



LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE
FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY

Alla Miķelsone
Mg.oec.

**NETIPISKO PIENSKĀBES BAKTĒRIJU IETEKME SIERA
NOGATAVINĀŠANĀ**
**INFLUENCE OF NON-STARTER LACTIC ACID BACTERIA ON
CHEESE RIPENING**

Promocijas darba kopsavilkums
Inženierzinātņu doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Pārtikas zinātnes nozarē

Summary of the Doctoral thesis for acquiring
the Doctor's degree of Engineering Sciences in
Food Science

Jelgava
2011

Promocijas darba zinātniskā vadītāja/
Scientific advisor:

Inga Ciproviča
prof. *Dr.sc.ing.*

Oficiālie recenzenti / Official reviewers:

Dr.habil.med., profesore Aija Žileviča – Latvijas Universitāte / Professor of University of Latvia

Dr.habil.sc.ing., profesore Sigita Angele Urbiene – Lietuvas Lauksaimniecības universitāte / Professor of Lithuanian University of Agriculture

Dr.sc.ing., valsts emeritētā zinātniece / emeritus scientist - Lilita Ozola

Promocijas darba izstrāde un noformēšana ir līdzfinansēta no ESF līdzekļiem.
Doctoral thesis has been worked out by financial support of ESF project.



Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011. gada 15. jūnijā plkst. 9.00 LLU Pārtikas zinātnes promocijas padomes atklātajā sēdē Jelgavā, Lielajā ielā 2, Pārtikas tehnoloģijas fakultātē, 145.auditorijā.

The defence of the Doctoral thesis in an open session of the Promotion Council of Food Science of Latvia University of Agriculture will be held on June 15, 2011, at 9.00 a.m. in room 145, Latvia University of Agriculture, 2 Liela street, Jelgava.

Ar promocijas darbu un kopsavilkumu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā, Lielajā ielā 2, Jelgavā, LV-3001.

Atsauksmes sūtīt Promocijas padomes sekretārei, LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātes docentei *Dr.phys. L.Markeviča* Lielā ielā 2, Jelgava, LV-3001 un / vai Lilija.Markevica@llu.lv.

The doctoral thesis is available at the Fundamental Library of Latvia University of Agriculture, 2 Liela street, Jelgava.

References are welcome to send to *Dr.phys. L.Markeviča*, the Secretary of the Promotion Council of Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, 2 Liela street, Jelgava, LV-3001, Latvia, and / or Lilija.Markevica@llu.lv.

SATURS

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE	5
ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA	7
MATERIĀLI UN METODES	8
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	13
1. <i>Lactobacillus</i> ģints sugas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros	13
2. Identificētās aromātveidojošās vielas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros	15
3. Komerciālo Krievijas un Holandes sieru sensoro īpašību novērtējums	18
4. <i>Lactobacillus</i> spp. eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieru paraugos	20
5. Netipisko pienskābes baktēriju skaita dinamika eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros nogatavināšanas laikā	25
6. pH dinamika eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru nogatavināšanas laikā	27
7. Identificētās aromātveidojošās vielas eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru nogatavināšanas laikā	30
8. Elastības izmaiņas eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros nogatavināšanas laikā	31
9. Eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru sensoro īpašību novērtējums	33
IETEIKUMI SIERA RAŽOTĀJIEM	35
SECINĀJUMI	37

CONTENT

TOPICALITY OF THE RESEARCH	39
APPROBATION OF THE RESEARCH WORK	41
MATERIALS AND METHODS	41
RESULTS AND DISCUSSIONS	44
1. <i>Lactobacillus</i> spp. in commercial Krievijas and Holandes cheeses	44
2. Identified aroma compounds in commercial Krievijas and Holandes cheeses	45
3. Evaluation of sensory properties of commercial Krievijas and Holandes cheeses	48
4. <i>Lactobacillus</i> spp. in experimental samples of Krievijas and Holandes cheeses	48
5. The dynamics of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening	52
6. The dynamics of pH in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening	53
7. The identified aroma compounds in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening	55

8. Changes of elasticity in Krievijas and Holandes cheeses during ripening	56
9. Evaluation of sensory properties of experimental Krievijas and Holandes cheeses	57
RECOMMENDATIONS FOR CHEESE MANUFACTURERS	58
CONCLUSIONS	60

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Latvijā ražotie Krievijas un Holandes sieri jāraksturo kā mainīgas kvalitātes prece. Siera kvalitāti nosaka vairāki faktori, starp tiem noteiktā secībā ir minami: piena kvalitāte, ražošanas tehnoloģija, iekārtu un telpu tīrība. Siers ir produkts, kas savas īpašības iegūst vairāku nedēļu, mēnešu, pat gadu garumā, tātad noteiktā laika posmā. Šajā laikā vislabāk varēs redzēt tos defektus, kas veidojas, ja pārkāpti kādi no iepriekš minētajiem faktoriem.

