pas significativement différentes des valeurs initiales ; elles étaient égales  $76,4 \pm 1$  % pour le RF et  $74,2 \pm 1$  % pour le SM. Les teneurs en NaCl de ces échantillons étaient toujours inférieures à 0,3 % en masse, avec une moyenne sur l'ensemble des essais égale à 0,1 %, soit des valeurs trop basses pour influencer en elles-mêmes sensiblement sur la structure du tissu musculaire.

Les tableaux 16 et 17 (identiques aux 2 tableaux du chapitre 6) regroupent les valeurs des deux paramètres caractérisant le traitement mécanique et les teneurs en eau et en NaCl des échantillons prélevés en position S. Leur teneur en eau ne différait jamais significativement de celle des témoins mais leur teneur en NaCl était toujours significativement plus élevée, avec des valeurs allant de 0,5 à 6 % en masse en fonction la concentration en sel dans la saumure, du taux de déformation et de la durée du traitement mécanique.

Si l'on compare les deux traitements extrêmes qui seront dénommés par la suite 'intense' (Csel 13 %, TC 30 %, 300 min) et 'léger' (Csel 5 %, TC 10 % et 42 min), la teneur en sel en S est pour les deux types de muscle, RF et SM, respectivement supérieure à 5 % et d'environ à 0,6 %.

Tableau 16 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles *Rectus femoris* et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.

Csel (g NaCl/100 g)	TC %	Durée	Fmax (N)	Energie (mJ)	Teneur en eau %	Teneur en NaCl %
13	10	C	$31 \pm 3$	$86 \pm 5$	$77,0 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,9$
		L	$38 \pm 5$	$87 \pm 17$	$76,0 \pm 1,0$	$4,5 \pm 0,4$
	30	C	$130 \pm 48$	$463 \pm 181$	$76,3 \pm 1,5$	$2,8 \pm 0,1$
		L	$129 \pm 18$	$498 \pm 134$	$76,0 \pm 0,0$	$5,1 \pm 0,4$
5	10	C	$37 \pm 17$	$118 \pm 60$	$77,0 \pm 1,7$	$0,6 \pm 0,1$
		L	$37 \pm 9$	$101 \pm 12$	$79,0 \pm 3,0$	$1,8 \pm 0,2$
	30	C	$144 \pm 8$	$543 \pm 68$	$77,0 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,1$
		L	$136 \pm 27$	$497 \pm 125$	$77,7 \pm 2,3$	$2,1 \pm 0,1$

Tableau 17 : Synthèse des caractéristiques des traitements mécaniques appliqués aux muscles *Semimembranosus* et teneurs en eau et en sel mesurées dans les échantillons prélevés en position S, près de la surface du muscle, à la fin de l'essai. Durée courte (C correspond à 42 min et 350 déformations. Durée longue (L) correspond à 300 min et 2500 déformations.

<b>Csel (g NaCl/100 g)</b>	<b>TC %</b>	<b>Durée</b>	<b>Fmax (N)</b>	<b>Energie (mJ)</b>	<b>Teneur en eau %</b>	<b>Teneur en NaCl %</b>
<b>13</b>	<b>10</b>	<b>C</b>	<b>37 ± 10</b>	<b>96 ± 13</b>	<b>75,0 ± 0,0</b>	<b>2,1 ± 0,4</b>
		<b>L</b>	<b>40 ± 1</b>	<b>96 ± 2</b>	<b>72,3 ± 0,6</b>	<b>4,3 ± 0,6</b>
	<b>30</b>	<b>C</b>	<b>153 ± 66</b>	<b>485 ± 197</b>	<b>74,7 ± 1,5</b>	<b>2,4 ± 0,3</b>
		<b>L</b>	<b>238 ± 59</b>	<b>676 ± 159</b>	<b>74,7 ± 1,2</b>	<b>5,8 ± 0,1</b>
<b>5</b>	<b>10</b>	<b>C</b>	<b>48 ± 9</b>	<b>119 ± 27</b>	<b>74,0 ± 1,0</b>	<b>0,7 ± 0,2</b>
		<b>L</b>	<b>42 ± 9</b>	<b>89 ± 28</b>	<b>75,3 ± 1,2</b>	<b>1,5 ± 0,1</b>
	<b>30</b>	<b>C</b>	<b>189 ± 76</b>	<b>610 ± 282</b>	<b>75,0 ± 2,0</b>	<b>0,9 ± 0,1</b>
		<b>L</b>	<b>160 ± 57</b>	<b>598 ± 159</b>	<b>75,3 ± 3,2</b>	<b>1,8 ± 0,2</b>

La position du muscle change à chaque déformation du fait de sa rotation dans la cuve ; la condition d'application de la déformation (taux de compression et surface de contact entre le piston et le muscle) n'est donc pas constante, ce qui est représentatif d'un malaxage industriel, mais aboutit à des écarts-types élevés pour les deux mesures mécaniques (Fmax et E). Des essais complémentaires ont montré la bonne répétabilité des mesures mécaniques avec des écarts-types inférieurs à 5 % de la valeur moyenne pour un même muscle restant dans la même position. Les écarts-types donnés dans les tableaux 16 et 17 correspondent à la variabilité des valeurs moyennes relatives à 3 répétitions avec 3 muscles de même type.

Outre la durée, associée au nombre de déformations, nos essais ont permis d'obtenir deux traitements mécaniques très différents et semblables pour les deux types de muscle. Le premier correspond à un taux moyen de déformation (TC) de 10 % ; les moyennes de la force maximale (Fmax) et de l'énergie de déformation (E), calculées sur la totalité d'un essai, étaient alors respectivement d'environ 40 N et 100 mJ. Le deuxième correspond à TC égal à 30 % ; Fmax et E étaient alors respectivement compris entre 130 et 190 N, soit environ 4 fois plus grand que dans le premier cas, et entre 460 et 670 mJ, soit 5 à 6 fois plus grand que précédemment. Compte tenu de la grande variabilité des mesures d'un essai à l'autre il n'a pas été possible de mettre en évidence une éventuelle différence de comportement mécanique entre les deux types de muscle.

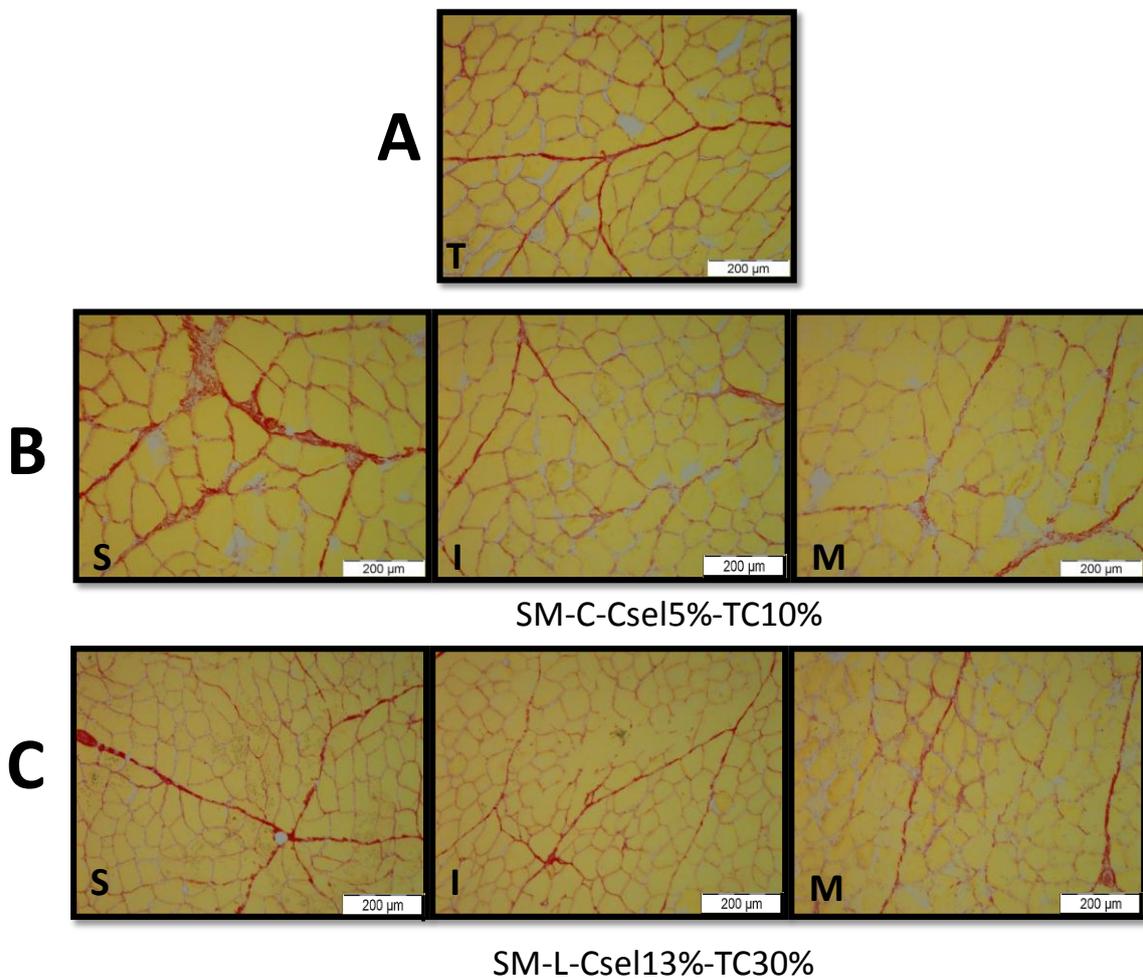


Figure 70 : Exemple d'images de coupes histologiques colorées au Rouge Sirius relatives au muscle *Semimembranosus*. (A) échantillon témoin avant traitement, (B) après saumurage-malaxage 'léger', soit un traitement court (350 déformations) avec un taux de compression TC 10 % et une teneur en sel dans la saumure Csel 5 %, et (C) après saumurage-malaxage 'intense', soit un traitement long (2500 déformations), TC30% et Csel 13 %. Les lettres S, I et M correspondent aux emplacements des prélèvements dans le muscle SM.

### 3.2 Élaboration d'un indice de dégradation du tissu conjonctif

La Figure 70 montre, à titre d'exemple, quelques images histologiques du muscle SM après coloration au Rouge Sirius. Dans le cas de l'échantillon témoin, les cellules musculaires (colorées en jaune) sont bien enveloppées par l'*endomysium* (coloré en rouge). Pour les échantillons ayant subi un saumurage-malaxage 'léger' ou 'intense', on observe des zones où l'*endomysium* est nettement moins bien coloré que précédemment, ou même disparaît en

partie, témoignant d'une fragilisation ou d'une destruction de ce tissu. C'est cette dégradation structurale qui a été quantifiée.

La Figure 71 illustre, sur un exemple d'un échantillon saumuré-malaxé, la succession des étapes de l'analyse automatisée des images qui ont permis de délimiter les « éléments séparés » et de mesurer leurs aires. L'image en noir et blanc, après traitement, révèle bien les zones qui ont été dégradées par des zones noires beaucoup plus grandes que les fibres.

Toutefois il convient de remarquer que les surfaces des « éléments séparés » des zones non-dégradées sont inférieures à celles des fibres. En effet, le niveau de seuillage et le nombre d'opérations 'érosion-dilatation' ont été déterminés par des essais préalables en traitant 50 images témoins qui provenaient de divers muscles des deux types de muscle. Le but fut d'obtenir un nombre d'« éléments séparés » sensiblement égal au nombre de fibres et parties de fibres (sur les bords de l'image) que celui dénombré visuellement sur l'image originale, en ne faisant aucune retouche sur les images. Ceci était indispensable, d'une part, pour ne pas biaiser les résultats relatifs aux échantillons ayant subi un traitement par une intervention manuelle inappropriée, et d'autre part, pour conserver l'information au bord des images puisqu'une zone dégradée peut se trouver à cet endroit. Ceci a conduit à épaissir sensiblement les espaces, de couleur blanche, entre les fibres et donc à mesurer des surfaces inférieures aux surfaces réelles des fibres.

La Figure 71 présente un histogramme type, du nombre d'éléments séparés selon leur surface, après traitement d'une seule image. La classe 1000-2000  $\mu\text{m}^2$  contient aussi les éléments dont la surface est inférieure à 1000  $\mu\text{m}^2$  ; cette classe était toujours prépondérante du fait qu'elle contient les éléments correspondant à des fibres non-dégradées et situées aux bords. Les surfaces des éléments séparés correspondant à des fibres non-dégradées étant plus petites que celles des fibres, on peut admettre que tous les éléments séparés de surfaces inférieures à 10 000  $\mu\text{m}^2$  ne correspondent pas à des zones dégradées. Par précaution, nous avons aussi éliminé du décompte des zones dégradées les classes de surfaces allant jusqu'à 15 000  $\mu\text{m}^2$  ; toutefois les classes entre 10 000 et 15 000  $\mu\text{m}^2$  ne représentaient jamais une quantité élevée comme le montre la Figure 71. Dans le cas des échantillons saumurés-malaxés la classe des éléments ayant une surface supérieure à 15 000  $\mu\text{m}^2$  a finalement été retenue comme indice de dégradation.

Dans le cas du muscle SM cette classe éléments ayant une surface supérieure à 15 000  $\mu\text{m}^2$  était systématiquement négligeable sur les témoins et les résultats relatifs aux échantillons

saumurés-malaxés ont pu être comparés facilement. Ces résultats sont présentés et discutés au paragraphe 3.3.

Dans le cas du muscle RF le résultat du traitement des images était extrêmement sensible à la valeur du seuil utilisé pour convertir l'image, initialement en niveaux de gris (256 niveaux), en image binaire en noir-et-blanc. Il n'a pas été possible de trouver une procédure unique de calcul automatique de ce seuil qui permette de rendre systématiquement négligeable la catégorie 'surface > 15 000  $\mu\text{m}^2$ ' pour les échantillons témoins.

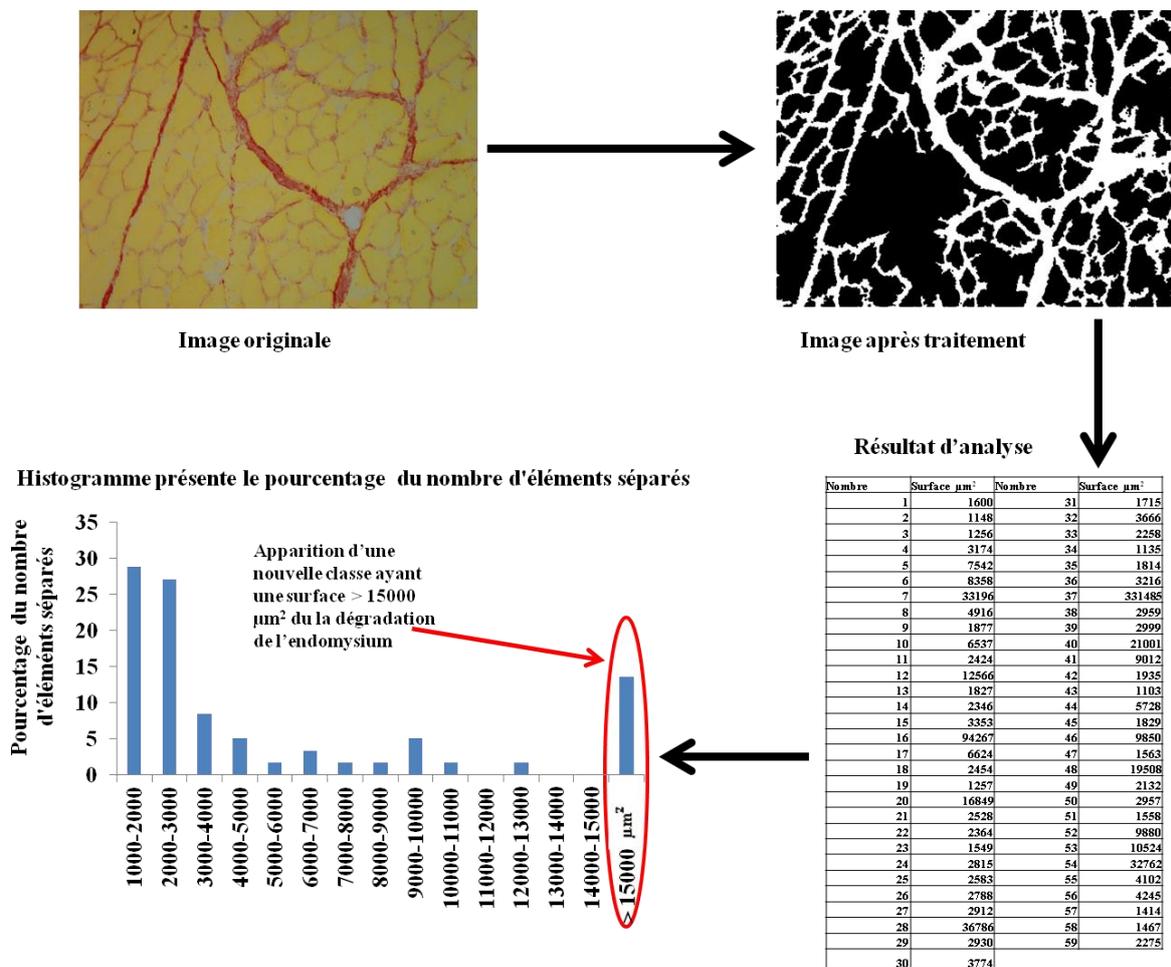


Figure 71 : Représentation des étapes de l'analyse d'image automatisée (ImageJ ® et Matlab ®) allant de l'image originale jusqu'à l'histogramme du nombre "d'éléments séparés" par classe de surface.

