

УДК 637.3.052

М.Б. Захарова, Т.В. Комарова, Д.С. Мамыкин

ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Углич

ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИЕ ДРОЖЖИ – ФАКТОР ПОВЕРХНОСТНОЙ ПОРЧИ СЫРОВ

Одной из причин снижения качества сыров, вплоть до их забраковки, является поверхностная порча, связанная с образованием цветных пятен. Данный порок может быть вызван развитием пигментообразующих дрожжей, продуцирующих каротиноиды красного, желтого, оранжевого цвета. В статье приведены результаты исследований мягких и полутвердых сыров, выработанных в разных регионах России - Мордовии, Краснодарском и Алтайском краях, Московской области, имеющих пороки внешнего вида – наличие пятен различных оттенков красного цвета на поверхности. Анализ микрофлоры из области цветных пятен свидетельствует о наличии микробиологических рисков, связанных с дрожжами, развитие которых на поверхности сыра в процессе созревания обеспечивает появление пороков внешнего вида – образование цветных пятен красного и красно-бурого цвета.

Ключевые слова: сыр, дрожжи, порча, пигментообразование, пороки внешнего вида

Развитие нежелательной микрофлоры на стадии выработки, созревания и хранения сыров может вызывать различные пороки, что приводит к снижению качества и хранимостепособности продукта. Одним из значимых микроорганизмов порчи молочной продукции являются дрожжи. Для сыров с низкой и высокой тем-

пературой второго нагревания дрожжи являются причиной пороков вкуса (нечистый, горький, дрожжевой), рисунка (сетчатый, рваный, броженный или губчатый), внешнего вида (появление цветных пятен на поверхности).

В последнее время пороки внешнего вида, связанные с появлением цветных пятен, достаточно часто выявляются в процессе созревания сыров, что приводит к забраковке продукции и снижению экономической эффективности производства. По имеющимся данным в литературе однозначного ответа о причинах появления пятен в процессе созревания или хранения сыров нет. Предполагаемые причины пороков внешнего вида сыров могут быть различны. В их числе можно рассматривать использование натуральных красителей, таких как аннато; образование в процессе созревания сыра окрашенных продуктов в результате реакции Майяра при накоплении галактозы; развитие посторонней поверхностной микрофлоры, включая дрожжи [1, 2, 3].

Различные виды дрожжей широко распространены в окружающей среде. Существенная численность дрожжей характерна для мест обитания с высоким содержанием легкодоступных питательных веществ (сахаров, органических кислот и др.), таких как сладкие плоды и ягоды, нектароносные цветы, выделяющийся сок деревьев. Дрожжи также присутствуют в природных субстратах с низким содержанием сахаров, включая почву, растения, разнообразные растительные остатки, природные воды. Численность дрожжей на зеленых листьях растений колеблется в пределах 10^3 – 10^5 КОЕ/г с возможным увеличением на стадии отмирания листьев; в почве их количество снижается до 10^2 – 10^3 КОЕ/г [4]. Таким образом, сухие и сочные корма являются основным источником обсеменения ферм, а соответственно, и производимого молока, дрожжами.

Во ВНИИМС проводились исследования сырого молока от хозяйств Центрального региона России на предмет оценки общей бактериальной обсемененности и содержания отдельных групп микроорганизмов, значимых для производства сыра. В результате исследований получены следующие данные (N=58): при общем уровне бактериальной обсемененности $(2,2 \pm 6,1) \times 10^5$ КОЕ/см³ содержание дрожжей в среднем составляет $(1,2 \pm 4,2) \times 10^3$ КОЕ/см³. Интервальная оценка среднего получена в результате математической обработки данных без учета выпадающих крайних значений. Однако в отдельных образцах молока содержание дрожжей выявлялось как наличие единичных клеток в 1 см³, так и в количестве $3,0 \times 10^4$ КОЕ/см³. Ввиду применения низкотемпературной термической обработки сырого молока при изготовлении сыра остаточное количество дрожжей в пастеризованном молоке может быть значимым. Допустимый уровень содержания дрожжей в молоке для сыроделия в соответствии с СТО ВНИИМС 019-2019 составляет не более 10^2 КОЕ/см³ [5]. Присутствие дрожжей в сборном сыром молоке на уровне 10^3 – 10^4 КОЕ/см³ свидетельствует о наличии высоких микробиологических рисков появления пороков, связанных с дрожжами, при изготовлении сыра.

