



УДК 637.5.04/07:611.018

С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, С.С. Бурлакова**ПРИМЕНЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЯСНОГО СЫРЬЯ
И ГОТОВЫХ ПРОДУКТОВ**

В статье представлены комплексные результаты гистологических исследований, проводимых в лаборатории микроструктурных исследований мясных продуктов ВНИИМП в течение последних лет, по оценке мясного сырья и готовых продуктов с целью определения их структурных характеристик, идентификации входящих в состав компонентов и выявления случаев фальсификации состава. Гистологический анализ позволяет судить как о структуре продукта в целом, так и об изменениях, происходящих в отдельных участках и компонентах исследуемых объектов. При этом на основе тех или иных морфологических особенностей различных тканевых и клеточных структур возможно не только установить сам факт их присутствия в продукте, но и определить их количество. На основе результатов проведенных исследований был разработан ряд государственных стандартов на методы микроструктурного анализа мяса и мясных продуктов.

Мясо, мясные продукты, идентификация состава, гистологический анализ.

Введение

С каждым годом увеличивается ассортимент мясных продуктов как отечественного, так и иностранного производства на потребительском рынке России. Официальная оценка качества мясной продукции направлена преимущественно на определение ее безопасности и практически не затрагивает определения состава использованного сырья и выяснения соответствия продукции нормативным документам. Метод гистологического анализа – прямой метод определения состояния сырья и продукции, их истинного состава. Микроструктурные исследования позволяют судить как о структуре продукта в целом, так и об изменениях, происходящих в отдельных участках и компонентах исследуемых объектов. При этом на основе тех или иных морфологических особенностей различных тканевых и клеточных структур возможно не только установить сам факт их присутствия в продукте, но и определить их количество. Этот метод давно известен и широко применяется в биологии и медицине. Однако работа с биологическими тканями в пищевых продуктах имеет существенную специфику по сравнению с нативными тканями, поскольку в нашем случае исследованию подвергается материал после механического, термического и других видов технологического воздействия.

Существуют следующие направления применения гистологического микроструктурного анализа в работе с мясным сырьем и мясными продуктами:

- определение структурных особенностей мясного сырья в зависимости от наличия пороков качества PSE и DFD, породы, пола, условий содержания и т.п.;
- определение степени свежести мяса убойных животных, мяса кроликов, мяса птицы;
- определение парного, охлажденного и размороженного мясного сырья;

- выяснение соблюдения и эффективности тех или иных режимов технологической обработки сырья и их нарушений;
- проведение дифференциации мясного фарша и мяса механической дообвалки;
- установление фактов вторичной переработки мясной продукции;
- дифференциация мяса птицы и мяса убойных животных;
- идентификация животных и растительных компонентов в различных мясных полуфабрикатах и готовых продуктах;
- установление степени измельчения (дисперсности) и однородности распределения компонентов мясных продуктов;
- контроль состава сыпучих добавок для мясной промышленности.

В последние годы в ГНУ ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии накоплен большой опыт проведения микроструктурных исследований мясного сырья и мясной продукции, в том числе и в плане идентификации компонентов мясных продуктов, прошедших различную технологическую обработку. На сегодняшний день на основе наших исследований создан ряд методик для проведения гистологического анализа, получивших статус государственных стандартов РФ на методы исследования: ГОСТ 19496-93 «Мясо. Метод гистологического исследования», ГОСТ Р 51604-2000 «Мясо и мясные продукты. Метод гистологической идентификации состава», ГОСТ Р 52480-2005 «Мясо и мясные продукты. Ускоренный гистологический метод определения структурных компонентов состава», ГОСТ Р 53213-2008 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных белковых добавок», ГОСТ Р 53222-2008 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод

определения растительных углеводных добавок», ГОСТ Р 54047-2010 «Мясо и мясные продукты. Метод определения дисперсности», ГОСТ Р 54368-2011 «Мясо и мясные продукты. Метод идентификации состава сыпучих добавок» [1].

