

Микробиологические риски как причина пороков внешнего вида сыра

Галина Михайловна Свириденко, д-р техн. наук, главный научный сотрудник, руководитель направления микробиологических исследований

Марина Борисовна Захарова, канд. техн. наук, научный сотрудник, руководитель направления исследований по средствам микробиологического контроля
E-mail: m.zakharova@fnscps.ru

Евгения Евгеньевна Ускова, младший научный сотрудник направления микробиологических исследований молока и молочной продукции

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, г. Углич

В статье приводятся сведения о распространенности пигментообразующих микроорганизмов (споровых аэробных бактерий рода *Bacillus*, дрожжей, микрококков и др.) в окружающей среде; их отличительных характеристиках, имеющих значение для сыроделия; возможных пороках в сыре, связанных с их развитием, а также результаты исследований сыров промышленного изготовления, имеющих пороки внешнего вида – образование цветных пятен на поверхности. Объектами исследования являются сыры в процессе созревания и хранения, выработанные в промышленных условиях в разных регионах России, с наличием пороков внешнего вида – поверхностных пятен различных оттенков желтого и красного цвета. Развитие пигментообразующих микроорганизмов на поверхности сыра может происходить при относительно низкой температуре созревания, значительной концентрации поваренной соли и критически низких концентрациях кислорода. Пигментообразующая микрофлора попадает в сыр из молока, рассола или с объектов производственной среды, включая воду, воздух, оборудование. Основным источником обсеменения ферм споровыми аэробными бактериями, дрожжами, плесневыми грибами, а, соответственно, и производимого молока являются сухие и сочные корма. Обсеменение сырого молока микрококками, наряду с доильным оборудованием и воздушной средой, в первую очередь, связано с выменем и кожными покровами животных. В связи с применением низкотемпературной термической обработки сырого молока при изготовлении сыра и возможными рисками повышенного содержания остаточной микрофлоры в пастеризованном молоке, общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, включая группу пигментообразователей, в сборном молоке для сыроделия не должно превышать 10^4 КОЕ/см³. Для отдельных групп микроорганизмов, таких как дрожжи и споровые микроорганизмы рода *Bacillus*, приемлемый уровень в молоке для сыроделия составляет не более 10^2 КОЕ/см³. Присутствие их в сборном сыром молоке в количестве более 10^3 КОЕ/см³ свидетельствует о наличии высоких микробиологических рисков появления пороков при изготовлении сыра. В результате проведенных исследований установлено, что преимущественно микрофлорой, причастной к образованию цветных пятен на поверхности сыров, могут быть дрожжи, микрококки, аэробные споровые палочки или их комбинации.

Ключевые слова: сыр, споровые аэробные микроорганизмы, микрококки, дрожжи, порча, пигментообразование, пороки внешнего вида

Для цитирования: Свириденко, Г. М. Микробиологические риски как причина пороков внешнего вида сыра / Г. М. Свириденко, М. Б. Захарова, Е. Е. Ускова // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 3. С 33–43. <https://www.doi.org/10.21603/2073-4018-2024-3-3>

Введение

Сыроделие, являясь сложным биотехнологическим производством, зависит от интенсивности и направленности микробиологических процессов, обусловленных преимущественно развитием заквасочных микроорганизмов. Однако нельзя исключить влияние посторонней микрофлоры – остаточной после пастеризации и микрофлоры вторичного обсеменения, которая, в зависимости от количественного ее содержания, участвует в процессах созревания сыров и может вызывать появление пороков вкуса и запаха, консистенции, внешнего вида.

Одним из пороков внешнего вида сыра является образование цветных пятен на его поверхности. По литературным данным, причины возникновения порока могут быть обусловлены использованием красителя аннато и проявлением таких фак-

торов как изменение уровня pH сырной матрицы (особенно ниже 5,4 ед. pH), изменение окислительно-восстановительного потенциала, взаимодействие между нитратами и аннато [1, 2].

F. G. Martly и V. Michel связывали формирование дефекта с образованием окрашенных продуктов в реакциях Майяра при интенсивном накоплении галактозы [3]. Однако чаще появление данного порока вызывают микроорганизмы, образующие пигменты разного цвета при своем развитии или продуцирующие вещества – хромогены, приобретающие окраску при взаимодействии с внешними факторами [4, 5].

Пигменты бактерий – это вторичные метаболиты, специфические фоторецепторные молекулы. Пигменты различаются химическим составом и цветом, растворимостью в тех или иных веществах (табл. 1). Их подразделяют на растворимые в воде

или в жирорастворителях (спирте, ацетоне, эфире) и нерастворимые в воде и спирте. Водорастворимые (феназиновые, пиразиновые) способны диффундировать в окружающую среду (хромопарные), при этом наблюдается окрашивание не только колоний микроорганизмов, но и питательной среды. Спирторастворимые (каротиноиды) и нерастворимые (меланины) тесно связаны с клеткой, локализованы в цитоплазме, вакуолях, во внутриклеточных выростах цитоплазматической мембраны (хромофорные), поэтому окрашивание происходит только колоний микроорганизмов^{1,2} [6 – 8].

Пигментообразование зависит от многих факторов внешней среды. Для синтеза пигментов требуются питательные среды, в составе которых присутствуют компоненты, необходимые для формирования этого признака. В литературе приводятся сведения, что на синтетической среде с глюкозой и 0,5 % смесью аминокислот, как единственным источником азота (аспарагин, аланин, аргинин, гистидин, лейцин, валин, триптофан, тирозин, фенилаланин), бактерии группы *Vacillus*

subtilis через 72 ч культивирования синтезируют черный пигмент, а при снижении концентрации аминокислот в 2 раза пигмент становится бурым. При исключении из сред микроэлементов колонии не имеют пигмента. Отсутствие отдельных аминокислот (аспарагина) из указанного комплекса увеличивает время появления меланина в среде или приводит к его утрате².