Siera ražošanas pamats - piens - ir bagātīgs daudzveidīgās mikrofloras avots. Mikrofloras sastāvu un kvantitāti nosaka ne tikai higiēnas noteikumu ievērošana piena ieguves un pārstrādes vietās, piena atdzesēšanas ātrums un temperatūra, bet arī telpu gaisā, uz iekārtu un inventāra virsmām esošā mikroflora. Neatņemama piena mikrofloras sastāvdaļa ir arī netipiskās pienskābes baktērijas - *Lactobacillus* spp.: *L.casei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus*, *L.curvatus*, *L.brevis*, *L.fermentum*; *Leuconostoc* spp.: *Leu.lactis*, *Leu.cremoris*; *Enterococcus* spp.: *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.durans* un *Pediococcus* spp.: *P.pentosaceus*, *P.acidilactici*.

Siera ražošanā izvēlētie piena pasterizācijas režīmi spēj iznīcināt lielāko daļu parastās mikrofloras, fermentu un patogēnu. Jāatzīmē, ka mikroorganismu inaktivācijas pakāpe ir atkarīga no mikroorganismu daudzuma, vairošanas fāzes un citiem faktoriem. Baktofūģēšana, mikrofiltrācija, kā arī pārtikas piedevu lietošana, *Lactobacillus* spp. un *Leuconostoc* spp. īpatnību produktā būtiski samazināt nevar. Netipisko pienskābes baktēriju izraisītie defekti sastopami visos piena produktos, bet vispildtāk tie izpaužas sieros.

Ikdienā netipisko pienskābes baktēriju izraisīto agrīno uzpūšanos bieži jauc ar koliformu baktēriju radīto. Netipiskās pienskābes baktērijas, galvenokārt heterofermentatīvās, producē gan diacetilu un acetoīnu, gan ievērojamus apjomus ogļskābo gāzi. Radusies ogļskābā gāze veido sieram daudz sīku acu, dažkārt gāzu spiediens ir tik ievērojams, ka sieram rodas sūkļveida konsistence. Šis defekts parādās sākotnējā siera nogatavināšanas laikā, kamēr vēl tajā saglabājas laktoze. Identisku defektu rada koliformas baktērijas. Lai gan defekts izpaužas vienādi, tā izraisītāji ir dažādi. Atšķiras arī tehnoloģiskie paņēmieni cīņai ar koliformu baktērijām. Ja piens ir iegūts atbilstoši sanitāri higiēniskajiem apstākļiem, iekārtas kārtīgi mazgātas, pārtikas piedevas koliformu baktēriju aktivitātes samazināšanai nav nepieciešamas. Ir jāpiebilst, ka patērētājiem lieki uzņemt nātrija nitrātu ir nevēlami. Sieru ražošanas uzņēmumu speciālisti ir neizpratnē par radušos defektu, tā izcelsmi un iespējamo novēršanu. Bez tam šo mikroorganismu producētie aromātveidojošie savienojumi – diacetils un acetoīns var veidot produktam neraksturīgu, biežpienam un mājās sieram līdzīgu garšu.

Līdzās iepriekšminētajiem defektiem, sieriem novēro arī rūgtu garšu. Šādu garšu var veidot arī netipiskās pienskābes baktērijas. *Lactobacillus* spp. producētie fermenti spēj hidrolizēt kazeīnu, veidojot rūgtos peptīdus, kas ietekmē siera garšas īpašības.

Jāatzīmē, ka netipiskās pienskābes baktērijas, pēc ierauga pienskābes baktēriju autolīzes, kļūst par dominējošo siera mikrofloru. Tām ir dažādas funkcijas sieru

nogatavināšanā, ietverot aromāta veidošanu, kontrolējot patogēnu augšanu, olbaltumvielu hidrolīzi, u.c., dažas no tām ir pat probiotikas.

Netipiskās pienskābes baktērijas nevar vērtēt viennozīmīgi. Atsevišķu sugu celmus lieto sieru nogatavināšanas paātrināšanai, olbaltumvielu hidrolīzes veicināšanai un augstākas brīvo aminoskābju koncentrācijas palielināšanai, sekmējot labi nogatavināta siera garšas un aromāta rašanos. Ir jāatzīmē, ka netipisko pienskābes baktēriju loma sieru kvalitātes veidošanā vēl joprojām nav skaidra. Vienīgais veids, kā nodrošināt sieru kvalitāti, kontrolējot biokīmisko procesu norisi un analizējot mikrofloras daudzveidību produkta nogatavināšanas laikā, ir korekcijas tehnoloģiskajā procesā.