Целью проводимых исследований является 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.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись мясное сырье (охлажденное, замороженное, размороженное), полуфабрикаты (фарши, котлеты, пельмени), готовые мясные продукты (колбасные изделия, деликатесная продукция, паштеты), мясо птицы механической обвалки и дообвалки, а также сыпучие добавки, используемые при производстве мясных продуктов (животные белки, соевые белковые продукты, каррагинаны, крахмалы, камеди, многокомпонентные смеси).

Гистологические исследования мясного сырья и продукции проводились в соответствии с классическим микроструктурным анализом и разработанными стандартизованными методами. Также применяли авторские модификации методов, позволяющие сократить время исследований и значительно повысить качество получаемых гистологических препаратов.

Гистологические срезы изготавливали на криостат-микротоме MICROM HM-525 (Carl Zeiss, Германия). Для монтированных на предметное стекло срезов применяли разработанный метод кратковременной дополнительной фиксации: на гистологический срез наносили 8%-й раствор формалина на 30 минут, затем тщательно промывали водой в течение 3 минут, подсушивали при комнатной температуре и приступали к окрашиванию гематоксилином и эозином.

Изучение гистологических препаратов и их фотографирование осуществляли на световом микроскопе AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия) с помощью подключенной видеокамеры AxioCam MRc5. Обработку изображений и проведение морфометрических исследований производили с применением компьютерной системы анализа изображений AxioVision 4.7.1.0, адаптированной для гистологических исследований. Для получения достоверных результатов эксперименты повторяли не менее трех раз при 3–5-кратной повторности анализов каждого из образцов по всем изучаемым параметрам.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных гистологических исследований было установлено следующее.

Мышечная ткань составляет основу большинства мясopодуKтов и должна содержаться в них в достаточном количестве. Наиболее важным ее элементом

является клеточный компонент. В зависимости от строения и свойств этих элементов различают поперечнополосатую (или скелетную) мышечную ткань, сердечную и гладкую мышечные ткани.

Поперечнополосатая мышечная ткань составляет основу мяса, в состав которого, кроме мышечных волокон, также входят элементы соединительной ткани и жировая ткань (рис. 1). В зависимости от их соотношения в образце мяса и будет определяться его сортность.

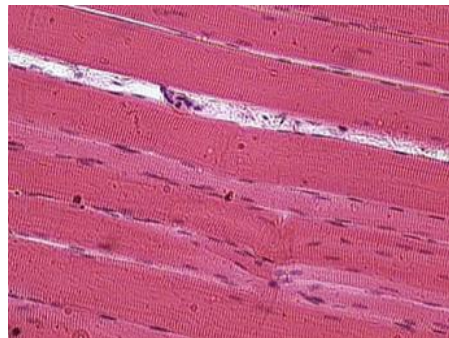


Рис. 1. Поперечнополосатая мышечная ткань. Продольный срез (об. 20х)

Скелетная мышечная ткань птиц имеет общий принцип структурного построения, аналогичный тому, что приведен для скелетных мышц убойных животных. Однако в их мышечных волокнах ядра имеют не только периферическое, но и центральное расположение (с определенными особенностями в белых и красных мышцах) (рис. 2).

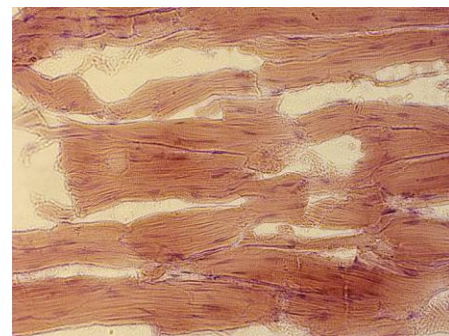


Рис. 2. Мышечная ткань курицы (грудная мышца). Продольный срез (об. 20х)

В замороженном мясе при его замораживании и хранении появляются кристаллы льда. Эти кристаллы могут располагаться как между мышечными волокнами, так и внутри них. Их количество и размеры также могут варьировать в больших пределах, приводя к разной степени разрушения сарколеммы и определяя таким образом качество и технологические свойства мясного сырья. В ряде случаев в замороженном мясе сохраняются дефекты мышечной ткани, появившиеся в результате образования кристаллов льда, что позволяет провести дифференциацию подвергнувшегося замораживанию и охлажденного мясного сырья (рис. 3).