Finalement, l'algorithme défini pour le SM a aussi été appliqué au RF. Ceci a conduit à avoir pour les échantillons témoins du muscle RF une fausse proportion de surface dégradée assez élevée et variable (4 à 15 %). Ceci a aussi empêché de comparer aux témoins les mesures relatives aux saumurages-malaxages courts car la variabilité des estimations était plus grande que dans le cas du SM. Les résultats des essais longs ont cependant pu être exploités en examinant les différences entre les proportions de surface dégradée des échantillons après saumurage-malaxage et celles des témoins (paragraphe 3.4).

### **3.3 Effet traitement mécanique sur la dégradation de l'endomysium du muscle SM**

La Figure 72 compare, entre eux et par rapport au témoin, les histogrammes complets calculés pour les 3 échantillons S, I et M, prélevés sur les muscles saumurés-malaxés des deux traitements 'léger' et 'intense' ; l'ordonnée donne le nombre des éléments séparés dans chaque classe de surface. Dans les deux cas le nombre total des classes relatives aux surfaces supérieures à  $10\,000\ \mu\text{m}^2$  est négligeable pour les témoins. La dégradation apparaît nettement pour les 3 échantillons du traitement intense, en particulier en position M. Elle est plus difficile à discerner sur le traitement 'léger'. En fait, le nombre d'éléments est un indicateur imparfait puisque plusieurs petites zones dégradées peuvent être équivalentes à une zone plus étendue. Le tableau de la Figure 71 illustre ce fait : par exemple, les éléments numérotés 7, 16, 28 et 37 ont des aires nettement plus grandes que le seuil de  $15\,000\ \mu\text{m}^2$ . Le pourcentage de la surface dégradée par rapport à la surface totale est finalement apparu plus pertinent ; ce critère est utilisé par la suite et dénommé Psd.

La Figure 73-A compare les 8 conditions de saumurage-malaxage sur la base du pourcentage de surface dégradée de tous les échantillons. Pour les échantillons témoins Psd est, en moyenne sur 2 répétitions, compris entre 1 et 6 % du total. Cela provient d'un défaut de séparation de plusieurs fibres, souvent lié à un seuillage imparfait, et une estimation dans cette plage doit donc être associée à une dégradation nulle. Psd est toujours plus grand pour tous les échantillons traités avec une tendance à l'augmentation pour les essais longs et un taux de déformation TC 30 %.

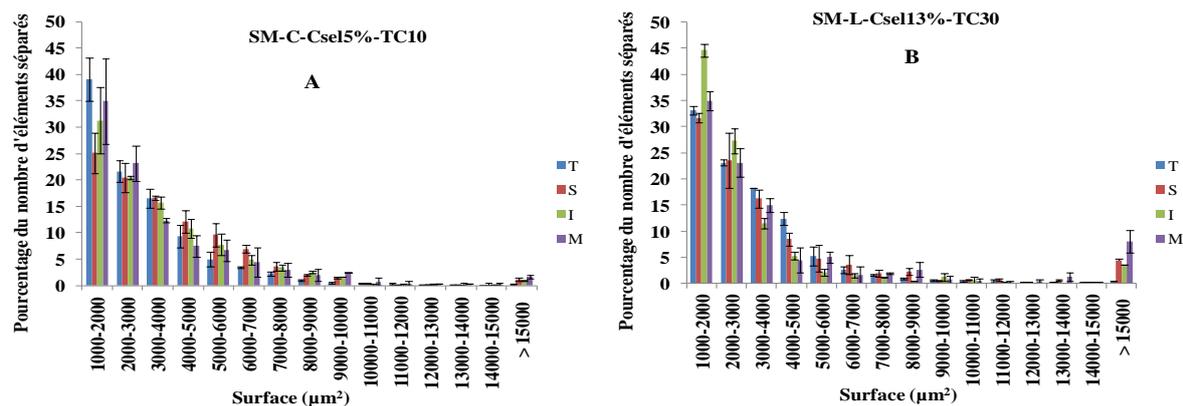


Figure 72 : Comparaison des histogrammes du nombre "d'éléments séparés" par classe de surface ( $\mu\text{m}^2$ ), calculés sur 12 images pour chacun des 4 échantillons (Témoin, Surface, Intermédiaire et Milieu), obtenus avec le muscle SM : (A) traitement 'léger' et (B) traitement 'intense'. Les barres présentent les valeurs min et max sur 2 répétitions.

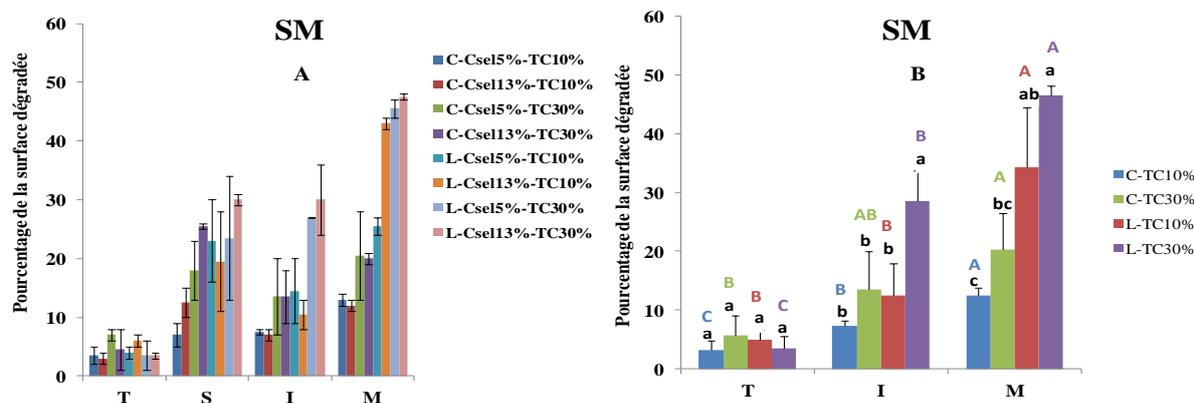


Figure 73 : Pourcentage de la surface dégradée pour : (A) les échantillons témoins, ainsi que les échantillons traités prélevés des trois positions (S, I et M). Les barres présentent les valeurs min et max sur deux répétitions ; Muscle SM. (B) les échantillons témoins, ainsi que les échantillons traités prélevés des positions I et M. Les barres présentent les écartypes sur 4 répétitions. Les lettres minuscules signifient une différence significative entre groupes et les lettres majuscules signifient une différence significative entre T, I et M pour  $p < 0,05$ ; Muscle SM.

Dans le graphe B, les significativités des différences entre 2 valeurs moyennes ont été évaluées pour les combinaisons deux par deux ; une lettre identique qu'il n'y a pas de différence ( $p > 0,05$ ). Les lettres minuscules n'ont de sens qu'au sein d'un groupe type d'échantillons (T ou I ou M). Les lettres majuscules correspondent aux comparaisons entre les 3 échantillons d'un même traitement (une couleur correspond à un traitement).

Il serait hasardeux de tirer des conclusions détaillées pour les échantillons S. Dans ce cas, il est vraisemblable qu'il y ait eu une action combinée de l'action mécanique et de la teneur en sel, or cette teneur en sel des échantillons variait au court du temps pendant nos essais. Il faut retenir simplement que Psd des échantillons S est supérieur ou égal à celui des échantillons I. Il apparait aussi dans le cas des 4 traitements courts, que pour un même TC, Psd augmente quand Csel augmente, et donc quand la teneur en sel finale de l'échantillon augmente (Tableau 17) ; à l'opposé Psd est alors identique pour les 2 niveaux de Csel, en I et M, là où seule l'action mécanique est en cause.

Les mesures des essais Csel 5 et 13 % ont donc été regroupées. La Figure 73-B présente ces résultats où seul le traitement mécanique entraîne une dégradation de l'*endomysium*. La comparaison des 4 cas (TC × 'Durée de malaxage'), comportant chacun 4 répétitions, a pu être faite pour les échantillons I et M. Les résultats de l'ANOVA ne pouvant pas être retenus du fait de variances trop hétérogènes, les comparaisons ont été faites 2 à 2 au moyen d'un test de Student pour un grand nombre de combinaisons. La légende de la Figure 73-B explicite ces comparaisons. Les principaux enseignements sont les suivants :

- Les témoins n'étaient pas significativement différents les uns des autres.
- Les lettres majuscules montrent que la différence est toujours significative entre les échantillons en position M et les témoins. Les conclusions sont moins nettes pour ceux en position I.
- Compte tenu des écarts-types élevés, si l'on compare les taux de compression, la différence n'est significative que dans le cas d'un traitement long en position I.
- Si l'on compare les durées de traitement, ou nombre de déformations, la différence est toujours significative sauf en position I et TC 10 %.

En fait, la dégradation dépend de l'énergie de déformation totale dissipée (Et) dans le muscle pendant la durée d'un essai. Cette dernière est égale au produit de l'énergie de déformation moyenne d'une déformation, qui dépend du taux de déformation (Tableau 17), par le nombre de déformations qui est proportionnel au temps du malaxage. Les valeurs de Psd de la Figure 73 ont été reportées sur la Figure 74 en fonction du Logarithme (base 10) de Et, exprimé en joules. Il apparait alors clairement que Psd est nettement inférieure en I qu'en M et que des relations linéaires peuvent être établies entre Psd et Log(Et).

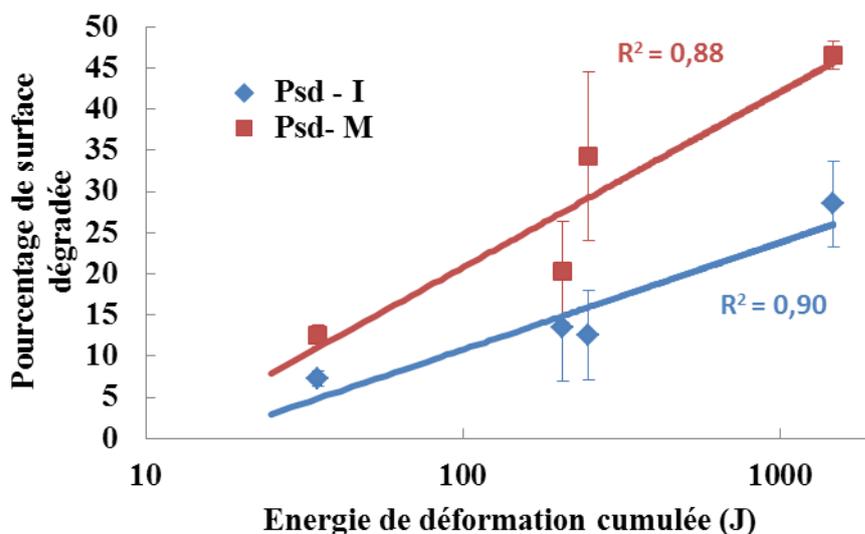


Figure 74 : Correspondance entre l'énergie de déformation cumulée (échelle log) pendant un essai saumurage-malaxage d'un muscle SM et le pourcentage de surface dégradée ; échantillons I et M après regroupement des essais réalisés avec les 2 niveaux de Csel ; les barres correspondent aux écarts-types sur 4 répétitions.

### 3.4 Comparaison de la dégradation de l'endomysium des muscles SM et RF

Les différences entre les proportions de surface dégradée des échantillons après saumurage-malaxage et celles des témoins ( $\Delta$ Psd) sont présentées sur la Figure 75 ; rappelons qu'il s'agit uniquement des essais longs. Les résultats précédents relatifs au muscle SM ont été repris ici comme base comparative.

Les valeurs de  $\Delta$ Psd relatives au RF sont très grandes et n'ont pas de signification dans l'absolu. Malgré cela, la Figure 75 suggère que l'effet du traitement mécanique est plus marqué sur le muscle RF que sur le SM. Les différences observées précédemment sur le SM entre les positions S et I pour les temps courts sont inversées sur le RF ; il est donc malheureusement impossible d'avoir une conclusion générale sur les effets combinés de l'action mécanique et de la teneur en sel. Aussi, les essais Csel 5 et 13 %, ont été regroupés pour toutes les positions. Les résultats sont présentés sur la Figure 76 ; la significativité des comparaisons statistiques entre moyennes, deux par deux, est indiquée avec les mêmes conventions que sur la Figure 73-B

La Figure 76 confirme, malgré les écarts-types très grands, qu'un malaxage à TC 30 %, imposant une énergie de déformation 6 fois plus grande (Tableau 16) qu'à TC 10 %, provoque des modifications structurales sur des zones plus étendues. Cette augmentation est dans le cas du RF toujours significative. Enfin, la différence entre les positions I et M, est toujours significative dans le cas du SM et significative dans le cas du RF quand TC est égal à 30 %. Cette incidence plus marquée, au centre qu'en périphérie du muscle, de l'action mécanique sur la dégradation de la structure tissulaire peut s'interpréter de la manière suivante : le muscle étant en rotation dans le simulateur, ou chutant dans diverses positions dans une baratte, la déformation ne s'opère pas toujours selon le même 'diamètre'. Un échantillon situé sur ce 'diamètre', ou sur le 'diamètre' orthogonal, subit une déformation maximale (compression ou extension) alors que s'il est situé à d'autres endroits sa déformation est moindre. Le 'centre' du muscle est toujours en déformation maximale alors que les autres endroits ne le sont que de temps en temps.

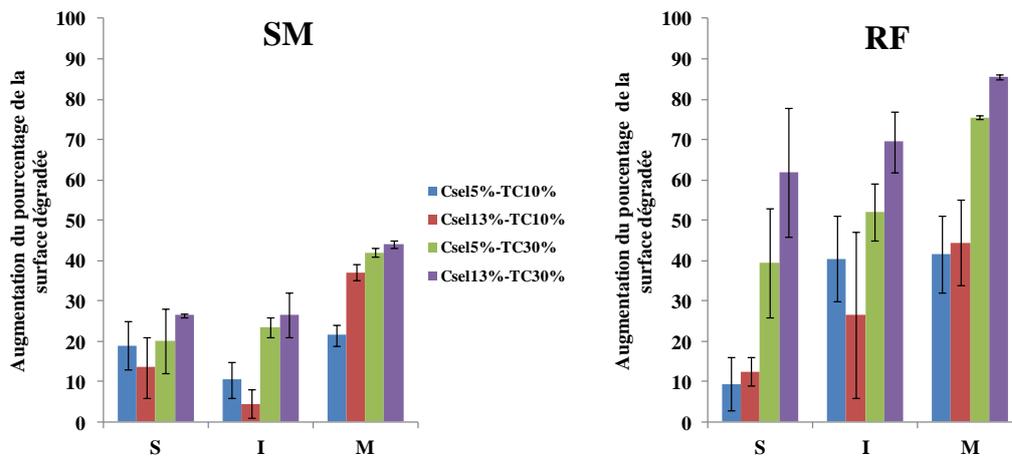


Figure 75 : Différence du pourcentage de la surface dégradée (Echantillon i - Témoin du même muscle) pour les traitements longs des muscles SM et RF et pour les trois positions (S, I et M). Les barres présentent les valeurs min et max sur deux répétitions.

