

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЯСНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ

В.А. Пчелкина

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова»,
109316, Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 26

e-mail: pchelkina@vniimp.ru

Дата поступления в редакцию: 05.07.2016

Дата принятия в печать: 20.09.2016

Применение морфометрии позволяет существенно расширить результаты гистологического анализа. Установлены основные этапы проведения количественного микроструктурного исследования с применением системы анализа изображений: считывание изображения с микроскопа с помощью подключенной фото-видеокамеры, его передача в компьютер, сохранение, корректирование в программе анализа, отбор объектов для морфометрии, проведение измерения, статистическая обработка и анализ данных, представление результатов в табличной или графической форме. Корректировка изображения включает в себя следующие действия: регулировка контрастности, яркости и цветности; подавление шума, сглаживание; повышение резкости и выделение деталей; коррекция освещенности и баланса белого. Определяющим условием является правильный способ подготовки образца к исследованию и выбор специального метода окрашивания изучаемого компонента: для жировых компонентов окрашивание Суданом III, IV или OilRedO, для крахмала – раствор Люголя, для растительных белков – иммуногистохимические методы. Автоматический режим измерений существенно сокращает время исследований, но оператор должен проводить ручную корректировку действий, совершаемых компьютером. Проводятся следующие параметры измерений: площадь (в том числе внутренняя площадь и периметр), размеры (средняя хорда, длина, ширина, средний размер, минимальный, максимальный и средний диаметр Фере, размеры по X и Y), размеры по формам (фактор круга/эллипса, округлость, удлиненность), размеры по моделям, цветовые и оптические. Систему анализа изображений целесообразно использовать при проведении микроструктурного анализа в соответствии с ГОСТ 32224-2013 «Мясо и мясные продукты для детского питания. Метод определения размеров костных частиц» и ГОСТ Р 54047-2010 «Мясо и мясные продукты. Метод определения дисперсности». Использование новейшего программного обеспечения позволяет на порядки увеличить производительность труда и оперативно получать результаты высокого качества.

Мясо, мясные продукты, гистологический анализ, морфометрия, компьютерная система анализа изображений

Введение

Методы микроструктурного анализа, наряду с физико-химическими и молекулярно-биологическими, достаточно широко распространены как в России, так и во всем мире. Гистологические методы позволяют выявить локальные изменения в мясном сырье, влияющие на химический состав и качество готового продукта. Они могут быть использованы для определения составных компонентов и технологии производства различных видов полуфабрикатов и готовых продуктов [1].

Сегодня известно большое количество как классических технических приемов подготовки образцов и получения препарата для проведения микроструктурных исследований, так и основанных на возможностях современного гистологического оборудования. Большинство исследований носит качественный характер и направлено на выявление того или иного ингредиента состава, тем не менее результаты могут быть существенно расширены за счет количественного (морфометрического) анализа [2].

Основные направления применения морфометрии – это расчет процентного содержания компонента в продукте (в данном случае результат будет выражаться в объемных процентах (об. %) – процент площади, занимаемой данным компонентом в

исследуемом образце) и определение линейных размеров частиц исследуемого образца.

Существует ручная морфометрия. Например, для определения процентного содержания компонента в продукте используются специальные измерительные решетки, вставляемые в окуляр микроскопа, либо интеграционные окуляры (окуляры с измерительной сеткой). Линейные размеры частиц измеряют с помощью окулярного микрометра – линейки, представляющей собой специальную вставку в окуляр микроскопа. Измерения проводят с использованием различных сочетаний объективов и окуляров в соответствии с размерами анализируемых структур. Однако в этом случае работа требует больших трудозатрат при меньшей точности результатов.

На современном этапе развития гистологического оборудования и программного обеспечения для проведения исследований все шире используются компьютерные системы анализа изображения, представляющие собой модульные системы обработки и анализа, предназначенные для световой микроскопии и проведения морфометрических исследований. Данные системы позволяют существенно сократить время исследования, одновременно предоставляя возможность значительно расширить набор определяемых показателей [3].