На образование пигментов также влияют условия культивирования – доступность кислорода, освещенность, температурные режимы. У многих микроорганизмов образование пигментов происходит только в условиях освещенности (фотохромогенные), в то же время отдельные представители (скотохромогенные) продуцируют пигменты при культивировании как в темноте, так и на свету^{1,3} [6].

Пигментообразование у микробов имеет определенное физиологическое значение. Пигменты обеспечивают защиту клеток от природной ультрафиолетовой радиации, участвуют в биохимических реакциях, обладают антибиотическим действием^{2,4}.

Таблица 1

Классификация пигментов по химическому составу, цвету, растворимости

Наименование пигмента (класс соединений)	Цвет	Растворимость	Пигментообразующие микроорганизмы
Индигоидин (азахиноновые)	Синий	Водорастворимые	Коринебактерии, псевдомонады, артробактерии
Каротиноиды	Красный, оранжевый, желтый, белый	Спирторастворимые	Сарцины, актиномицеты, стафилококки (<i>S. aureus</i>), микрококки, коринебактерии, дрожжи
Меланиновые	Черный, коричневый	Преимущественно нерастворимые в воде, спирте, сильных кислотах	Плесневые грибы; представители родов <i>Bacteroides</i> (<i>B. niger</i>) и <i>Bacillus</i> (<i>B. subtilis</i> subsp. <i>niger</i>)
Продигиозин (пирроловые)	Ярко-красный	Спирторастворимые	<i>Serratia marcescens</i> (чудесная палочка)
Пиоцианин (фенозиновые)	Сине-зеленый (щелочная среда) или красный (кислая среда)	Органические растворители (хлороформ) в щелочной и нейтральной среде / Водорастворимые в кислой среде	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (синегнойная палочка)
Флюоресцин (ксантеновые, входящие в класс трифенилметановых красителей)	Зеленый, зеленовато-желтый	Водорастворимые. Растворимые в ледяной уксусной кислоте, в кипящих этаноле и эфире, водных щелочах, плохо растворимые в воде	<i>Ps. fluorescens</i> , <i>Ps. aeruginosa</i>
Пульхерримин (пиразиновые)	Темно-красный	Водорастворимые	Дрожжи <i>Metschnikowia pulcherrima</i>

¹Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта – Пер. с англ. – М.: Издательство «Мир», 1980. – 496 с.

²Использование физиолого-биохимических свойств микроорганизмов в диагностических реакциях. Пигменты микроорганизмов [Электронный ресурс]. URL: <https://petritest.ru/labinskaya-obshchaya-i-sanitarnaya-mikrobiologiya/9-3-ispolzovanie-fiziologo-biokhimicheskikh-svoystv-mikroorganizmov-v-diagnosticheskikh-reaktsiyakh> (дата обращения 04.07.2024).

³Пигменты микроорганизмов и фотосинтез [Электронный ресурс].

URL: https://dommedika.com/medicinskaia_mikrobiologia/pigmenti_mikroorganizmov.html (дата обращения 23.05.2024).

⁴Хохлова, И. Ю. Выделение и исследование антибиотической активности метаболита *Pseudomonas aeruginosa* пиоцианина / И. Ю. Хохлова, М. В. Чубик // Перспективы развития фундаментальных наук: IX Международная конференция студентов и молодых ученых. – Томск, 2012. – С. 513–515.

Среди разнообразных видов и штаммов в микрофлоре сырого молока также присутствуют микроорганизмы, способные продуцировать различные пигменты. В их число входят микрококки, стафилококки, дрожжи, плесневые грибы, энтерококки, споровые палочки рода *Bacillus*, бревибактерии, пропионовокислые бактерии и др. Многие из этих представителей, обладая определенной термоустойчивостью, выдерживают низкотемпературные режимы пастеризации, принятые в сыроделии, и являются частью микробиоты сыров.

Споровые палочки рода *Bacillus*. Микроорганизмы рода *Bacillus* образуют термоустойчивые эндоспores и благодаря этому обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к внешним физическим и химическим воздействиям [9, 10]. Отличаются широким температурным диапазоном роста – от 3–5 °С (*Bacillus megaterium*, *B. subtilis*) до 65–75 °С (*B. stearothermophilus*). Аэробы или факультативные анаэробы. Отношение к повышенной температуре, pH и содержанию NaCl в среде сильно варьирует. Многие представители растут при содержании соли NaCl 5–7 %¹.

Бактерии рода *Bacillus* считаются почвенными микроорганизмами, однако широко распространены в окружающей среде и выявляются с растений и растительных остатков, обнаружены в пресной и морской воде, воздухе, донных отложениях, желудочно-кишечном тракте животных, человека, насекомых [11–14], что служит постоянными источниками обсеменения ферм и сырого молока данной группой микроорганизмов.

Представители рода *Bacillus*, как правило, выявляются в составе микрофлоры сырого молока, при этом их количество зависит от условий содержания животных, используемых кормов, режимов кормления, санитарии при получении молока. По данным в источнике [11], в 1 см³ сырого молока может содержаться аэробных спорообразующих бактерий от 100 до 200 спор при стойловом содержании и от 10 до 20 спор при пастбищном содержании. Контроль сырого молока, осуществляемого во ВНИИМС от поставщиков центрального региона России, показывает аналогичные результаты – содержание спор мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в среднем составляет $(2,4 \pm 4,8) \times 10^1$ спор/см³ с разбросом показателя от единичных спор до $2,9 \times 10^2$ спор/см³ (N = 45). Уровень до 100 спор/см³ считается приемлемым для молока для сыроделия в соответствии с СТО ВНИИМС 019-2019 «Молоко коровье сырое.