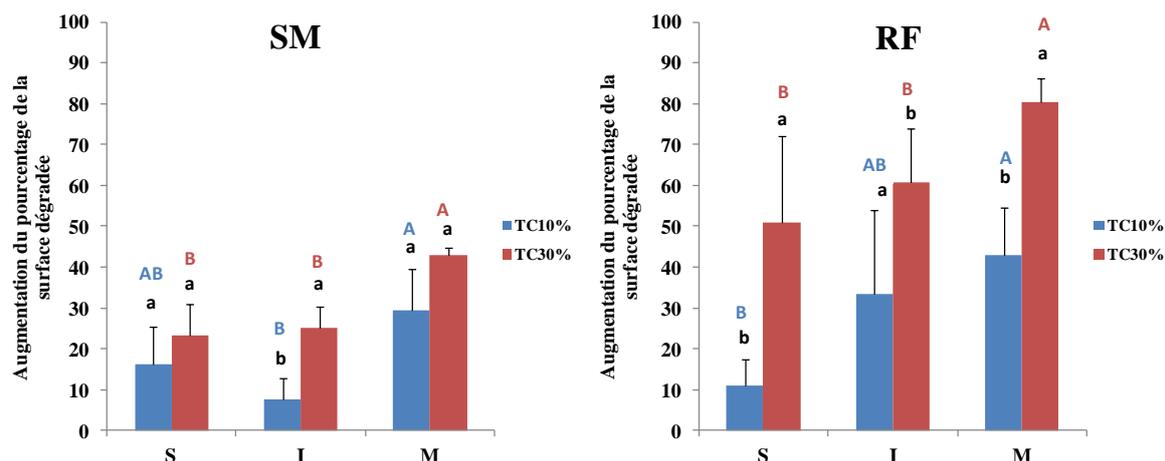


Figure 76 : Différence du pourcentage de la surface dégradée (Echantillon i - Témoin du même muscle) pour les traitements longs des muscles SM et RF et pour les trois positions (S, I et M) après regroupement des essais réalisés avec les 2 niveaux de Csel. Les barres présentent les écarts-types sur 4 répétitions. Les significativités des différences entre 2 valeurs moyennes ont été évaluées pour les combinaisons deux par deux ; une lettre identique signifie qu'il n'y a pas de différence ( $p > 0,05$ ). Les lettres minuscules n'ont de sens qu'au sein d'un groupe type d'échantillons (T ou I ou M). Les lettres majuscules correspondent aux comparaisons entre les 3 échantillons d'un même traitement (une couleur correspond à un taux de déformation).

#### 4. Discussion et conclusion

Il n'a pas été possible de comparer nos résultats à ceux de la littérature car aucun travail de ce type n'a été publié à notre connaissance ; et ceci pour deux raisons : (1) les essais réalisés sur le simulateur de malaxage ont permis de contrôler et caractériser l'action mécanique appliquée aux muscles alors que c'est impossible dans une baratte et (2) les mesures quantitatives tirées d'images histologiques sont peu nombreuses et concernent surtout des descripteurs topologiques de l'organisation tissulaire dans des viandes et produits carnés non barattés (Astruc *et al.*, 2008 ; Astruc *et al.*, 2010 ; Realini *et al.*, 2013 ; Harkouss *et al.*, 2015 ; Sharedeh *et al.*, soumis-chapitre 3). Si l'on élimine les travaux portant sur l'ultrastructure, qui n'a pas été considérée dans cette étude, nos résultats sont en cohérence avec les observations de la structure microscopique des viandes après un saumurage-barattage, suivi parfois d'une cuisson. Par exemple, dans le cas de viandes saumurées au préalable par injection de saumure Theno *et al.*, (1978) rapportent une déstructuration du tissu conjonctif. Dans un autre cas, une

augmentation de l'espace entre les fibres musculaires, après un traitement par ultrasons ou en baratte a été constatée par Siro *et al.* (2009) par rapport à des échantillons saumurés sans traitement mécanique. Ceci pourrait résulter d'une dégradation de l'*endomysium*. Plus indirectement, Pietrasilc & Shand (2004) ont montré que des rôtis de bœuf barattés durant une longue période seraient plus tendres ce qui suggère une possible fragilisation du tissu conjonctif.

L'indice de dégradation retenu est pertinent pour évaluer l'impact du traitement mécanique. Il serait cependant nécessaire de qualifier précisément cette dégradation. Ceci pourra être fait en sélectionnant les échantillons associés aux Psd les plus grands et en faisant des observations en microscopie électronique de l'*endomysium*. La comparaison des zones peu contrastées et bien contrastées par le Rouge Sirius sera certainement instructive.

Nos essais, réalisés sur un simulateur de malaxage, ont permis de contrôler le saumurage-malaxage de deux types de muscle de porc, très différents par leurs caractéristiques métaboliques, entrant dans la fabrication du jambon cuit. Deux niveaux de déformation des muscles, qui correspondent approximativement aux traitements mécaniques dans de petites barattes pilotes et dans des grandes barattes industrielles, ont été combinés avec deux durées de traitement, ou nombres de déformations.

Les résultats permettent d'évaluer, pour la première fois, l'incidence propre de l'action mécanique sur la modification de la structure du tissu musculaire. De plus, une relation linéaire a été obtenue entre le pourcentage de surface dégradée et le logarithme de l'énergie mécanique totale dissipée. Cette relation nécessite d'être confortée en réalisant de nouveaux essais pour d'autres valeurs de cette énergie totale ; par exemple à 100 J et à 700 J, en choisissant à chaque fois 2 couples différents (TC × Durée) produisant la même dissipation totale d'énergie. Si ces relations se confirment, nous aurions alors à notre disposition un moyen de prédire l'incidence de l'allongement du malaxage, ou d'un changement de vitesse de rotation, ou encore du passage d'une baratte d'un certain diamètre à celle d'un autre diamètre. En effet, les deux premières variables déterminent le nombre de chutes des muscles dans une baratte alors que la troisième détermine le taux de déformation (Daudin *et al.*, soumis—chapitre 4).

Ces premiers résultats ont été obtenus dans une situation très simplifiée par rapport à la pratique industrielle. Le saumurage par immersion de muscles entiers a eu l'avantage de produire des échantillons issus d'un même muscle, ayant subi le même traitement mécanique, certains étant salés et d'autres pas. Ceci était indispensable pour séparer au mieux l'effet de

l'action mécanique de celui du salage ; cette séparation est cependant imparfaite puisque nos résultats suggèrent aussi une hétérogénéité de l'action mécanique au sein du muscle et serait plus marqué au centre qu'en périphérie. De nouveaux essais sont nécessaires pour poursuivre cette étude. Ils sont de deux types : (1) afin de confirmer l'hétérogénéité de l'action mécanique il faudrait effectuer des malaxages sans saumurage et (2) pour vérifier l'incidence des modifications structurales sur la texture après cuisson, du fait de l'effet combiné du traitement mécanique et du sel, il faudrait mettre au point une procédure de laboratoire pour contrôler l'injection de saumure dans le muscle avant malaxage. Ceci permettrait alors de définir indépendamment le niveau de teneur en sel et le niveau de l'énergie totale de déformation. Il serait alors possible d'évaluer par un plan d'expérience les effets respectifs de ces deux variables au moyen de mesures instrumentales de la texture après une cuisson standardisée.



**Discussion Générale**



Ce travail concerne l'impact des différentes conditions de traitement sur les modifications biochimiques et structurales du tissu musculaire. Trois points ont été abordés : (1) caractériser l'effet du pH et du NaCl sur les modifications histologiques et sur l'état des lipides et des protéines lors du marinage des viandes de bœuf (2) évaluer l'effet du malaxage sur la diffusivité apparente du NaCl (D), (3) une grande partie a été consacrée au saumurage-malaxage qui est utilisé pour favoriser la conservation et améliorer la texture et la jutosité des produits carnés cuits, tels que le jambon cuit, dans le but d'évaluer les effets respectifs du NaCl et de l'action mécanique subie par la viande.

A propos du marinage, beaucoup de travaux avaient été faits sur les modifications biochimiques et histologiques mais les mesures étaient le plus souvent reliées aux caractéristiques des marinades (NaCl et pH), alors que les échantillons n'étaient pas nécessairement en équilibre avec la marinade. En imposant un équilibre, cette étude a permis de clarifier les effets respectifs et interactifs du pH (4,3 à 6,5) et de la teneur en sel (1 à 2%) de la viande. L'analyse d'images de coupes histologiques a montré que le gonflement du tissu musculaire lors d'un marinage acide est en grande partie dû à une augmentation de l'espace extracellulaire. Or d'autres travaux ont montré que l'impact sur l'attendrissement s'explique par le gonflement des fibres musculaires ; le marinage acide n'aurait donc pas d'intérêt de ce point de vue. Cela doit être confirmé sur d'autres muscles de bovins et sur la base de tests sensoriels après cuisson. D'un point de vue nutritionnel, le marinage acide de la viande bovine doit être évité du fait d'une augmentation importante de l'oxydation des lipides, des protéines et d'une augmentation de l'hydrophobie de la surface des protéines.

Mon étude a été focalisée sur le malaxage qui impose des sollicitations mécaniques aux pièces de viande, favorisent la pénétration des ingrédients et provoquent des modifications biochimiques et structurales, ce qui au final affecte le rendement de cuisson, la tenue de tranche et les qualités sensorielles des produits finis. En expérimentant avec des barattes pilotes ou industrielles, il est très difficile et coûteux de faire varier les paramètres qui dépendent de la conception, et surtout, il est impossible de caractériser les sollicitations mécaniques subies par les pièces de viande. Pour ces raisons, mes essais ont été réalisés sur un simulateur de malaxage qui permet de contrôler et mesurer l'action mécanique pendant un saumurage.

Le simulateur de saumurage-malaxage avait été développé par mon laboratoire d'accueil. J'ai défini les conditions de fonctionnement et les protocoles des essais. Afin de simuler la chute des pièces de viande dans une baratte, le principe est d'imposer une succession de centaines de compressions, avec extension libre dans la direction orthogonale. Le principal élément à contrôler était le taux de déformation du morceau de viande qui est approximativement relié à la hauteur de chute dans une baratte par une relation linéaire. Malgré la forme irrégulière et la taille variable des muscles *Semimembranosus* et *Rectus femoris* de porc, utilisés pendant tous les essais, il a été possible de leur imposer un taux de compression (TC) moyen, ou taux de déformation moyen, répétable d'un essai à l'autre. Deux niveaux ont été retenus, 10 et 30%, afin d'avoir des traitements mécaniques très différents, correspondant approximativement à l'action mécanique dans une petite baratte pilote, de diamètre inférieur à 0,5 m, et dans les plus grandes barattes industrielles, dont les diamètres avoisinent 2 m. Il faut cependant noter (1) que la friction de la surface du muscle n'a pu être ni contrôlée, ni caractérisée et (2) que la déformation qui a été observée sur des films au ralenti lors d'une chute est très brève ; la durée de déformation dans le simulateur est 2 à 4 fois plus longue.

L'action mécanique relative à chaque déformation a été caractérisée à partir des diagrammes force-déplacement par 2 critères : ( $F_{max}$ ) la force maximum atteinte lors d'une compression et, plus intéressant, ( $E$ ) l'énergie mécanique dissipée dans la viande appelée énergie de déformation. Les mesures de ces deux paramètres ont démontré la régularité du traitement mécanique pendant un essai. De plus, l'énergie de déformation cumulée au cours des centaines de déformations d'un essai, ou énergie de déformation totale ( $E_t$ ) s'est révélée instructive par rapport aux modifications structurales provoquées dans le tissu musculaire.

Aucune étude n'avait pu mettre en évidence la cause de l'augmentation de la vitesse d'homogénéisation du NaCl constatée lors du malaxage dans les barattes ; elle était généralement interprétée dans la littérature comme le résultat d'une modification de la structure du tissu musculaire. Mes essais ont démontré que ces modifications sont effectivement présentes et correspondent à une énergie totale de déformation ( $E_t$ ) très petite, de l'ordre de quelques Joules. Toutefois, elles n'expliquent qu'une augmentation de 20% de la diffusivité apparente du NaCl alors qu'elle était d'environ 200% lors d'un saumurage-malaxage à TC 30%. Cette forte augmentation pourrait s'expliquer par des mouvements d'eau, dans laquelle sont dissous les ions, lors des déformations. Ces résultats doivent être confirmés par des essais de saumurage-malaxage à d'autres TC que les cas extrêmes qui ont été testés dans cette étude.

La série d'essais la plus conséquente a été faite lors du saumurage-malaxage dans le but de faire la part entre l'action du NaCl et celle de l'action mécanique sur les modifications biochimiques et structurale du tissu musculaire ; ceci a pu être obtenu en réduisant la durée de malaxage de façon à n'avoir une teneur en sel significative que dans la couche périphérique du muscle. Deux types de muscle de porc, très différents par leurs caractéristiques métaboliques, ont été sélectionnés. Les deux niveaux extrêmes de déformation (10 et 30%) ont été combinés à deux durées (ou, en nombre de déformations 350 et 2500) et à deux taux de sel dans la saumure : 5 et 13%.

Ces essais ont montré pour la première fois que la solubilité des protéines au sein d'un muscle baratté augmente fortement du simple fait de l'action mécanique, propriété connue pour moduler les qualités technologiques et qualitatives des viandes transformées. Afin de séparer l'effet du NaCl de cet effet mécanique, les mesures effectuées sur les échantillons prélevés en périphérie des muscles malaxés ont été comparés à des courbes de références (une pour le SM et une pour le RF) pour lesquelles seul le NaCl influait ; ces deux courbes de références sont très semblables. En résumé, l'augmentation de la solubilité des protéines est d'autant plus grande que le nombre de déformations et le taux de déformation sont grands. Elle varie de 20 à 50 % par rapport à des échantillons non malaxés, qu'ils soient salés ou non.

La thèse de Laure Bombrun (2013), réalisée dans mon laboratoire d'accueil, portait sur l'influence de la réduction de la teneur en sel lors de la fabrication du jambon cuit. Elle était orientée sur la cuisson après barattage. Elle a souvent servi de référence lors des discussions dans mon étude, en particulier à propos de la teneur en protéines totale du limon qui détermine l'adhésion des différents muscles pendant la cuisson. Mes essais ont montré que la teneur en sel de la saumure a une incidence négligeable sur la quantité de protéines extraites ; ceci est en accord avec les précédents résultats obtenus par malaxage dans une baratte pilote. En revanche, mes essais ont mis en évidence le rôle déterminant du taux de déformation, et donc du diamètre des barattes, sur l'extraction des protéines vers le limon que d'autres auteurs ont montré être un critère essentiel de la tenue de tranche des jambons cuits. Ceci suggère que des résultats obtenus sur des barattes pilotes ne sont pas transposables facilement vers les barattes industrielles.

Le traitement mécanique seul entraîne une augmentation modérée de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires, propriété qui traduit un changement de conformation de ces protéines. L'augmentation varie de 15 à 40 % par rapport aux témoins selon les essais. La tendance générale indique qu'elle est d'autant plus forte que l'action mécanique est intense et longue, mais des essais complémentaires sont indispensables pour dégager une relation entre les mesures d'hydrophobie et les mesures mécaniques. A la périphérie des muscles, lorsque la teneur en NaCl atteignait 1 ou 2 %, valeurs équivalentes à celles des produits habituellement commercialisés, l'augmentation d'hydrophobie était respectivement égale à 40 et 80%.

Des dégradations sensibles de l'*endomysium* entourant les fibres musculaires ont été quantifiées grâce à la mise au point d'une méthode automatisée d'analyse d'images histologiques après coloration du tissu conjonctif par le Rouge Sirius. Cette méthode a permis d'évaluer le pourcentage de surface des images où la structure tissulaire est dégradée (Psd) dans le cas muscle SM, mais des difficultés méthodologiques ont limité l'analyse relative au RF. Pour la première fois, l'ampleur des modifications structurales a été mise en relation avec l'intensité et la durée de l'action mécanique appliquée au tissu musculaire. L'énergie mécanique totale dissipée (Et) dans le SM était comprise entre 35 à 1500 J selon les conditions de malaxage ; Psd varie linéairement avec Log(Et) et plus fortement au centre qu'en périphérie. Cette relation devra être affinée par de nouveaux essais en faisant varier le niveau de Et par des combinaisons entre TC et le nombre de compressions. Ceci offrirait alors un moyen de prédire l'incidence de l'allongement du malaxage, ou d'un changement de vitesse de rotation, ou encore du passage d'une baratte d'un certain diamètre à celle d'un autre diamètre. En effet, les deux premières variables déterminent le nombre de chutes des muscles dans une baratte alors que la troisième détermine le taux de déformation

Trois points particuliers peuvent être évoqués dans la perspective d'une poursuite de ce travail :

#### *1- Modifications de la structure tissulaire pendant le malaxage*

Parmi les 3 types de coupes histologiques utilisées pendant cette étude, seule la coloration par le Rouge Sirius était adaptée à une analyse quantitative : (i) la coloration à l'Hématoxyline Eosine Safran ne se prête pas à un seuillage automatisé et impose parfois des retouches manuelles, et (ii) l'immuno-marquage de la laminine demande plus de temps de préparation des coupes et les zones de décollement doivent être coloriées manuellement. Ce qui a été appelé 'dégradation de l'*endomysium*' traduit en fait une moindre aptitude du Rouge Sirius à

révéler ce tissu conjonctif, souvent en parallèle d'une coloration jaune plus nette des fibres, ce qui suggère un passage plus important du colorant dans les cellules du fait d'une dégradation du sarcolemme. Afin de qualifier précisément les dégradations il faudrait sélectionner les échantillons ayant les 'pourcentage de surface dégradée' les plus grands et faire des observations en microscopie électronique de l'espace extracellulaire et des membranes cellulaires.

