

UNE MÉTHODE POUR DÉTERMINER SI LE POISSON EST A L'ÉTAT FRAIS OU DÉCONGELÉ

par Marc MOREL

— La vente de poisson décongelé présenté comme poisson frais constitue une sorte de tromperie bien que la réglementation française ne soit pas très explicite en la matière. C'est pourquoi divers chercheurs se sont attachés à mettre au point un test objectif susceptible de différencier les poissons frais des poissons décongelés. —

Au Canada, E. Gould a mis en évidence deux formes de l'enzyme malique, l'une présente normalement dans le sarcoplasme et l'autre, sous forme latente, qui apparaît après congélation.

R. Hamm et L. Körmendy, dans un même ordre d'idée, distinguent dans les viandes de porc et de bœuf les glutamate oxaloacétate transaminase mitochondriale (GOT_M) et sarcoplasmique (GOT_S).

Nous avons tenté d'appliquer aux poissons cette méthode que R. Guillot, J.M. Lisch et R. Rosset ont déjà utilisée pour les viandes congelées.

1. Principe de la méthode.

R. Hamm et L. Körmendy ont montré que dans la viande de porc et de bœuf une transaminase, la GOT se présente sous deux formes (isoenzymes) ; la GOT sarcoplasmique ou GOT_S et la GOT mitochondriale ou GOT_M.

La congélation a pour effet de fragiliser les parois des mitochondries, ce qui facilite le passage en solution dans le sarcoplasme de la GOT_M. Après congélation il y aura donc présence des deux formes de la GOT dans le sarcoplasme alors qu'il n'en existait qu'une seule à l'état frais.

La méthode consiste à isoler ces isoenzymes par électrophorèse et à les révéler par une réaction spécifique.

2. Description de la méthode.

Préparation de l'extrait enzymatique.

Les extraits peuvent être préparés soit par presse soit par centrifugation.

Selon la 1^{re} technique, des morceaux de filets sont pressés afin de recueillir environ 5 ml de jus. La pression ne doit pas dépasser 10 kg/cm² sinon les cellules et les parois des mitochondries pourraient être brisées. Le suc de muscle ainsi obtenu est dilué au 1/2 avec une solution 0,05 M de tampon phosphate.

Selon la seconde technique, des morceaux de filets sont centrifugés à 17 000 t/mn pendant 30 mn à 0 °C. l'extrait surnageant est filtré si nécessaire puis dilué comme précédemment avec le tampon phosphate.

Électrophorèse.

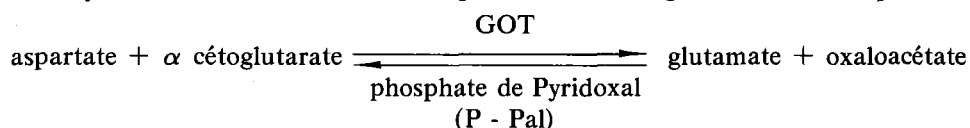
L'électrophorèse est faite sur un support d'acétate de cellulose (Cellogel RS 5 × 25 cm). Ces plaques sont plongées 30 mn dans un tampon phosphate 0,025 M, essorées puis mises en place dans la cuve à électrophorèse maintenue à + 2° / + 4 °C.

5 µl de la solution protéique à analyser sont déposés sur une largeur de 2,5 cm au milieu de la plaque. Plusieurs extraits peuvent être disposés sur une même membrane à condition que les bandes extrêmes restent assez éloignées du bord de la plaque. La séparation électrophorétique dure 4 heures sous une intensité constante de 5 mA par bande.

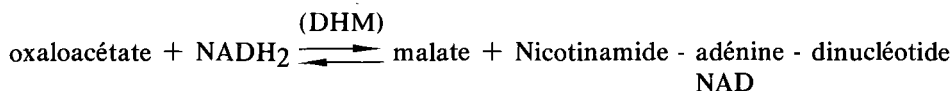
Révélation des isoenzymes.

La ou les GOT qui ont migré lors de l'électrophorèse sont révélées à l'aide des réactions décrites ci-dessous.

La GOT catalyse le transfert de l'azote de l'aspartate à l'α cétooglutarate selon l'équation suivante :



L'oxaloacétate, donc indirectement la GOT, est mis en évidence en utilisant une seconde réaction enzymatique :



Cette réaction a été choisie car le Dihyronicotinamide - adénine - dinucléotide (NADH₂) absorbe spécifiquement la radiation $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ et peut par conséquent être dosé par spectrophotométrie UV à 366 mµ. Une diminution de la quantité de NADH₂ sera directement liée à l'activité de la GOT.