Технические условия» (не более 10² КОЕ/см³). В то же время их повышенное количество в сборном сыром молоке (более 10³ спор/см³) может свидетельствовать о наличии рисков, связанных с бациллами, и провоцировать появление пороков при изготовлении сыра.

Отдельные представители рода *Bacillus*, такие как *B. atropaeus*, *B. megaterium*, *B. indicus*, *B. nakamurai*, *B. cibi*, *B. firmus* и др., образуют пигменты различного вида и цвета [9, 15, 16].

Bacillus atropaeus (где «ater» означает «черный», а «phaeus» – коричневый и «atropaeus» означает «темно-коричневый») – грамположительные аэробные спорообразующие бактерии, фенотипически сходные с *B. subtilis*. Отличаются продуцированием темно-коричневого пигмента при культивировании в средах, содержащих источник органического азота [17]. Характерные свойства *B. atropaeus*, описанные Л. К. Nakamura [17], свидетельствуют о возможном развитии данных микроорганизмов в процессе созревания сыров: при оптимальной температуре роста от 28 до 30 °С максимальная температура составляет от 50 до 55 °С, а минимальная – от 5 до 10 °С. Растет при pH 5,6 или 5,7 и в присутствии 7 % NaCl. Рост обычно подавляется 0,001 % лизоцимом [17].

По данным Sorokulova I. B., Reznik S. R., пигменты, произведенные *Bacillus subtilis* var. *niger* (ранее употреблявшееся название для *Bacillus atropaeus*) на тирозиновом агаре и синтетической среде, содержащей гистидин, были классифицированы как меланины [18].

Другим видом, способным к продуцированию черных пигментов из группы меланинов, является *Bacillus nakamurai* [19]. Штаммы *B. nakamurai* на питательном агаре образуют кремово-белые, слизистые, полупрозрачные, приподнятые колонии. От близкородственных штаммов отличаются по образованию черного пигмента на пептонном железном агаре через 72 ч при 30 °С. Оптимальные температура и pH составляют 37 °С и 7,0 соответственно. Однако рост возможен при активной кислотности от 5,5 до 10 ед. pH и пониженной температуре. Они используют цитрат и гидролизуют казеин; производят кислоту из глюкозы без выделения газа [19]. Результаты биологических тестов показали способность метаболизировать различные вещества, в том числе α-D-глюкозу, D-галактозу; аминокислоты (L-пролин, L-аланин, L-аргинин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, L-гистидин, L-серин); органические кислоты (L-молоч-

ную, уксусную, муравьиную) и др. [19]. Исследованные штаммы развивались, по данным С. А. Dunlap et al., при содержании в среде до 9 % NaCl [19].

Наряду с данными о продуцировании бациллами темных пигментов, в литературе приводятся сведения об образовании желтых, оранжевых и розовых пигментов у представителей рода *Bacillus*, таких как *Bacillus marisflavi*, *B. indicus*, *B. cibi*, *B. firmus*, *B. altitudinis*, *B. safensis* [20]. Синтез красного пигмента, связанного с мембранами спор, выявлен во время споруляции у *Bacillus megaterium* [16]. Пигменты, связанные с мембранами спор или вегетативных клеток, идентифицированы как каротиноиды. Каротиноиды, обладая антиоксидантной активностью, выполняют функцию защиты мембран от окисления и стресса, что повышает устойчивость к ультрафиолетовому облучению и активным формам кислорода, стабилизирует клеточную мембрану при низких температурах [9, 20].

Пигментация и интенсивность окраски при развитии хромогенных бацилл, также как и у других микроорганизмов, может варьировать в зависимости от условий роста – состава питательной среды, температуры, плотности клеточной популяции. Отмечено, что клетки штамма *B. subtilis* 168 L-4 эффективно продуцировали коричневый пигмент в присутствии ионов Mn^{2+} и ряда аминокислот (аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот) [22]. Изолят SF214 из морской воды развивал оранжевый пигмент при 25 °C и формирование белых колоний при 42 °C [20]. Фаза развития клеточной популяции также оказывает влияние на пигментообразование: *B. indicus* вырабатывал желтый каротиноидный пигмент в процессе вегетативного роста клеток, но по мере того, как клетки спорулировали, пигментация менялась на оранжевую [20, 21].

Продуцирование широкого спектра пигментов бактериями рода *Bacillus* обусловлено той или иной формой питательного или внешнего внеклеточного воздействия и направлено на защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды (понижение температуры, повышенное содержание солей, ультрафиолетовое излучение и др.). Значительная часть хромогенных бактерий семейства *Bacillaceae* может продуцировать несколько пигментов различной природы. При этом пигменты могут быть как основным, так и дополнительным фактором защиты бацилл от негативного воздействия ультрафиолета или других факторов внешней среды, в том числе и при созревании сыров [22].

Дрожжи. Другой группой микроорганизмов, способной к пигментообразованию и выявляемой в сыром молоке от единичных клеток до 10^4 КОЕ/см³, являются дрожжи. В соответствии с СТО ВНИИМС 019-2019, содержание дрожжей в молоке для сыроделия не должно превышать 10^2 КОЕ/см³. Превышение данного уровня в сборном сыром молоке создает риски появления пороков, связанных с дрожжами, при изготовлении сыра.

Дрожжи широко распространены во всех климатических зонах в таких природных нишах, как растительные остатки и верхние горизонты почвы, ризосфера, нектароносные цветы, поверхность корнеплодов, фруктов и ягод, и т. д. В этой связи, сухие и сочные корма являются основным источником обсеменения ферм и, соответственно, сырого молока дрожжами.