### *2- Production du limon, cuisson et tenue de tranche*

Les cinétiques d'extraction des protéines dans le limon ont été mesurées pour deux taux extrêmes de déformation. D'autres taux de compression des muscles doivent être testés. Les essais à faire sont simples puisque cette extraction est indépendante de Csel et que la mesure de la teneur en protéine est une analyse de routine ; 3 répétitions paraissent suffisantes par taux de compression. Une série d'essais avec le muscle SM, Csel égal à 0,9 %, afin d'avoir une force ionique proche de celle du muscle, et comprenant 5 autres taux de compressions que ceux déjà testés (13, 16, 19, 22 et 25) peut être envisagée.

D'autres essais de saumurage-malaxage seront nécessaires pour évaluer la capacité d'adhésion de surface des muscles malaxés. Les protocoles de Laure Bombrun relatifs à un chauffage-refroidissement standardisé et au test de séparation seraient repris. Auparavant il faudrait contrôler la quantité de protéine adsorbée en surface du muscle, ce qui n'est pas évident. Une piste serait de réduire au maximum la quantité de saumure dans le bac du simulateur. Des essais préliminaires à TC 30%, qui devraient permettre d'avoir la meilleure adhésion, seront nécessaires pour définir cette quantité.

### *3- Autres essais de saumurage-malaxage pour aller jusqu'à des lois de transposition entre barattes de différentes tailles, notamment à propos des modifications biochimiques*

Mes résultats ont été obtenus dans une situation très simplifiée par rapport à la pratique industrielle. De nouveaux essais sont nécessaires pour (a) confirmer l'hétérogénéité de l'action mécanique dans le muscle, (b) relier les mesures biochimiques aux mesures mécaniques et (c) évaluer l'incidence des modifications biochimiques et structurales sur la texture après cuisson. Pour les points a et b, les essais seront semblables à ceux proposés précédemment afin de limiter la pénétration du NaCl. Le point critique est le point 2 car l'effet de l'action mécanique sur la solubilité des protéines et de l'hydrophobie des protéines myofibrillaires ne semble linéaire, ni en fonction de TC, ni en fonction du nombre de compressions, ni en fonction de Et. Un plan d'expérience à plusieurs niveaux pour chacune des deux variables de contrôle (TC et nombre de compressions) permettrait de réduire le

nombre d'essais. Pour le point c, il faudrait mettre au point une procédure de laboratoire pour injecter une quantité précise de saumure dans le muscle avant malaxage. Ceci permettrait alors de contrôler indépendamment le niveau de teneur en sel et le niveau de l'énergie totale de déformation. Il serait alors possible d'évaluer par un autre plan d'expérience les effets respectifs de ces deux variables sur une mesure instrumentale de la texture après une cuisson standardisée.

**Références Bibliographiques**

- Aaslyng, M.D., Bejerholm, C., Ertbjerg, P., Bertram, H.C., Andersen, H.J., (2003). Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Quality and Preference* 14(4), 277-288.
- Abi Nakhoul, P., (2006). Traitement acide de dinde par immersion. Thèse, ENSIA . p 148.
- Akköse, A., Aktaş, N., (2014). Curing and diffusion coefficient study in pastırma, a Turkish traditional meat product. *Meat Science* 96(1), 311-314.
- Aktas, N., (2003). The effects of pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub> on thermal denaturation characteristics of intramuscular connective tissue. *Thermochimica Acta* 407(1-2), 105-112.
- Aktas, N., Aksu, M.I., Kaya, M., (2003). The effect of organic acid marination on tenderness, cooking loss and bound water content of beef. *Journal of Muscle Foods* 14, 181-194.
- Anonyme, (2006). Le point sur ... La couleur de la viande bovine *Interbev- juillet 2006*.
- Astruc, T., Gatellier, P., Labas, R., Santé-Lhoutellier, V., Marinova, P., (2010). Microstructural changes in *m. rectus abdominis* bovine muscle after heating. *Meat Science* 85(4), 743-751.
- Astruc, T., Labas, R., Vendevre, J.L., Martin, J.L., Taylor, R.G., (2008). Beef sausage structure affected by sodium chloride and potassium lactate. *Meat Science* 80(4), 1092-1099.
- Astruc, T., Marinova, P., Labas, R., Gatellier, P., Sante-Lhoutellier, V., (2007). Detection and localization of oxidized proteins in muscle cells by fluorescence microscopy. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 55(23), 9554-9558.
- Astruc, T., Peyrin, F., Venien, A., Labas, R., Abrantes, M., Dumas, P., Jamme, F., (2012). In situ thermal denaturation of myofiber sub-type proteins studied by immunohistofluorescence and synchrotron radiation FT-IR microspectroscopy. *Food Chemistry* 134(2), 1044-1051.
- Aumailley, M. & col. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biology* 24(5), 326-332.
- Barbanti, D., Pasquini, M., (2005). Influence of cooking conditions on cooking loss and tenderness of raw and marinated chicken breast meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 38(8), 895-901.
- Barbera, S., Tassone, S., (2006). Meat cooking shrinkage: Measurement of a new meat quality parameter. *Meat Science* 73(3), 467-474.
- Baublits, R.T., Pohlman, F.W., Brown, A.H., Yancey, E.J., Johnson, Z.B., (2006). Impact of muscle type and sodium chloride concentration on the quality, sensory, and instrumental color characteristics of solution enhanced whole-muscle beef. *Meat Science* 72(4), 704-712.
- Bauchart, D., Chantelot, F., Gandemer, G., (2008). Qualités nutritionnelles de la viande et des abats chez le bovin. *Cahiers de nutrition et de diététique* 43, 1S29-21S39.
- Berge, P., Ertbjerg, P., Larsen, L.M., Astruc, T., Vignon, X., Moller, A.J., (2001). Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. *Meat Sci* 57, 347-357.

- Bimbenet, J.J., Brusset, H., Loncin, M., (1970). Effet de la présence de corps solubles sur la déshydratation des produits biologiques. *Industries alimentaires et agricoles* 87(4), 385-391.
- Bimbenet, J.J., Loncin, M., (1995). *Bases du génie des procédés alimentaires*. (1ère ed). Masson, Paris.
- Bjorkroth, J., (2005). Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Science* 70(3), 477-480.
- Bombrun, L., (2014). Analyse des transferts de masse et de l'adhésion entre muscles lors de la fabrication de charcuteries cuites à faible teneur en sel-Effet du traitement thermique et modélisation des pertes de poids. Thèse, Ecole doctorale SVSAE, Université de Clermont-Ferrand, p. 182.
- Bombrun, L., Gatellier, P., Carlier, M., Kondjoyan, A., (2014). The effects of low salt concentrations on the mechanism of adhesion between two pieces of pork semimembranosus muscle following tumbling and cooking. *Meat Science* 96(1), 5-13.
- Bombrun, L., Gatellier, P., Portanguen, S., Kondjoyan, A., (2015). Analysis of the juice and water losses in salted and unsalted pork samples heated in water bath. Consequences for the prediction of weight loss by transfer models. *Meat Science* 99, 113-122.
- Boudhrioua, N., (2004). Etude des migrations de l'eau et du Chlorure de Sodium dans des gels alimentaires. Incidence de la composition du gel et du procédé appliqué. Thèse, ENSIA, Massy, France, p. 149.
- Bouton, P.E., Harris, P.V., Shortose, W.R., (1982). The effect of temperature and ultimate pH on the increase in meat toughness resulting from restraint during cooking. *Meat Science* 6, 235-241.
- Broyart, B., Boudhrioua, N., Bonazzi, C., Daudin, J.D., (2007). Modelling of moisture and salt transport in gelatine gels during drying at constant temperature. *Journal of Food Engineering* 87(2), 301-301.
- Burke, R.M., Monahan, F.J., (2003). The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade. *Meat Science* 63(2), 161-168.
- Camirand, J., (2004). Développement d'un protocole d'induction de tolérance immunologique applicable à la transplantation de myoblastes comme traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ph.D. Université de Laval, Canada (<http://theses.ulaval.ca>).
- Carballo, J., Ayo, J., Colmenero, F.J., (2006). Microbial transglutaminase and caseinate as cold set binders: Influence of meat species and chilling storage. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 39(6), 692-699.
- Carlier, M., Martin, J.L., Vautier, A., Gault, E., Bombrun, L., Burton, O., Loison, O., Danon, J., Sante-Lhoutellier, V., Astruc, T., (2012). Histochemical and biochemical characteristics of four major muscles of the ham, *58th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)*, August 12-17, Montreal, Canada.
- Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science* 74(4), 681-683.

- Chelh, I., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., (2007). Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Science* 76(2), 210-215.
- Christieans, S., (2003). La température et la durée de stockage sont des facteurs déterminants. *Viandes et produits carnés* 23(2).
- Combes, S., Lepetit, J., Darche, B., Lebas, F., (2004). Effect of cooking temperature and cooking time on Warner-Bratzler tenderness measurement and collagen content in rabbit meat. *Meat Science* 66(1), 91-96.
- Cornier, G., Colin, D., Guihard, L., Le Bail, A., Leroy, M., Orcil, Y., Rannou, M.H., Vallet, J.L., (1994). Etude, conception et experimentation d'un pasteurisateur industriel pour la préparation de plats cuisinés en cycle court. AFREM-Bretagne-Ingénierie, Lorient.
- Crank, J., (1975). *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, London.
- Cussler, E.L., (2009). Diffusion : mass transfert in fluid systems. Third edition. Cambridge University Press, New York, 631.
- Davey, C.L., Gilbert, K.V., (1974). Temperature-dependent cooking toughness in beef. *Journal of Science of Food and Agriculture* 25, 931-938.
- De Lamballerie, M., Chraïti, F., Culioli, J., Ouali, A., (1993). Gelation properties of bovine myofibrillar proteins. *Sciences des Aliments* 13(2), 237-247.
- Desmond, E.M., Troy, D.J., (2001). Effect of Lactic and Citric Acid on Low-value Beef used for Emulsion-type Meat Products. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 34, 374-379.
- Devatkal, S.K., Naveena, B., (2010). Effect of salt, kinnow and pomegranate fruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. *Meat Science* 85(2), 306-311.
- Djelveh, G., Gros, J.B., Bories, B., (1989). An Improvement of the Cell Diffusion Method for the Rapid Determination of Diffusion Constants in Gels or Foods. *Journal of Food Science* 54(1), 166-169.
- Dolata, W., Piotrowska, E., Wajdzik, J., Tritt-Goc, J., (2004). The use of the MRI technique in the evaluation of water distribution in tumbled porcine muscle. *Meat Science* 67(1), 25-31.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Kampani, A., Kritikos, D., Metaxopoulos, I., (2006). Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Science* 73(1), 75-81.
- Dumont, B.L., (1986). *La restructuration des Viandes*. ERTI Versailles.
- Durand, P., (1999). *Technologies de produits de charcuterie et des salaisons*. Lavoisier, Paris.
- Dzudie, T., Okubanjo, A., (1999). Effects of rigor state and tumbling time on quality of goat hams. *Journal of Food Engineering* 42(2), 103-107.
- Ergezer, H., Gokce, R., (2011). Comparison of Marinating with Two Different Types of Marinade on Some Quality and Sensory Characteristics Turkey Breast Meat. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10(1), 60-67.

- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Maes, B., Hiele, M., Rutgeerts, P., Ghoo, Y., (1998). Evidence for impaired assimilation and increased colonic fermentation of protein, related to gastric acid suppression therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 12(10), 1011-1019.
- Flint, F.O., Pickering, K., (1984). Demonstration of collagen in meat products by an improved micro-sirius red polarisation method. *Analyst* 109, 1505-1506.
- Fox, J.B., (1980). Diffusion of chloride, nitrite, and nitrate in beef and pork. *Journal of Food Science* 45(6), 1740-1744.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., Greve, E., Yoon, K., Santé-Lhoutellier, V., (2009a). Determination of aromatic amino acid content in cooked meat by derivative spectrophotometry: Implications for nutritional quality of meat. *Food Chemistry* 114(3), 1074-1078.
- Gatellier, P., Kondjoyan, A., Portanguen, S., Santé-Lhoutellier, V., (2010). Effect of cooking on protein oxidation in n-3 polyunsaturated fatty acids enriched beef. Implication on nutritional quality. *Meat Science* 85(4), 645-650.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., (2009). Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor. *Meat Science* 81(2), 405-409.
- Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., Portanguen, S., Kondjoyan, A., (2009b). Use of meat fluorescence emission as a marker of oxidation promoted by cooking. *Meat Science* 83(4), 651-656.
- Gault, N.F.S., (1985). The relationship between water-holding capacity and cooked meat tenderness in some beef muscles as influenced by acidic conditions below the ultimate pH. *Meat Science* 15(1), 15-30.
- Gault, N.F.S., (1991). Marinated meat in: Lawrie, R. (Ed.), *Developments in Meat Science-5*. Elsevier Applied Science, London, pp. 191-246.
- Gerrard, J.A., (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology* 13(12), 391-399.
- Geypens, B., Claus, D., Evenepoel, P., Hiele, M., Maes, B., Peeters, M., Rutgeerts, P., Ghoo, Y., (1997). Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut* 41(1), 70-76.
- Ghavimi, B., Althen, T.G., Rogers, R.W., (1987). Effects of tumbling at various speeds on some characteristics of restructured cured beef. *Journal of Food Science* 52(3), 543-.
- Gheisari, H.R., Motamedi, H., (2010). Chloride salt type/ionic strength and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in cattle, camel and chicken meat. *Meat Science* 86(2), 377-383.
- Giddings, G.G., (1977). Basis of color in muscle foods. *Journal of Food Science* 42(2), 288-294.

- Gillett, T.A., Cassidy, R.D., Simon, S., (1981). Effect of Continuous Massaging on Bind, Yield, and Color of Hams. *Journal of Food Science* 46(6), 1681-1683.
- Gillett, T.A., Cassidy, R.D., Simon, S., (1982). Ham Massaging. Effect of Massaging Cycle, Environmental Temperature and Pump Level on Yield, Bind, and Color of Intermittently Massaged Hams. *Journal of Food Science* 47(4), 1083-1088.
- Girard, J.P., (1988). *Technologie de la viande et des produits carnés*. Lavoisier, Paris.
- Goli, T., (2012). Comportement des matrices protéiques acidifiées par immersion concentrée. Thèse, Ecole doctorale, Sciences des Procédés-Sciences des Aliments. Université, Montpellier II.
- Goli, T., Ricci, J., Bohuon, P., Marchesseau, S., Collignan, A., (2014). Influence of sodium chloride and pH during acidic marination on water retention and mechanical properties of turkey breast meat. *Meat Science* 96(3), 1133-1140.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 177(2), 751-766.
- Gotoh, T., Shikama, K., (1976). Generation of superoxide radical during autoxidation of oxymyoglobin. *Journal of Biochemistry* 80(2), 397-399.
- Graiver, N., Pinotti, A., Califano, A., Zaritzky, N., (2006). Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering* 77(4), 910-918.
- Graiver, N., Pinotti, A., Califano, A., Zaritzky, N., (2009). Mathematical modeling of the uptake of curing salts in pork meat. *Journal of Food Engineering* 95(4), 533-540.
- Groenlund, K., Boles, J.A., Swan, J., (2007). Cooked turkey roasts have different processing characteristics than cooked beef roasts. *Fleischwirtschaft International* 4, 70-72.
- Gros, J.B., Rûegg, M., (1987). Determination of the apparent diffusion coefficient of sodium chloride in model foods and cheese. In *Physical properties of foods-2 : COST 90bis*, Jowitt R., Escher T., Mc Kenna F.B. and Roques M., Elsevier, 71-108.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., De Smet, S., (2006). Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Science* 74(3), 476-486.
- Hansen, C.L., van der Berg, F., Ringgaard, S., Stødkilde-Jørgensen, H., Karlsson, A.H., (2008). Diffusion of NaCl in meat studied by  $^1\text{H}$  and  $^{23}\text{Na}$  magnetic resonance imaging. *Meat Science* 80(3), 851-856.
- Harkouss, R., (2014). Effet du salage et du séchage sur la dynamique d'évolution de la protéolyse, de la structure et de la texture lors de la fabrication d'un jambon sec. Développement d'un modèle de « jambon numérique » couplant transferts d'eau, de sel et protéolyse. Thèse, Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur. Université Clermont Ferrand II, p. 169.
- Harkouss, R., Astruc, T., Lebert, A., Gatellier, P., Loison, O., Safa, H., Portanguen, S., Parafita, E., Mirade, P.S., (2015). Quantitative study of the relationships among proteolysis,

lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. *Food Chemistry* 166, 522–530.

Hernandez, P., Park, D., Rhee, K.S., (2002). Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. *Meat Science* 61(4), 405-410.

Hullberg, A., Lundstrom, K., (2004). The effects of RN genotype and tumbling on processing yield in cured-smoked pork loins. *Meat Science* 67(3), 409-419.

James, S.J., James, C., (2000). Microbiology of refrigerated meat. *Meat Refrigeration*, 3-19.

Jeremiah, L.E., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L., Gibson, L.L., (2003). Assessment of the chemical and cooking properties of the major beef muscles and muscle groups. *Meat Science* 65(3), 985-992.

Jul, M., (1984). *The quality of frozen foods*. Academic Press, London.