Apkopojot iepriekšminēto, promocijas darbā ir izvirzīta šāda **hipotēze**: ražošanas un nogatavināšanas apstākļi konkrētā uzņēmumā būtiski ietekmē mikrofloras daudzveidību un sensorās īpašības puscietajos sieros.

Hipotēzi pierāda ar **aizstāvamām tēzēm**:

- 1) ražošanas un nogatavināšanas apstākļi ietekmē netipisko pienskābes baktēriju kvalitatīvo un kvantitatīvo saturu sieros;
- 2) paaugstināta nogatavināšanas temperatūra veicina vēlamu sensoro īpašību veidošanos sieros.

Pētījuma objekts:

Latvijā ražotie Krievijas un Holandes sieri.

Pētījuma mērķis:

pētīt netipisko pienskābes baktēriju daudzveidību Holandes un Krievijas sieros, vērtēt to ietekmi uz produktu kvalitāti.

Pētījuma uzdevumi:

- 1) izzināt *Lactobacillus* ģints sugas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros;
- 2) analizēt komerciālo Krievijas un Holandes sieru sensoros un fizikāli-ķīmiskos rādītājus;
- 3) pētīt *Lactobacillus* ģints sugu mainību eksperimentālajos sieros nogatavināšanas laikā;
- 4) vērtēt nogatavināšanas temperatūras un ilguma ietekmi uz netipisko pienskābes baktēriju vairošanās dinamiku eksperimentālajos sieros;
- 5) analizēt eksperimentālo sieru sensoro un fizikāli-ķīmisko rādītāju izmaiņas, nogatavinot sierus dažādās temperatūrās;
- 6) noteikt aromātveidojošās vielas sieros, to veidošanās dinamiku un ietekmi uz sieru kvalitāti.

Pētījuma novitāte un zinātniskais nozīmīgums:

- 1) izzināta Krievijas un Holandes sieru mikroflora, veikta *Lactobacillus* ģints sugu un celmu identifikācija, analizēta mikrofloras ietekme uz sieru kvalitāti;
- 2) izvērtēta nogatavināšanas režīmu ietekme uz netipisko pienskābes baktēriju vairošanās dinamiku Krievijas un Holandes sieros;
- 3) apzinātas aromātveidojošās vielas sieros un to ietekme uz Krievijas un Holandes sieru sensorajām īpašībām.

Darba tautsaimnieciskā nozīme:

Pētījums par netipisko pienskābes baktēriju daudzveidību un to izmaiņu dinamiku sieru nogatavināšanā un lomu sensoro īpašību veidošanā ļauj kāpināt Holandes un Krievijas sieru konkurētspēju un nodrošināt nemainīgu produkta kvalitāti.

ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA

Par rezultātiem ziņots starptautiskajās zinātniskajās konferencēs un simpozijā Latvijā, Lietuvā, Igaunijā, Vācijā, Jaunzēlandē un Norvēģijā.

- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. The study of attenuated starter in Holandes cheese ripening. *6th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOODBALT-2011"*, Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, 5–6 May, 2011 (referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I., Zagorska, J. Characterization of the non starter lactic acid bacteria of Latvian cheeses / IDF Dairy Summit and DIAA conference "Cheese science", Auckland, New Zealand, 8-11 November, 2010 (stenda referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. Effect of ripening temperature on Latvian semi-hard cheeses quality. *5th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOODBALT-2010"*, Tallin University of Technology, Tallin, Estonia, 29–30 October, 2010 (referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. Sieru mikrofloras analīze. *Starptautiskā zinātniskā konference: Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna, 2010*. Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Jelgava, Latvija, 29.oktobris, 2010 (referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. Diversity of *Lactobacillus* spp. in Krievijas cheese. *International Scientific Conference: Research for Rural Development 2010*. Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, 19-21 May, 2010 (referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. Quality of Latvian semi-hard cheeses. *Symposium 'Health aspects of cheese'*, Drobak, Norway, 6-8 October, 2009 (referāts).
- Ciprovica, I., **Novikova (Miķelsone), A.** Non-starter lactic acid bacteria in Latvian semi-hard cheeses. IDF-FIL World Dairy Summit&Exhibition, Berlin, 24-28 September, 2009 (stenda referāts).
- **Miķelsone, A.**, Ciproviča, I. Diversity of non-starter lactic acid bacteria in Latvian semi-hard cheeses. *International Scientific Conference: Research for Rural Development 2009*. Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, 20-22 May, 2009 (referāts).
- **Novikova (Miķelsone), A.**, Ciproviča, I. Effect of ripening conditions on Latvian semi-hard cheeses quality. *4nd Baltic Conference on Food Science and Technology "FOODBALT-2009"*, Kaunas University of Technology, Kaunas, Lithuania, 12–13 May, 2009 (referāts).
- **Novikova (Miķelsone), A.**, Strautniece, E., Ciproviča, I. The evaluation of sensory properties of Latvian semi-hard cheeses. *International Scientific Conference: Research for Rural Development 2008*. Latvia University of Agriculture, Jelgava, Latvia, 21-23 May, 2008 (referāts).