Для ряда дрожжей, так называемых «черных дрожжей» (*Aureobasidium pullulans*), характерно образование темноокрашенных оливковых, коричневых или черных колоний за счет накопления меланиноподобных пигментов [24]. Некоторые дрожжи образуют диффундирующие в среду красно-вишневые железосодержащие пигменты из группы пиразина (*Metschnikowia pulcherrima*). Отмечено развитие коричневых пигментов на поверхности сыра при росте таких видов дрожжей, как *Yarrowia lipolytica* [23].

Значительная часть дрожжей продуцирует пигменты класса каротиноидов, которые придают их колониям красную, розовую, оранжевую или желтую окраску. «Красные дрожжи», продуценты каротиноидов, относятся к родам *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidiobolus* [23]. Поскольку каротиноиды, вырабатываемые дрожжами, имеют важное значение для разных сфер жизнедеятельности человека и производятся промышленным способом, в литературе приводятся обширные данные о влиянии внешних факторов на продуцирование пигментов – температуры, pH, наличия необходимых питательных веществ и микроэлементов, воздействия света, влияние перекиси водорода и соли NaCl [25–27].

Анализ приводимых данных показывает, что развитие дрожжей на поверхности сыра и продуцирование пигментов, как защитная реакция на неблагоприятные факторы выживания, может происходить при относительно низкой температуре созревания, низком pH, значительной концентрации поваренной соли и минимальном наличии кислорода в окружающей среде.

Микрококки. Среди микроорганизмов, способных синтезировать каротиноиды – представители семейства *Micrococcaceae*. Семейство *Micrococcaceae* включает роды грамположительных, облигатно и факультативно аэробных бактерий, имеющих широкое распространение в пресноводных и морских источниках, ризосфере растений, на поверхности кожи млекопитающих, а также являются типичными обитателями почвенных экосистем⁵ [28].

Типовым для семейства является род *Micrococcus*, для представителей которого оптимальная температура роста 25–37 °С, в то же время возможен рост при низких температурах 5–8 °С [29]. Галотолерантны – растут в присутствии 5 % NaCl, однако многие способны к росту при 7,5 % соли в среде, в том числе *Micrococcus luteus*, *M. varians*, *M. roseus*.

Большинство видов продуцируют каротиноидные пигменты различного цвета – могут быть желтыми, желтовато-зелеными или оранжевыми, как у *Micrococcus luteus*; темно-желтыми, как у *M. varians*; розовыми или красными, как у *M. roseus*; темно-розово-красными, как у *M. agilis*; или кремовыми и белыми, как у *M. lylae*, *M. kristinae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. sedentarius* и *M. halobius* [30].

Микрококки занимают главное место в микрофлоре вымени здоровых животных и всегда присутствуют в сыром молоке. Их максимальная доля в сыром молоке составляет 31,5–55,0 % в зависимости от общей обсемененности молока [11]. При пастеризации, принятой в сыроделии, погибают. Однако существуют устойчивые формы, в частности, попадающие из доильного оборудования, которые выдерживают кратковременный нагрев и являются микрофлорой пастеризованного молока и сыров [23]. Представители рода *Micrococcus*, благодаря своей протеолитической и липолитической активности, участвуют в созревании различных видов сыра. В некоторых случаях при интенсивном развитии это приводит к появлению пороков вкуса, а также появлению цветных пятен на поверхности сыра [23].

Сырое сборное молоко отличается большим разнообразием микроорганизмов, в том числе пигментообразующих, которые попадают в молоко с кожи сосков, доильного оборудования, кормов для животных, воды, воздуха, почвы, навоза. Кроме перечисленных выше групп микроорганиз-



Источники изображений: freepik.com

мов, образование пигментов характерно для бревибактерий, пропионовокислых бактерий, плесневых грибов, энтерококков, стафилококков и др., которые также присутствуют в сыром молоке. Как правило, отдельные виды бактерий встречаются в диапазоне от 10¹ до 10⁴ КОЕ/см³ в молоке [3]. Некоторые микроорганизмы являются необходимыми для созревания мягких сыров или сыров, созревающих с участием микрофлоры поверхностной слизи. Их развитие в процессе изготовления сыра обогащает вкус готового продукта, способствует формированию необходимой консистенции и требуемых органолептических характеристик. В то же время интенсивное развитие нежелательных представителей в мягких, полутвердых и твердых сырах может провоцировать появление различных пороков вкуса (нечистый, броженный – дрожжи; горький – микрококки; аммиачный запах и вкус для полутвердых и твердых сыров при развитии микрофлоры сырной слизи; гнилостный вкус и запах при развитии протеолитических бактерий), рисунка (сетчатый, рваный, броженный или губчатый при развитии дрожжей), а также пороков внешнего вида, характеризующихся появлением пятен различной окраски на поверхности.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являются сыры в процессе созревания, выработанные в промышленных условиях в разных регионах России, в частности в республиках Татарстан, Мордовии, Удмуртии, Краснодарском и Алтайском краях, Омской и Московской областях, с наличием пороков внешнего вида – поверхностных пятен различных оттенков красного и желтого цвета. Для анализа

⁵Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. – Пер. с англ. – М.: Издательство «Мир», 1980. – 496 с.

состава их поверхностной микрофлоры и выявления микроорганизмов, способных образовывать поверхностные пятна, исследования проводили в несколько этапов по следующей схеме:

- микроскопирование соскоба из области пятен по ГОСТ 32901-2014;
- поверхностный посев материала из области пятен на питательные среды КМАФАММ по ГОСТ 32901-2014 и Сабуро по ГОСТ 33566-2015 и визуальная оценка выросших колоний с последующим микроскопированием;
- размножение микрофлоры из области пятен в среде накопления (питательном бульоне) – исследуемый биологический материал из области пятен переносили в питательный бульон и культивировали при двух температурных режимах 30 °С и 37 °С в течение 72 часов;
- анализ состава микрофлоры в культуральной жидкости – выполнение посевов из культуральных жидкостей на среды КМАФАММ по ГОСТ 32901-2014 и Сабуро по ГОСТ 33566-2015 с последующей морфологической оценкой и микроскопическими исследованиями выросших колоний.

