УДК: 611.018.6:614.31:637.5’64
DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.1.80

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИССЛЕДОВАНИЯ СВИНИНЫ

Смирнов А.В. (ORCID 0000-0003-3250-4433; ResearcherID: O-8586-2017)-кандидат ветеринарных наук, доцент Урбан В.Г. (ORCID 0000-0003-3615-8726; ResearcherID: O-9109-2017)-кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

***Ключевые слова*:** свинина, гистологическое исследования, ветеринарно-санитарная экспертиза, фальсификация мяса
Key word: pork, histological examination, veterinary and sanitary examination, falsification of meat.

РЕФЕРАТ
В статье приведен морфологический анализ на клеточном уровне исследования мяса свинины разного термического состояния. Цель исследования – развитие и усовершенствование классических гистологических методик и методов оценки качества мясного сырья для определения фальсификации и создание научно-обоснованной методики научно-практического значения. Объектами исследований было мясное сырье – свинина, разного термического состояния: охлажденная, замороженная, размороженная. В качестве контроля использовали гистологические препараты парного мяса свинины, изготовленные классическим методом по ГОСТ 19496-2013. Исследования проводили в соответствии с классическим микроструктурным анализом и разработанными официальными стандартизированными методами, в авторской модификации.

Авторская модификация метода позволила сократить время подготовки срезов для исследования и исключить приготовление классических гистологических срезов. Микроскопию срезов проводили на световом микроскопе MicroOptix MX 300(T) (West Medica, Austria). Фотографирование препаратов производили с помощью видеокамеры CAM® V1200(C) HD (West Medica, Austria).

В микроструктуре мяса происходят существенные изменения в процессе созревания. Морфологический анализ выявляет как общие структурные особенности изменения исследуемых мышц в охлажденном и размороженном виде, так и морфологические изменения внутренней структуры отдельных волокон или мышц. При этом объем и размер мышечных волокон в разных мускулах поперечнополосатой мышечной ткани был разный. На продольном срезе мышечные волокна, находящиеся в термическом состоянии остывших мускулов, всегда имели характерную форму: гофрированная, или складчатая.

Установили, что гофрированность и складчатость нестабильна. В охлажденном мясе складчатость обнаруживается крайне редко. Она постепенно почти полностью исчезает. Это один из морфологических признаков, который можно хорошо наблюдать при увеличении микроскопа 10х40 и оценивать качество мяса по степени созревания: парное или охлажденное.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при замораживании общий вид мышечных волокон заметно изменяется - поперечная исчерченность проявляется хуже,

иногда исчезает и не обнаруживается. Все волокна после замораживания значительно уменьшаются в объеме (становятся тоньше).

Существенные изменения происходят в ядрах клеток. В размороженном мясе они становятся менее объемные, хроматин виден сплошной массой, в большинстве случаев, пикнотического характера. Хроматин коагулирует в сплошную сильно окрашивающуюся массу. Ядра в целом изменяют свою форму и если обнаруживаются, то имеют вид темной удлиненно-овальной формы гомогенной массы.

Использование гистологических и микроскопических методик исследования сравнительных изменений, протекающих в парном, охлажденном и размороженном мясе, может способствовать точности и совершенствованию методов выявления размороженного мяса при фальсификации им охлажденного, а также режимов обработки и соблюдения условий хранения охлажденного мяса.

ВВЕДЕНИЕ

Поперечноисчерченная мышечная ткань является основной составной частью мяса. В среднем содержание мышечной ткани в туше животных колеблется в пределах 50-65%, жировой ткани 5-30, соединительной 10-16, костной 7-32% соответственно. Количественное соотношение тканей в мясе зависит от многих факторов: вида, породы, пола, возраста, и упитанности животного. С повышением упитанности относительное содержание мышечной ткани уменьшается.

Мышечная ткань обладает высокой питательной ценностью, вкусовыми достоинствами и лучше всего усваивается в организме человека. При технологической и кулинарной обработке она изменяется и приобретает органолептические свойства, необходимые человеку. Эти свойства поперечноисчерченной мышечной ткани по степени хозяйственной важности ставят ее на первое место из всех гистологических тканей организма продуктивных животных. В связи с этим именно ее микроструктуре уделяется наибольшее внимание, изучается и дается наиболее полный анализ ее особенностям.[4]

Цель исследования – развитие и усовершенствование классических гистологических методик и методов оценки качества мясного сырья для определения фальсификации и создание научно-обоснованной методики научно-практического значения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлось мясное сырье – свинина разного термического состояния: охлажденная, замороженная, размороженная. В качестве контроля использовали парное мясо.