Pētījumu rezultāti apkopoti un publicēti recenzējamos zinātniskajos izdevumos latviešu un angļu valodā:

- **Miķelsone, A.,** Ciproviča, I. (2011) The study of attenuated starters in Holandes cheese ripening. **In: FOODBART 2011(Conference Proceeding)**, 2011, p.148-152.
- **Miķelsone, A.,** Ciproviča, I. (2010) Sieru mikrofloras analīze. **In: Veterinārmedicīnas raksti 2010**, 2010, lpp.96-102.
- **Miķelsone, A.,** Ciproviča, I. (2010) Diversity of *Lactobacillus* spp. in Krievijas cheese. **In: Research for Rural Development**, Vol.16, 2010, p.100-103.
- **Miķelsone, A.,** Ciproviča, I. (2009) Diversity of non-starter lactic acid bacteria in Latvian semi-hard cheeses. **In: Research for Rural Development**, Vol.15, 2009, p.103-107.
- **Novikova (Miķelsone), A.,** Ciproviča, I. (2009) Effect of ripening conditions on Latvian semi-hard cheeses quality. **In: Chemine Technologija**, Vol.3 (52), 2009, p.93-97.
- **Novikova (Miķelsone), A.,** Strautniece, E., Ciproviča, I. (2008) The evaluation of sensory properties of Latvian semi-hard cheeses. **In: Research for Rural Development**, Vol.14, 2008, p.324-328.

Publicēšanai LLU Rakstos / Submitted to be published in LLU Proceedings:

- **Miķelsone, A.,** Ciproviča, I. (2011) Aromātveidojošo vielu dinamika Krievijas siera nogatavināšanā.

MATERIĀLI UN METODES

Pētījuma laiks un vieta

Darbā atspoguļotie pētījumi veikti no 2008. gada janvāra līdz 2010. gada septembrim, tie izstrādāti:

- ✓ LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Mikrobioloģijas zinātniskajā, Sensorās novērtēšanas, Pārtikas produktu analīžu, Iepakojšanas materiālu īpašību izpētes laboratorijā;
- ✓ LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras laboratorijās;
- ✓ Kopenhāgenas universitātes Dabas zinātņu fakultātes Pārtikas zinātnes katedras laboratorijā.

Pētījuma objekts

Netipisko pienskābes baktēriju sugu apzināšanai puscietajos sieros un to ietekmes vērtēšanai uz sieru kvalitāti, t.sk. sensorajām īpašībām, pirmajā pētījumā sērijā tika analizēti mazumtirdzniecībā pieejamie komerciālie puscietajie Holandes un Krievijas sieri nogatavināti pienskābes baktēriju ietekmē. Komerciālie sieri gatavoti Latvijas piena pārstrādes uzņēmumos, atbilstoši katra uzņēmuma tehniskajiem noteikumiem un nozares standartu LPCS 10:2001 ‘Krievijas siers’ un LPCS 11:2001 ‘Holandes siers’ rekomendācijām. Analizēto sieru raksturojums dots 1.tabulā.

**Komerčiālo sieru raksturojums saskaņā ar ražotāju norādīto informāciju
marķējumā vai tehniskajos dokumentos**

**The characterisation of commercial cheeses according to information in
cheese label or technical documents**

Ražotājs / Producer	Siers / Cheese	Tauku saturs sausnā / Fat content in dry matter, %	Sāls saturs / Salt content, %*
AS 'Smiltenes piens' / JSC 'Smiltenes piens'	Krievijas	50.0	1.3-1.8
	Holandes	45.0	1.5-3.0
AS 'Rīgas piena kombināts' / JSC 'Rīgas piena kombināts' **	Edamjuusto (Holandes)	40.0	1.5-3.0
	'Old Farmer' (Krievijas)	50.0	1.3-1.8
	'Limbažu' (Krievijas)	50.0	1.3-1.8
AS 'Trikātes piens' / JSC 'Trikātes piens'	Krievijas	50.0	1.3-1.8
	Holandes	45.0	1.5-3.0
SIA 'Mālpils piensaimnieks' / 'Mālpils piensaimnieks' Ltd.	Holandes	45.0	1.5-3.0
AS 'Cesvaines piens' / JSC 'Cesvaines piens'	Holandes	45.0	1.5-3.0
AS 'Valmieras piens' / JSC 'Valmieras piens' ***	Holandes	45.0	1.5-3.0
AS 'Rankas piens' / JSC 'Rankas piens'	Holandes	45.0	1.5-3.0
	Krievijas	50.0	1.3-1.8

* sāls saturs norādīts, pamatojoties uz nozares standartos definētajām attiecīgā rādītāja robežām / salt content is indicated in margins, taking as a basis the stated margins for the relevant parameter;

** AS 'Rīgas piena kombināts' 'Limbažu Krievijas' siera apzīmējumam lietots 'Limbažu' nosaukums / Further in the thesis, the 'Limbažu' is being used for designation of the cheese 'Limbažu Krievijas' of JSC 'Rīgas piena kombināts';

*** siers pēc AS 'Valmieras piens' pasūtījuma ražots ES dalībvalstī / the cheese according to the order of JSC 'Valmieras piens' is produced in an EU member state.