Для некоторых видов дрожжей характерно образование пигментов, что приводит к формированию пятен на твердых субстратах или образованию колоний в посевах на плотных питательных средах, окрашенных в различные цвета. Окраска

может быть обусловлена как пигментацией самих клеток, так и выделением веществ, придающих среде ту или иную окраску. Пигментообразование дрожжей служит характерным признаком и используется при их диагностике. Пигменты класса каротиноидов придают колониям дрожжей красную, розовую, оранжевую или желтую окраску. «Красные дрожжи», продуценты каротиноидов, относятся к родам *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridiobolus* [6, 7].

Выраженная каротиноидная пигментация, характерная для дрожжей, входящих в группу фитобионтов, является специфической физиологической особенностью для обеспечения защиты клеток от воздействия синглетного кислорода и избыточного излучения видимого и УФ-спектра света [4, 8].

Каротиноидные пигменты являются наиболее распространенной группой природных пигментов. Они различаются структурно и функционально и придают окраску от желтой до красной значительной части живой природы [9]. Каротиноидные пигменты синтезируются дрожжами и плесневыми грибами и во всех фотосинтезирующих организмах, начиная от бактерий и микроводорослей до высших растений [10]. Эти соединения хорошо растворимы в жирах и не растворяются в воде. По литературным данным обнаружено и идентифицировано порядка 750 различных каротиноидов [6, 8, 11].

Каротиноиды, молекулы которых имеют чисто углеводородное строение (ликопин, α -, ϵ - и β -каротин), называются каротинами и окрашены в оранжевый цвет. Для другой группы каротиноидов характерно наличие в своем составе кислородсодержащих функциональных групп. Эти каротиноиды называются ксантофиллами (зеаксантин, лютеин, лактукаксантин) и окрашены в цвета от желтого до красного [10].

Пигментообразующие красные дрожжи способны к синтезу широкого спектра каротиноидов: α -каротин, β -каротин (предшественник витамина А), γ -каротин, торулен, торулародин, астаксантин, лютеин, зеаксантин, ликопин, фитоин, β -криптоксантин, виолоксантин, флавоксантин, нейроспорин [6, 9, 11]. Причем для определенного вида дрожжей характерен свой набор каротиноидных пигментов как в качественном, так и в количественном соотношении.

На развитие дрожжей и пигментообразование влияет ряд факторов окружающей среды, таких как наличие доступных питательных веществ и факторов роста (минералов и витаминов), рН, аэрация, температура, свет, облучение и др.

Воздействие света стимулирует биосинтез каротиноидных пигментов, обладающих антиоксидантными свойствами и оказывающих фотозащитное действие на клетки. В работе О.П. Червяковой и др. [12] показано, что облучение белым холодным, синим и зеленым светом повышает продукцию каротинов дрожжами *Rhodotorula rubra*, при этом максимальный выход наблюдается при синем освещении (470 нм). Использование ультрафиолетового облучения в сырохранилищах может провоцировать выработку пигментов дрожжами как защитное действие на неблагоприятный фактор.

Температура является важным параметром, регулирующим биосинтез каротиноидов, т.к. от нее зависит активность ферментов, участвующих в процессе их

продукции. У большинства видов дрожжей минимальная температура роста находится в пределах 0–5 °С, и синтез β -каротина *Rhodotorula glutinis* возможен при 5 °С [8]. Поскольку пониженная температура не является ограничивающим фактором для развития дрожжей, то при температурах созревания и хранения сыров они могут развиваться и продуцировать пигменты при наличии соответствующих условий.