В настоящее время в мясоперерабатывающей промышленности системы анализа изображений используются для измерения различных параметров мышечного волокна, для определения количества тканей и костей, особенно в мясе механической обвалки, для обнаружения растительных компонентов [4, 5].

Во ВНИИМП активно проводятся работы, направленные на совершенствование и модернизацию традиционных микроструктурных методов определения качества мясного сырья и продуктов, в том числе на расширение возможностей применения компьютерных систем анализа изображений.

Объекты и методы исследований

Гистологические исследования проводились в соответствии с действующими стандартизованными методами: ГОСТ 19496-2013 «Мясо и мясные продукты. Метод гистологического исследования», ГОСТ 31796-2012 «Мясо и мясные продукты. Ускоренный метод определения структурных компонентов состава», ГОСТ 32224-2013 «Мясо и мясные продукты для детского питания. Метод определения размеров костных частиц», ГОСТ Р 54047-2010 «Мясо и мясные продукты. Метод определения дисперсности», ГОСТ 31474-2012 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных белковых добавок», ГОСТ 31500-2012 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных углеводных добавок».

Срезы изготавливали на криостатном микротоме MICROM HM-525, толщина срезов 16-20 мкм. Окрашивали срезы гематоксилином Эрлиха и докрасивали 1%-м свежеприготовленным водно-спиртовым раствором эозина; заключали под покровные стекла в глицерин-желатин. Анализ гистологических препаратов проводили на световом микроскопе AxioImagerA1 (CarlZeiss, Германия), применяя объективы с увеличением от 10х до 63х, с подключенной видеокамерой AxioCamMRc 5. Корректирование изображений и морфометрические исследования осуществляли на компьютерной системе анализа изображений AxioVision 4.7.1.0, разработанной для гистологических исследований. Морфометрические исследования проводили в соответствии с традиционными методами количественного анализа и трехкратной повторностью эксперимента.

Результаты и их обсуждение

Система анализа изображений включает в себя три объединенных друг с другом блока: оптическое устройство, считывающее изображение (световой микроскоп или стереомикроскоп), устройство передачи и хранения данных (видеокамера, цифровая фотокамера или сканер, подключенные к компьютеру) и программное обеспечение. Перечисленные блоки должны быть максимально согласованы между собой, чтобы сформированное микроскопом изображение испытывало минимальные искажения в процессе его передачи и последующей обработки на компьютере.

Основные этапы проведения количественного микроструктурного исследования с применением системы анализа изображений: считывание изображения с микроскопа с помощью подключенной фотовидеокамеры, его передача в компьютер, сохранение, корректирование в программе анализа, отбор объектов для морфометрии, проведение измерения. Затем следует статистическая обработка и анализ данных и далее представление результатов в табличной или графической форме.

Корректировка изображения включает в себя следующие действия: регулировка контрастности, яркости и цветности; подавление шума, сглаживание; повышение резкости и выделение деталей; коррекция освещенности и баланса белого. Совершенствование операционного аппарата обработки изображений позволяет существенно снизить трудоемкость микроструктурного анализа.

С помощью систем анализа изображений можно анализировать как макроскопические, так и микроскопические изображения, проводить измерения как в интерактивном, так и в автоматическом режимах (рис. 1).

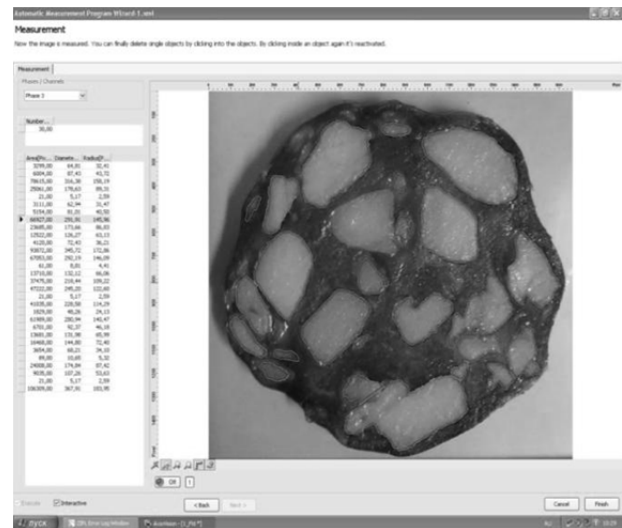


Рис. 1. Определение размера жировых фрагментов на срезе сырокопченой колбасы в интерактивном режиме измерения