Iegūstot pētnieciskos datus par netipisko pienskābes baktēriju sugu daudzveidību komerciālajos Holandes un Krievijas sieros, tālāk pētnieciskā darba otrajā pētījumā sērijā analizēti jau konkrētu ražotāju nenogatavināti siera paraugi. Uzņēmuma izvēle eksperimentālo paraugu analīzei veikta, pamatojoties uz uzņēmuma lielumu, pārstrādātā piena daudzumu, atrašanās vietu, siera ražošanas apjomu un tehnoloģiskās modernizācijas līmeni.

Eksperimentālie AS 'Rīgas piena kombināts' (Krievijas siers I, Krievijas siers III, Holandes siers I un Holandes siers III) un AS 'Smiltenes piens' (Krievijas siers II un Holandes siers II) sieri gatavoti saskaņā ar nozares standartu vai uzņēmuma tehnisko noteikumu prasībām. Krievijas un Holandes sieru III ierauga sastāvs ir papildināts ar pienskābes baktēriju celmiem ar lielāku proteolītisko un lipolītisko aktivitāti. Šo ieraugu lieto, lai paātrinātu nogatavināšanas procesu un uzlabotu produkta sensorās īpašības.

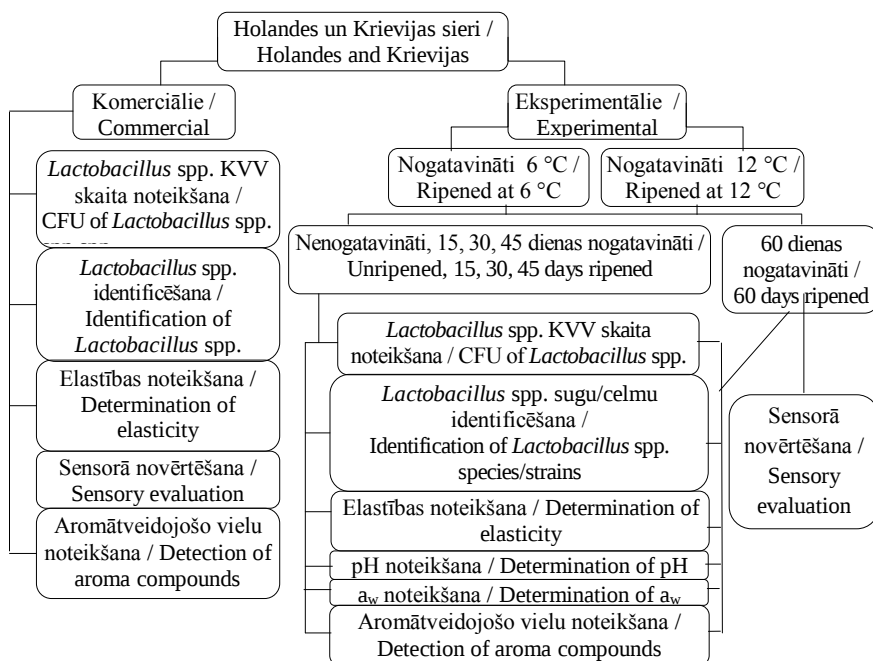
Ekspimentālo sieru raksturošanai un rezultātu interpretācijai turpmāk tekstā lietoti šādi apzīmējumi – Krievijas siers I, Krievijas siers II, Krievijas siers III, Holandes siers I, Holandes siers II un Holandes siers III.

Siera paraugi pēc sālīšanas nogādāti LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Piena un gaļas produktu laboratorijā, kur paraugi iepakoti polimēra materiāla termosaraukuma plēvē un nogatavināti LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras laboratorijās 6 °C un 12 °C 60 dienas.

Nogatavināšanas temperatūra izvēlēta, pamatojoties uz Latvijas sieru ražošanas tradīcijām un pētniecisko rakstu atziņām par mikrofloras mainību (6 °C), un Krievijas un Holandes sieru ražošanas tehnoloģijā ieteiktajiem nogatavināšanas parametriem (12 °C). Vienlaicīgi abi nogatavināšanas režīmi palīdz labāk izprast mikrofloras ietekmi uz siera kvalitāti, t.sk. sensoro īpašību veidošanos.