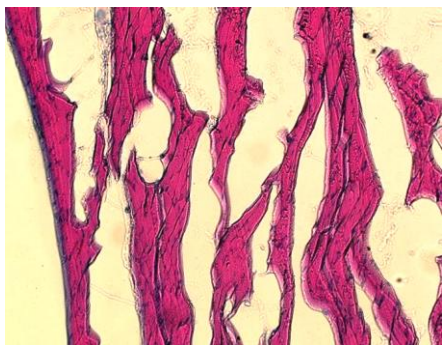


Рис. 3. Микроструктура замороженного мяса длительного холодильного хранения (об. 20х)

Гистологический анализ позволяет определять свежесть мяса и степень его созревания. Микробная контаминация мышц гнилостной микрофлорой и ее развитие в процессе длительного хранения мяса приводит к глубоким специфичным структурным изменениям мышечных тканей, характерным для порчи мяса. Это позволяет объективно оценивать степень его свежести по следующим микроструктурным показателям: локализации микрофлоры и глубине ее распространения в мясе, состоянию клеточных ядер в мышечных волокнах, выраженности проявления исчерченности мышечных волокон, степени набухания и лизиса структур мышечных волокон под действием экзоферментов микрофлоры.

Микроструктурный анализ позволяет выявить микробную порчу мяса в более ранние сроки вследствие того, что общее количество микроорганизмов на поверхности туши (куска мяса) не всегда отражает их ферментативную активность и степень деструкции мышечной ткани. По микроструктурным признакам выделяют четыре категории свежести: мясо свежее; мясо свежее, не подлежащее длительному хранению; мясо сомнительной свежести и мясо несвежее. Однако использование категорий свежести по гистологическим критериям ограничено тем, что при контроле свежести микробиологическими методами применяют только три категории, не используя градацию «мясо свежее, не подлежащее длительному хранению» (рис. 4).

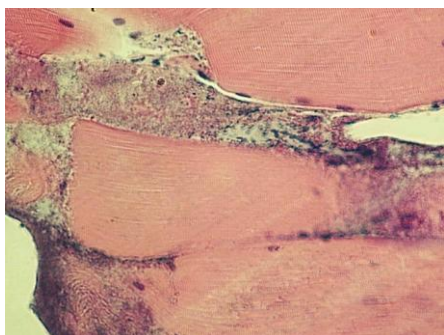


Рис. 4. Мясо несвежее, 8 суток хранения (об. 40х)

Структура мышечной ткани в мясной продукции зависит от технологических режимов производства. В процессе технологической обработки колбас происходят обязательные деструктивные изменения в элементах мышечной ткани. При этом наблюдается

набухание мышечных волокон, их фрагментация и частично гомогенизация при распаде ядерных структур и сократительных фибриллярных белковых комплексов, формирование мелкозернистой белковой массы, составляющей в ряде продуктов (вареные колбасы) существенную часть их объема (рис. 5).

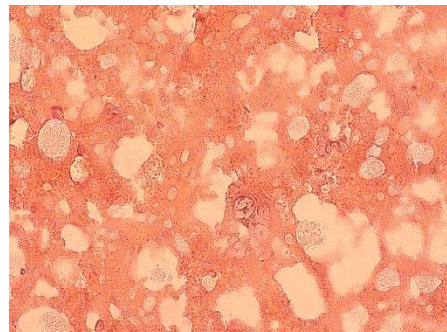


Рис. 5. Микроструктура вареной колбасы (об. 20х)

Фарш полукопченых колбасных изделий формируют преимущественно мелкие и средней величины фрагменты мышечной ткани, характеризующиеся умеренной деструкцией. Мелкозернистая белковая масса образуется в ограниченном количестве (рис. 6).