En vaporisant le mélange α cétooglutarate - aspartate - phosphate de Pyridoxal - NADH₂ - DHM, il est donc possible, par examen sous la lampe UV à 366 mµ d'évaluer une variation de l'activité GOT.

Le réactif de révélation se prépare à partir de 2 ml d'une solution de Merck livrée prête à l'emploi qui contient l'aspartate, l'α cétooglutarate et la DHM. On y ajoute 2 ml de solution de P - Pal 0,005 % et 4 à 5 mg de NADH₂. Après révélation, la teneur en GOT peut être déterminée par enregistrement de la densité optique dans l'UV.

3. Résultats.

La méthode a été appliquée à 4 espèces de poissons (merlan, tacaud, grondin, maquereau) avant et après congélation à - 30 °C. De plus le merlan a été entreposé quelques jours en glace fondante afin de voir l'influence de l'état de fraîcheur sur la validité du test.

Les extraits obtenus à partir des chairs fraîches présentent surtout la forme sarcoplasmique GOT_S alors que ceux obtenus à partir de chairs décongelées présentent les deux formes GOT_S et GOT_M en quantité à peu près égale (fig. 1).

Les extraits de poissons frais ne présentent cependant que très rarement la bande de GOT_S. Il est en effet difficile de concevoir qu'il n'y ait aucune rupture mitochondriale lors de la préparation des extraits. De plus la dénaturation due à l'entreposage, même très court, libère une partie de la GOT_M.

Pour éliminer cette cause d'erreur on procède comme suit. Sur les échantillons prélevés une partie est congelée et analysée comparativement avec celle non traitée; si l'électrophorèse ne révèle aucune différence entre les deux c'est que le poisson soumis à l'analyse était congelé, par contre si une nette différence est visible l'échantillon n'avait pas subi de congélation préalable.

Limite de validité du test.

La présence de la GOT_M dans les extraits de poisson en bon état de fraîcheur (1 à 2 j de glace fondante) nous a amené à suivre les modifications qui pourraient intervenir durant l'entreposage.

Lorsque le merlan est mis dans la glace fondante pendant 1, 4, 6 et 8 jours, la quantité de GOT_S mise en évidence après électrophorèse reste constante au cours du temps tandis que celle de GOT_M augmente

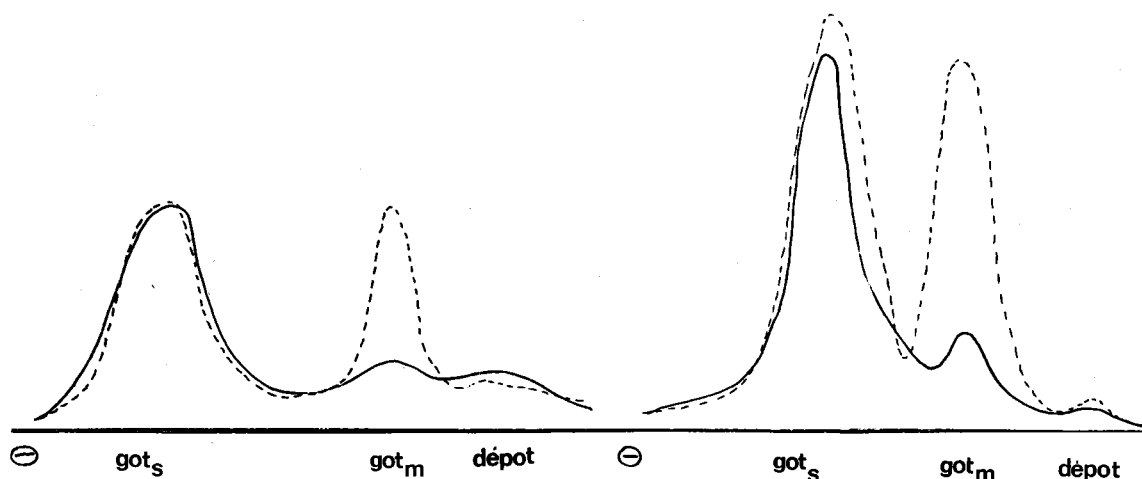


Fig. 1. — Spectre UV respectif d'extraits de poissons frais de 1 à 2 jours de glace et de poissons décongelés; à gauche: merlan, à droite: grondin; trait: poisson frais; pointillé: poisson congelé.

avec la durée de l'entreposage (fig. 2). A la limite, il devient difficile de distinguer au bout de 8 jours en glace si le poisson a été congelé ou non.