Морфологические исследования проводили в соответствии с классическим микроструктурным анализом и разработанными стандартизированными методами [3], с использованием авторской модификации. Авторская модификация позволила сократить время подготовки срезов для исследования и исключить дорогостоящее оборудование по приготовлению гистологических срезов. Изогнутыми ножницами делали тонкие продольные срезы мышечных волокон по форме «овсяного зерна», раздавливали их между стеклами компрессориума. Затем срезы аккуратно снимали, в фарфоровой чашке окрашивали гематоксилином Эрлиха 3-4 минуты, промывали в воде 2 минуты до обесцвечивания смываемой воды, обрабатывали 1% раствором соляной кислоты до появления слабо-розовой окраски и 1% раствором аммиака до синего окрашивания жидкости, вновь промывали водой 2 минуты. После чего срезы окрашивали 1% водно-спиртовым раствором эозина в течение 1 мин, промывали водой и помещали на предметное стекло. [1, 2]

Микроскопию срезов и изучение морфологических особенностей препаратов мяса разного термического состояния проводили на световом микроскопе MicroOptixMX 300(T) (WestMedica, Austria), . Фотографирование препаратов производили с помощью подключенной видеокамеры CAM® V1200(C) HD (WestMedica, Austria) - ув. х400.

Для получения достоверных результатов и

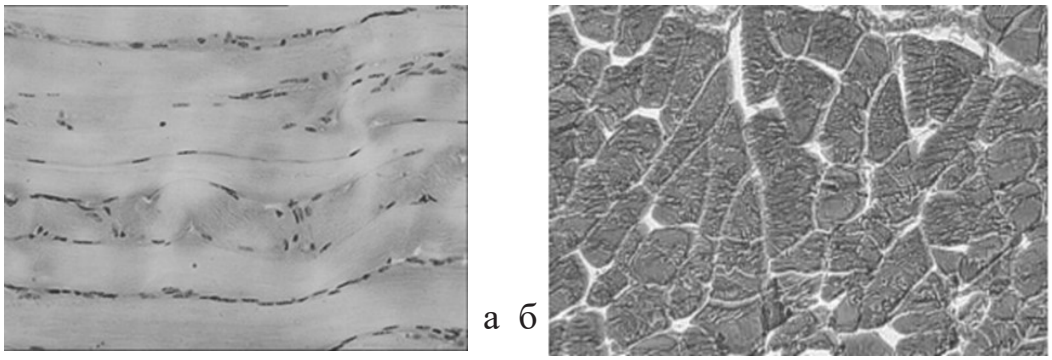

Рис. 1. Морфологический анализ поперечноисчерченной мышечной ткани: а – продольный срез; б – поперечный срез. Ув. х 300.

исключения ложноположительных результатов исследования проводили не менее трех раз и пятикратной повторности анализов каждого образца пробы мышц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основу строения поперечноисчерченной мышечной ткани составляют мышечные волокна (клетки) удлинённой веретенообразной формы длиной от нескольких миллиметров до 12 см и в диаметре (толщиной) от 10 до 110-140 мкм. При увеличении микроскопа 10х40 они достаточно хорошо просматриваются и располагаются в одном направлении продольно. Волокна покрыты эластичной тонкой прозрачной оболочкой – сарколеммой. Около внутренней поверхности сарколеммы располагаются ядра. В саркоплазме (цитоплазме) клеток просматриваются расположенные вдоль миофибриллы, которые похожи на волокна, но отличаются от последних значительно меньшими размерами: диаметр миофибрилл около 1мкм.

Мышечные волокна соединяются в небольшие пучки, которые с помощью покрывающих их соединительнотканных образований в свою очередь объединяются в мускулы.

С точки зрения пищевой ценности оболочка мышечного волокна представляет собой тонкую прозрачную соединительнотканную пленку, которая состоит из двух слоев. Слои сарколеммы хорошо просматриваются под электронным микроскопом. Характерно, что наружный слой сарколеммы более плотный, он формирует базальную мембрану, к которой прикреплены тонкие (аргирофильные) фибриллы в виде сети. Внутренний слой сарколеммы (плазмолемма) рыхлый. Благодаря такому строению сарколеммы происходит обмена веществ между мышечным волокном и окружающей средой – рыхлой соединительной тканью.

Между наружным и внутренним слоями сарколеммы лежит пространство в среднем шириной 14-24 нм.