Kamin-Belsky, N., Brillon, A.A., Arav, R., Shaklai, N., (1996). Degradation of myosin by enzymes of the digestive system: Comparison between native and oxidatively cross-linked protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(7), 1641-1646.

Kanner, J., Doll, L., (1991). Ferritin in turkey muscle tissue: a source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 39(2), 247-249.

Kanner, J., Harel, S., Jaffe, R., (1991). Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(6), 1017-1021.

Kanner, J., Hazan, B., Doll, L., (1988). Catalytic Free Iron Ions in Muscle Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36(3), 412-415.

Katsaras, K., Budras, K., (1993). The relationship of the microstructure of cooked ham to its properties and quality. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 26(3), 229-234.

Ke, S., Huang, Y., Decker, E.A., Hultin, H.O., (2009). Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. *Meat Science* 82(1), 113-118.

Kerry, J.F., Morrissey, P.A., Buckley, D.J., (1999a). The rheological properties of exudates from cured porcine muscle: effects of added polysaccharides and whey protein/polysaccharide blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(10), 1260-1266.

Kerry, J.F., Stack, F., Buckley, D.J., (1999b). The rheological properties of exudates from cured porcine muscle- effects of added non-meat proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 101-106.

King, A.J., Bosch, N., (1990). Effect of NaCl and KCl on rancidity of dark turkey meat heated by microwave. *Journal of Food Science* 55(6), 1549-1551.

Knockaert, C., (1989). Les marinades des produits de la mer. *Sdp Ifremer*, 78.

Kondjoyan, A., McCann, M.S., Rouaud, O., Havet, M., Foster, A., Swain, M., Daudin, J.D., (2006). Modelling coupled heat-water transfers during a decontamination treatment of the surface of solid food products by a jet of hot air II. Validations of product surface temperature

- and water activity under fast transient air temperature conditions. *Journal of Food Engineering* 76, 63-69.
- Kondjoyan, A., Ouilic, S., Portanguen, S., Gros, J.B., (2013). Combined heat transfer and kinetic models to predict cooking loss during heat treatment of beef meat. *Meat Science* 95(2), 336-344.
- Krause, R.J., Ockerman, H.W., Krol, B., Moerman, P.C., Plimpton, R.F., (1978). Influence of tumbling, tumbling time, trim and sodium tripolyphosphate on quality and yield of cured hams. *Journal of Food Science* 43(3), 853-855.
- Lachowicz, K., Sobczak, M., Gajowiecki, L., Zych, A., (2003). Effects of massaging time on texture, rheological properties, and structure of three pork ham muscles. *Meat Science* 63(2), 225-233.
- Laroche, M., (1978). Factors affecting water losses during cooking of meat. *Annales De Technologie Agricole* 27(4), 849-871.
- Lea, C.H., (1939). *Rancidity in edible fats*. Chemical Publishing Company Incorporated, New York.
- Lebert, A., Daudin, J.-D., (2014). Modelling the distribution of aw, pH and ions in marinated beef meat. *Meat Science* 97(3), 347-357.
- Lee, K.C., Chin, K.B., (2011). Evaluation of various salt levels and different dairy proteins in combination with microbial transglutaminase on the quality characteristics of restructured pork ham. *International Journal of Food Science & Technology* 46(7), 1522-1528.
- Lee, S.H., Joo, S.T., Ryu, Y.C., (2010). Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science* 86(1), 166-170.
- Lee, S.K., Mei, L., Decker, E.A., (1997). Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. *Meat Science* 46(4), 349-355.
- Lefaucheur, L., (2010). A second look into fibre typing - relation to meat quality. *Meat Science* 84(2).
- Lepetit, J., (1991). Theoretical strain ranges in raw meat. *Meat Science* 29, 271-283.
- Lepetit, J., Culioli, J., (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science* 36, 203-237.
- Lepetit, J., Salé, P., (1985). Analyse du comportement rhéologique de la viande par une méthode de compression sinusoidale. *Sciences des Aliments* 5(4), 521-540.
- Lepetit, J., Salé, P., Ouali, A., (1986). Post-mortem evolution of rheological properties of the myofibrillar structure. *Meat Science* 16, 161-164.
- Liu, G., Xiong, Y.L., (2000). Electrophoretic Pattern, Thermal Denaturation, and in Vitro Digestibility of Oxidized Myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3), 624-630.
- Lund, M.N., Hviid, M.S., Skibsted, L.H., (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science* 76(2), 226-233.

- Mabrouk, A., Dugan, L.R., Jr., (1960). A kinetic study of the autoxidation of methyl linoleate and linoleic acid emulsions in the presence of sodium chloride. *Journal of the American Oil Chemists Society* 37(10), 486-490.
- MacFarlane, J.J., Schmidt, G.R., Turner, R.H., (1977). Binding of Meat Pieces - Comparison of Myosin, Actomyosin and Sarcoplasmic Proteins As Binding Agents. *Journal of Food Science* 42(6), 1603-1605.
- Martin, J.M., (2012). Meat curing technology, in: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of meat and meat processing*. CRC Press, Taylor&Francis Group, London, pp. 531-546.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., Renerre, M., (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7), 2481-2487.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Renerre, M., (2004). Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science* 66(2), 467-473.
- Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H., Renerre, M., (1998). Effect of dietary fat and vitamin E on colour stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Science* 48(3/4), 301-318.
- Monin, G., Ouali, A., (1991). Muscle differentiation and meat quality, in: Lawrie, R. (Ed.), *Developments in Meat Science-5*. Elsevier Applied Science, London, pp. 89-157.
- Morzell, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., Laville, E., (2006). Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science* 73(3), 536-543.
- O'Neill, L.M., Galvin, K., Morrissey, P.A., Buckley, D.J., (1999). Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Science* 52(1), 89-94.
- Offer, G., Knight, P., (1988). The structural basis of water-holding in meat, in: Lawrie, R. (Ed.), *Developments in meat science - 4. Chapter 3-4*. Elsevier Applied Science, London, pp. 63-243.
- Oillic, S., Lemoine, E., Gros, J.B., Kondjoyan, A., (2011). Kinetic analysis of cooking losses from beef and other animal muscles heated in a water bath - Effect of sample dimensions and prior freezing and ageing. *Meat Science* 88(3), 338-346.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., Stadtman, E.R., (1987). Age-related-changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry* 262(12), 5488-5491.
- Olkiewicz, M., Senik, I., Tyszkiewicz, I., (1995). Pork meat tumbling, binding ability of exudate, *41st Annual International Congress of Meat Science and Technology*, August 20-25, San Antonio, Texas, U.S.A., pp. 491-492.
- Omolosho, D.A., (1982). La déshydratation de la viande. Contribution à l'étude des aspects microbiologiques et techniques Thèse, Université de Clermont II.

- Onenc, A., Serdaroglu, M., Abdraimov, K., (2004). Effect of various additives to marinating baths on some properties of cattle meat. *European Food Research and Technology* 218, 114-117.
- Oreskovich, D.C., Bechtel, P.J., McKeith, F.K., Novakofski, J., Basgall, E.J., (1992). Marinade pH affects textural properties of beef. *Journal of Food Science* 57(2), 305-311.
- Orsingher, G., Jacquet, B., Tassencourt, L., (1974). Tenue de tranche et rendement du jambon cuit. *Revue Alimentation* 12, 25-30.
- Ouali, A., (1991). Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *INRA Production Animale* 4(3), 195-208.
- Pathania, A., McKee, S.R., Bilgili, S.F., Singh, M., (2010). Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology* 139(3), 214-217.
- Pearson, A.M., Young, R.B., (1989). *Muscle and meat biochemistry*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Pérez, M.L., Escalona, H., Guerrero, I., (1998). Effect of calcium chloride marination on calpain and quality characteristics of meat from chicken, horse, cattle and rabbit. *Meat Science* 48(1-2), 125-134.
- Petran, R.L., Zottola, E.A., (1989). A Study of Factors Affecting Growth and Recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Science* 54(2), 458-460.
- Pietrasik, Z., Shand, P.J., (2004). Effect of blade tenderization and tumbling time on the processing characteristics and tenderness of injected cooked roast beef. *Meat Science* 66(4), 871-879.
- Pinotti, A., Graiver, N., Califano, A., Zaritzky, N., (2002). Diffusion of Nitrite and Nitrate Salts in Pork Tissue in the Presence of Sodium Chloride. *Journal of Food Science* 67(6), 2165-2171.
- Porcine myology (2015) University of Nebraska, USA, p. <http://porcine.unl.edu/>.
- Promeyrat, A., (2013). Analyse et modélisation des mécanismes à l'origine des modifications des protéines lors du chauffage du tissu musculaire. Thèse, Ecole doctorale SVSAE, Université de Clermont-Ferrand, p. 327.
- Promeyrat, A., Bax, M.L., Traoré, S., Aubry, L., Sante-Lhoutellier, V., Gatellier, P., (2010a). Changed dynamics in myofibrillar protein aggregation as a consequence of heating time and temperature, *Meat Science*, pp. 625-631.
- Promeyrat, A., Daudin, J.D., Astruc, T., Danon, J., Gatellier, P., (2013). Kinetics of protein physicochemical changes induced by heating in meat using mimetic models: (2) Effects of fibre type, peroxides and antioxidants. *Food Chemistry* 138(4), 2283-2290.
- Promeyrat, A., Gatellier, P., Lebret, E., Kajac, K., Aubry, L., Santé-Lhoutellier, V., (2010). Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chemistry* 121(2), 412-417.

- Puolanne, E., Halonen, M., (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science* 86(1), 151-165.
- Puolanne, E.J., Ruusunen, M.H., Vainionpää, J.I., (2001). Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate. *Meat Science* 58(1), 1-7.
- Rao, M.V., Gault, N.F.S., Kennedy, S., (1989). Variations in water-holding capacity due to changes in the fibre diameter, sarcomere length and connective tissue morphology of some beef muscles under acidic conditions below the ultimate pH. *Meat Science* 26(1), 19-37.
- Realini, C.E., Venien, A., Gou, P., Gatellier, P., Perez-Juan, M., Danon, J., Astruc, T., (2013). Characterization of Longissimus thoracis, Semitendinosus and Masseter muscles and relationships with technological quality in pigs. 1. Microscopic analysis of muscles. *Meat Science* 94(3), 408-416.
- Reichert, J., Färber, D., Flachmann, A., (1985). Scheibenzusammenhalt bei Kochschinken - Teil 4. *Die Fleischerei* 1, 16-22.
- Renner, M., Anton, M., Gatellier, P., (1992). Autoxidation of purified myoglobin from 2 bovine muscles. *Meat Science* 32(3), 331-342.
- Rhee, K.S., Smith, G.C., Terrell, R.N., (1983). Effect of reduction and replacement of sodium-chloride on rancidity development in raw and cooked ground pork. *Journal of Food Protection* 46(7), 578-&.
- Rhee, M.S., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., (2004). Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science* 82(2), 534-550.
- Ripoche, A., (2000). Contribution au contrôle de la fabrication du jambon cuit supérieur. Thèse, Ecole doctorale ABIES, ENSIA. p. 129.
- Rougier, T., Bonazzi, C., Daudin, J.D., (2007). Modelling incidence of lipid and sodium chloride contents on sorption curves of gelatine in the high humidity range. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology* 40, 1798-1807.
- Rougier, T., (2006). Caractérisation et modélisation des transferts d'eau et de solutés en vue d'une aide à la formulation des aliments composites - Cas des assemblages base céréalière – fourrage humide protéique ". Thèse, Ecole doctorale ABIES, ENSIA. p 271.
- Rowe, L.J., Maddock, K.R., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., (2004). Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *Journal of Animal Science* 82(3), 785-793.
- Ruusunen, M., Sarkka-Tirkkonen, M., Puolanne, E., (2001). Saltiness of coarsely ground cooked ham with reduced salt content. *Agricultural and Food Science in Finland* 10(1), 27-32.
- Sabah, J.R., Juneja, V.K., Fung, D.Y.C., (2004). Effect of spices and organic acids on the growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked ground beef. *Journal of Food Protection* 67(9), 1840-1847.

- Sallam, K., Ahmed, A.M., Elgazzar, M.M., Eldaly, E.A., (2007). Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *Food Chemistry* 102(4), 1061-1070.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Greve, E., Gatellier, P., (2008a). Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4), 1488-1494.
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Marinova, P., Grève, E., Gatellier, P., (2008b). Effect of meat cooking on physicochemical state and in vitro digestibility of myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4), 1488-1494.
- Sante-Lhoutellier, V., Aubry, L., Gatellier, P., (2007). Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13), 5343-5348.
- Santé-Lhoutellier, V., Engel, E., Gatellier, P., (2008c). Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. *Food Chemistry* 109(3), 573-579.
- Saravacos, G.D., Maroulis, Z.B., (2001). *Transport Properties of Foods*. Marcel Dekker Inc, New York, 415.
- Sarraga, C., Carreras, I., Regueiro, J.A.G., (2002). Influence of meat quality and NaCl percentage on glutathione peroxidase activity and values for acid-reactive substances of raw and dry-cured *Longissimus dorsi*. *Meat Science* 62(4), 503-507.
- Sarraga, C., Garcia-Regueiro, J.A., (1998). Oxidation of microsomal fraction in the processing conditions of dry-cured ham. The in-vitro effect of brine. *Meat Science* 50(3), 295-302.
- Scanga, J.A., Delmore, J., Ames, R.P., Belk, K.E., Tatum, J.D., Smith, G.C., (2000). Palatability of beef steaks marinated with solutions of calcium chloride, phosphate, and (or) beef-flavoring. *Meat Science* 55(4), 397-401.
- Shanks, B.C., Wulf, D.M., Maddock, R.J., (2002). Technical note: The effect of freezing on Warner-Bratzler shear force values of beef longissimus steaks across several postmortem aging periods. *Journal of Animal Science* 80(8), 2122-2125.
- Sheard, P.R., Nute, G.R., Richardson, R.I., Wood, J.D., (2005). Effects of breed and marination on the sensory attributes of pork from Large White and Hampshire-sired pigs. *Meat Science* 70(4), 699-707.
- Sheard, P.R., Tali, A., (2004). Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. *Meat Science* 68(2), 305-311.
- Sheehan, D., Hrapchak, B., (1980). *Theory and practice of histotechnology (2nd ed.)*. Ohio: Battelle Press.
- Shelef, L.A., (1984). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6(1), 29-44.

- Siegel, D.G., Theno, D.M., Schmidt, G.R., (1978). Meat massaging: The effects of salt, phosphate and massaging on the presence of specific skeletal muscle proteins in the exudate of a sectioned and formed ham. *Journal of Food Science* 43(2), 327-330.
- Sindelar, J.J., Prochaska, F., Britt, J., Smith, G.L., Osburn, W.N., (2003). Strategies to eliminate atypical aromas and flavors in sow loins--part II: consumer acceptance of loins marinated with sodium tripolyphosphate and sodium bicarbonate. *Meat Science* 65(4), 1223-1230.
- Siro, I., Vén, C., Balla, C., Jonas, G., Zeke, I., Friedrich, L., (2009). Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. *Journal of Food Engineering* 91(2), 353-362.
- Solignat, G., Mangin, P., (2003). *Produits de charcuterie - Procédés de transformation* Technique de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire.
- Solomon, L.W., Norton, H.W., Schmidt, G.R., (1980). Effect of vacuum and rigor condition on cure absorption in tumbled porcine muscles. *Journal of Food Science* 45(3), 438-440.
- Souci, S.W., Frachmann, W., Kraut, H., (2008). La composition des aliments Tableaux des valeurs nutritives. 7ème édition. MedPharm Scientific Publishers, Taylor & Francis, Allemagne, 1364.
- Stadtman, E.R., (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins - biochemical-mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9(4), 315-325.
- Sugawara, Y., Shikama, K., (1980). Autoxidation of native oxymyoglobin - thermodynamic analysis of the pH profile. *European Journal of Biochemistry* 110(1), 241-246.
- Szerman, N., Gonzalez, C.B., Sancho, A.M., Grigioni, G., Carduza, F., Vaudagna, S.R., (2007). Effect of whey protein concentrate and sodium chloride addition plus tumbling procedures on technological parameters, physical properties and visual appearance of sous vide cooked beef. *Meat Science* 76(3), 463-473.
- Theno, D.M., Siegel, D.G., Schmidt, G.R., (1978a). Meat massaging: Effects of salt and phosphate on the microstructural composition of the muscle exudate. *Journal of Food Science* 43(2), 483-487.
- Theno, D.M., Siegel, D.G., Schmidt, G.R., (1978b). Meat massaging: effects of salt and phosphate on the ultrastructure of cured porcine muscle. *Journal of Food Science* 43(2), 488-492.
- Tomaszewska-Gras, J., Konieczny, P., (2012). Effect of marination on the thermodynamic properties of chicken muscle proteins studied by DSC. *Czech Journal of Food Sciences* 30(4).
- Velinov, P.D., Zhikov, M.V., Cassens, R.G., (1990). The effect of tumbling, sodium-chloride and polyphosphates on the microstructure and appearance of whole-muscle processed meats. *Food Structure* 9(2), 91-95.
- Vestergaard, C., Andersen, B.L., Adler-Nissen, J., (2007). Sodium diffusion in cured pork determined by <sup>22</sup>Na radiology. *Meat Science* 76(2), 258-265.