Активная кислотность (значение рН) оказывает влияние как на продуцирование каротиноидов, так и на нарастание биомассы дрожжей. В сырах значения активной кислотности колеблются в интервале от 6,5 до 4,5 ед. рН, что соответствует оптимальным значениям пигментобразования [13].

Процесс синтеза каротиноидов у дрожжей происходит в присутствии кислорода. Режим аэрации оказывает влияние на количественный и качественный состав синтезируемых пигментов, а эффект аэрации зависит от видовой принадлежности дрожжей [4].

Ионы металлов (железа, магния, марганца, кальция, цинка, кобальта, алюминия) активируют специфические ферменты, участвующие в биосинтезе пигментов, что обеспечивает сложные эффекты воздействия этих факторов на продукцию каротиноидов [6]. Химические факторы вызывают окислительный стресс, сопровождающийся повышенным синтезом каротиноидов в дрожжевой клетке. При этом каротиноиды выполняют роль антиоксидантов и защищают клетку дрожжей от разрушающего воздействия химических агентов. На основе литературных данных установлено, что добавление в питательную среду этанола (10 г/л) или уксусной кислоты (5 г/л) при культивировании дрожжей *Xanthophyllomyces dendrorhous* приводит к увеличению продукции каротиноида астаксантина, а также биомассы дрожжей. Другим агентом выступала перекись водорода, которая в концентрации (4–6 г/л) вызывала гиперпродукцию каротиноидов у дрожжей рода *Rhodotorula* [12]. Кроме того, к агентам, вызывающим окислительный стресс и сверхсинтез пигментов, относится хлорид натрия. При культивировании дрожжей вида *Rhodotorula glutinis* добавление 3 % NaCl в питательную среду на основе подсырной сыворотки приводило к повышенному продуцированию каротиноидов, а при культивировании *Rhodotorula mucilagenosa* стимулирующий эффект оказывало добавление в питательную среду 6 % NaCl [6].

Необходимо отметить, что образование каротиноидных пигментов дрожжами происходит при доступе кислорода, что на первый взгляд не соответствует условиям созревания и хранения сыров, упакованных в полимерные пакеты под вакуумом. Однако, как отмечают производители сыров, красноватые пятна появляются в конце или после созревания на этапах хранения. К этому моменту минимальные критические концентрации кислорода, зависящие от внешних условий, в том числе температуры, вида упаковочного материала и его проницаемости, становятся доступны для пигментобразования.

Целью данных исследований было изучение пятен красного цвета на поверхности мягких и полутвердых сыров на предмет выявления причины появления данного порока и взаимосвязи с пигментобразующими дрожжами.

Объектами исследований были мягкие и полутвердые сыры кондиционной зрелости с наличием пороков внешнего вида в виде поверхностных пятен красного и красновато-бурого цвета, выработанные в промышленных условиях в разных регионах России: в республике Мордовии, Краснодарском и Алтайском краях, Московской области.

Для анализа состава поверхностной микрофлоры и выявления микроорганизмов, способных образовывать поверхностные пятна на сыре, исследования проводили по следующей схеме:

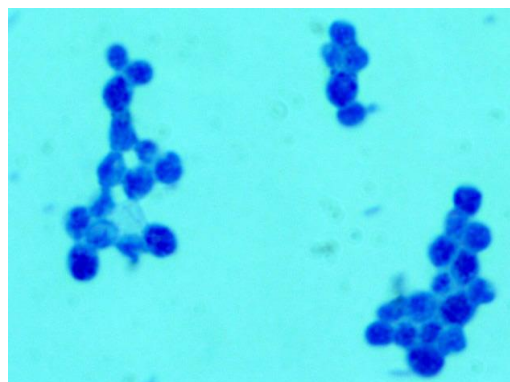
- микроскопирование соскоба из области пятен по ГОСТ 32901-2014;
- поверхностный посев материала из области пятен на питательные среды КМАФАнМ по ГОСТ 32901-2014 и Сабуро по ГОСТ 33566-2015 и визуальная оценка выросших колоний с последующим микроскопированием;
- размножение микрофлоры из области пятен в среде накопления (питательном бульоне). Для этого исследуемый биологический материал из области пятен снимали бактериологической петлей и переносили в питательный бульон, культивировали при температуре 30 °С в течение 72 часов;
- анализ состава микрофлоры в культуральной жидкости путем выполнения посевов из культуральных жидкостей на среды КМАФАнМ по ГОСТ 32901-2014 и Сабуро по ГОСТ 33566-2015 с последующей морфологической оценкой и микроскопическими исследованиями выросших колоний.

Для выявления пигментообразования чашки с посевами, полученные на разных этапах исследований, после термостатирования посевов, выдерживали в условиях естественной освещенности при температуре (20 ± 2) °С в течение 5–10 суток до появления окрашенных колоний.

На рис. 1 и рис. 2 представлены внешний вид мягких сыров Рикотта и Моцарелла с наличием пятен красного цвета на поверхности и результаты исследований поверхностной микрофлоры из области пятен.



а)



б)

Рисунок 1. Развитие дрожжей на поверхности сыра Рикотта:
а) внешний вид сыра; б) микроскопическая картина из области красных пятен

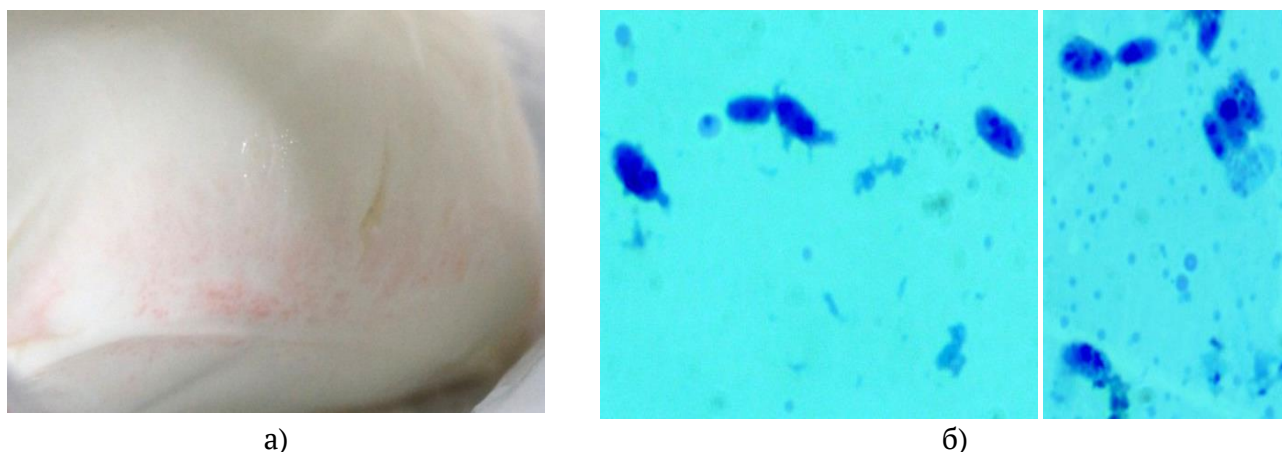


Рисунок 2. Развитие дрожжей на поверхности сыра Моцарелла:
а) внешний вид сыра; б) микроскопическая картина из области красных пятен

При микроскопировании материала, взятого с поверхности сыров из области красных пятен, установлено, что господствующей микрофлорой являются дрожжи, т.е. в поле зрения присутствуют крупные клетки овальной формы, характерные для дрожжей.

Результаты микробиологических исследований культуральных жидкостей, полученных при заражении питательного бульона материалом из области пятен с поверхности сыра, представлены в табл. 1.