Современное модульное программное обеспечение позволяет проводить «выбор» анализируемых структур в автоматическом режиме с учетом многофакторного анализа. 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 важным шагом 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 OilRedO [6], а для выявления крахмала использовать раствор Люголя (рис. 2).

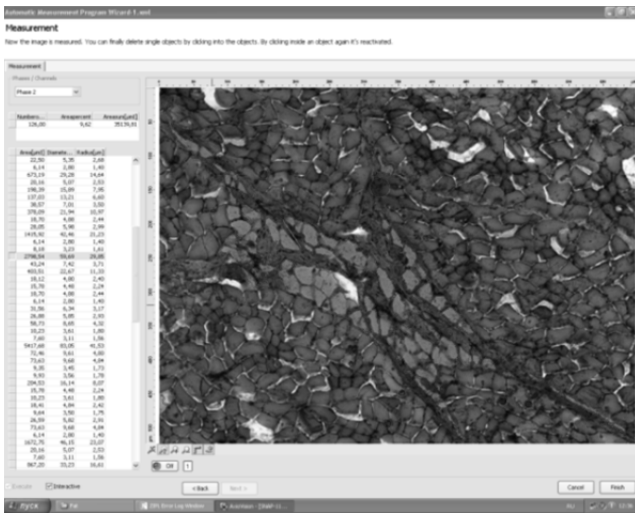


Рис. 2. Определение количества жировой ткани, окрашенной OilRedO, на препарате сырокопченной колбасы в автоматическом режиме измерения

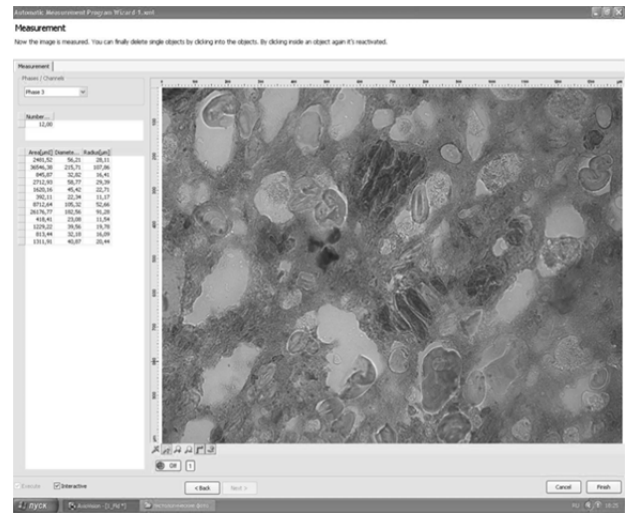


Рис. 3. Определение количества соевого белка на препарате вареной колбасы в автоматическом режиме измерения

Для определения растительных белков, таких как соевый и пшеничный, которые на гистологическом препарате окрашиваются как мышечные структуры, разрабатываются высокоспецифичные иммуногистохимические методы, когда окраске подвергается только выявляемый компонент, что дает возможность широкого применения системы анализа изображения для более детального изучения гистологического препарата и проведения морфометрического анализа [7, 8].

Система анализа изображений дает возможность получить детальную количественную информацию по следующим параметрам измерений: площадь (в том числе внутренняя площадь и периметр), размеры (средняя хорда, длина, ширина, средний размер, минимальный, максимальный и средний диаметр Фере, размеры по X и Y), размеры по формам (фактор круга/эллипса, округлость, удлиненность), размеры по моделям, цветовые и оптические и др.