Под сарколеммой расположена жидкая саркоплазма. В мышечной ткани свинины многочисленные удлиненно-овальные ядра располагаются в саркоплазме по периферии. В любом мускуле можно выделить симпластические образования (симпласт) с многочисленными ядрами. Форма ядер мышечных волокон была разная - овальная (палочковидная) или округлая, она на прямую зависит от степени напряжения при сокращении мышечного волокна. Когда мышечное волокно находится в расслабленном состоянии, форма ядра имела вид овала реже палочковидной формы. При сокращении мышечного волокна соответственно округлая (рис. 2, 3).

Цитоплазматическая (саркоплазматическая) сеть мышечных волокон состоит из системы трубочек и пузырьков. Они сообщаются друг с дру-

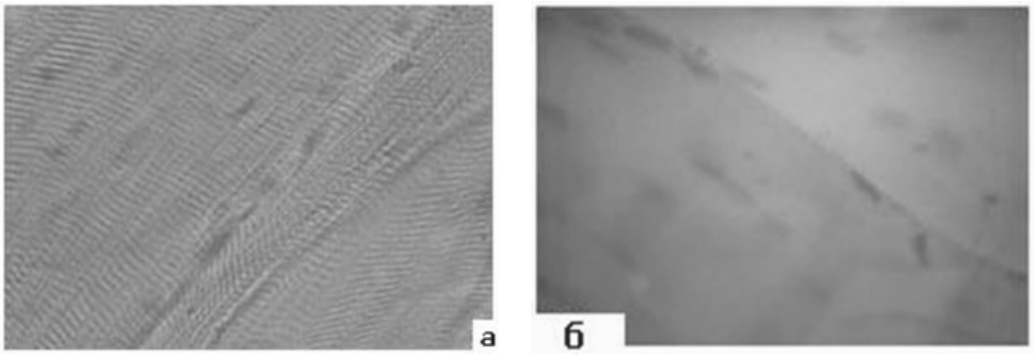

Рис. 2. Структура и форма ядер в мышечных волокнах: а — охлажденная свинина, б — размороженная свинина.

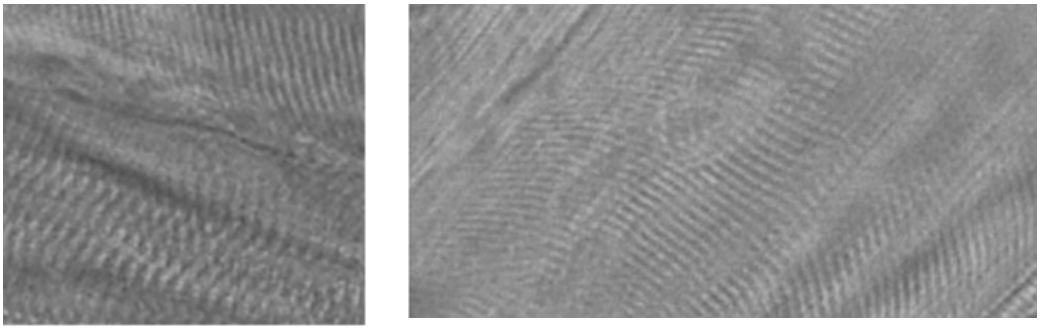

Рис. 3. Разная форма волокон. Ув. х 400.

гом, образуя единую лабиринтную систему, ограниченную тончайшими белково-липоидными мембранами. Саркоплазматическую сеть образуют две системы: поперечная - ориентирована поперек мышечного волокна, и соответственно продольная - расположена по ходу миофибрилл.

Поперечная система представлена прямыми трубочками диаметром около 40 нм, идущими от плазмолеммы. Они проходят по соседству с полоской Z или у мест стыковки анизотропных и изотропных дисков. В связи с тем, что система поперечных трубочек имеет близкую связь с системой продольно идущих трубочек, их объединяют в общую так называемую трансверсальную систему (Т-систему), называя отдельные участки ее триадами Портера и Палладе.

Центральная структурная система, расположенная внутри саркоплазмы каждого мышечного волокна, представлена множеством тончайших белковых сократимых нитей хорошо различимых в электронный сканирующий микроскоп. Количество миофибрилл в различных волокнах различное. В одних волокнах миофибрилл значительное количество, и как результат, на поперечном срезе таких волокон видны темные точки, каждая из которыхсоответствует поперечному срезу конкретных миофибрилл.