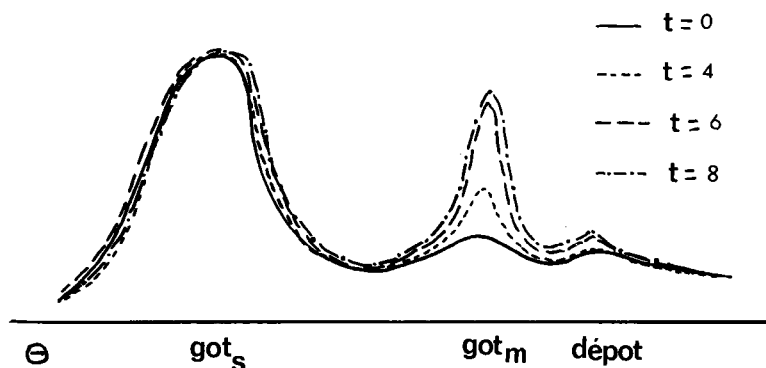


Fig. 2. — Évolution de la teneur en GOT_M chez le merlan entreposé en glace fondante.

Pour rendre plus efficace le « test GOT » nous l'avons complété par des mesures d'altération. Nous avons suivi parallèlement l'évolution au cours du temps des teneurs en GOT_M et GOT_S et celles fournies par les différents tests d'altération: cotation organoleptique, azotes volatils (ABVT, TMA) produits de dégradation de l'Adénosine triphosphate (ATP).

$$\text{Rapport K} = \frac{\text{Inosine} + \text{Hypoxanthine}}{\text{Inosine} + \text{Hypoxanthine} + \text{Inosine monophosphate}} \times 100$$

	T = 0	T = 1,5 j	T = 4 j	T = 6 j	T = 8 j	Congelé
$\frac{GOT_M}{GOT_S}$	0,11	—	0,27	0,37	0,38	0,7
ABVT mg/100 g	10,24	11,03	14,97	21,67	55,55	—
TMA mg/100 g	3,16	3,54	5,91	9,85	18,91	—
K %	40	42	56	80	88	—
Cotation I.S.T.P.M.	1,3	1,5	2,05	2,65	3,25	—

Tabl. 1. — Évolution de l'altération du merlan entreposé en glace fondante.