Автоматическая морфометрия в отличие от ручной предоставляет более точные данные и зависит от способа подготовки образца к исследованию и окрашивания препарата. Тем не менее данный метод чаще всего невозможен без активного вмешательства специалиста-гистолога, который должен проводить ручную коррекцию действий, осуществляемых компьютером. Особенно это необходимо для идентификации и точного установления границ измеряемых частиц, то есть правильного определения тканевой принадлежности, что особенно актуально в микроструктуре мясных продуктов, когда после технологической обработки существенно меняется нативная морфология.

Особенно актуальным является определение количества того или иного компонента в составе продукта (рис. 3). Однако подсчет массовой доли того или иного компонента продукта микроструктурным методом затруднен нелинейной корреляцией между объемными и массовыми данными, прежде всего в связи с различной степенью гидратирования компонентов при технологической обработке.

Во ВНИИМП им. В.М. Горбатова был разработан ГОСТ 32224-2013 «Мясо и мясные продукты для детского питания. Метод определения размеров костных частиц», который основан на измерении размера костных частиц после химического выделения костного остатка из продукта. В стандарте в том числе, предусмотрено и использование компьютерной системы анализа изображения (рис. 4).

При проведении исследований для частиц сложной формы определяют средний диаметр Фере, для удлиненных линейных – длину. Если автоматическое разделение частиц невозможно, прибегают к их интерактивному разделению. В результате работы получают следующие показатели: общее количество частиц, минимальный и максимальный размеры, средний размер частиц, стандартное отклонение, а также другие показатели. Полученные данные представляют в виде таблиц, графиков распределения или диаграмм. В заключение рассчитывают процент частиц, которые превышают нормативный размер.

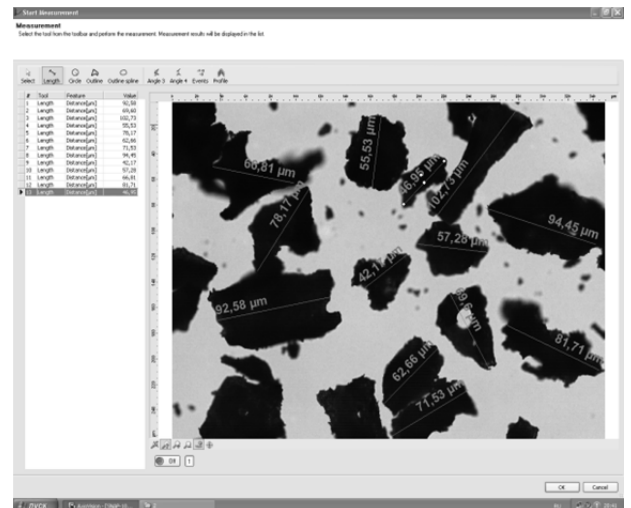


Рис. 4. Определение размера костных частиц

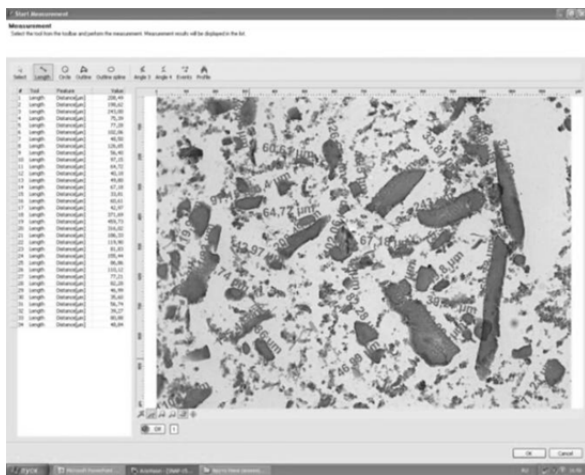


Рис. 5. Определение дисперсности мясного продукта для детского питания

В России действует ГОСТ Р 54047-2010 «Мясо и мясные продукты. Метод определения дисперсности», который позволяет устанавливать размер частиц мясных и мясосодержащих продуктов с использованием количественного гистологического анализа. Это особенно актуально для продуктов, предназначенных для детского питания, что связано с особенностями

физиологии пищеварения детей и строения их желудочно-кишечного тракта (рис. 5) [9].