Pētījumu struktūra

Komerčiālo un eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru pētījumu struktūra parādīta 1.attēlā.



1.att. Komerčiālo un eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru pētījumu struktūra

Fig.1. Structure of the study of commercial and experimental Krievijas and Holandes cheeses

Pētījumā noteiktie rādītāji un lietotās metodes

pH noteikšana veikta visiem eksperimentālajiem siera paraugiem nogatavināšanas laikā, saskaņā ar LVS ISO 5546:2010 'Kazeīni un kazeināti - pH noteikšana', lietojot pH-metru *3520 pH Meter* - JENWAY (Barloworld Scientific Ltd., Essex, UK). pH noteikšana katram paraugam veikta trijos atkārtojumos.

Elastības noteikšana veikta komerciālajiem un eksperimentālajiem siera paraugiem. Tās noteikšanai lietots struktūrmehānisko rādītāju analizators *TA.XT Plus Texture Analyser* (Stable Microsystems Ltd., Surrey, UK), izmantojot 25,4 mm uzgali (P/1S – Ball Stainless) un mērot sieru saspiešanas spēku (testa ātrums 2 mm s^{-1} , iespiešanas dziļums 5 mm, pieliktais spēks 0,0493 N).

Visiem analizējamajiem paraugiem mērījumi veikti 10 atkārtojumos. Rezultātu apstrādei lietota *Texture Exponent 32* programma.

Ūdens aktivitātes noteikšana veikta tikai eksperimentālajiem siera paraugiem, lietojot *Meter AquaLab LITE* (Decagon Inc, USA). Paraugiem ūdens aktivitātes mērījumi veikti trijos atkārtojumos (ar precizitāti $\pm 0,015$). Pirms paraugu analizēšanas veikta iekārtas kalibrēšana ar 0,5M KCl (Lot 932375, Decagon).

Aromātveidojošo vielu noteikšana veikta trijiem komerciālajiem siera paraugiem (AS 'Rīgas piena kombināts' 'Limbažu' Krievijas un 'Limbažu' Holandes, AS 'Trikātas piens' Krievijas sieriem) un visiem eksperimentālajiem sieriem. Katram paraugam analīzes veiktas trijos atkārtojumos. Daļa analīžu veikta Kopenhāgenas universitātes Dabas zinātņu fakultātes Pārtikas zinātnes katedras laboratorijā, aromātveidojošās vielas nosakot nenogatavinātam, 6 un 12 °C temperatūrā nogatavinātiem Krievijas siera I un komerciālajiem siera paraugiem, izmantojot cietās fāzes mikroekstrakciju.

Analīzes gaita: Stikla pudelītē ar tilpumu 15 ml ievēra četrus gramus siera, pievienoja 0.1 ml iekšējās standartvielas – 4-metilpentān-1-ola ($50 \mu\text{l l}^{-1}$) un pudelīti noslēdza ar alumīnija vāciņu. Līdz analīzei, paraugi turēti 5 °C temperatūrā automatiskajā parauga ievadīšanas sistēmā *Combi Pal autosampler* (CTC Analytics, Switzerland). Parauga kušana un līdzsvara sasniegšana tvaika fāzē 60 °C ilga 15 minūtes, bet aromātveidojošo vielu ekstrakcija uz cietās fāzes mikroekstrakcijas šķiedras ar CAR/PDMS pārklājumu ($75 \mu\text{m}$) (Supelco, Bellafonte, PA) - 50 minūtes. Tvaika fāzē esošo aromātveidojošo vielu izdalīšanai lietots gāzu hromatogrāfs *Hewlett-Packard 1530A* (Palo Alto, CA), kas aprīkots ar kapilāro kolonnu *J&W Scientific DB-Wax column* ($30\text{m} \times 0.25\text{mm} \times 0.25 \mu\text{m}$). Krāsns temperatūru no 40 °C un parauga izturēšanu 2 min pakāpeniski palielināja līdz 160 °C ar kāpumu 6 °C min^{-1} un no 160 °C līdz 210 °C ar kāpumu 10 °C min^{-1} . Detektora temperatūra bija 250 °C. Nesējgāzes (hēlija) plūsmas ātrums 1ml min^{-1} bez plūsmas dalīšanas režīma. Izolēto aromātveidojošo vielu desorbija ilga divas minūtes 250 °C. Izdalītās aromātveidojošās vielas identificētas, lietojot masas selektīvo detektoru *Hewlett-Packard 5973*. Jonizācija veikta ar 70 eV enerģiju un 250 °C temperatūrā. Vielu identificēšana veikta pēc vielas masas spektru līdzības ar masu spektru bibliotēkām.