- Vestergaard, C., Risum, J., Adler-Nissen, J., (2004). Quantification of salt concentrations in cured pork by computed tomography. *Meat Science* 68(1), 107-113.
- Vestergaard, C., Risum, J., Adler-Nissen, J., (2005). <sup>23</sup>Na-MRI quantification of sodium and water mobility in pork during brine curing. *Meat Science* 69(4), 663-672.
- Villacis, M.F., Rastogi, N.K., Balasubramaniam, V.M., (2008). Effect of high pressure on moisture and NaCl diffusion into turkey breast. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology* 41(5), 836-844.
- Villamonte, G., Simonin, H., Durantou, F., Cheret, R., de Lamballerie, M., (2013). Functionality of pork meat proteins: Impact of sodium chloride and phosphates under high-pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 18, 15-23.
- Wang, Z., Xu, Y., Zhang, J., Li, X., Lin, Z., Ma, C., (2011). Proteolysis, protein oxidation and protease activity in dry-cured Xuanwei ham during the salting stages. *International Journal of Food Science and Technology* 46(7), 1370-1377.
- Watts, B.M., (1954). Oxidative rancidity and discoloration in meat. *Advances in Food Research* 5, 1-52.
- Wenham, L.M., Locker, R.H., (1976). The effect of marinading on beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27(12), 1079-1084.
- Wirth, F., (1974). Brühwurst Herstellung Heute : Wasser bindung, Fettbindung Struktur. *Fleischwirtschaft* 54, 192-196.
- Xargayo, M., Freixanet, L., Lagares, J., Fernandez, E., De Jaeger-Ponnet, P., (1998). Effects of pre-massaging in the manufacture of whole muscle cooked meat products. *Fleischwirtschaft International* 5, 20-24.
- Xiong, Y.L., (2005). Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. *Food Research International* 38(3), 281-287.
- Xu, S.Q., Zhou, G.H., Peng, Z.Q., Zhao, L.Y., Yao, R.U.I., (2009). The influence of polyphosphate marination on simmental beef shear value and ultrastructure. *Journal of Muscle Foods* 20(1), 101-116.
- Yongsawatdigul, J., Park, J.W., (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. *Food Chemistry* 83(3), 409-416.
- Young, L.L., Smith, D.P., (2007). Marination pressure and phosphate effects on broiler breast fillet yield, tenderness, and color. *Poultry Science* 86(12), 2666-2670.
- Yusop, S.M., O'Sullivan, M.G., Kerry, J.F., Kerry, J.P., (2010). Effect of marinating time and low pH on marinade performance and sensory acceptability of poultry meat. *Meat Science* 85(4), 657-663.
- Zakrys, P.I., Hogan, S.A., O'Sullivan, M.G., Allen, P., Kerry, J.P., (2008). Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Science* 79(4), 648-655.

Zochowska-Kujawska, J., Lachowicz, K., Sobczak, M., (2012). Effects of fibre type and kefir, wine lemon, and pineapple marinades on texture and sensory properties of wild boar and deer longissimus muscle. *Meat Science* 92(4), 675-680.



## Annexes



## *Annexe 1 – DETAILS DES METHODES BIOCHIMIQUES*

### Préparation d'extraits bruts:

Une solution d'extraction isotonique est préparée en diluant 11,2 g de chlorure de potassium (KCL) dans un litre d'eau distillée. Un mL de Butyl Hydroxytoluène (BHT) est ajouté comme antioxydant. Le BHT est préparé dans de l'éthanol à la concentration de 0,1 M. Cette solution d'extraction KCL 0,15 M / BHT 0,1 mM est conservée à 4°C pendant une semaine. L'extrait brut provient de 0,5 g de l'échantillon broyé dans 5 ml de solution pendant 20 secondes à l'aide d'un broyeur (Ultra-Turrax) ; ce dernier est réparti dans 5 tubes en polypropylène à raison de 1 mL par tube. On évite toute contamination bactérienne ou dénaturation des protéines de la viande par congélation à -80°C, jusqu'aux analyses.

### Préparation du tampon phosphate 40 mM (force ionique = 0.24 M (pH 6)) :

On met 24 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans une cuve puis on complète à un litre d'eau distillée solution (1), on met 28,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans une cuve puis on complète à un litre d'eau distillée solution (2), on prend 174,5 mL de la solution (1) et 24,6 ml de la solution (2) puis on complète à un litre avec d'eau distillée.

### Dosage des protéines par la méthode de Biuret :

Un prélèvement de 200 µL de la solution homogénéisée est effectué en double, en même temps nous prélevons 200 µL de BSA (10 mg/ml) en double et 200 µL d'eau distillée. Nous ajoutons les réactifs de Biuret dans chaque tube : 200 µl de Cholate (0,4 %), 300 µl de sulfate de cuivre (1%) et 3 ml de NaOH (10%), les tubes sont agités pendant 30 minutes puis centrifugées (4000 rpm) pendant 15 min à 4°C. Après centrifugation nous prélevons 1 ml de surnageant pour mesurer la densité optique à 540 nm et 760 nm. La concentration de protéines C (mg/ml) est calculée à partir de la formule :

$$C = 10 * (DO_{540} - DO_{760}) \text{ échantillon} / (DO_{540} - DO_{760}) \text{ BSA}$$

## *Annexe 1 – DETAILS DES METHODES BIOCHIMIQUES*

### Dosage des carbonyles

Une suspension de protéines myofibrillaires est centrifugée (4000 rpm) pendant 15 min à 4°C. Nous ajoutons au culot de centrifugation 500 µl de DNPH 0,2 % p/v, préparé dans de l'acide HCl 2 N. Après fragmentation à la spatule cette préparation est incubée 1 heure à température ambiante en agitant au vortex, puis centrifugée de nouveau.

Les culots de protéines, désormais marquées au DNPH, sont lavés trois fois par un solvant contenant de l'éthanol 50 % et de l'acétate d'éthyle 50 %, avec pour chaque lavage élimination du surnageant, fragmentation des culots à spatule, solubilisation des culots dans le solvant et sédimentation par centrifugation. Les tubes contenant les culots sont égouttés environ une heure sur du papier absorbant sous hotte aspirante.

Les culots sont solubilisés avec 2 ml de guanidine à une concentration de 6 M ; une agitation durant 30 min permet de solubiliser un maximum de protéines. On centrifuge pour éliminer les protéines non solubilisées (comme le collagène) et on conserve le surnageant.

L'absorbance des surnageants est mesurée au spectrophotomètre à 370 nm contre un blanc de guanidine 6 M. Puis ils sont dilués au quart dans de la guanidine 6 M pour une seconde lecture de densité optique à 280 nm. Cette seconde lecture permet d'évaluer le taux de protéines dans l'échantillon, mais aussi d'intégrer un facteur de correction, car le DNPH absorbe également à 280 nm. En effet, l'absorbance du DNPH à 280 nm est égale à 0,29 fois l'absorbance à 370 nm. La densité optique corrigée (DO 280 corrigée) est telle que :

$$\text{DO 280 corrigée} = 4 * \text{DO280 mesurée} - 0,29 * \text{DO370nm}$$

Le taux de carbonyles de l'échantillon, exprimé en nanomoles par milligramme de protéines, est calculé à partir des deux densités optiques mesurées précédemment, par comparaison avec une standard albumine dans la guanidine 6 M, par la formule suivante :

$$\text{Taux de Carbonyles} = (\text{DO370nm} * 0,65) / (\text{DO280nm corrigée} * 21) / 1000$$

Où 0,65 est l'absorbance à 280 nm d'une solution standard de BSA à 1 mg/ml dans la guanidine 6 M, et 21 le coefficient d'absorption millimolaire des phényl hydrazones à 370 nm.

## *Annexe 1 – DETAILS DES METHODES BIOCHIMIQUES*

### Mesure des thiols libres

On ajoute 2250 µl de tampon (urée 8 M + phosphate de sodium 100 mM à pH 8) à 250 µl de protéines myofibrillaires homogénéisées dans le tampon d'extraction. On centrifuge et on récupère ensuite le surnageant

La densité optique (DO1) des solutions protéiques est mesurée à 386 nm contre un blanc (tampon phosphate et urée). On mesure aussi l'absorbance à 280 nm d'une solution de BSA à 2 mg/ml préparée dans le même tampon. La concentration des protéines est calculée à partir de la formule :

$$\text{Concentration de protéine} = \text{DO}_{280 \text{ nm}} * 1 / \text{DOBSA}$$

Où DOBSA=1.

On ajoute 25 µl de DTNP (31 mg DTNP préparé dans 10 ml de l'éthanol), puis on agite 60 minutes sur une plaque d'agitation dans un emballage d'aluminium pour éviter une dénaturation du DTNP par la lumière. La longueur d'onde spécifique d'absorption du DTNP est égale à 386 nm. La mesure précédente, effectuée avec l'extrait protéique seul, sans DTNP (DO1), permet de corriger la ligne de base.

On mesure la (DO2) à 386 nm des échantillons, contre un blanc de tampon (2,5 ml) + 25 µl de DTNP et on calcule la concentration des groupements –SH libres :

$$\text{SH libres} = (\text{DO2} - \text{DO1}) / 14000 * \text{concentration des protéines en mg par ml}$$

Où 14000 est le coefficient d'absorption du DTNP.

## Annexe 2 - LES CARACTERISTIQUES DIMENSIONNELLES DE DEUX GAMMES DE BARATTES PROPOSEES PAR DEUX CONSTRUCTEURS

---



Exemple d'une baratte pilote de capacité 100 kg.

Les barattes proposées par le fabricant ARMOR INOX

volume L	diamètre (mm)	capacité kg
200	600	100
1000	950	550
2000	1100	1100
4000	1400	2200
6000	1700	3300
9000	1900	5000
12000	2000	6600

Les barattes proposées par le fabricant LUTETIA

diamètre (mm)	capacité kg
660	150
972	400
1122	800 à 1000
1340	1400 à 1500
1340	1600 à 2000
1950	2800 à 4000
1950	5000 à 6000

### Relation entre l'alimentation des moteurs qui font tourner le filet contenant le muscle et la vitesse de rotation de ce filet (Vf).

Pour trouver cette relation, 7 essais ont été faits en faisant varier l'alimentation entre 6 et 12 volts, pour chaque essai nous avons mesuré le temps en minutes (t) et le nombre de tours correspondant (N), donc  $V_f = N/t$ .

Nous avons trouvé une relation est linéaire :

$V_f = 0.6678x - 0.0117$  où x est la tension d'alimentation en volt

Nous pouvons choisir une vitesse de rotation du filet entre 4 et 8 tours par minute à l'aide du diagramme présenté en Figure A3-1.

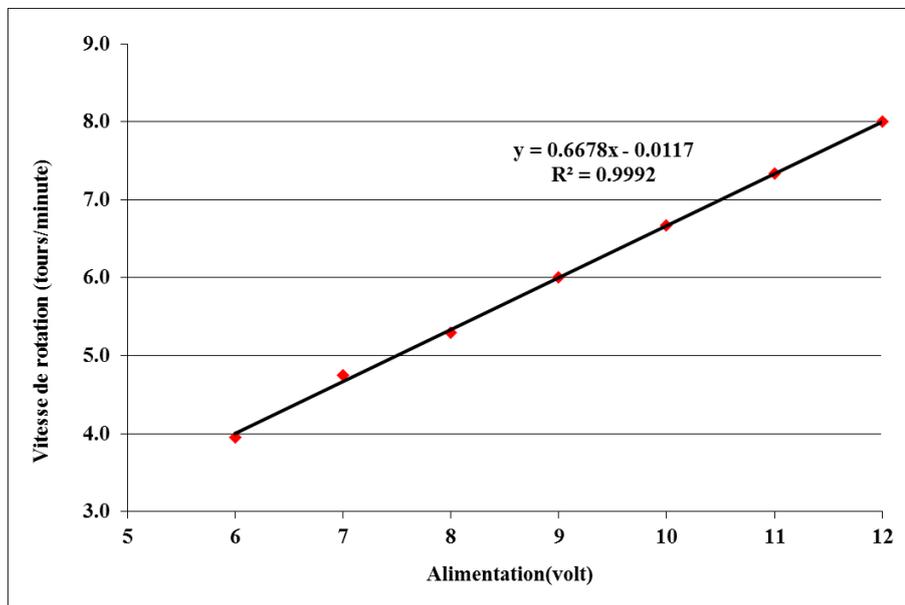


Figure A3-1 : relation entre l'alimentation des moteurs et la vitesse de rotation du filet contenant le muscle.

### Relation entre la course commandée du piston et la course vraie :

Nous avons remarqué qu'il y a un léger décalage entre la distance de déplacement de piston commandée (affichée sur l'appareil de commande) et la course vraie (mesurée par le capteur de distance).

Nous avons fait plusieurs essais pour trouver cette relation en faisant varier, d'une part, la durée de compression (0.2, 0.5 et 0.8 secondes), et d'autre part, la course commandée (entre 10 et 40 mm) pour un nombre de compressions égal à 30.

Ces essais nous ont permis de trouver les relations linéaires suivantes (tableau A3-1) qui ont permis de corriger la commande.

### Annexe 3 - REGLAGES DU SIMULATEUR DE MALAXAGE

Durée de compression	Relation entre la course commandée et la course vraie
0.2	$y = 0,9601 x + 2,6777$
0.5	$y = 1,046 x + 0,4191$
0.8	$y = 1,033 x + 0,2081$

Tableau A3-1 : la relation entre la course commandé (y) et la course vraie (x) exprimées en mm.

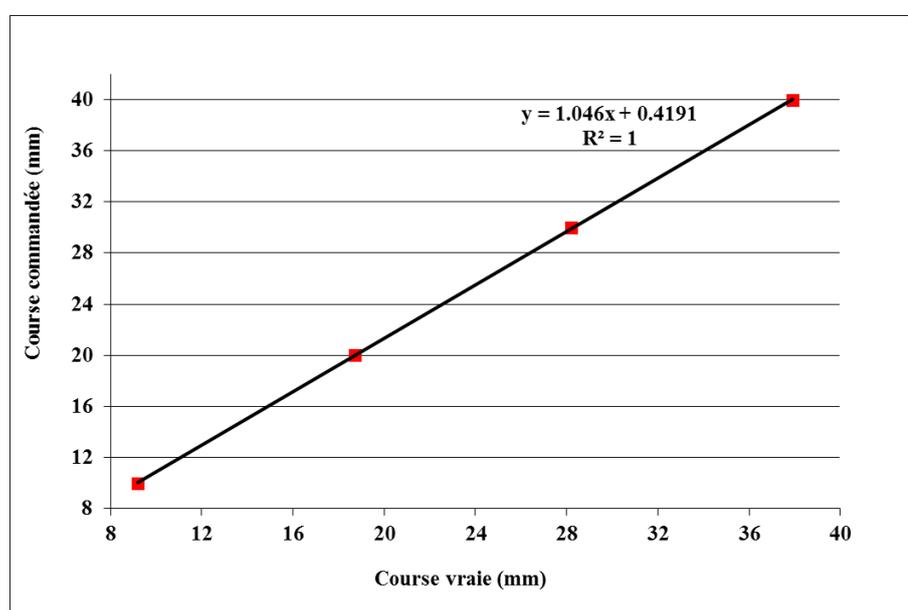


Figure A3-2 : un exemple de la relation entre la course commandée et la course vraie (durée de compression 0.5 seconde)

### Annexe 3 - REGLAGES DU SIMULATEUR DE MALAXAGE

#### Relation entre les durées, commandée et mesurée, de l'intervalle de temps (s) entre deux compressions successives:

Nous avons aussi remarqué un décalage entre la durée d'intervalle commandée (affichée sur l'appareil) et la durée d'intervalle mesurée (ou vraie) entre deux compressions successives.

Nous avons effectué plusieurs essais en faisant varier la durée de compression entre 0.2 et 0.8 secondes et la durée d'intervalle (6, 12, 18, 24 et 30 secondes). Nous avons appliqué une course de compression unique égale à 30 mm et un nombre de compression égale à 30 par condition.