Выводы

В заключение, хочется отметить, что ни одна из самых современных компьютерных систем анализа изображений не способна заменить квалифицированного исследователя. Это связано прежде всего с тем, что пока современная наука не может создать аппаратуру, характеристики которой приближались бы к возможностям человеческого глаза, и которая могла бы заменить человеческий мозг. Однако системы анализа и обработки изображений, активно развивающиеся в последнее время, позволяют при участии высококвалифицированного специалиста на порядки увеличить производительность труда и оперативно получать результаты высокого качества.

Совмещение высокоспецифичных методов окрашивания с применением новейшего программного обеспечения позволит существенно расширить возможности использования системы анализа изображений для исследования мясного сырья и готовых продуктов.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-10073).

Список литературы

1. Хвыля, С.И. Применение гистологического анализа при исследовании мясного сырья и готовых продуктов / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, С.С. Бурлакова // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – № 3 (26). – С. 132–138.
2. Хвыля С.И. Контроль качества мяса: гистологические методы / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина // Контроль качества продукции. – 2013. – № 10. – С. 30–34.
3. Хвыля, С.И. Методология установления фальсификации и дисперсности мясных продуктов с использованием гистологии и систем анализа изображения / С.И. Хвыля // Все о мясе. – 1999. – 4. – С. 15–17.
4. Chmiel M. Application of video image analysis in meat technology / M. Chmiel, M. Slowinski // Medycyna Weterynaryjna. – 2013. – № 11 (69). – С. 670–673.
5. Pospiech, M. Microscopic methods in food analysis / M. Pospiech, Z. Rezacova-Lukaskova, B. Tremlova, Z. Randulova, P. Bartl // Maso international, Brno. – 2011. – Vol. 1. – P. 27–34.
6. Newman P. B. The use of video image analysis for quantitative measurement of visible fat and lean in meat: Part 4 – application of image analysis measurement techniques to minced meats / P. B. Newman // MeatScience. – 1987. – № 19. – С. 139–150.
7. Randulova, Z. Determination of soya protein in model meat products using image analysis / Z. Randulova, B. Tremlova, Z. Rezacova-Lukaskova, M. Pospiech, I. Straka // Czech Journal of Food Sciences. – 2011. – Vol. 29. – Is. 4. – P. 318–321.
8. 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.
9. Хвыля, С.И. Определение дисперсности продуктов детского питания гистологическим методом / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, С.С. Бурлакова // Мясная индустрия. – 2010. – № 11. – С.33–36.

APPLICATION OF IMAGE ANALYSIS SYSTEMS IN THE STUDY ON RAW MATERIALS AND MEAT PRODUCTS

V.A. Pchelkina

The Gorbatov's All-Russian Meat Research Institute (VNIIMP),
26, Talalikhina Str., Moscow, 109316, Russia

e-mail: pchelkina@vniimp.ru

Received: 05.07.2016

Accepted: 20.09.2016

Application of morphometry makes it possible to widen the results of histological assay. The main stages in the quantitative study using image analysis system are reading the image from a microscope with a connected photo-video camera, its transfer to a computer, storing, correction of the computer program, selection of the object for morphometry, measurements, statistical processing and analysis of data, presentation of the results in tabular or graphical forms. Image adjustment includes the following steps: correction of contrast, brightness and color; noise reduction; smoothing; sharpening, and details highlighting, correction of light and white balance. The correct method of sample preparation and the choice of a special method of staining of the studied components is a determining condition for a successful automatic analysis. They are Sudan III, IV or Oil Red O, for fat components staining, Lugol solution for starch, immuno-histo-chemical methods for vegetable proteins. Automatic measurement mode reduces the time of research significantly, but requires active intervention of the operator for manual correction of operations implemented by a computer. The measurements are carried out with the following parameters: area (including inner area and perimeter), dimensions (diameter, chord, size, length, width), shape dimensions (form factor, circularity, elongation), characterizing the position and orientation of objects (the X and the Y, direction), or optical densitometry (brightness, optical density). The application of image analysis system is useful when carrying out a quantitative microstructure assay in accordance with GOST 32224-2013 "Meat and meat products for child nutrition. Method for determination of bone particle size", and GOST R 54047-2010 "Meat and meat products. Method of dispersion determination". The use of the latest software allows increasing productivity and obtaining high quality results quickly.