Для выявления пигментообразования, чашки, полученные на разных этапах исследований, после термостатирования посевов, выдерживали в условиях естественной освещенности при комнатной температуре до появления окрашенных колоний.

Для идентификации микроорганизмов в выросших колониях проводили тестирование по следующим признакам:

- определение каталазной активности микроорганизмов – по ГОСТ 33568-2015;
- тест Греггерсена для идентификации грамположительных и грамотрицательных бактерий – по ГОСТ Р 54755-2011;
- определение оксидазой активности микроорганизмов – проводили путем снятия колонии и растирания ее по оксидазному диску. Учет реакции вели в течение 5–10 секунд при 25–30 °С. Отсутствие изменения цвета на диске или развитие окраски через 60 и более секунд расценивали как отрицательную реакцию;
- возможность роста на питательной среде с массовой концентрацией NaCl 75 г/дм³ – проводили поверхностный посев культуры на молочно-солевой агар с массовой концентрацией NaCl 75 г/дм³ с последующим термостатированием посевов при 37 ± 1 °С в течение 24–48 ч.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований твердого сыра с наличием пятен желто-оранжевого цвета на поверхности

На рисунке 1 представлен внешний вид и поверхность сыра с развитием пятен желто-оранжевого цвета на поверхности.

При микроскопировании материала из области желто-оранжевых пятен выявлено наличие кокков, одиночных, парных и в небольших скоплениях, что характерно для микрококков (рис. 2 а). Микроскопирование осадков из сред накопления, полученных при заражении питательного бульона материалом из области пятен с поверхности сыра, показывает следующую картину: в средах накопления выявлена смешанная микрофлора, представленная преимущественно кокками средних размеров при температуре культивирования среды накопления 30 °С (рис. 2 б) и кокками и палочками средней длины при температуре 37 °С (рис. 2 в).

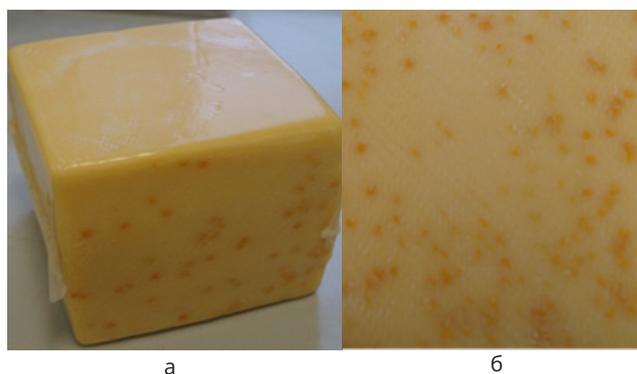


Рисунок 1. а – внешний вид; б – поверхность сыра с желто-оранжевыми пятнами

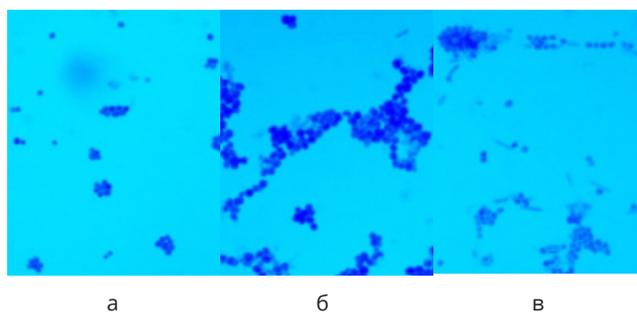


Рисунок 2. Микроскопическая картина материала из области желто-оранжевых пятен: а – из соскобов с поверхности сыра; б – из культуральной жидкости, полученной при температуре 30 °С; в – из культуральной жидкости, полученной при температуре 37 °С

Таблица 2

Результаты микробиологических исследований сред накопления, полученных при культивировании соскобов с поверхности сыра в питательном бульоне

Наименование образца	КМАФАнМ, КОЕ/см ³	Дрожжи, КОЕ/см ³	Плесневые грибы, КОЕ/см ³	КСАФАнМ КОЕ/см ³
Соскоб, t = 30 °С	1,5 × 10 ⁵	отсутст. в 1,0	отсутст. в 1,0	отсутст. в 1,0
Соскоб, t = 37 °С	1,1 × 10 ⁵	отсутст. в 1,0	отсутст. в 1,0	отсутст. в 1,0

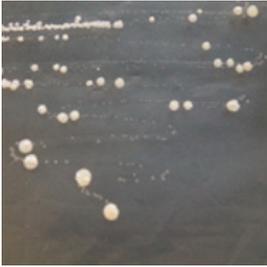
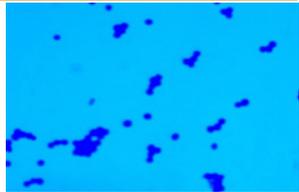
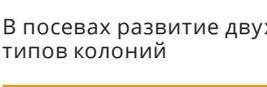
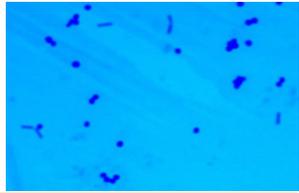
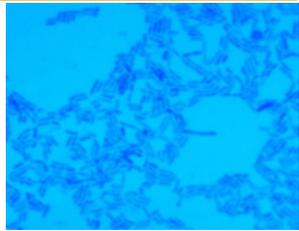
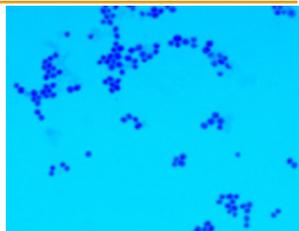
Результаты микробиологических исследований сред накопления показывают, что основной микрофлорой на поверхности сыра является заквасочная микрофлора, о чем свидетельствует показатель КМАФАнМ на уровне 10⁵ КОЕ/см³ (табл. 2) и характер господствующих колоний на/в питательных средах – мелкие глубинные и поверхност-

ные колонии в виде дисков и лодочек, что характерно для молочнокислых микроорганизмов.

