

Я.Ф. Жукова, канд. біол. наук, с.н.с.
Ц.О. Король, канд. тех. наук., с.н.с.
М.М. Вакуленко, науковий співробітник
В.В. Малова, науковий співробітник
Інститут продовольчих ресурсів НААН України

ВПЛИВ РІЗНИХ КУЛЬТУР БІЛОЇ ПЛІСЕНІ НА НАКОПИЧЕННЯ ЛЕТКИХ АРОМАТИЧНИХ СПОЛУК У М'ЯКИХ СИРАХ

*Розроблено спосіб ідентифікації культур *Penicillium candidum* та *Geotrichum candidum* методом полімеразної ланцюгової реакції, досліджено вплив цих культур на вміст ароматичних сполук у м'яких сирах, ідентифіковано та визначено ряд характеристичних летких сполук за допомогою капілярної газової хроматографії.*

*Ключові слова: культури *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, леткі ароматичні сполуки, сир м'який.*

*Разработан способ идентификации культур *Penicillium candidum* и *Geotrichum candidum* методом полимеразной цепной реакции, исследовано влияние этих культур на содержание ароматических соединений в мягких сырах, идентифицированы и определены ряд характеристических летучих соединений с помощью капиллярной газовой хроматографии.*

*Ключевые слова: культуры *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, летучие ароматические соединения, сыр мягкий.*

*A method for identifying cultures of *Penicillium candidum* and *Geotrichum candidum* by polymerase chain reaction have been designed, the influence of these cultures on the content of aromatic compounds in soft cheeses have been investigated, a number of characteristic volatile compounds was identified and defined by capillary gas chromatography.*

*Key words: culture of *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, volatile aromatic compounds, soft cheese.*

Для кращого розуміння біохімічних процесів, що відбуваються під час визрівання сирів, необхідно враховувати мікробіологічну компоненту, особливо це стосується сирів з плісінню. Традиційно для сирів типу Камамбер застосовують культури білої плісені *Penicillium candidum* та дріжджіподібних грибів *Geotrichum candidum*. Саме вони надають сирам такого типу специфічного грибного аромату. Цим культурам притаманні свої біохімічні властивості, що обумовлює утворення специфічних органолептичних властивостей сирів та внесення корективів у технологічні режими.

Метою даної роботи було розроблення синтетичних олігонуклеотидів – праймерів – для ідентифікації культур *Penicillium candidum* та *Geotrichum candidum* методом полімеразної ланцюгової реакції та визначення специфічних ароматичних летких сполук, що утворюються у сирі при застосуванні цих мікроорганізмів.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були м'які сири з білою плісінню, виготовлені за класичною технологією у лабораторних умовах із застосуванням заквашувального препарату “Alba THC-02”, до складу якого входили *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* та *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (виробник – ДДПБЗ ІПР НААН). Контрольними були сири, виготовлені із застосуванням культури *Penicillium candidum* V5 (“SACCO”, Італія). Дослідними були варіанти сирів, виготовлені із застосуванням суміші культур з *Penicillium candidum* V5 та *Geotrichum candidum* C (“SACCO”, Італія) у співвідношенні 1:1.

Вміст ароматичних сполук у сирах досліджували на газовому хроматографі “Кристаллюкс 4000М”, обладнаному капілярною колонкою FFAP довжиною 60 м з внутрішнім діаметром 0,25 мкм.

Результати досліджень. Для встановлення особливостей впливу різних культур білих плісень на вміст ароматичних сполук у сирах були проведені дослідження щодо ідентифікації та визначення кількісного вмісту летких жирних кислот, альдегідів, кетонів, лактонів, спиртів.

Результати щодо якісного та кількісного вмісту летких жирних кислот у поверхневому та внутрішньому шарі сирів, ви-

готовлених з молока, пастеризованого за 82 оС упродовж 2 с. за участю культур *P. candidum* та суміші *P. candidum/G. candidum* наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Склад вільних жирних кислот у зрілих сирах з різними культурами білої плісені

<i>Кислота</i>	Сирі з різними культурами білої плісені							
	1				2			
	В		П		В		П	
	% від заг. вмісту	мг/100 г	% від заг. вмісту	мг/100 г	% від заг. вмісту	мг/100 г	% від заг. вмісту	мг/100 г
Оцтова	70,21	11,90	64,88	23,24	68,26	9,27	64,84	25,61
Пропіонова	0,41	0,07	1,28	0,46	1,77	0,24	0,61	0,24
Ізомасляна	0,59	0,10	1,14	0,41	0,59	0,08	5,06	2,00
Масляна	23,89	4,05	27,78	9,95	27,69	3,76	23,32	9,21
Ізовалеріанова	4,19	0,71	3,18	1,14	0,52	0,07	4,53	1,79
Капронова	0,71	0,12	1,73	0,62	1,18	0,16	1,65	0,65
Сума	100	16,95	100	35,82	100	13,58	100	39,50

Примітка: № 1 - Сир із застосуванням *P. candidum* V5; № 2 - Сир із застосуванням *P. candidum* V5 + *G. candidum* C; В – внутрішній шар; П – поверхневий шар.

