

СОВРЕМЕННЫЕ МИКРОСТРУКТУРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯСНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ

Пчелкина В.А.

ФБГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова», г. Москва

Аннотация. Микроструктурные методы используются для изучения различных видов мясного сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов с точки зрения составных компонентов и технологии производства, они позволяют выявить локальные изменения в сырье, влияющие и качество готового продукта. Широко применяют как качественный, так и количественный микроструктурный анализ.

Методы гистологического анализа, наряду с физико-химическими и молекулярно-биологическими, в настоящее время достаточно широко распространены как в России, так и за рубежом. По мере накопления знаний в середине прошлого столетия возникло новое направление в науке о мясе – «Микроструктура мяса и мясопродуктов», которое отделилось от общей гистологии в связи с морфофизиологическими особенностями мышечной ткани после технологического воздействия в процессе производства готового продукта. Сегодня известно большое количество как классических, так и основанных на возможностях современного оборудования технических приемов подготовки образцов и получения препарата для проведения микроструктурных исследований [1].

Во ВНИИМП активно проводятся исследования, направленные на развитие методологии и усовершенствование классических гистологических методов оценки качества для установления фальсификации мясного сырья, а также создание на этой основе методик, имеющих научно-практическое и нормативно-правовое значение для защиты интересов потребителей мясной продукции и рационального использования сырья на мясоперерабатывающих предприятиях. Основные принципы пробоподготовки, этапы получения гистологического препарата мясных продуктов отражены в ГОСТ 31479 – 2012 «Мясо и мясопродукты. Метод гистологической идентификации состава» и ГОСТ 31796 – 2012 «Мясо и мясные продукты. Ускоренный гистологический метод определения структурных компонентов состава» [2].

Гистологические методы позволяют выявить локальные изменения в сырье, влияющие на качество готового продукта. Они могут быть использованы для изучения различных видов мясного сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов с точки зрения составных компонентов и технологии производства. Так, применяя микроструктурный анализ в соответствии с ГОСТ 19496 – 2013 «Мясо. Метод гистологического исследования» можно определить свежесть мяса, степень (этап) его созревания.

Большинство исследований носит качественный характер и направлено на выявление того или иного ингредиента состава, тем не менее результаты мо-

гут быть существенно расширены за счет количественного (морфометрического) анализа. Существует ручная морфометрия, которая предусматривает измерение количественных показателей структур с помощью окуляр-микрометра. Недостатком этого метода является большая трудоемкость.

На современном этапе развития гистологического оборудования и программного обеспечения используются компьютерные системы анализа изображения, представляющие собой модульные системы обработки и анализа, предназначенные для световой микроскопии и проведения морфометрических исследований, которые просты в использовании и позволяют существенно сократить время исследования, одновременно предоставляя возможность значительно расширить набор определяемых показателей. С их помощью можно анализировать как макроскопические, так и микроскопические изображения, проводить измерения как в интерактивном, так и в автоматическом режимах.

Основные этапы при проведении количественного исследования с помощью анализатора изображения следующие: считывание изображения с помощью видеокамеры и передача его в компьютер, запоминание изображения с помощью соответствующей программы, первичная корректировка изображения компьютерной программой, выделение конкретного объекта для морфометрического анализа, проведение измерения.

Захваченное присоединенной к микроскопу фотокамерой изображение немедленно выводится на мониторе компьютера в программе гистологического анализа, после чего его можно оптимизировать с помощью широкого спектра методов компьютерной коррекции: регулировка контрастности, яркости и цветности; подавление шума, сглаживание; повышение резкости и выделение деталей; коррекция освещенности и баланса белого. Затем следует статистическая обработка и анализ данных, и далее представление результатов в табличной или графической форме. Значительное совершенствование операционного аппарата обработки видеоизображений позволило снизить трудоемкость микроскопического метода анализа.

Наиболее сложное программное обеспечение позволяет производить «узнавание» различных анализируемых структур с учетом многофакторного анализа в автоматическом режиме. В этом случае требуется максимальная контрастность изучаемых объектов и их дифференцированное окрашивание, так как все программы автоматически распознают структуры только по их цветовым характеристикам. Очень важный шаг для успешного автоматического анализа изображений является правильный выбор специального метода окрашивания для изучаемого компонента. Так, для изучения жировых компонентов лучше применять окрашивание Суданом III, IV или Oil Red O, а для выявления крахмала использовать раствор Люголя или йода [6].