Для идентификации микрофлоры в средах накопления и получения изолированных колоний выполнены поверхностные посевы на среду КМАФАнМ и молочно-солевой агар (табл. 3).

Таблица 3

Поверхностные посевы из сред накопления, полученных после культивирования материала из соскоба с поверхности сырных пятен, и микроскопическая картина господствующих колоний

Фото чашек	Описание колоний	Описание микропрепаратов	Фото микропрепаратов
Посев среды накопления (30 °С) на среду КМАФАнМ			
	Колония № 1 бежевая, с неровным краем, диаметр 3 мм	Кокки по одному, по два, в коротких цепочках	
	Колония № 2 бежевая, точечная	Смешанный препарат: кокки + палочки средней длины	
Посев среды накопления (37 °С) на среду КМАФАнМ			
	Колония № 3 бежевая, мелкая, диаметр 1 мм	Палочки средней длины	
Посев среды накопления (37 °С) на среду МСА			
	Колония № 4 с желтым оттенком поверхностная, с ровным краем, диаметр 2 мм	Кокки по одному, по два, в скоплениях	

В посевах развитие двух типов колоний

Результаты микроскопических исследований и проведение идентификационных тестов из изолированных колоний показывают наличие однотипной микрофлоры в посевах материала, взятого с поверхности пятна и размноженного в среде накопления, которая представлена микрококками и палочками средней длины:

- колония № 1 и № 4 – грамположительные, каталазоположительные, оксидазоположительные кокки, которые дают рост при 30 ± 1 °C и 37 ± 1 °C, развитие на молочно-солевом агаре с содержанием соли NaCl 7,5 % ; при развитии на молочно-солевом агаре дают колонии с желтым оттенком (колония № 4), что свидетельствует о принадлежности выделенных кокков к микрококкам;
- колония № 3 – грамположительные, каталазоположительные палочки, которые дают рост только при 37 ± 1 °C, не развиваются на молочно-солевом агаре с содержанием NaCl 7,5 %.

Господствующей микрофлорой с зоны желтых пятен на поверхности сыра, вызвавшей появление порока, являются кокки, образующие на питательных средах поверхностные блестящие колонии желтого цвета среднего размера с ровным краем и идентифицируемые как микрококки.

На поверхности сыра присутствуют пятна двух видов: желтого цвета и бежевого с розовым оттенком (рис. 3).

Ниже, на рисунках 4 и 5, представлены результаты микроскопических исследований соскобов из области пятен, которые показывают наличие кокковых форм незаквасочного происхождения, дрожжей, споровых палочек, что подтверждается микроскопированием сред накопления, полученных при заражении питательного бульона материалом из области пятен (рис. 6), и микроскопированием колоний из посевов культуральных жидкостей на среду КМАФАНМ (табл. 4).



Рисунок 3. Внешний вид поверхности сыра с пятнами двух видов



Источник изображения: freerplk.com

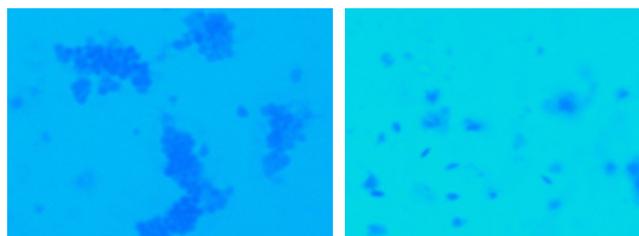


Рисунок 4. Микроскопическая картина материала из соскобов с поверхности сыра из области бежево-розовых пятен

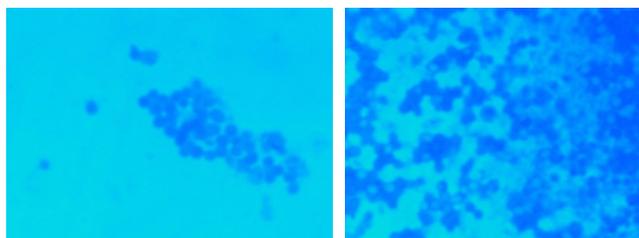
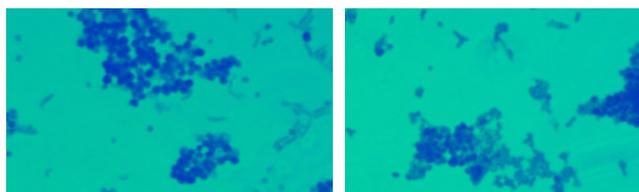


Рисунок 5. Микроскопическая картина материала из соскобов с поверхности сыра из области желтых пятен



Смешанный препарат: палочки средней длины (споровые палочки) + дрожжи + кокки

а

Смешанный препарат: палочки средней длины + дрожжи + кокки

б

Рисунок 6. Микроскопическая картина из сред накопления, полученных при заражении материалом из области пятен: а – бежево-розового цвета; б – желтого цвета

При проведении исследований материала, взятого с поверхности сыра из области пигментированных пятен желтого и бежевого цвета с розовым оттенком, выявлены колонии микроорганизмов идентичной окраски, в процессе роста которых на поверхности питательной среды образуются пигменты желтого и бежевого цвета с розовым оттенком. Интенсивность окраски колоний возрастает со временем и интенсифицируется при доступе кислорода после вскрытия упаковочного материала.