Волокна, содержащие значительное количество миофибрилл составляют, так называемое, белое мясо, поскольку волокнаимеют небольшой объем саркоплазмы, котораясодержитмиоглобин, имеющийкрасноватый пигмент, в результате чего они кажутся беловатыми.

Волокна, с незначительным количеством миофибрилл, содержат значительно больше саркоплазмы, в следствии чего они приобретают красноватую окраску.

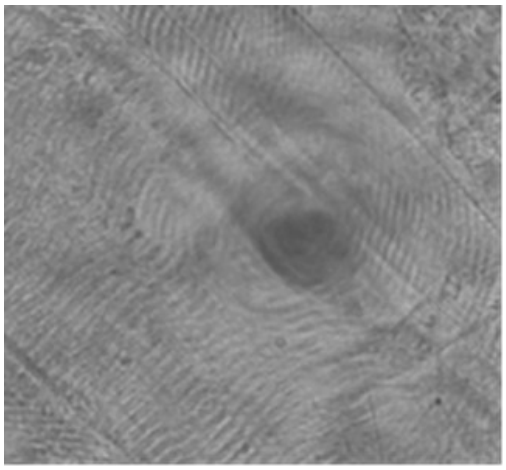

Рис. 4. Узел сокращения, захвативший часть миофибрилл.

Эти волокна в конечном итоге составляют красное мясо.

Как правило, миофибриллы этих волокон собраны в своеобразные пучки, между которыми хорошо просматриваются достаточно объемные прослойки саркоплазмы. На поперечных срезах пучки этих миофибрилл видны в виде полей Конгейма.

Морфологически микроструктура миофибрилл поперечно исчерченных мышечных волокон состоит из последовательно и строго чередующихся темных, и светлых дисков (рис. 2 а, 3). При анализе необходимо учитывать, что темные А-диски анизотропные и поэтому в поляризационном микроскопе они дают двойное лучепреломление. СветлыеI-диски изотропные и в поляризационном микроскопе они наоборот производят простое одинарное лучепреломление.

Расположение темных и светлых дисков различных миофибрилл имеет строго определенную последовательность: все темные - против темных, все светлые - против светлых, они располагаются один против другого, соответственно. И мышечное волокно в конечном итоге приобретает поперечную исчерченность.

В оптическом микроскопе при средних и больших увеличениях при микроскопии легко обнаруживаются их структурные особенности. Посредине светлого изотропного диска проходит хорошо заметная плотная полоска, обозначаемая буквой Z и называемая промежуточной полоской. Ширина ее достигает 2,5 мкм. Посередине темного диска проходит полоска, обозначаемая буквой М и называемая срединной. В анизотропном диске обнаруживается еще более широкая полоска, обозначаемая буквой Н. Она также располагается посередине диска и включает полоску М. Если мышечные волокна подвергнуть мацерации или воздействию фермента трипсина, то их миофибриллы распадутся на совершенно идентичные участки, называемые саркомерами. Такой распад происходит точно по полоскам Z в каждом светлом диске.

Таким образом, саркомеры представляют собой элементарные структурные единицы миофибрилл. Длина саркомеров у крупного рогатого скота и свиней не превышает 4 мкм. Каждый саркомер состоит из двух половинок светлого диска по концам с полосками Z и цельного темного диска.

Микроструктура мяса претерпевает изменения в процессе автолиза. Автолиз мяса — это чрезвычайно сложный и многогранный процесс, до настоящего времени еще недостаточно изученный. Вместе с тем изучать процесс автолиза во всех деталях необходимо, так как именно в это время созревает мясо. В процессе созревании мяса выделяют несколько периодов, один из которых носит условное название «послеубойное (посмертное) окоченение» (rigormortis), когда все мускулы туши животного вовлекаются в процесс подвергаются сильному сокращению и напряжению. Этот период длится при комнатной температуре около суток, после чего начинается постепенное расслабление. Явление rigormortismожно рассматривать и как результат исчезновения или распада АТФ в мышцах. При отсутствии АТФ актин и миозин, соединяясь, образуют жесткие цепи актомиозина (актомиозиновый комплекс), что в конечном итоге проявляется потерей растяжимости мышечных волокон. В данном

процессе можно выделить два этапа: первый называется период задержки, когда актомиозиновый комплекс образуется медленно, за ним следует второй- быстрая фаза, когда актомиозиновый комплекс весьма быстро образуется. У отдельных мышц растяжимость при этом может полностью утрачивается, у других едва сохраняется.