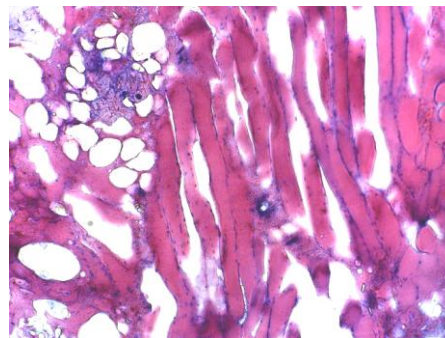


Рис. 6. Микроструктура варено-копченой колбасы (об. 10х)

При исследовании мясных продуктов встречаются случаи замены мясного сырья на животные компоненты, к числу которых относятся субпродукты, которые достоверно идентифицируются при гистологическом анализе по характерным структурным элементам (рис. 7).

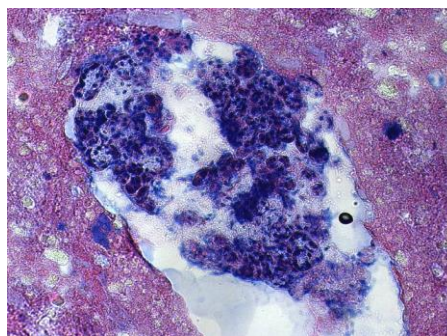


Рис. 7. Фрагмент слюнной железы в вареной колбасе (об. 20х)

В течение последних шести лет в лаборатории проводится мониторинг состава вареных колбас «Докторская», «Молочная» и «Русская» с маркировкой на этикетке ГОСТ Р 52196-2003 с целью выявления случаев фальсификации.

Анализ состава мясной продукции показал, что предприятия мясной промышленности для увеличения выхода готовой продукции нередко сознательно используют компоненты, не входящие в рецептуры, предписанные ГОСТами на соответствующие виды изделий, иными словами, преднамеренно фальсифицируют колбасные изделия. В существенной части предприятий ослаблен входной контроль фактического состава используемых ингредиентов, что также в конечном итоге приводит к фальсификации пищевой продукции.

Наиболее распространенной добавкой в 2011 году в вареных колбасах являлся крахмал, его использовали около 35 % производящих мясную продукцию предприятий. Чаще всего это кукурузный крахмал, попадающий в готовую мясную продукцию с яичным порошком. Но нередко встречалось и использование картофельного и различного модифицированного крахмала. Можно также отметить, что наибольшее количество мясоперерабатывающих предприятий использовали для приготовления вареных колбас препараты каррагинана и камеди (около 30 и 19 % соответственно). Менее распространенными в последнее время становятся соевые белковые продукты (около 14 %), животный белок (около 15 %) и мука (около 8 %).

В то же время, несмотря на высокую долю фальсифицированной вареной колбасной продукции, использование добавок по сравнению с 2010 годом значительно снизилось. Особенно это заметно в отношении крахмалов и соевых белковых продуктов, использование которых за последние два года сократилось на 15 %. Одновременно снизилось и использование каррагинана – примерно на 8 % (рис. 8).

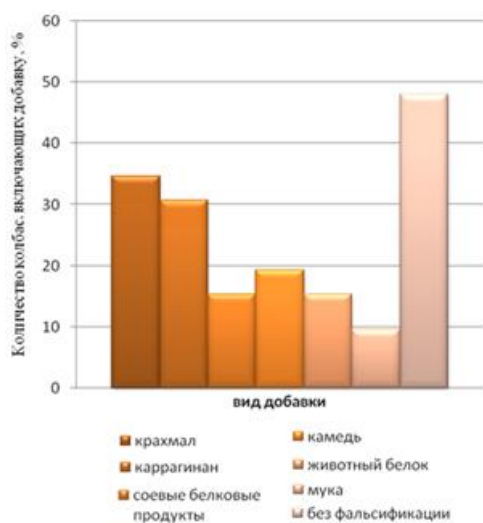


Рис. 8. Распределение фальсифицированных колбас по содержанию различных добавок за период 2011 года

При проведении гистологических исследований выявлено, что большинство мясных продуктов содержат в своем составе крахмал, который удерживает влагу в больших количествах и увеличивает выход готовой продукции. Этот растительный компонент легко обнаруживается при окраске срезов препаратами йода и имеет вид разрозненных сине-коричневых (до черного) зерен разной величины (рис. 9).