La relation linéaire suivante détermine la relation entre la durée commandée et la durée vraie d'intervalle:

$$y = 1.0345 x - 1.0345$$

où y est la durée d'intervalle commandée et x celle mesurée (ou vraie) Figure (A3-3)

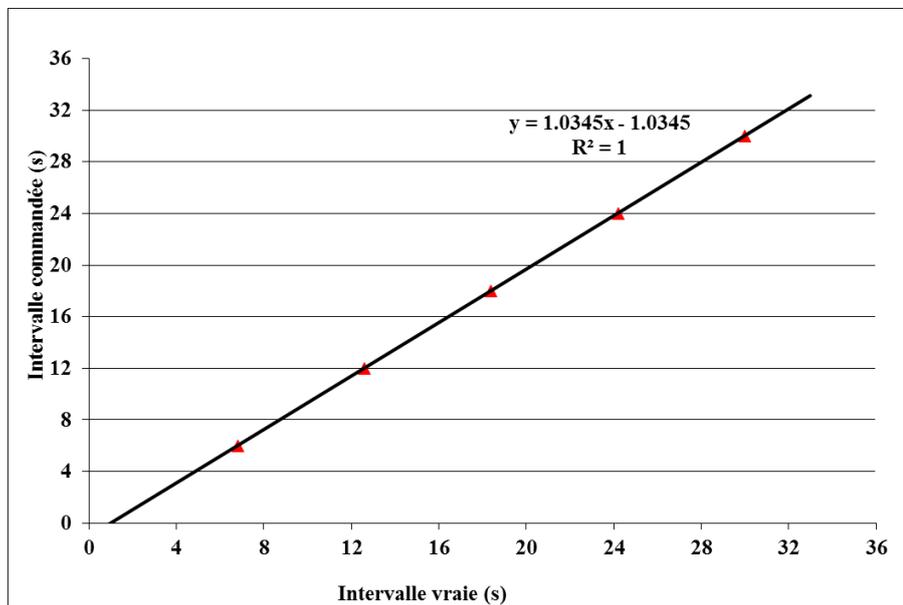


Figure A3-3 : la relation entre les durées d'intervalle commandée et vraie entre deux compressions

#### Mesure de l'épaisseur moyenne du morceau de la viande (Mt)

L'épaisseur moyenne du muscle mis en place dans la cuve du simulateur est mesurée par un réglet, coulissant dans la direction de déplacement du piston et muni à l'extrémité inférieure d'une plaque orthogonale à cette direction qui vient s'appuyer sur le muscle. Nous mesurons l'épaisseur moyenne du muscle à partir de 21 mesures (7 mesures au milieu du morceau dans le sens longitudinal et 7 mesures entre ce milieu et chaque extrémité) ; chacune des 7 mesures sur une section correspond à une position angulaire du muscle dans la cuve.

## Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE

---

Cette annexe présente deux exemples de dépouillement des mesures relatives au traitement des mesures mécaniques (Temps, Position du piston, Force) pendant un essai de saumuration-malaxage d'un muscle.

**Exemple du traitement d'un essai 'court', soit 45 minutes et 350 compressions, avec un taux de compression cible TC égal à 30 %, une saumure de concentration 5 % et un muscle RF (RF-C-5-C30-22-02-12)**

*Quelques cycles de compressions :*

Les cycles complets, ou bruts, des mesures Force-Position du piston (Figure A4-1) et leurs équivalents après traitements (Figure A4-2 ), c'est à dire après avoir conservé seulement les mesures correspondant à la compression effective du muscle

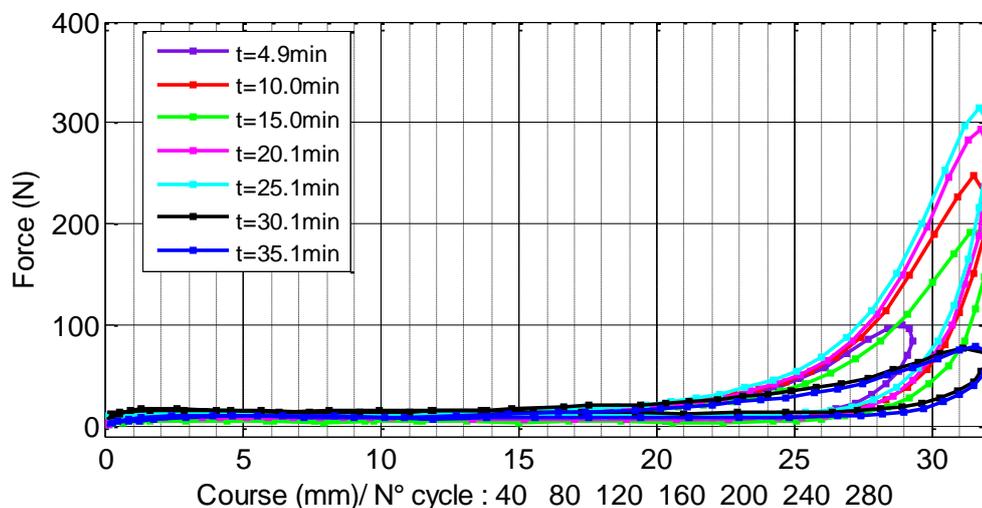


Figure A4-1 : la force mesurée (N) en fonction de la course (mm) pour 7 cycles bruts prélevés de l'essai (RF-C-5-C30-22-02-12)

Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE

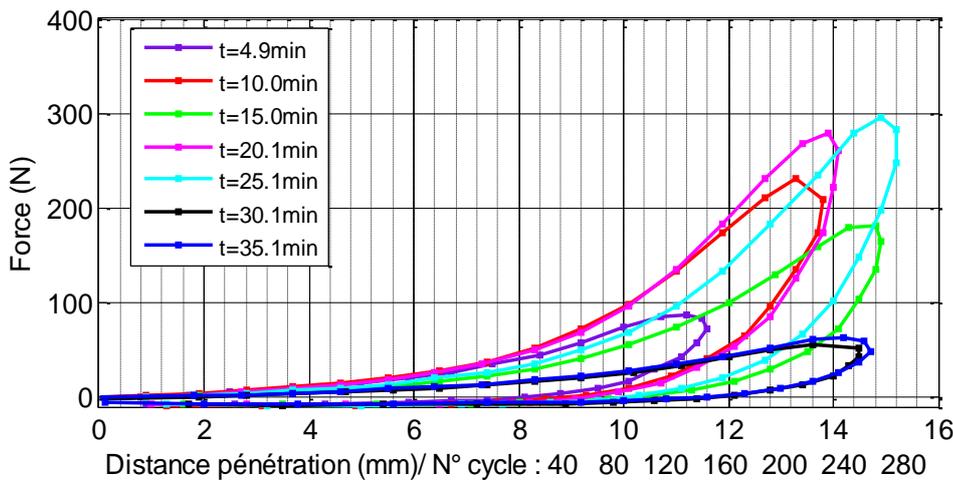


Figure A4-2 : la force mesurée (N) en fonction de la distance de pénétration du piston dans le muscle (mm) pour les 7 cycles bruts de la Figure A4-1

Synthèse des mesures sur la totalité de l'essai : la Figure A4-3 montre les valeurs des trois paramètres caractéristiques du traitement mécanique (TC mesuré, Fmax, force maximale enregistrée lors d'une compression et E, énergie de déformation); la Figure A4-4 montre qu'il y peu de corrélation entre le taux de compression mesuré qui varie de 24 à 36 et Fmax; le tableau A4-1 indique la régularité du traitement mécanique moyen sur des périodes de 10 minutes (les valeurs moyennes et médianes calculées sur ces périodes varient peu).

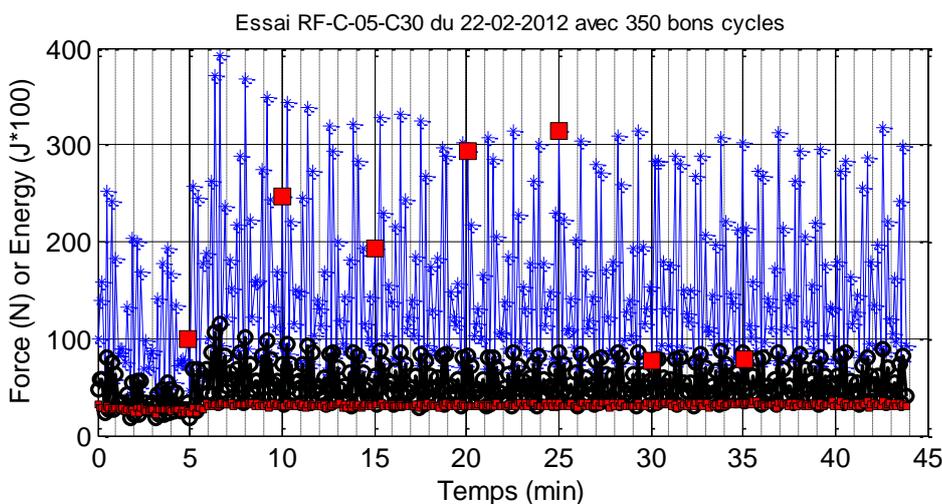


Figure A4-3 : la force (bleu), l'énergie transmise à la viande (noire) et le taux de compression mesuré (rouge) pour l'essai (RF-C-5-C30-22-02-12). Les carrés rouges correspondent aux cycles N° 40, 80, 120, 160, 200, 240 et 280 présentés sur les Figures A4-1 et A4-2.

*Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE*

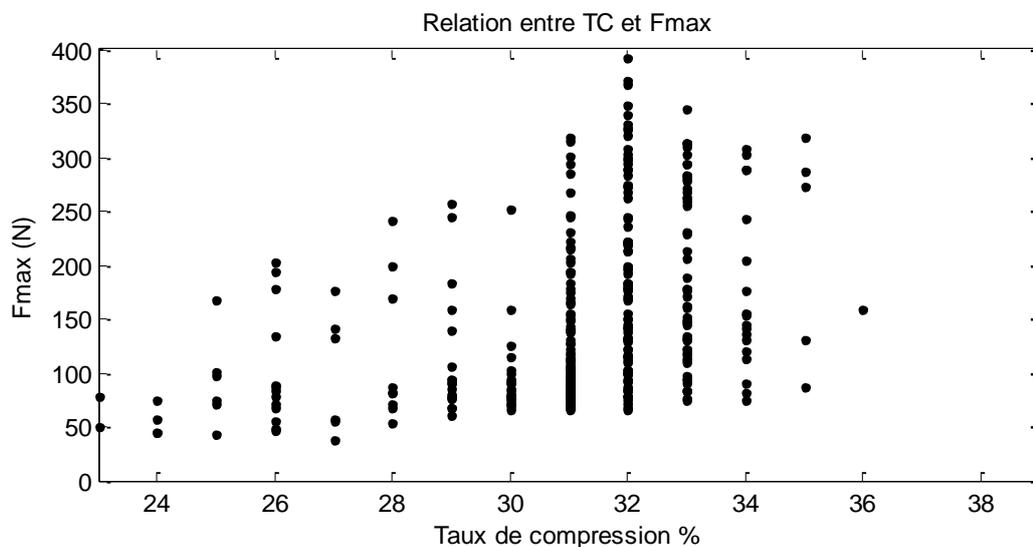


Figure A4-4 : relation entre le taux de compression mesuré TC (%) et la force maximale enregistrée lors d'une compression (N) pour l'essai RF-C-5-C30-22-02-12

Tableau A4-1 : les valeurs moyennes et médianes de TC mesuré, Fmax et E pour l'essai (RF-C-5-C30-22-02-12) de 10 à 20 min, de 20 à 30 min, de 30 à 40 min et pendant la durée totale (45min) de l'essai

essai	RF-C-5-C30 (22.02.12)			
	0 à 45	de 10 à 20	de 20 à 30	de 30 à 40
TC % (médiane)	31	31	31	32
TC % (moyenne)	31	31.3	31.6	32.1
Ecartype.TC	2.3	1.2	1.3	1.4
Fmax (N)(médiane)	122	126	125	128
Fmax(N)(moyenne)	148.9	155	150	150
Ecartype.Fmax	80.7	85	77	75
E(mJ) (médiane)	461	487	480	472
E(mJ) (moyenne)	514.7	533	519	524
Ecartype.E	190.9	191	173	171

## Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE

Exemple du traitement d'un essai 'long', soit 5 heures et environ 2500 compressions, avec un taux de compression cible TC égal à 30 %, une saumure de concentration 13 % et un muscle SM (SM-L-13-C30-21.02.12)

Quelques cycles de compressions :

Les cycles complets, ou bruts, des mesures Force-Position du piston (Figure A4-5) et leurs équivalents après traitements (Figure A4-6), c'est à dire après avoir conservé seulement les mesures correspondant à la compression effective du muscle

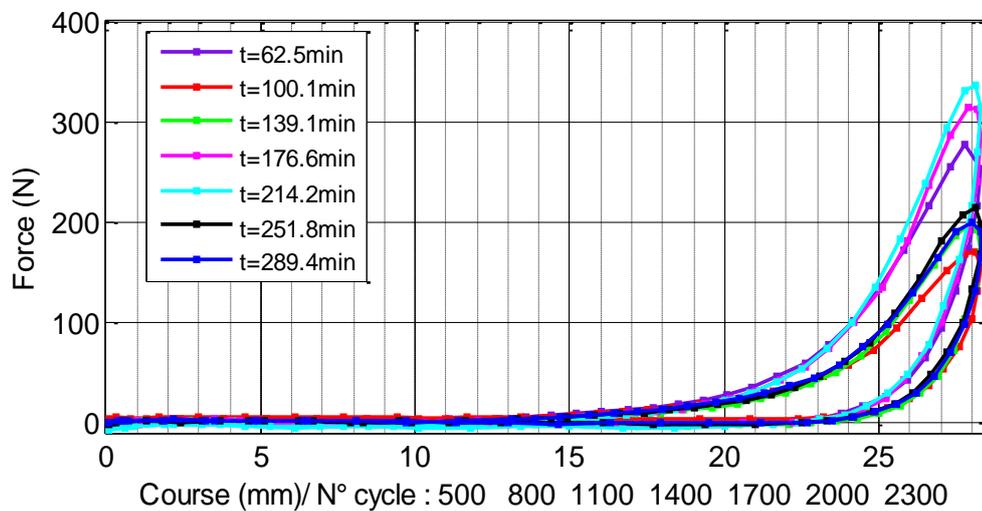


Figure A4-5 : la force mesurée (N) en fonction de la course (mm) pour 7 cycles bruts prélevés de l'essai (SM-L-13-C30-21.02.12)

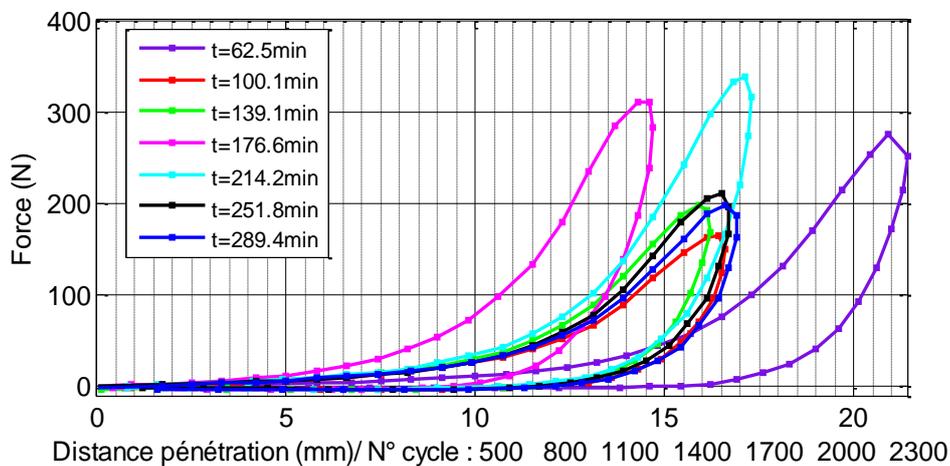


Figure A4-6 : la force mesurée (N) en fonction de la distance de pénétration du piston dans le muscle (mm) pour les 7 cycles bruts de la figure A4-5

## Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE

Synthèse des mesures sur la totalité de l'essai : la Figure A4-7 montre les valeurs des trois paramètres caractéristiques du traitement mécanique (TC mesuré, Fmax, force maximale enregistrée lors d'une compression et E, énergie de déformation); la Figure A4-8 montre qu'il n'y pas de corrélation entre le taux de compression mesuré qui varie de 24 à 36 et Fmax; le tableau A4-2 indique la régularité du traitement mécanique moyen sur des périodes de 50 minutes (les valeurs moyennes et médianes calculées sur ces périodes varient peu).