В настоящее время с точки зрения биохимических процессов многое стало ясным и явления раннего автолиза возможно определить. Однако морфологические изменения в мышцах изучены еще недостаточно, особенно процессы, происходящие во время созревания мяса, при его замораживании и размораживании или другой технологической обработке. Таким образом, морфологические показатели мышечной ткани при микроскопировании могут быть четкими и дополнительными индикаторами происходящих процессов при определении качества мяса и мясопродуктов при меньших затратах времени и средств на анализы. А также способны подтвердить или опровергнуть возможное замораживание при реализации мяса в охлажденном виде.

Морфологический анализ отчетливо обнаруживает единую микроструктурную характерность исследуемых мышц разного термического состояния: парного и охлажденного, равно как и отличия в их внутренней микроструктуре. Диаметр мышечных волокон мышц различен. На продольных срезах во всех мышцах достаточно хорошо была различима гофрированная либо складчатая структура мышечных волокон.

Гофрированность объясняется разной степенью сокращения и сокращенности соседних волокон: гофрированные волокна имеют слабое сокращение или вовсе распущены (рис. 3), а соседние с ними прямые волокна сильно сокращены. Они и вызывают складчатость в соседних расслабленных волокнах (рис. 1).

Характерно, что гофрированность и либо складчатая структура мышечных волокон малоустойчива, обнаружена прямая корреляция с термическим состоянием. В охлажденном мясе – выражена незначительно или почти полностью исчезает. В размороженном мясе она всегда отсутствует.

Это один из морфологических признаков, который можно хорошо наблюдать при увеличении микроскопа 10х40 и оценивать качество мяса по степени созревания: парное или охлажденное.

Форма поперечных срезов волокон мускулов полигональная, волокна либо крупные или мелкие, но в любом мускуле расположены плотно отдельными крупными пучками, разъединяющимися прослойками перимизия.

В охлажденном мясе обнаруживали узлы сокращения (рис. 4). Они представляли собой структуры, являющиеся сильным сокращением отдельных участков разных мышечных волокон.

Характерно, что в свинине на 2-3 сутки обнаруживали четкие узлы сокращения. Необходимо отметить, что в этих же мускулах, подвергнутых замораживанию с последующим размораживанием, узлов сокращения не обнаруживали.

При исследовании остывшего мяса, обнаруживали различную сокращенности мышечных волокон и разное количество сокращенных и гофрированных волокон. В мускулах постоянно присутствовали узлы сокращения. Их наблюдалось меньше в первые часы после убоя, а затем, в процессе происходящего автолиза мяса число их заметно увеличивалось. Структурно узлы сокращения в разных мускулах различаются, но в целом морфологическая картина одинакова.

При морфологическом анализе клеток мышечной ткани установили, что ядра расслабленных мышечных волокон имели овальную или слегка вытянутую, изредка палочковидную форму соответственно. При этом наблюдали достаточно хорошо выраженную гранулированность ядра.

В охлажденной свинине по длине мышечного волокна большого поясничного мускула установили, что на продольном и поперечном срезах между наружным и внутренним слоями сарколеммы лежит пространство в среднем шириной 14-24

нм. Структура ядер хорошо просматривается в мышечных волокнах в расслабленном и сокращенном состоянии. Многочисленные ядра удлиненно-овальной формы располагаются под сарколеммой по периферии расслабленных волокон. Если волокна были резко сокращены, то ядра приобретали округлую форму. Все миофибриллы поперечнополосатых мышечных волокон построены из правильно чередующихся темных и светлых дисков.

Установили, что гофрированность и складчатость нестабильна. В охлажденном мясе складчатость обнаруживается крайне редко. Она постепенно почти полностью исчезает. Это один из морфологических признаков, который можно хорошо наблюдать при увеличении микроскопа 10х40 и оценивать качество мяса по степени созревания: парное или охлажденное.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при замораживании общий вид мышечных волокон заметно изменяется - поперечная исчерченность проявляется хуже, иногда исчезает и не обнаруживается. Все волокна после замораживания значительно уменьшаются в объеме (становятся тоньше).

Существенные изменения происходят в ядрах клеток. В размороженном мясе они становятся менее объемные, хроматин виден сплошной массой, в большинстве случаев, пикнотического характера. Хроматин коагулирует в сплошную сильно окрашивающуюся массу. Ядра в целом изменяют свою форму и если обнаруживаются, то имеют вид темной удлиненно-овальной формы гомогенной массы. Повсеместно отмечали локальные деструкции сарколеммы клетки с выходом мелкозернистой белковой массы в межмышечное пространство.