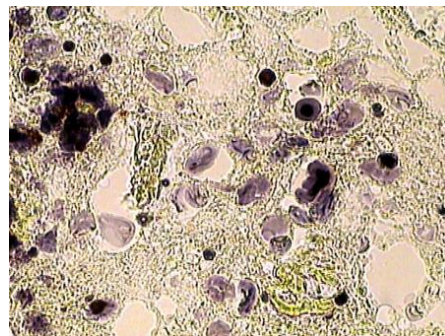
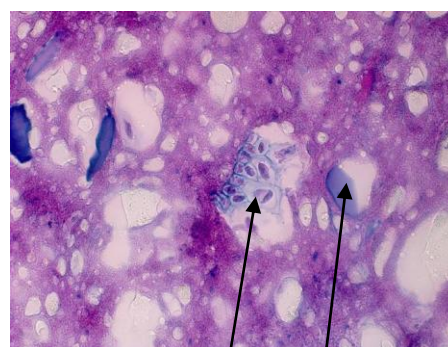


Рис. 9. Крахмал в вареной колбасе. Окраска раствором йода (об. 20х)

Часть колбасной продукции, произведенной по ГОСТу, фальсифицирована за счет введения в состав полисахаридных добавок (камедь рожкового или гуарового дерева, каррагинан). На гистологических препаратах растительная камедь выявляется как группа клеток, сохранивших свою исходную структуру, которые имеют вид округлых компактных эозинофильных структур с широким светлым (неокрашиваемым) цитоплазматическим пространством. Частицы каррагинана имели вид стекловидных конгломератов, связывающих элементы фарша мясных продуктов. При окраске гематоксилином и эозином они характеризовались выраженной базофильностью и приобретали специфический лиловый, нередко с синим или голубым оттенком, цвет (рис. 10).



Растительная камедь Каррагинан

Рис. 10. Растительные компоненты в вареной колбасе (об. 20х)


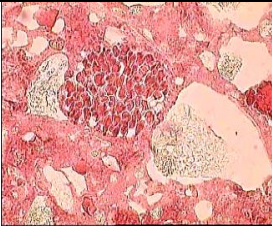
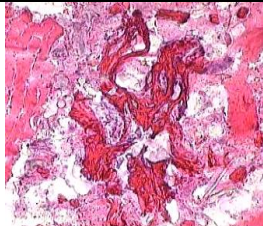

Накопленные данные о микроструктурных особенностях растительных компонентов разной химической природы, а также их изменениях в ходе технологических воздействий позволяют провести идентификацию состава использованных в мясных продуктах растительных добавок. Микроструктурные исследования дают возможность установить не только химическую природу растительного ингредиента, но и его примененную технологическую форму, что особенно актуально для соевых белковых продуктов. По установленным морфологическим характеристикам можно дифференцировать соевый изолированный белок, концентрат, текстурированный соевый продукт. Гистологический анализ также

позволяет определить вид используемого крахмала (картофельный, кукурузный, тапиоковый, рисовый, гороховый), тип каррагинана (очищенный, полуочищенный).

Для более удобной идентификации растительных компонентов были разработаны определительные таблицы (табл. 1), в которых описаны морфологические характеристики растительных добавок и приведены их микрофотографии. Основными показателями для проведения однозначной идентификации выбраны форма частиц компонентов, их размеры, а также способность окрашиваться гистологическими красителями (тинкториальные свойства).