Современный анализатор позволяет получить точную количественную информацию и производить различного вида измерения по следующим параметрам: площадные (площадь и периметр), размерные (диаметр, хорда, габарит, длина, ширина и др.), описывающие форму (фактор формы, округлость, удлиненность и др.), характеризующие положение и ориентацию объектов (коорди-

наты X и Y, направление и др.), денситометрические или оптические (яркость, оптическая плотность и др.).

Автоматическая морфометрия в отличие от ручной, предоставляет данные более высокой точности, которая в свою очередь зависит от способа подготовки образца к исследованию и окрашивания препарата. Тем не менее, данный метод чаще всего требует активного вмешательства оператора для ручной коррекции осуществляемых компьютером действий. Особенно это важно для эффективного установления границы измеряемых частиц и их идентификации, то есть правильного определения тканевой принадлежности, что особенно актуально в микроструктуре мясных продуктов, когда после технологической обработки существенно меняется нативная морфология (рис. 1).

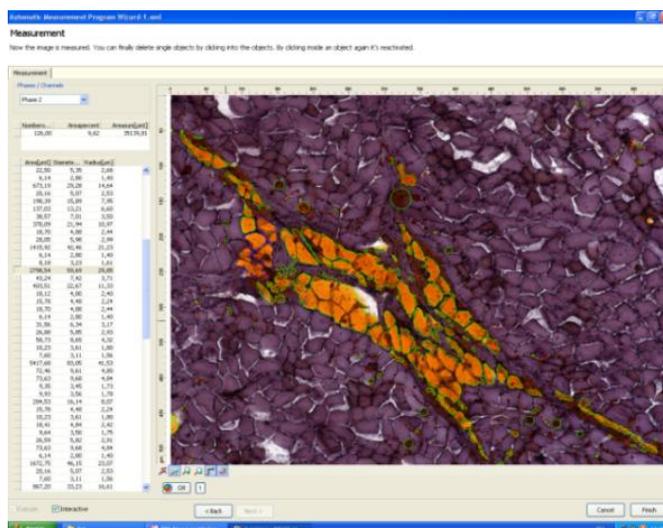


Рис. 1. Определение количества жировой ткани, окрашенной Oil Red O, на препарате сырокопченой колбасы в автоматическом режиме на системе анализа изображений

В настоящее время, в мясоперерабатывающей промышленности метод анализа изображений используется для измерения различных параметров мышечного волокна, для определения количества тканей и костей, особенно в мясе механической обвалки, для определения степени порозности замороженного мясного сырья [8].

В ВНИИМП им. В.М. Горбатова на основе совмещения методов химического и микроструктурного анализа разработан ГОСТ 32224 – 2013 «Мясо и мясные продукты для детского питания. Метод определения размеров костных частиц», который основан на измерении размеров костных частиц, в том числе с использованием компьютерных систем анализа изображения после их выделения химическим путем из мясного сырья и мясных продуктов (рис. 2).

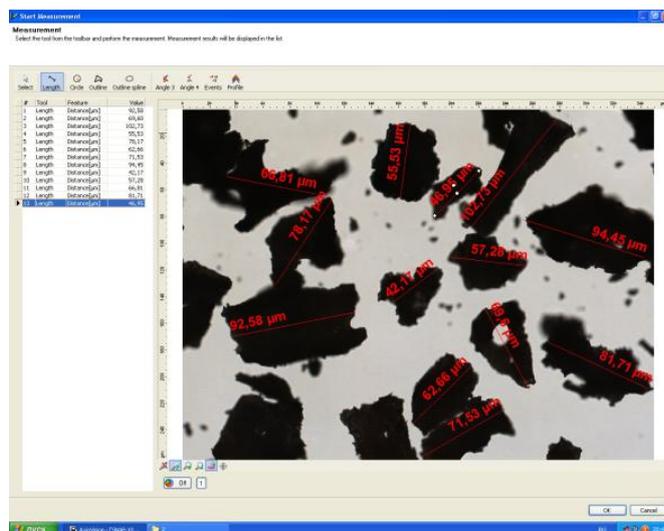


Рис. 2. Определение размера костных частиц в интерактивном режиме на системе анализа изображений

Качество фаршевых и дисперсных мясных продуктов в значительной степени обусловлено степенью их измельчения. В наибольшей степени это важно по отношению к продуктам, предназначенным для питания детей и, прежде всего, в связи с особенностями строения желудочно-кишечного тракта и физиологии пищеварения детей раннего возраста.