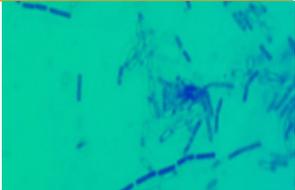
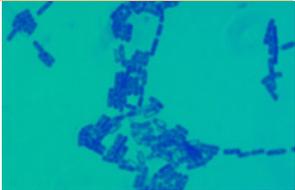
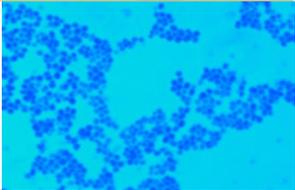
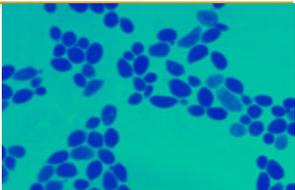
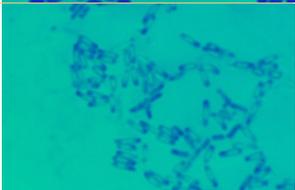
Идентификация колоний и оценка морфологии клеток в микропрепаратах показала наличие споровых палочек рода *Bacillus*, дрожжей и микрококков. Для данных групп микроорганизмов характерно образование

пигментов различного цвета от желтого до бежевого и коричневого с розовым или красным оттенком при индивидуальном и совместном развитии.

Выводы

Появление цветных пятен на поверхности сыра в процессе созревания является разновидностью поверхностной порчи, снижающей хранимоспособность продукта и негативно влияющей на экономические показатели деятельности предприятия. Образование цветных пятен могут вызывать различные группы, роды и виды бактерий, плесневых грибов и дрожжей, как при индивидуальном развитии, так и в симбиозе.

Таблица 4
Микробиологические исследования микрофлоры из сред накопления, полученных из области пятен бежево-розового и желтого цвета

Фото чашек	Описание колоний	Описание микропрепаратов	Фото микропрепаратов
Посев среды накопления (37 °С) на среду КМАФАММ			
	Колония бежевая с розовым оттенком, поверхностная, с неровным краем, диаметр 5 мм	Споровые палочки, споры	
	Колония бежевая, поверхностная, с неровным краем, диаметр 2 мм	Споровые палочки, споры	
	Колония желтого цвета, поверхностная, с ровным краем, диаметр 1 мм	Кокки в скоплениях (микрококки)	
Поверхностный посев на КМАФАММ, культивирование при 30 °С			
	Колония бежевая с розовым оттенком, поверхностная, с ровным краем, диаметр 3 мм	Дрожжи	
	Колония бежевая, поверхностная, с неровным краем, диаметр 3 мм	Споровые палочки, споры	

Источником спорных палочек рода *Bacillus*, дрожжей и микрококков в сырах является сырое молоко. Данная микрофлора выдерживает температуры пастеризации, принятые в сыроделии, переходит в сыр и может загрязнять рассол при посолке головок сыра; путем вторичного обсеменения попадать на сыры последующих партий и постепенно становиться микрофлорой предприятия.

Развитие пигментообразующих микроорганизмов и выделение окрашенных соединений, как фактор защиты при неблагоприятных внешних условиях, может проходить при относительно низкой температуре созревания сыров, значительной концентрации поваренной соли, низком значении pH и минимальном доступе кислорода, являясь одной из основных причин появления пороков внешнего вида – цветных пятен на поверхности сыра. ■

Microbiological Risks of Cheese Color Defects

Galina M. Sviridenko, Marina B. Zakharova, Evgeniya E. Uskova

All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheese Production, Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Uglich

Aerobic *Bacillus* bacteria, yeasts, and micrococci are pigment-forming microorganisms responsible for color defects in cheese production. The article describes their environment, industry-related characteristics, types of defects they cause, and various color violations in commercial cheeses. The research featured domestic cheeses with yellow and red surface spots that appeared during industrial ripening and storage. Pigment-forming microorganisms developed on cheese surface at a low ripening temperature, high concentration of table salt, and critically low oxygen. Pigment-forming microflora proved to enter cheese from milk, brine, or production environment, e.g., water, air, and processing equipment, dry and succulent feeds being the main source of milk contamination with spore-forming aerobic bacteria, yeast, mold fungi, etc. Contamination of raw milk, milking equipment, and air environment with micrococci was primarily associated with cows' udder and skin. Cheese production presupposes low-temperature heat treatment of raw milk, which means possible residual microflora in pasteurized milk. As a result, the total count of mesophilic aerobic and optionally anaerobic microorganisms, i.e., the potential pigment formers, was to stay below 104 CFU/cm³. Yeast and spore-forming *Bacillus* microorganisms demonstrated the acceptable level of ≤ 102 CFU/cm³ in milk intended for cheesemaking. If their total count exceeded 103 CFU/cm³, it indicated high microbiological risks of cheese appearance defects. The microflora responsible for discoloration of cheese surface was represented by yeast, micrococci, aerobic spores, or their combinations.