Таблица 1

Определительная таблица для идентификации растительных компонентов белковой природы

Показатель	Соевые белковые продукты			Гороховая мука
	Соевый изолированный белок	Соевый концентрат	Текстурированный соевый белковый продукт	
Форма частиц	Округлые частицы с отверстиями внутри, имеют форму бублика, гантели или цветка	Частицы состоят из клеток цилиндрических (продольный срез) или округлых (поперечный срез), окруженных целлюлозной оболочкой	Включает в себя волокнистый компонент – тонкие рыхлые пучки волокон и узкие цилиндрические клетки, собранные в стопки	Округлые или овальные частицы гороха, внутри зерна крахмала
Размер	10–110 мкм	30–105 мкм	50 мкм – 5 мм	10 мкм – 3 мм
Фрагменты оболочки боба сои	Отсутствуют	Присутствуют	Присутствуют	Отсутствуют
Частицы при окраске гематоксилином и эозином	Частицы окрашиваются в розовый цвет	Частицы окрашиваются в оттенки красного, окружены узким ровным неокрашиваемым просветом – целлюлозной оболочкой	Красные или сиреневые пучки волокон и неокрашиваемые клетки целлюлозной оболочки боба сои	Белковый компонент окрашивается эозином в оранжевый цвет, между ними неокрашенные частицы крахмала
Микроструктура	 Соевый изолированный белок	 Соевый концентрат, поперечный срез	 Текстурированный соевый белковый продукт	 Частицы гороха

В ходе исследований по применению гистологического метода для анализа порошкообразных добавок была разработана методика, позволяющая получить гистологический препарат исследуемого сыпучего образца, окрашенный гематоксилином и эозином (рис. 11).

Качество фаршевых и дисперсных мясных продуктов в значительной мере обусловлено степенью их измельчения. Это особенно важно по отношению к продуктам, предназначенным для питания детей, в связи с особенностями строения желудочно-кишечного тракта и физиологии пищеварения детей раннего возраста. Особое внимание должно уделяться определению их дисперсности (измерению размеров

частиц компонентов, составляющих продукт). Действующей нормативной документацией на продукты детского питания предусмотрены ограничения размеров их частиц (дисперсности) – количество частиц, размер которых превышает 0,2 мм, не должно быть больше 20 % от общей массы продукта [2].

В настоящее время существует только один способ объективно и с минимальными погрешностями оценить размеры частиц – использование компьютерных систем анализа изображения, дающих четкую математическую характеристику максимальных размеров частиц, среднего размера и процентное содержание частиц различного размера (рис. 12).

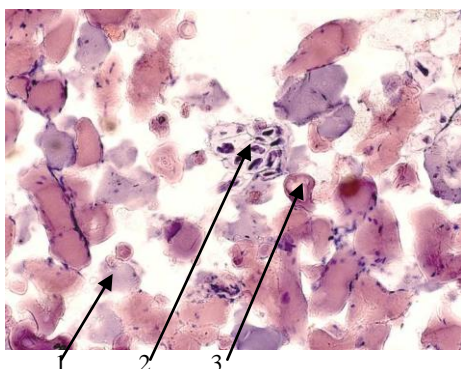


Рис. 11. Комплексная пищевая добавка: 1 – животный коллагеновый белок; 2 – растительная камедь; 3 – соевый изолированный белок

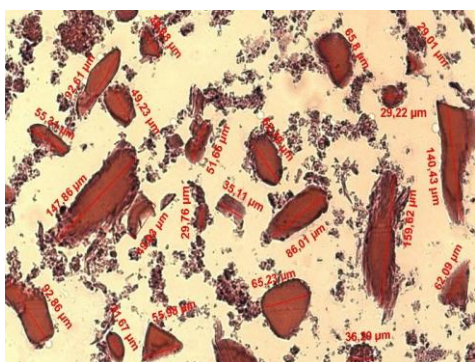


Рис. 12. Определение дисперсности мясного продукта для детского питания

В связи с этим проводится развитие количественных методов оценки с помощью гистологического метода при применении компьютерных систем анализа изображения для определения размера частиц (количественный морфометрический анализ) измельченного мясного сырья и мясных продуктов, являющихся сложными многокомпонентными системами. На этой основе должна быть расширена методическая база использования гистологических методов в мясной промышленности при сертификации мясного сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов.