На территории России действует ГОСТ Р 54047 – 2010 «Мясо и мясные продукты. Метод определения дисперсности», позволяющий определять размеры частиц мясных и мясосодержащих продуктов на основе гистологического анализа.

Важно отметить, что проведение точного измерения массовой доли компонента гистологическими методами затруднено нелинейной корреляцией объемных и массовых данных при количественной оценке содержания компонентов, прежде всего из-за различной степени их гидратирования в ходе технологической обработки.

Проведены комплексные исследования структурных особенностей растительных белковых компонентов, используемых в производстве мясных продуктов, изучены особенности изменения их микроструктуры в процессе технологической обработки и разработаны гистологические методы их идентификации в любых видах мясного сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов. Выявление соевых белковых продуктов, дифференциация по технологическим вариантам и определение характеристик их качества могут осуществляться на базе разработанного ГОСТ 31474 – 2012 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных белковых добавок».

В общем случае при проведении микроструктурных исследований мясных продуктов в соответствии с действующими стандартами применяют такие гистологические красители, как гематоксилин и эозин, позволяющие выявить основные тканевые и клеточные структурные особенности.

Однако использование традиционных гистологических методов для выявления растительных белков не всегда может дать достоверную информацию

об их содержании в составе продукта. Ни один из специальных методов окрашивания белковых добавок растительного происхождения не обладает высокой специфичностью, поскольку они в значительной степени основаны на обнаружении полисахаридных структур растительных клеток [4]. Использование различных растительных белков в относительно небольших количествах в составе одного продукта может также осложнить оценку.

К тому же, окрашиваемость белковых препаратов как мышечных структур затрудняет применение широко используемых компьютерных анализаторов изображения [7].

В связи с вышеизложенным возникла необходимость в разработке новых методов анализа. Одним из таких методов является иммуногистохимический [5]. В России данный метод применяется только в ветеринарии и медицине при патологоанатомических исследованиях и не используется для определения состава мясных продуктов и идентификации компонентов.

Иммуногистохимические методы являются высокоспецифичными, и объединяют преимущества традиционных гистологических методов с чувствительностью иммунологических. Эти методы основаны на обработке гистологических срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном. При этом окраске подвергается только выявляемый компонент, а фоновое контрастирование среза можно проводить различными методами, что дает возможность широкого применения системы анализа изображения для более детального изучения гистологического препарата и проведения морфометрического анализа [3]. За рубежом иммуногистохимические методы стали очень популярны для обнаружения небольших количеств аллергенов в составе пищевых продуктов.

Таким образом, дальнейшая работа по совершенствованию гистологических методов будет направлена на разработку, адаптацию и оптимизацию иммуногистохимического метода для определения состава мясных продуктов и выявления растительных компонентов, прежде всего белков-аллергенов.

Литература.

1. Хвыля, С.И. Контроль качества мяса: гистологические методы / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина // Контроль качества продукции. – 2013. – № 10. – С. 30-34.
2. Хвыля, С.И. Разработка национальных стандартов на гистологические методы исследования мясных продуктов / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, С.С. Бурлакова // Мясная индустрия. – 2010. – № 3. – С. 32-35.
3. Boutten, B. Quantification of soy proteins by association of immunohistochemistry and video image analysis / B. Boutten, C. Humbert, M. Chelbi, P. Durand, D. Peyraud // Food and Agricultural Immunology. – 1999. – Vol.11. – P.51–59.
4. Heitmann, J. Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen mit einem indirekten Immunfluoreszenztest / J. Heitmann // Fleischwirtschaft. – 1987. – №67. – P. 621–622.

5. Pospiech, M. Immunohistochemical detection of soya protein – optimisation and verification of the method / M. Pospiech, B. Tremlová, E. Renčová, Z. Randulová // Czech Journal of Food Sciences. – 2009. – №27. – P. 11–19.
6. Pospiech, M. Microscopic methods in food analysis / Pospiech M., Rezacova-Lukaskova Z., Tremlova B., Randulova Z., Bartl P. // Maso international. – Brno. – 2011. – Vol. 1. – P.27-34.
7. Randulova, Z. Determination of soya protein in model meat products using image analysis / Randulova Z., Tremlova B., Rezacova-Lukaskova Z., Pospiech M., Straka I. // Czech Journal of Food Sciences. – 2011. – Vol. 29. – Is. 4. – P. 318-321.
8. Tremlová, B. Evaluation of histological methods for detection of plant ingredients in meat products with regard to the use of image analysis systems / B. Tremlová, P. Štarha // In: 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 25.–25.09. 2001. – 2002. – P. 838–842.