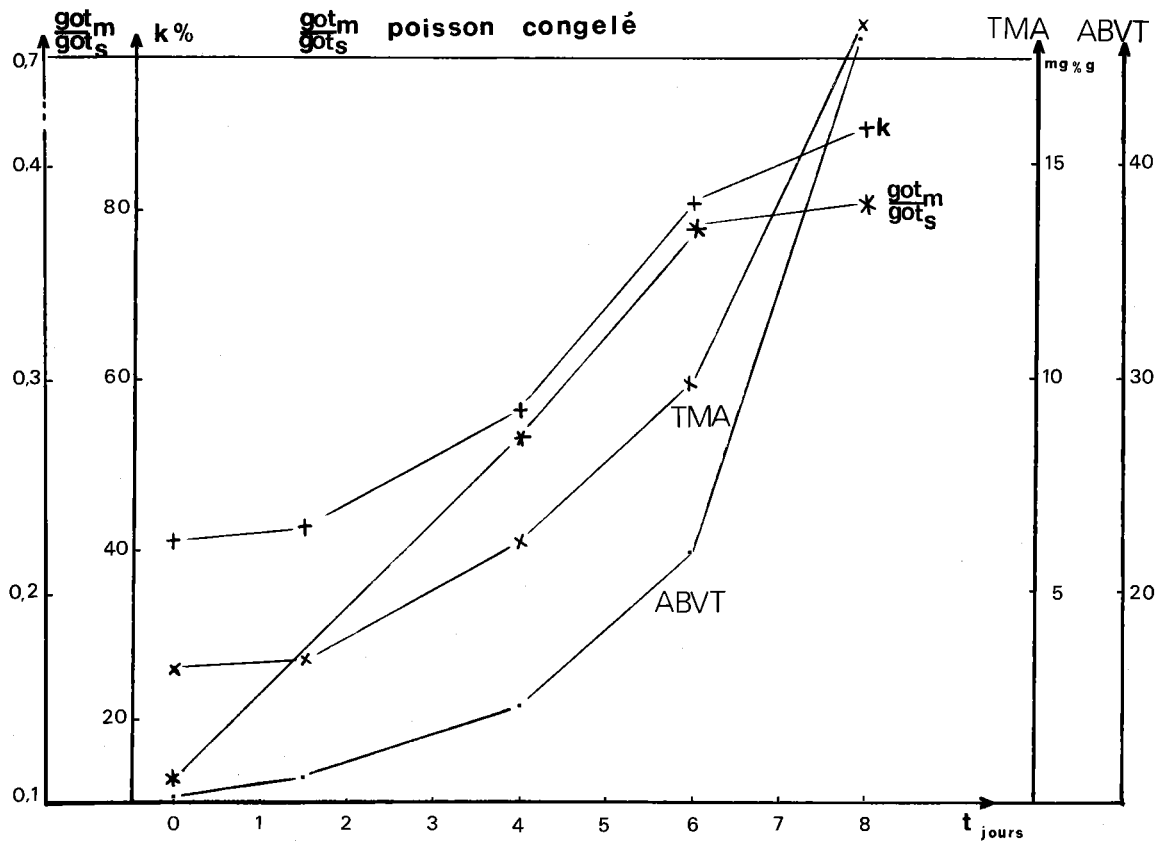


Fig. 3. — Comparaison entre courbes d'altération et évolution du rapport $\frac{GOT_M}{GOT_S}$ au cours de l'entreposage du merlan en glace fondante.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 de la figure 3. On constate que le rapport $\frac{GOT_M}{GOT_S}$ passe de 0,11 à 0,38 après 8 jours d'entreposage.

C'est-à-dire une valeur inférieure à celle trouvée pour le poisson congelé qui est ordinairement au moins de 0,7.

Les renseignements fournis par les différentes courbes d'altération confirment ces résultats : un poisson possédant un rapport $\frac{GOT_M}{GOT_S}$ élevé et des mesures d'altération basses sera suspecté de congélation. Si toutes les valeurs sont basses, le poisson est frais, c'est-à-dire qu'il n'a pas subi de congélation. Par contre un poisson possédant à la fois un rapport $\frac{GOT_M}{GOT_S}$ et des valeurs d'altération élevées n'est pas nécessairement décongelé. Dans ce cas la mauvaise qualité du poisson fait passer au second plan le fait de savoir s'il a été congelé ou non.

Conclusion.

Le « test GOT » a été appliqué avec succès sur quatre espèces : le merlan, le tacaud, le maquereau et le grondin.

Dans chaque cas nous avons noté une différence assez nette entre poisson frais et poisson congelé. Cette différence, due à l'apparition de la GOT_M , dépend de l'espèce. Le rapport $\frac{GOT_M}{GOT_S}$ passe en moyenne de 0,15 pour le merlan frais à 0,7 pour le congelé, il passe de 0,1 à 1 pour le grondin, de 0,3 à 0,8 pour le maquereau, de 0,15 à 0,8 pour le tacaud. Il est certain que plus l'écart est grand, plus il est facile de détecter une congélation éventuelle. De même la méthode sera d'autant plus efficace que le poisson n'aura pas subi de dénaturation. Le poisson surgelé en mer est facilement détecté quand on essaye de le faire passer pour du poisson frais mais l'interprétation des résultats est plus délicate quand les échantillons à analyser ont subi une altération.

Pour éviter cet inconvénient, il est indispensable de traiter le plus rapidement possible les échantillons après leur prélèvement. Bien entendu, dans ce cas, ils ne peuvent être acheminés à l'état congelé vers le laboratoire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GOULD (E.), 1968. — Malic enzyme : evidence for two molecular forms in the sarcoplasm of fish skeletal muscle. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25** (8) : 1581-89.
- 1971. — An objective test for determining whether « fresh » fish have been frozen and thawed. — « Fish Inspection and quality control ». *Fishing news (books) Ltd.* : 72-75.
- GUILLOT (G.), LISCH (J.M.) et ROSSET (R.), 1972. — Modifications structurales des viandes congelées susceptibles de les différencier des viandes fraîches ou réfrigérées. Caractérisation de la GOT présente dans les muscles. — Commissions C2 et D1, Varsovie, annexe 1972 - 2. *Supplément au Bulletin de l'Institut International du Froid*.
- HAMM (R.), KÖRMENDY (L.) et GANTNER (G.), 1969. — Transminases of skeletal muscle, part. 1, 2, 3. — *Journal of Food Science*, **34** : 446-457.
- SALLES (D.), 1975. — Différenciation par électrophorèse des viandes réfrigérées et décongelées. — Thèse Université Claude Bernard de Lyon, École Vétérinaire, n° 35, 43 p.
-