Совместно с гистологическим методом оценки качественного состава в настоящее время применяется количественный метод, который позволяет дать количественную характеристику составных компонентов мяса и мясных продуктов.

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 соответ-

ствующей программы, первичная корректировка изображения компьютерной программой, выделение конкретного объекта для морфометрического анализа, бинаризация изображения (переведение его в двухтоновую черно-белую форму). Затем следуют измерение параметров и представление результатов в табличной или графической форме.

В зависимости от целей проводимого исследования при анализе изображения измеряют следующие параметры: количество структур, их линейные размеры (диаметр, длина, длина окружности и т.д.), двумерные параметры (площадь, соотношение диаметров во взаимно перпендикулярных направлениях и т.д.), трехмерные параметры (объем). Наиболее сложное программное обеспечение позволяет производить «узнавание» различных анализируемых структур с учетом многофакторного анализа в автоматическом режиме.

В то же время 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.

Таким образом, собранные сведения о микроструктурных особенностях мышечной, жировой и соединительной тканей, субпродуктов и растительных добавок, а также их изменениях в ходе технологических воздействий позволяют провести идентификацию реального состава мясных продуктов. Дополнительное использование систем анализа изображения позволяет также провести объективные измерения линейных, плоскостных и объемных параметров частиц и определить содержание сырьевых компонентов животного и растительного происхождения в полуфабрикатах и готовых продуктах.

Сведения, получаемые методами качественного и количественного гистологического анализа компонентов сырья и продукции, целесообразно использовать в процессе создания и отработки технологических режимов получения комбинированных мясных изделий, а также при выявлении случаев фальсификации состава мясных продуктов. Эти методы должны использоваться при контроле качества и состава сыпучих добавок, применяемых в мясной промышленности. Изготавливаемые для гистологического исследования препараты могут сохраняться продолжительное время и служить юридическим основанием при решении арбитражных вопросов. И в любой момент фиксированные при подготовке материала образцы продукции могут быть подвергнуты изучению независимыми компетентными организациями.

Список литературы

1. Хвьяля, С.И. Стандартизованные гистологические методы оценки качества мяса и мясных продуктов / С.И. Хвьяля, В.А. Пчелкина, С.С. Буракова // Все о мясе. – 2011. – № 6. – С. 32–35.
2. Хвьяля, С.И. Определение дисперсности продуктов детского питания гистологическим методом / С.И. Хвьяля, В.А. Пчелкина, С.С. Буракова // Мясная индустрия. – 2010. – № 11. – С. 33–36.

ГНУ ВНИИ мясной промышленности
им. В.М. Горбатова Россельхозакадемии,
109316, Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 26.
Тел.: (495) 676-92-31
e-mail: vniimp@inbox.ru

SUMMARY

S.I. Hvilya, V.A. Pchelkina, S.S. Burlakova

APPLICATION OF THE HISTOLOGICAL ANALYSIS FOR INVESTIGATION OF MEAT RAW MATERIALS AND FINISHED PRODUCTS

The article presents complex results of histological investigation carried out recently in the laboratory of micro-structure researches of meat products to evaluate meat raw materials and finished products in order to determine their structural characteristics and to identify their components and structural falsification. The histological analysis makes it possible to see both the product structure as a whole and the changes occurring in separate parts and components of the studied objects. Thus on the basis of morphological characteristics of various tissue and cell structures it is possible to establish not only the very fact of their presence in the product but also to determine their quantity. On the basis of the results of the carried-out researches a number of state standards on the methods of the micro-structural analysis of meat and meat products have been developed.

Meat, meat products, structure identification, histological analysis.

The Gorbатов's All-Russian Meat Research Institute (VNIIMP)
26, Talalikhina str., Moscow, 109316, Russia
Phone: (495) 676-92-31
e-mail: vniimp@inbox.ru