Таблица 1

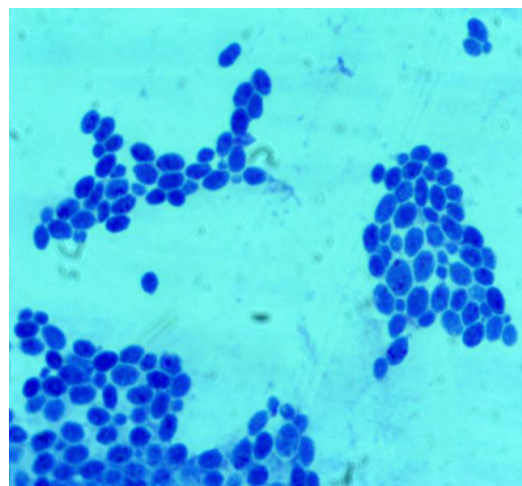
Результаты микробиологических исследований культуральных жидкостей

Объект исследования	КМАФАнМ, КОЕ/см ³	Дрожжи, КОЕ/см ³ (посев на среду Сабуро с антибиотиком)
Сыр Рикотта	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(5,4 \pm 0,3) \times 10^5$
Сыр Моцарелла	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,3) \times 10^5$

На фоне общей бактериальной обсемененности в средах накопления, имеющей уровень 10^8 КОЕ/см³, содержание дрожжей насчитывает не менее 5×10^5 КОЕ/см³, что свидетельствует о значимом присутствии дрожжей на поверхности сыров и давших интенсивное развитие в средах накопления. В посевах культуральных жидкостей как на среду КМАФАнМ, так и на среду Сабуро выявлены колонии розового цвета с ровным краем, блестящие, поверхностные, диаметром $1 \div 2$ мм, характерные для дрожжей, что было подтверждено в результате оценки морфологии клеток при микроскопировании (рис. 3 и 4).



а)



б)

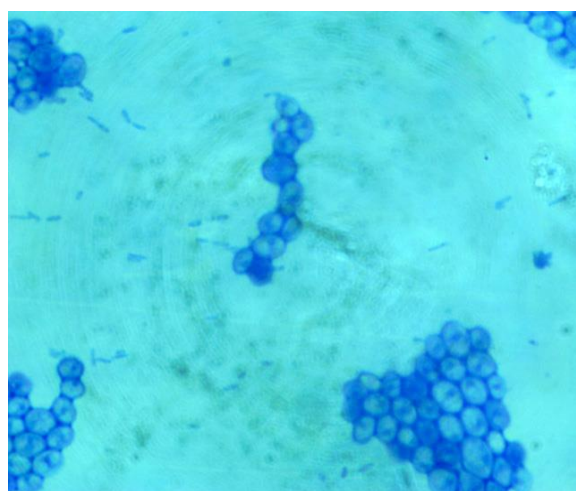
Рисунок 3. Посев культуральной жидкости, полученной при заражении питательного бульона материалом из области пятен с поверхности сыра Рикотта:

а) чашка с посевом на среду КМАФАНМ через 5 суток выдержки;

б) микропрепарат из колонии розового цвета



а)



б)

Рисунок 4. Посев культуральной жидкости, полученной при заражении питательного бульона материалом из области пятен с поверхности сыра Моцарелла:

а) чашка с посевом на среду КМАФАНМ через 5 суток выдержки;

б) микропрепарат из колонии розового цвета

Сыры из группы полутвердых также имеют риски развития пороков внешнего вида. На рис. 5 показан внешний вид полутвердых сыров с развитием цветных пятен на поверхности.