Keywords: cheese, spore-forming aerobic microorganisms, micrococci, yeast, spoilage, pigmentation, appearance defects



Список литературы

1. **Govindarajan, S.** Pink discoloration in Cheddar cheese / S. Govindarajan, H. A. Morris // *Journal of Food Science*. 2006. Vol. 38. № 4. P. 675–678. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02843.x>
2. **Daly, D. F. M.** Pink discolouration defect in commercial cheese: A review / D. F. M. Daly, P. L. H. McSweeney, J. J. Sheehan // *Dairy Science and Technology*. 2012. Vol. 92. № 5. P. 439–453. <http://doi.org/10.1007/s13594-012-0079-0>
3. **Martley, F. G.** Short communications. Pinkish colouration in Cheddar cheese – description and factors contributing to its formation / F. G. Martley, V. Michel // *Journal of Dairy Research*. 2001. Vol. 68. P. 327–332. <http://doi.org/10.1017/S0022029901004836>
4. **Гудков, А. В.** Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А. В. Гудков; под редакцией С. А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 800 с.
5. **Quigley, L.** *Thermus* and the pink discoloration defect in cheese / L. Quigley [et al.] // *mSystems*. 2016. Vol. 1(3). e00023-16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00023-16>
6. **Глазунова, Е. Г.** Биосинтез пигментов у актинобактерий *Agreia* в зависимости от условий культивирования / Е. Г. Глазунова, Д. Р. Яруллина, И. Ю. Васильев [и др.] // *Ученые записки Казанского университета, Естественные науки*. 2012. Том 154, кн. 2. С. 77–84.
7. **Abdelaziz, A. A.** *Pseudomonas aeruginosa's* greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. REVIEW / A. A. Abdelaziz [et al.] // *Microbial Cell Factories*. 2023. 22:110. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02122-1>
8. **Сиволодский, Е. П.** Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флуоресцеина бактериями рода *Pseudomonas* / Е. П. Сиволодский // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012. № 10. С. 60–62.
9. **Manzo, N.** Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation / N. Manzo [et al.] // *BMC Microbiology*. 2011. Vol. 11. 198. <https://doi.org/10.1186%2F1471-2180-11-198>
10. **Henriques, A. O.** Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers / A. O. Henriques, C. P. Moran Jr. // *Annual review of microbiology*. 2007. Vol. 61. P. 555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
11. **Мюньх, Г.-Д.** Микробиология продуктов животного происхождения / Г.-Д. Мюньх [и др]. – Пер. с нем. – М.: Агропромиздат, 1985. – 592 с.
12. **Fakhry, S.** Characterization of Spore Forming *Bacilli* Isolated From the Human Gastrointestinal Tract / S. Fakhry [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. 2008. Vol. 105. P. 2178–2186. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x>
13. **Hong, H. A.** *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract / H. A. Hong [et al.] // *Research in Microbiology*. 2009. Vol. 160. P. 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.11.002>
14. **Kharkhota, M.** Chromogenicity of aerobic spore-forming bacteria of the *Bacillaceae* family isolated from different ecological niches and physiographic zones / M. Kharkhota [et al.] // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022. Vol. 53 P. 1395–1408. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00755-9>
15. **Sella, S. R. B. R.** *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review / S. R. B. R. Sella, L. P. S. Vandenberghe, C. R. Soccol // *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 35 (4). <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.922915>
16. **Mitchell, C.** Red pigment in *Bacillus megaterium* spores / C. Mitchell [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. 1986. Vol. 52(1). P. 64–67. <https://doi.org/10.1128/aem.52.1.64-67.1986>
17. **Nakamura, L. K.** Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. / L. K. Nakamura // *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. 1989. Vol. 39 (3). P. 295–300. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-295>
18. **Sorokulova, I. B.** Pigments produced by *Bacillus subtilis* var. *niger* 16k. / I. B. Sorokulova, S. R. Reznik // *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*. 1979. Vol. 15 (2). P. 314–317.
19. **Dunlap, C. A.** *Bacillus nakamura* sp. nov., a black pigment producing strain / C. A. Dunlap [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016. Vol. 66 (8). P. 2987–2991. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001135>
20. **Khaneja, R.** Carotenoids found in *Bacillus* / R. Khaneja [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 108. P. 1889–1902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x>
21. **Duc, L. H.** Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* sporeformers / L. H. Duc [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. 2006. Vol. 255 (2). P. 275–279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00091.x>
22. **Kharkhota, M.** Chromogenicity of aerobic spore-forming bacteria of the *Bacillaceae* family isolated from different ecological niches and physiographic zones / M. Kharkhota [et al.] // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022. Vol. 53. P. 1395–1408. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00755-9>
23. **Ritschard, J. S.** The Microbial Diversity on the Surface of Smear-Ripened Cheeses and Its Impact on Cheese Quality and Safety / J. S. Ritschard, M. Schuppler // *Food*. 2024. Vol. 13 (2), 214. <https://doi.org/10.3390/foods13020214>
24. **Бабьева, И. П.** Биология дрожжей / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 221 с.
25. **Савчик, А. В.** Каротиноидсинтезирующие дрожжевые грибы и их применение в биотехнологии (обзор литературы) / А. В. Савчик, Г. И. Новик // *Пищевая промышленность: наука и технология*. 2020. Том 13, № 3 (49). С. 70–83. <https://www.elibrary.ru/njsecb>
26. **Hernández-Almanza, A.** *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry / A. Hernández-Almanza [et al.] // *Food Bioscience*. 2014. Vol 5. P. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>
27. **Cardoso, L.** Microbial production of carotenoids A review / L. Cardoso, K. Kanno, S. Karp // *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. 2017. Vol. 16 (4). P. 139–146. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15763>
28. **Ястребова, О. В.** Филогенетическое разнообразие бактерий семейства *Micrococcaceae*, выделенных из биотопов с различным антропогенным воздействием / О. В. Ястребова, Е. Г. Плотноикова // *Вестник Пермского университета. Сер. Биология*. 2020. № 4. С. 321–333. <https://doi.org/10.17072/1994-9952-2020-4-321-333>; <https://www.elibrary.ru/xlmhdz>
29. **Блекберн К. де В.** Микробиологическая порча пищевых продуктов / К. де В. Блекберн (ред). – Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2011. – 784 с.
30. **Jagannadham, M. V.** The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* with synthetic membranes / M. V. Jagannadham, V. J. Rao, S. Shivaji // *Journal of bacteriology*. 1991. Vol. 173 (24). P. 7911–7917. <https://doi.org/10.1128%2Fj.173.24.7911-7917.1991>