Krievijas siera II, III, Holandes siera I, II un III nenogatavinātiem un 6 un 12 °C temperatūrā noteiktu laiku nogatavinātiem paraugiem aromātveidojošās vielas noteiktas LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras Iepakojamo materiālu īpašību izpētes

laboratorijā, izmantojot *Clarus 500 GC/MS* (PerkinElmer®) gāzu hromatogrāfu tandēmā ar maspektrometru. Katram paraugam analīzes veiktas trijos atkārtojumos. Stikla pudelītē ar tilpumu 20 ml ievēra četrus gramus parauga, pudelīti noslēdza ar alumīnija vāciņu. Parauga kušana un līdzsvara sasniegšana tvaika fāzē 70 °C ilga 30 minūtes. Aromātveidojošo vielu ekstrakcijas un identificēšanas gaita līdzīga iepriekš aprakstītajai.

Paraugiem, kuriem analīzes veiktas Kopenhāgenas universitātē, aromātveidojošās vielas tika noteiktas gan kvalitatīvi, gan kvantitatīvi. Sieriem, kam analīzes veiktas LLU, aromātveidojošās vielas noteikta tikai kvalitatīvi. Rezultātu sadaļā datu salīdzināšanā lietots aizņemtās vielas hromatogrammas pīķa smailes laukums.

Sensorā novērtēšana veikta pieciem Holandes un trijiem Krievijas sieriem, kā arī eksperimentālajiem Krievijas un Holandes siera III paraugiem. Eksperimentālie paraugi vērtēšanai izvēlēti, lai noteiktu mikrofloras ietekmi uz dažādā temperatūrā nogatavinātiem siera paraugiem un analizētu sensoro rādītāju intensitāti sieriem ar pātrinātu proteolīzi un lipolīzi.

Visiem sieriem vērtēšana veikta saskaņā ar ISO 4121:1987 'Sensory analysis - Methodology - Evaluation of food products by methods using scales' metodiku, analizējot sensoro rādītāju intensitāti siera krāsai, konsistencei, acojumam un 'garšai + smaržai'. Paraugu vērtēšanā piedalījās apmācīti 22-27 vērtētāji.

***Lactobacillus* spp. noteikšana** veikta visiem analizētajiem komerciālo un eksperimentālo sieru paraugiem, saskaņā ar LVS ISO 15214:1998 'Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija - Horizontālā metode mezofilo pienskābes baktēriju noteikšanai - Koloniju skaitīšanas metode pie 30 °C', lietojot MRS agara barotni (Scharlau, Spain).

Barotnes sagatavotas saskaņā ar LVS CEN ISO/TS 11133-1:2009 'Pārtikas produktu un lopbarības mikrobioloģija. Norādījumi barotņu sagatavošanā un ražošanā. 1.daļa. Vispārīgie norādījumi laboratorijas barotņu sagatavošanas kvalitātes nodrošināšanai'.

Paraugu atšķaidījumi gatavoti saskaņā ar LVS EN ISO 8261:2002 'Piens un piena produkti. Vispārīgie norādījumi testa paraugu, sākotnējo suspensiju un decimālatšķaidījumu sagatavošanai mikrobioloģiskai pārbaudei' un ISO 6887-5:2010 'Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products'.

Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits noteikts, ievērojot ISO 15214:1998 'Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija - Horizontālā metode mezofilo pienskābes baktēriju noteikšanai - Koloniju skaitīšanas metode pie 30 °C' metodiku. Pienskābes baktēriju kultivēšanai MRS agarā izvēlētie parametri bija 37 °C 72 stundas (Coeuret et al., 2003).

***Lactobacillus* spp. koloniju identificēšana** veikta, pamatojoties uz ogļhidrātu fermentāciju, izmantojot API 50 CHL testu (BioMerieux, France). *APILAB Plus version 4.0* (BioMerieux) programma lietota iegūto fermentācijas profilu atšifrēšanai un izolēto koloniju identificēšanai līdz sugai.

DNS izolēšana veikta biežāk identificēto *Lactobacillus* spp. sugu pārstāvjiem - *L.plantarum* 1 un *L.curvatus*, izmantojot PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.).

Polimerāzes ķēdes reakcijas analīze veikta LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras laboratorijā, izdalīto *Lactobacillus* sugu apstiprināšanai.

Paraugi nodoti sekvenēšanai LU Biomedicīnisko pētījumu un studiju centrā. Iegūtās sekvences analizētas ar *Staden Package 1.6.0. release* (<http://staden.sourceforge.net/>) un salīdzinātas ar datu bāzē BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) esošajām sekvencēm.

Datu matemātiskā apstrāde veikta, lietojot *StatistiXL* un *Microsoft Excel* programmas. Rezultātu apstrādei izmantota vienfaktora dispersijas analīze, Tjūkija tests un korelācijas analīze. Eksperimentālajiem datiem noteikts vidējais aritmētiskais un standartnovirze.