Между симпластами и пучками размороженных мышечных волокон появляются довольно обширные пустые пространства, при этом наблюдали разрыхленную сетчатую структуру, которая состояла практически из единичных анастомозов тонких нитей соединительной ткани.

В мясном соке размороженного мяса обнаруживали сигаровидные или удлиненно-овальные ядра мышечных волокон. После размораживания охлажденного, а затем замороженного мяса, ядер наблюдали в 2-3 раза меньше, чем в мясном соке замороженного парного мяса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования показали: по морфологическим особенностям волокон – наличие гофрированности и складчатости, объему саркомеров, присутствия узлов сокращения, можно судить о функциональных и качественных характеристиках в различии как отдельных мышц туши, так и о степени выраженности процесса автолиза.

Использование гистологических и микроскопических методик исследования сравнительных изменений, протекающих в парном, охлажденном и размороженном мясе, может способствовать точности и совершенствованию методов выявления размороженного мяса при фальсификации им охлажденного, а также режимов обработки и соблюдения условий хранения охлажденного мяса.

Morphological analysis of pork assessment. Smirnov A., PhD of Vet.Sc., docent; Urban V. PhD of Vet.Sci., docent Department of veterinary-sanitary expertise St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

ABSTRACT

The article presents a morphological analysis of different thermal conditions of pork at the cellular level. The purpose of the study is to develop and improve classical histological techniques and methods for assessing the quality of raw meat to determine falsification. And to creat scientifically based methodology of scientific and practical value. The objects of research were raw meat materials - pork with different thermal conditions: chilled, frozen, thawed. As a control, we used histological preparations of fresh pork meat, made by the classical method according to GOST 19496-2013. The studies were carried out in accordance with the classical microstructural analysis and with standardized methods, in the author's modification.

The author’s modification of the method

allowed to reduce the time for preparing sections for research and to exclude expensive equipment for the preparation of histological sections. Microscopy of sections was carried out using a MicroOptix MX 300 (T) light microscope (West Medica, Austria). Photography of the preparations was carried out using a CAM® V1200 (C) HD video camera (West Medica, Austria).

The microstructure of meat undergoes changes in the process of autolysis. Microscopic analysis clearly reveals the general structural features of the studied muscles of chilled and thawed meat, as well as differences in their internal structure. The thickness of the muscle fibers of different muscles is various. The corrugated or folded shape of many muscle fibers of the cooled meat is clearly visible in all muscles on the longitudinal section. Corrugated fibers have a slight contraction or are completely loose, and at the same time the adjacent straight fibers are strongly reduced. They cause folding in neighboring relaxed fibers.

It was found that corrugation and folding are unstable, they almost completely disappears in chilled meat. This is one of the morphological features that can be well observed with a magnification of 10 × 40 microscope and can be evaluate the quality of meat by the degree of maturation: fresh or chilled.

The obtained data indicate that the general appearance of muscle fibers noticeably changes during freezing - the transverse striation can appear worse, undetected and sometimes it can disappears. All fibers become thinner after freezing.

Significant changes occur in the nuclei of cells. In thawed meat, they become smaller and thinner, chromatin is visible as a continuous mass with a pycnotic nature. Chromatin coagulates into a continuous, highly stained mass. The nuclei change their shape and they can be looked like a dark elongated oval shape of a homogeneous mass.

The use of histological and microscopic methods for studying comparative changes in fresh, chilled and thawed meat can contribute to the accuracy and improvement of methods for detecting thawed meat that can be used during falsification of chilled meat, as well as it allows to study processing and storage conditions for chilled meat.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова, Л. В. Анатомия и гистология сельскохозяйственных животных / Л. В. Антипова, В. С. Слободяник, С. М. Сулейманов. – Москва : КолосС, 2013. - 384 с.
2. ГОСТ 19496-2013. Мясо и мясные продукты. Метод гистологического исследования. – Москва : Стандартинформ, 2014. - 10 с.
3. An express assessment method for meat quality and safety / T. Kalyuzhnaya, L. Karpenko, D. Orlova, A. Drozd, V. Urban // International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies. -2020. - Vol. 11, №1. - P. 8.
4. Morphological features of the meat of various species of animals in assessing the thermal state / D.A. Orlova, T.V. Kalyuzhnaya, A.N. Tokarev, A.V. Smirnov, A.S. Smolkina // Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences. - 2019. - Vol. 6, iss.6. – P.11756-11760.