а)

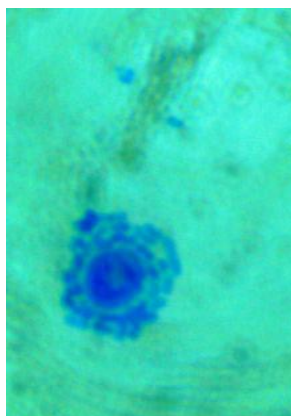
б)

Рисунок 5. Внешний вид поверхности сыра с красновато-бурыми пятнами (а) и красными пятнами (б)

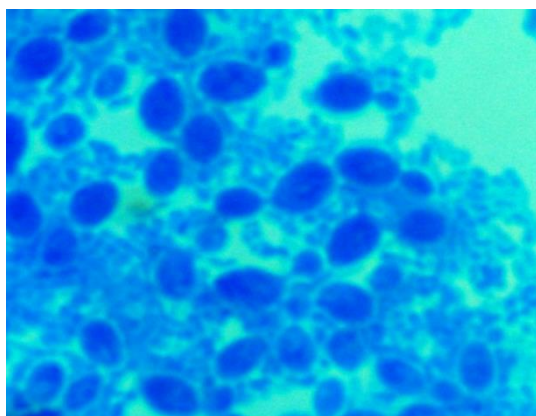
Несмотря на то, что образцы сыра происходили из разных регионов, при проведении исследований по общей схеме выявлены одностипные причины формирования пороков внешнего вида в виде развития дрожжей. Ниже приведены результаты анализа поверхностной микрофлоры из области красных пятен для полутвердого сыра, представленного на рис. 5а.

Микробиологические исследования культуральной жидкости свидетельствуют о развитии мезофильных микроорганизмов (показатель КМАФАнМ составляет $(8,0 \pm 0,3) \times 10^7$ КОЕ/см³); качественный состав представлен преимущественно заквасочной микрофлорой и дрожжами, содержание которых составило $(2,5 \pm 0,2) \times 10^5$ КОЕ/см³.

При микроскопировании материала из области пятен с поверхности сыра также выявлены дрожжи и заквасочная микрофлора (рис. 6а). Микроскопирование осадка из среды накопления показывает аналогичную картину (рис. 6б).



а)



б)

Рисунок 6. Микроскопическая картина материала из области красновато-бурых пятен из соскобов с поверхности сыра (а), из культуральной жидкости (б)

На фотографии микропрепарата, приготовленного из соскоба (рис. 6а), видна клетка дрожжей, окруженная палочковидными и кокковидными бактериями - ассо-

циантами дрожжей. Они располагаются в капсуле клетки дрожжей, которая не видна при просмотре фиксированных препаратов в световом микроскопе. Подобные ассоциации встречаются при микроскопировании материала с поверхности сыров. Формирование полисахаридных капсул, способствующих адгезии бактериальных клеток и предохраняющих от высыхания, характерно для пигментообразующих дрожжей. Капсулы способствуют прикреплению клеток к поверхности твердого субстрата, включая сырную корочку [9].

На рис. 7 отражены результаты посева на среду КМАФАнМ культуральной жидкости, полученной при заражении питательного бульона материалом из области пятен красновато-бурого цвета. Необходимо отметить, что первоначально колонии в посевах имели белую окраску (рис. 7а), но со временем, при выдержке в условиях освещенности, происходило их порозовение. Микроскопическая картина поверхностной колонии с ровным краем диаметром 2 мм свидетельствует о наличии округлых и овальных клеток разного размера, имеющих выраженное ядро, с присутствием почкующихся клеток, что характерно для дрожжей (рис. 7в). В посевах культуральной жидкости от данного образца сыра на среду Сабуро также выявлено развитие пигментообразующих дрожжей, способных к образованию красных пятен различной интенсивности на поверхности сыра.