Показано, що загальний вміст летких жирних кислот більший в усіх варіантах сирів у поверхневому, ніж у внутрішньому шарі.

Показано, що на 14-ту добу визрівання загальна кількість летких жирних кислот у поверхневому шарі була вища у сирі з *P. candidum* у 2,1 раза, ніж у внутрішньому. У сирі з сумішню культур – у 2,9 раза. При цьому вміст оцтової кислоти ставив 64,8–70,2%, а масляна – 23,3–27,7% від загального вмісту. При цьому у внутрішньому шарі сиру з *P. candidum* рівень оцтової та масляної кислоти був вищим, ніж у сирі з сумішами культур. Цим можна пояснити більш різкий аромат та смак сиру з культурою *P. candidum*. У сирах із сумішами культур у поверхневому шарі було менше майже в 2 рази пропіонової кислоти, в 1,4 раза більше ізовалеріанової кислоти.

Тобто, застосування різних культур плісень призводить до формування різних за гостротою та ароматом сирів, що

відбивалось на якісному та кількісному складі летких жирних кислот.

Специфічним летким компонентом в сирах типу Камамбер є вторинний спирт 1-октен-3-ол, якому притаманний “грибний” аромат [1]. Методом капілярної газової хроматографії було проведено його ідентифікацію і визначено кількісний вміст. Його концентрація в досліджуваних продуктах варіювала від 1,35 мг/100 г до 1,83 мг/100 г. У поверхневому шарі сиру концентрація цієї сполуки була значно вище, ніж у внутрішньому шарі продукту, що підтверджує думку накопичення цієї сполуки клітинами білої плісені.

Максимальний вміст 1-октен-3-олу виявлено у зразках сирів з культурами *P. candidum* у поверхневому шарі, який становив 1,74 мг/100 г продукту. Варіант сиру із сумішшю культур містив цієї сполуки на 7,5% менше. Внутрішній шар сирів містив незначну кількість цієї сполуки незалежно від застосованих культур плісень і варіював від 0,03 до 0,04 мг/100 г продукту. Таким чином, застосування сумішей культур при виробленні сирів з білою плісенню зменшує гостроту сирної маси, при цьому не зменшуючи їх специфічного “грибного” аромату.

Оскільки для виготовлення сирів типу Камамбер у світі використовують обидві культури білої плісені, то нагальним питанням для контролювання якості такої продукції є розроблення способу швидкої ідентифікації культур *P. candidum* та *G. candidum*.

Відомі з літератури праймери для ідентифікації та детекції ДНК культур *P. candidum* та *P. roqueforti* не є високоспецифічними для визначення даних культур і можуть розпізнавати культури усього роду *Penicillium ssp* [1]. Відомі праймери для ідентифікації та детекції ДНК культур *G. candidum* також не є високоспецифічними для визначення даних культур, оскільки спостерігається високий рівень подібності щодо послідовностей ДНК між промисловими та спонтанними штамами *G. candidum*, крім того, ці праймери були підібрані для аналізу полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією, що передбачає ампліфікацію специфічного фрагменту рибонуклеїнової кислоти [2].

Підбір пар синтетичних олігонуклеотидних праймерів проводили згідно з правилами молекулярного дизайну. Обирали найконсервативніші ділянки характерних послідовностей специфічних генів, які раніше не використовувались при підборі праймерів для ДНК культур *P. candidum* та *G. candidum*: фрагмент гену гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази для культур *P. candidum* та фрагмент гену піруват цистатіонін- γ -ліази для *G. candidum* (Заявка на патент № а 201209974 від 20 серпня 2012 р).

ДНК білих плісеной виділяли з міцелію м'якого сиру Камамбер, виготовленого з додаванням культур *P. candidum* або *G. candidum* виробництва "SACCO", Італія, або одночасно до обох імовірно присутніх у цьому сири (табл. 2). Для негативного контролю було взято очищену ДНК молочнокислих бактерій та проведено реакцію при повній відсутності ДНК у пробі – реакція № 10 (табл. 2).