Meat, meat products, histology assay, morphometry, computer system of image analysis

References

1. Khvylyya S.I., Pchelkina V.A., Burlakova S.S. Primenenie gistologicheskogo analiza pri issledovanii myasnogo syr'ya i gotovykh produktov [Application of the histological analysis for investigation of meat raw materials and finished products]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Food Processing: Techniques and Technology], 2012, vol. 26, no. 3, pp. 132–138.
2. Khvylyya S.I., Pchelkina V.A. Kontrol' kachestva mjasa: gistologicheskie metody [Meat quality control: histological methods]. *Kontrol' kachestva produktsii* [Production Quality Control], 2013, no. 10, pp. 30–34.
3. Khvylyya S.I. Metodologiya ustanovleniya fal'sifikatsii i dispersnosti myasnykh produktov s ispol'zovaniem gistologii i sistem analiza izobrazheniya [Methodology falsification and dispersion of meat products using histology and image analysis systems]. *Vse o miase* [All About Meat], 1999, no. 4, pp. 15–17.
4. Chmiel M., Slowinski M. Application of video image analysis in meat technology. *Medycyna Weterynaryjna*, 2013, no. 11 (69), pp. 670–673.
5. Pospiech M., Rezacova-Lukaskova Z., Tremlova B., Randulova Z., Bartl P. Microscopic methods in food analysis. *Maso international*, 2011, vol. 1, pp. 27–34.
6. Newman P.B. The use of video image analysis for quantitative measurement of visible fat and lean in meat: Part 4 – application of image analysis measurement techniques to minced meats. *Meat Science*, 1987, no. 19, pp. 139–150. DOI: 10.1016/0309-1740(87)90019-2.
7. Randulova Z., Tremlova B., Rezacova-Lukaskova Z., Pospiech M., Straka I. Determination of soya protein in model meat products using image analysis. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, vol. 29, iss. 4, pp. 318–321.
8. Boutten B., Humbert C., Chelbi M., Durand P., Peyraud D. Quantification of soy proteins by association of immuno-histochemistry and video image analysis. *Food and Agricultural Immunology*, 1999, vol. 11, pp. 51–59.
9. Khvylyya S.I., Pchelkina V.A., Burlakova S.S. Opredelenie dispersnosti produktov detskogo pitaniya gistologicheskim metodom [Determination of dispersion of child nutrition products by histological method]. *Meat Industry Journal*, 2010, no.11, pp. 33–36.

Дополнительная информация / Additional Information

Пчелкина, В.А. Возможности применения системы анализа изображения при исследовании мясного сырья и продуктов / В.А. Пчелкина // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 43. – № 4. – С. 70–75.

Pchelkina V.A. Application of image analysis systems in the study on raw materials and meat products. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2016, vol. 43, no. 4, pp. 70–75 (In Russ.).

Пчелкина Виктория Александровна

канд. техн. наук, старший научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова», 109316, Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 26, тел.: +7 (495) 676-92-31, e-mail: pchelkina@vniimp.ru

Viktoriia A. Pchelkina

Cand.Sci.(Eng.), Senior Researcher of the of Experimental Clinic - Laboratory of Biologically Active Substances of an Animal Origin, Gorbato's All-Russian Meat Research Institute (VNIIMP), 26, Talalikhina Str., 109316, Moscow, phone: +7 (495) 676-92-31, e-mail: pchelkina@vniimp.ru