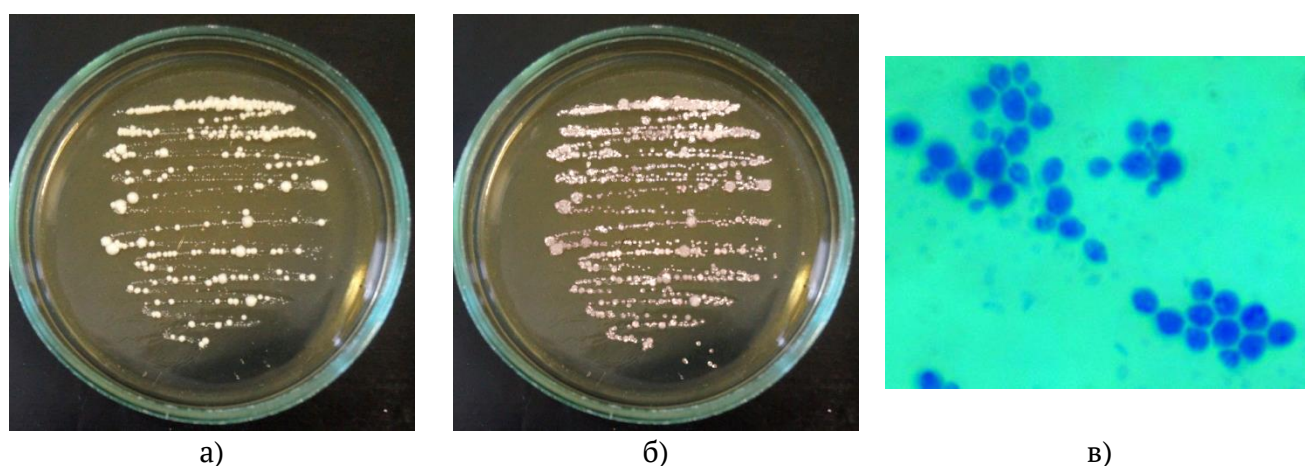


Рисунок 7. Посев на среду КМАФАнМ культуральной жидкости, полученной при заражении питательного бульона материалом из области пятен красновато-бурого цвета:

- а) чашка с посевом через 72 ч культивирования;
- б) вид посева после выдержки в течение 7 сут в условиях освещенности;
- в) микроскопическая картина колонии

При исследовании второго образца сыра, имеющего выраженные красные пятна на поверхности (рис. 5б), выявлена аналогичная картина: в посевах культуральной жидкости на среды КМАФАнМ и Сабуро после выдержки их в условиях освещенности при комнатной температуре присутствуют бежевые с розовым оттенком колонии. Их микроскопическая картина показывает наличие крупных и средних клеток овальной, округлой, иногда вытянутой формы, с присутствием почкующихся клеток, что подтверждает развитие дрожжей, способных образовывать пигменты (рис. 8).

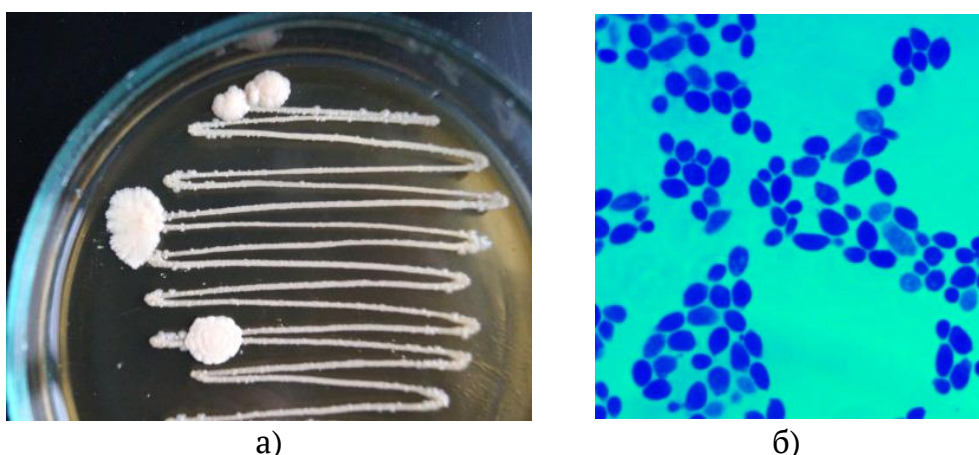


Рисунок 8. Посев на среду КМАФАНМ культуральной жидкости, полученной при заражении питательного бульона материалом из области пятен красного цвета:

- а) чашка с посевом через 5 сут выдержки;
 б) микроскопическая картина колонии

Таким образом, появление цветных пятен на поверхности сыра является поверхностной порчей, ухудшающей его товарный вид, снижающей хранимособность продукта, что отрицательно отражается на эффективности экономической деятельности сыродельного производства. Как показали исследования, причиной образования цветных пятен красного и красно-бурого цвета являются пигментообразующие дрожжи. Однако формирование окраски идет во времени от белой к красной и красно-бурой под действием освещения при относительно низкой температуре созревания и хранения сыров. Следовательно, при производстве сыров с целью снижения рисков образования в процессе созревания и хранения на поверхности сыров цветных пятен красного цвета необходимо осуществлять контроль молока-сырья на содержание дрожжей в соответствии с требованиями к молоку для сыроделия [5]; обеспечивать эффективную мойку и дезинфекцию оборудования; контролировать рассол и воздух производственных помещений в соответствии с МР 2.3.2.2327-08 [14] и проводить их обеззараживание при превышении допустимых уровней.

Список использованной литературы:

1. **Govindarajan, S.** Pink discoloration in Cheddar cheese / S. Govindarajan, H.A. Morris // Journal of Food Science. 2006. 38(4). 675–678. <https://doi:10.1111/j.1365-2621.1973.tb02843.x>
2. **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. 68. 327–332.
3. **Daly, D.F.M.** Pink discoloration defect in commercial cheese: A review / D.F.M. Daly, P.L.H. McSweeney, J.J. Sheehan // Dairy Science and Technology. 2012. 92(5). 439–453. <https://doi:10.1007/s13594-012-0079-0>
4. **Бабьева, И.П.** Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 221 с.
5. СТО ВНИИМС 019-2019 Молоко коровье сырое. Технические условия: стандарт ВНИИМС: дата введения 2019-02-05 / Разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом

маслоделия и сыроделия – филиал ФГБНУ «Федеральный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. – Углич, Ярославская область, 2019. –14 с.

6. **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.

7. **Кантерова, А.В.** Морфологическая характеристика и молекулярно-генетическая идентификация выделенных из природных источников каротинсинтезирующих дрожжевых грибов / А.В. Кантерова, С.И. Леонович, А.В. Савчик [и др.] // Пищевая промышленность: наука и технология. 2019. Том 12, № 4 (46). С. 59–64.

8. **Kot, A.M.** Rhodotorula glutinis—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries / A.M. Kot, S. Blazejak, A. Kurcz [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. 2016. 100: 6103–6117. <https://doi:10.1007/s00253-016-7611-8>

9. **Дейнека, В.И.** Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения / В.И. Дейнека [и др.] // Научные ведомости. 2008. № 6(46). С. 19–25.

10. **Ладыгин, В.Г.** Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Вопросы современной альгологии. 2015. 87 с.

11. **Cardoso, L.A. de C.** Microbial production of carotenoids – A review / L.A. de C. Cardoso, K.Y.F. Kanno, S.G. Karp // African journal of biotechnology. 2017. 16(4). 139–146.

12. **Червякова, О.П.** Исследование каротиногенеза дрожжами Rhodotorula rubra / О.П. Червякова, С.С. Караулова // Успехи в химии и химической технологии. 2009. Том XXIII. № 10 (103). С. 117–120.

13. **Latha, B.V.** Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of Rhodotorula glutinis DFR-PDY from natural source / B.V. Latha [et al.] // Indian journal of biotechnology. 2005. 4. 353–357.

14. Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов) МР 2.3.2.2327-08 (в редакции 2015 г.). Том I. – ФГБНУ ВНИИМС, 2015. – 174 с.