Таблиця 2

Номери реакцій, що відповідають номерам доріжок на електрофореграмі

№ реакції	Джерело проби ДНК	Амплік он	Наявність культури
1	Заквашувальний препарат <i>P. candidum</i>	131 bp	<i>P. candidum</i>
2	Суміш культур препаратів <i>P. candidum</i> та <i>G. candidum A</i>	131 bp	<i>P. candidum</i>
3	Сир Камамбер, виготовлений з <i>P. candidum</i>	131 bp	<i>P. candidum</i>
4	Заквашувальний препарат <i>G. candidum A</i>	-	не містить <i>P. candidum</i>
5	Заквашувальний препарат <i>G. candidum A</i>	114 bp	<i>G. candidum</i>
6	Заквашувальний препарат <i>G. candidum C</i>	114 bp	<i>G. candidum</i>
7	Суміш культур препаратів <i>P. candidum</i> та <i>G. candidum A</i>	114 bp	<i>G. candidum</i>
8	Сир Камамбер, виготовлений з сумішшю культур <i>P. candidum</i> та <i>G. candidum C</i>	114 bp	<i>G. candidum</i>
9	Заквашувальний препарат <i>P. candidum</i>	-	не містить <i>G. candidum</i>
10	Вода	-	не містить <i>P. candidum</i> та <i>G. candidum</i>

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за такими параметрами: початкова стадія денатурації ДНК за температури 94 °С упродовж 3 хв; основна стадія – 30 циклів, які складалась з:

- етапу за температури 94 °С впродовж 30 секунд,
- етапу за температури 56 °С впродовж 40 секунд,
- етапу за температури 72 °С впродовж 30 секунд;
- кінцева стадія елонгації за температури 72 °С впродовж

5 хв. Реакцію проводили за допомогою ампліфікатора “GeneAmp PCR System 9600” з відповідним програмним забезпеченням.

Продукти ПЛР – амплікони фрагментів обраних генів – аналізували методом електрофорезу в 1,6% агарозному гелі, який містив бромистий етидій. Амплікони мали характерну довжину, що дозволило їх розрізнити після електрофоретичного розділення при опроміненні ультрафіолетом (рис.1):

1) амплікон довжиною 131 п.н. належав культурі *P. candidum*;

2) амплікон довжиною 114 п.н. – культури *G. candidum*.

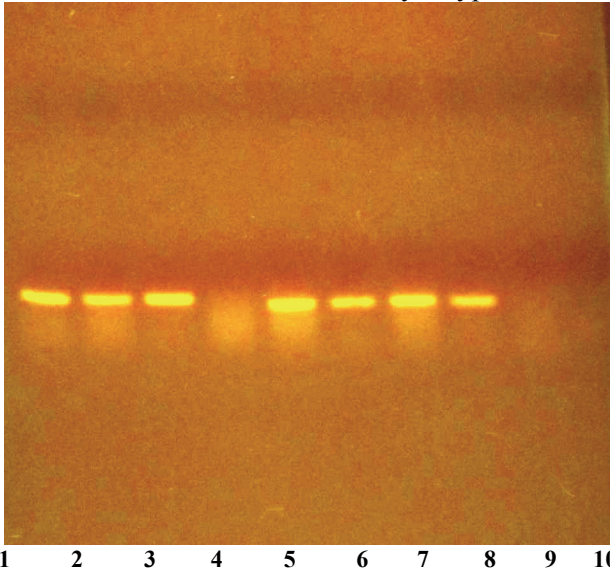


Рис. 1. Електрофореграма ампліконів в агарозному гелі, фарбованому бромистим етидієм при опроміненні ультрафіолетом

Розроблений спосіб може бути використаний для ідентифікації культур *P. candidum* та/або *G. candidum* при проведенні моніторингу м'яких сирів та перевірки відповідності наявності культур *P. candidum* та *G. candidum* нормативним та супровідним документам при виробництві та у торгівельній мережі.

Висновки:

1. Застосування сумішей культур *P. candidum* та *G. candidum* у співвідношенні 1:1 при виробленні сирів з білою плісенню зменшує гостроту сирної маси, не зменшуючи їх специфічного “грибного” аромату.

2. Встановлено відмінності у якісному та кількісному складі летких жирних кислот у сирах з різними культурами білої плісені, що обумовлює різну гостроту продуктів.

3. Розроблено праймери для ідентифікації культур *P. candidum* та *G. candidum* методом ПЛР, які можуть бути використані для з'ясування наявності обох культур у заквасках, м'яких сирах та інших продуктах харчування.

Література

1. Le Dréan G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese / G. Le Dréan, J. Le.J. Mounier, V. D. Vasseur, D. Arzur, O. Habrylo, G. Barbier // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 31. – № 1–2. – P. 100–107.

2. Larpin S. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese / S. Larpin, C. Mondoloni, S. Goerges, J.-P. Vernoux, M. Gueguen, N. Desmasures // *FEMS Yeast Res.* – 2006. – Vol. 6. – № 8. – P. 1243–1253.