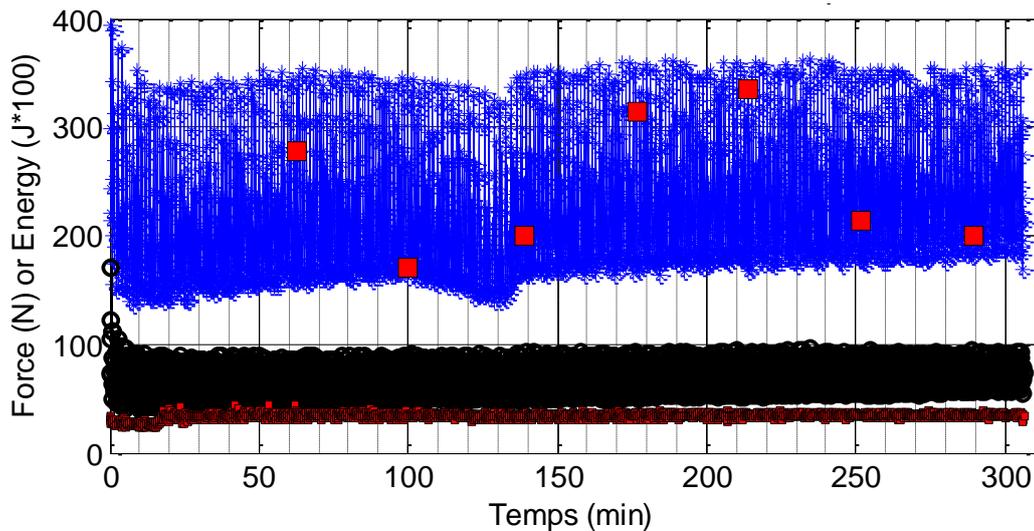


Figure A4-7 : la force (bleu), l'énergie transmise à la viande (noire) et le taux de compression (rouge) pour l'essai (SM-L-13-C30-21.02.12). Les carrés rouges correspondent à la force (N) pour les cycles N° 500, 800, 1100, 1400, 1700, 2000 et 2300 présentés sur les Figures A4-5 et A4-6.

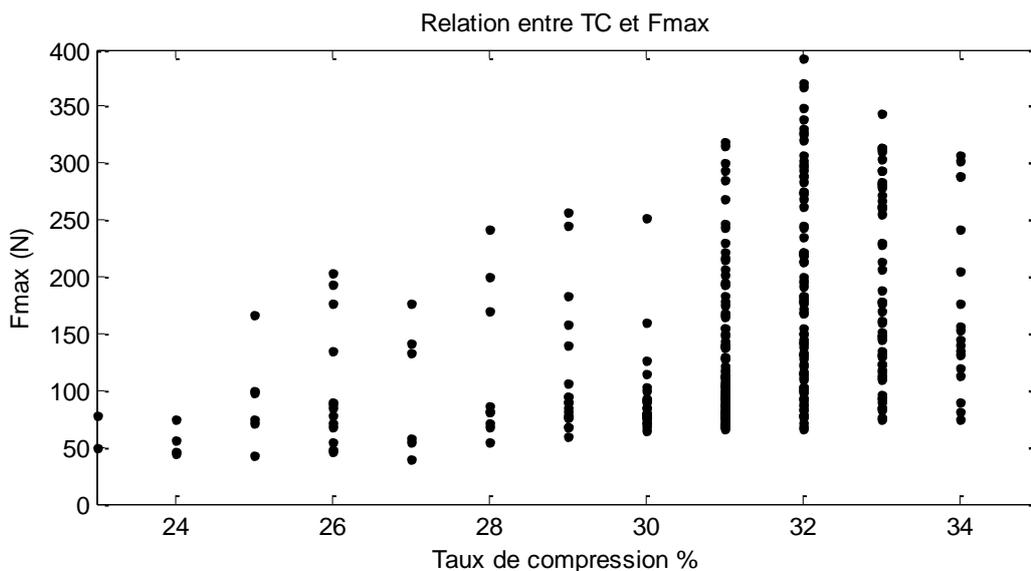


Figure A4-8 : la relation entre le taux de compression mesuré TC (%) et la force max (N) pour l'essai SM-L-13-C30-21-02-12

*Annexe 4 - EXEMPLES DE TRAITEMENTS DES MESURES 'FORCE-DEPLACEMENT' LORS DE SERIES DE COMPRESSIONS IMPOSEES A UN MUSCLE DANS LE SIMULATEUR DE MALAXAGE*

Tableau A4-2 : les valeurs moyennes et médianes de TC mesuré, Fmax et E pour l'essai (SM-L-13-C30-21.02.12) de 50 à 100 min, de 100 à 150 min, de 150 à 200 min et pendant la durée totale (305 min) de l'essai.

essai	SM-L-13-C30 (21.02.12)				
	tout l'essai 306	de 50 à 100	de 100 à 150	de 150 à 200	de 200 à 250
TC % (médiane)	34	34	33	34	34
TC % (moyenne)	33.6	34.2	33.6	34.3	34.1
Ecartype.TC	2.5	2.2	1.7	1	1.6
Fmax (N)(médiane)	206	195	192	208	216
Fmax(N)(moyenne)	227.4	221	232	242	239
Ecartype. Fmax	62.3	62	61	56	60
E(mJ) (médiane)	615	570	583	605	641
E(mJ)(moyenne)	649.4	615	656	696	680
Ecartype. E	138.3	134	129	117	128

## Annexe 5 – SYNTHÈSE DES MESURES MÉCANIQUES EFFECTUÉES PENDANT LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE AVEC LE SIMULATEUR DE MALAXAGE

Les tableaux A5-1 et A5-4 montrent que pour les deux muscles, nous avons pu obtenir les taux de compression souhaités. Nous avons obtenu des valeurs moyennes sur 3 essais compris entre 11 et 15 % pour un taux de compression cible de 10 %, et des valeurs entre 27 et 31 % pour une cible à 30 %.

Les valeurs de Fmax (Tableaux A5-2 et A5-5) et E (Tableaux A5- 3 etA5- 6) étaient toujours plus grands avec le muscle SM qu'avec le muscle RF :

- Les valeurs de Fmax étaient en moyenne de 35 N à TC 10 % et de 135 N à TC 30 % pour le muscle RF ; pour le muscle SM ces valeurs étaient en moyenne de 40 N à TC 10 % et de 170 N à TC 30 %.
- Les valeurs de E étaient en moyenne de 100 mJ à TC 10% et de 500 mJ à TC 30% pour le muscle RF ; pour le muscle SM ces valeurs étaient semblables à TC 10% et supérieure d'environ 10% (550 mJ) à TC 30%.

Tableau A5-1 : les valeurs moyennes de taux de compression TC (%) pour tous les essais pour le muscle RF

essai	TC % de 3 répétitions			Moyenne TC %	Ecartype TC
	1	2	3		
RF-C-5-C10	9.4	12.9	12.0	11.4	1.8
RF-C-13-C10	11.9	10.9	13.8	12.2	1.5
RF-L-5-C10	-	14.0	16.6	15.3	1.8
RF-L-13-C10	11.5	13.7	13.2	12.8	1.2
RF-C-5-C30	28.4	31.0	30.6	30.0	1.4
RF-C-13-C30	28.0	26.8	29.2	28.0	1.2
RF-L-5-C30	35.2	27.5	28.7	30.5	4.1
RF-L-13-C30	28.3	23.7	28.1	26.7	2.6

*Annexe 5 – SYNTHÈSE DES MESURES MÉCANIQUES EFFECTUÉES PENDANT LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE AVEC LE SIMULATEUR DE MALAXAGE*

Tableau A5-2 : les valeurs moyennes de la force max (N) pour tous les essais pour le muscle RF

essai	Fmax (N) % de 3 répétitions			Moyenne Fmax (N)	Ecartype Fmax
	1	2	3		
RF-C-5-C10	18.1	40.9	50.7	36.6	16.7
RF-C-13-C10	34.1	28.2	31.3	31.2	2.9
RF-L-5-C10	-	42.9	30.7	36.8	8.6
RF-L-13-C10	32.3	39.6	42.9	38.3	5.4
RF-C-5-C30	148.2	148.9	133.8	143.6	8.5
RF-C-13-C30	83.3	178.5	129.5	130.4	47.6
RF-L-5-C30	109.0	136.9	163.3	136.4	27.1
RF-L-13-C30	114.5	123.0	149.5	129.0	18.2

Tableau A5-3 : les valeurs moyennes de l'énergie de déformation (mJ) pour tous les essais pour le muscle RF

essai	E (mJ) de 3 répétitions			Moyenne E (mJ)	Ecartype E
	1	2	3		
RF-C-5-C10	53.5	129.2	172.7	118.5	60.3
RF-C-13-C10	83.2	83.8	92.2	86.4	5.0
RF-L-5-C10	-	92.2	109.6	100.9	12.3
RF-L-13-C10	67.4	100.9	92.2	86.8	17.4
RF-C-5-C30	493.6	514.7	620.4	542.9	67.9
RF-C-13-C30	254.5	546.3	586.7	462.5	181.3
RF-L-5-C30	369.7	500.3	619.4	496.5	124.9
RF-L-13-C30	402.1	441.4	650.6	498.0	133.6

Tableau A5- 4 : les valeurs moyennes de taux de compression TC (%) pour tous les essais pour le muscle SM

essai	TC % de 3 répétitions			Moyenne TC %	Ecartype TC
	1	2	3		
SM-C-5-C10	11.1	16.2	10.2	12.5	3.2
SM-C-13-C10	10.2	13.7	11.1	11.7	1.9
SM-L-5-C10	10.2	13.3	11.8	11.8	1.5
SM-L-13-C10	-	12.5	16.4	14.5	2.8
SM-C-5-C30	27.2	33.4	30.4	30.3	3.1
SM-C-13-C30	25.2	31.5	28.1	28.3	3.2
SM-L-5-C30	28.1	29.2	28.0	28.4	0.7
SM-L-13-C30	27.8	33.6	24.6	28.7	4.5

*Annexe 5 – SYNTHÈSE DES MESURES MÉCANIQUES EFFECTUÉES PENDANT LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE AVEC LE SIMULATEUR DE MALAXAGE*

Tableau A5-5 : les valeurs moyennes de la force (N) pour tous les essais pour le muscle SM

essai	Fmax (N) % de 3 répétitions			Moyenne Fmax (N)	Ecartype Fmax
	1	2	3		
SM-C-5-C10	43.2	58.6	42.0	48.0	9.3
SM-C-13-C10	42.0	24.9	43.2	36.7	10.2
SM-L-5-C10	48.1	32.0	47.0	42.4	9.0
SM-L-13-C10	-	39.0	40.0	39.5	0.7
SM-C-5-C30	248.8	213.8	103.9	188.8	75.6
SM-C-13-C30	226.2	134.7	98.0	153.0	66.0
SM-L-5-C30	225.5	127.0	126.3	159.6	57.1
SM-L-13-C30	300.8	227.4	184.4	237.5	58.9

Tableau A5- 6 : les valeurs moyennes de l'énergie de déformation (mJ) pour tous les essais pour le muscle SM

essai	E (mJ) de 3 répétitions			Moyenne E (mJ)	Ecartype E
	1	2	3		
SM-C-5-C10	101.0	150.6	106.2	119.3	27.3
SM-C-13-C10	106.2	82.0	101.0	96.4	12.7
SM-L-5-C10	108.0	101.0	57.0	88.7	27.6
SM-L-13-C10	-	94.0	97.0	95.5	2.1
SM-C-5-C30	808.8	733.9	287.8	610.2	281.7
SM-C-13-C30	677.0	495.8	283.0	485.3	197.2
SM-L-5-C30	773.9	558.0	463.4	598.4	159.1
SM-L-13-C30	847.1	649.4	531.8	676.1	159.4

*Annexe 5 – SYNTHÈSE DES MESURES MÉCANIQUES EFFECTUÉES PENDANT LES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE AVEC LE SIMULATEUR DE MALAXAGE*

Tableau 7 : toutes les valeurs de TC, Fmax et E quand à TC cible était de 10 %

	TC cible de 10%					
	TC mesuré %		Fmax (N)		E (mJ)	
	SM	RF	SM	RF	SM	RF
1	11.1	9.4	43.2	18.1	101.0	53.5
2	16.2	12.9	58.6	40.9	150.6	129.2
3	10.2	12.0	42.0	50.7	106.2	172.7
4	10.2	11.9	42.0	34.1	106.2	83.2
5	13.7	10.9	24.9	28.2	82.0	83.8
6	11.1	13.8	43.2	31.3	101.0	92.2
7	10.2	-	48.1	-	108.0	-
8	13.3	14.0	32.0	42.9	101.0	92.2
9	11.8	16.6	47.0	30.7	57.0	109.6
10	-	11.5	-	32.3	-	67.4
11	12.5	13.7	39.0	39.6	94.0	100.9
12	16.4	13.2	40.0	42.9	97.0	92.2
Moyenne	12.4	12.7	41.8	35.6	100.4	97.9
Ecart type	2.3	1.9	8.6	8.9	22.2	31.8

Tableau 8 : toutes les valeurs de TC, Fmax et E quand TC cible était de 30 %

	TC cible de 30%					
	TC mesuré %		Fmax (N)		E (mJ)	
	SM	RF	SM	RF	SM	RF
1	27.2	28.4	248.8	148.2	808.8	493.6
2	33.4	31.0	213.8	148.9	733.9	514.7
3	30.4	30.6	103.9	133.8	287.8	620.4
4	25.2	28.0	226.2	83.3	677.0	254.5
5	31.5	26.8	134.7	178.5	495.8	546.3
6	28.1	29.2	98.0	129.5	283.0	586.7
7	28.1	35.2	225.5	109.0	773.9	369.7
8	29.2	27.5	127.0	136.9	558.0	500.3
9	28.0	28.7	126.3	163.3	463.4	619.4
10	27.8	28.3	300.8	114.5	847.1	402.1
11	33.6	23.7	227.4	123.0	649.4	441.4
12	24.6	28.1	184.4	149.5	531.8	650.6
Moyenne	28.9	28.8	184.7	134.9	592.5	500.0
Ecart type	2.9	2.7	65.3	25.6	189.4	117.4

Annexe 6 – SYNTHÈSE DES MESURES DES TENEURS EN EAU ET EN NaCl A LA FIN DES ESSAIS DE SAUMURAGE-MALAXAGE

		Teneur en eau et en sel des échantillons malaxés-saumurés et des témoins (en %)							
		RF				SM			
		Teneur en eau		Teneur en NaCl		Teneur en eau		Teneur en NaCl	
essais	échantillons	Moyenne	écartype	Moyenne	écartype	Moyenne	écartype	Moyenne	écartype
C-13-C10	Témoin	77,33	0,58	0,04	0,02	74,67	0,58	0,03	0,03
	Surface	77,00	1,00	2,43	0,94	75,00	0,00	2,01	0,36
	Intermédiaire	76,67	1,15	0,10	0,05	76,00	1,00	0,08	0,04
	Milieu	77,67	1,15	0,06	0,01	75,67	0,58	0,06	0,03
C-13-C30	Témoin	76,67	0,58	0,06	0,02	72,33	0,58	0,03	0,02
	Surface	76,33	1,53	2,86	0,08	74,67	1,53	2,35	0,25
	Intermédiaire	76,33	0,58	0,34	0,38	75,00	1,00	0,07	0,04
	Milieu	76,00	1,00	0,08	0,04	75,33	1,15	0,05	0,02
L-13-C-10	Témoin	76,33	1,53	0,04	0,02	73,67	1,53	0,02	0,01
	Surface	76,00	1,00	4,54	0,36	72,33	0,58	4,28	0,57
	Intermédiaire	76,00	1,00	0,11	0,09	73,67	1,15	0,08	0,04
	Milieu	75,67	1,53	0,05	0,04	74,00	1,00	0,04	0,00
L-13-C30	Témoin	78,67	2,08	0,04	0,03	73,33	1,53	0,03	0,00
	Surface	76,00	0,00	5,15	0,37	74,67	1,15	5,82	0,06
	Intermédiaire	76,00	1,00	0,19	0,05	75,33	1,15	0,30	0,14
	Milieu	77,33	0,58	0,08	0,04	75,00	1,00	0,05	0,03
C-5-C10	Témoin	76,33	0,58	0,01	0,01	74,00	1,00	0,03	0,00
	Surface	77,00	1,73	0,56	0,14	74,00	1,00	0,71	0,20
	Intermédiaire	75,67	0,58	0,04	0,04	73,33	0,58	0,04	0,00
	Milieu	75,00	1,00	0,02	0,02	74,33	0,58	0,03	0,00
C-5-C30	Témoin	77,33	1,15	0,01	0,02	74,00	1,73	0,02	0,01
	Surface	77,00	1,00	0,95	0,08	75,00	2,00	0,93	0,10
	Intermédiaire	76,00	0,00	0,08	0,05	73,67	1,53	0,07	0,04
	Milieu	76,33	0,58	0,03	0,02	73,33	0,58	0,04	0,02
L-5-C-10	Témoin	77,67	0,58	0,03	0,02	72,67	0,58	0,03	0,01
	Surface	79,00	3,00	1,83	0,20	75,33	1,15	1,50	0,10
	Intermédiaire	77,00	1,00	0,17	0,13	72,33	3,06	0,07	0,01
	Milieu	77,00	0,00	0,12	0,13	73,33	2,08	0,04	0,01
L-5-C30	Témoin	77,00	0,00	0,05	0,02	73,67	1,15	0,02	0,02
	Surface	77,67	2,31	2,09	0,07	75,33	3,21	1,75	0,18
	Intermédiaire	77,00	1,00	0,22	0,15	73,67	1,53	0,05	0,01
	Milieu	76,67	0,58	0,15	0,12	74,00	1,73	0,03	0,02