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

1. *Lactobacillus* ģints sugas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros

Analizējot mazumtirdzniecībā iegādātos Latvijas uzņēmumos ražotos Krievijas sierus, tajos noteiktas *L.curvatus* un *L.plantarum* 2 asociācijas, novērota arī vienas sugas dominēšana. Katram sieram ir raksturīgā mikroflora, pat vienas šķirnes dažādu ražotāju sieram mikrofloras sastāvs var atšķirties (2. tab.).

2. tabula / Table 2

Lactobacillus spp. komerciālajos Krievijas sieros *Lactobacillus* spp. in commercial Krievijas cheeses

Ražotājs / Producer	Siers / Cheese	<i>Lactobacillus</i> spp.
AS 'Smiltenes piens' / JSC 'Smiltenes piens'	Krievijas	<i>L.curvatus</i>
AS 'Rīgas piena kombināts' / JSC 'Rīgas piena kombināts'	Old Farmer (Krievijas)	<i>L.curvatus</i>
	Limbažu Krievijas	<i>L.curvatus</i> , <i>L.plantarum</i> 2
AS 'Trikātas piens' / JSC 'Trikātas piens'	Krievijas	<i>L.curvatus</i> , <i>L.plantarum</i> 2
AS 'Rankas piens' / JSC 'Rankas piens'	Krievijas	<i>L.curvatus</i> , <i>L.acidophilus</i> 3

Netipiskās pienskābes baktērijas ir izdalītas no visiem komerciālajiem sieriem. Viens no galvenajiem netipisko pienskābes baktēriju avotiem ir piens. *Lactobacillus* spp. var izdzīvot pasterizācijas procesā vai nokļūt sierā no ierauga, iekārtām, sāļjuma, iepakojšanas materiāla. To novēroja Čederas siera ražošanā, gatavojot produktu *L.curvatus* un *L.fermentum* biofilmu klātbūtnē. Gatavajam sieram tika konstatēta dažādu *L.curvatus* celmu klātbūtne (Somers et al., 2001). *L.curvatus* veidotās biofilmas ir ļoti izturīgas un spējīgas izdzīvot iekārtu sanitārās apstrādes procesos. *L.curvatus* ir dominējošā netipiskā pienskābes baktēriju suga mazumtirdzniecībā iegādātajos Krievijas sieros.

L.plantarum noteikta AS 'Trikātas piens' un AS 'Rīgas piena kombināts' Krievijas sieros un ir viena no biežāk sastopamajām netipisko pienskābes baktēriju pārstāvē, kas sierā nonāk no piena, ražošanas iekārtām vai gaisa (Fox et al., 2000).

Savukārt *L.acidophilus* klātbūtne AS 'Rankas piens' Krievijas sierā liecina par iespējamo nokļūšanu no ražošanas telpu gaisa, jo *L.acidophilus* plaši izmanto skābpiena produktu gatavošanā.

Holandes sieru mikroflora (3. tab.) ir pārstāvēta ar *L.paracasei* subsp.*paracasei* 1, *L.paracasei* subsp.*paracasei* 2 un *L.rhamnosus* asociācijām un tikai AS 'Valmieras piens' produktā ir noteikta *L.curvatus* un *L.plantarum* 2 asociācija. Visas šīs sugas, saskaņā ar Coppola u.c. (1997) un Fitzsimons u.c. (1999) pētījumiem, uzskatāmas par netipisko mikrofloru, kuras visbiežāk izolē no puscietajiem sieriem.

3. tabula / Table 3

***Lactobacillus* spp. komerciālajos Holandes sieraos**
***Lactobacillus* ssp. in commercial Holandes cheeses**

Ražotājs / Producer	Siers / Cheese	<i>Lactobacillus</i> spp.
AS 'Smiltēnes piens' / JSC 'Smiltēnes piens'	Holandes	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2
AS 'Rīgas piena kombināts' / JSC 'Rīgas piena kombināts'	Edamjuusto (Holandes)	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.rhamnosus</i>
AS 'Trikātes piens' / JSC 'Trikātes piens'	Holandes	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.rhamnosus</i>
SIA 'Mālpils piensaimnieks' / 'Mālpils piensaimnieks' Ltd.	Holandes	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2, <i>L.rhamnosus</i>
AS 'Cesvaines piens' / JSC 'Cesvaines piens'	Holandes	<i>L.curvatus</i> , <i>L.rhamnosus</i>
AS 'Rankas piens' / JSC 'Rankas piens'	Holandes	<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2
AS 'Valmieras piens' / JSC 'Valmieras piens'	Holandes	<i>L.curvatus</i> , <i>L.plantarum</i> 2

Salīdzinot Krievijas un Holandes sieru mikrofloru, redzams, ka netipisko pienskābes baktēriju sugas atšķiras ne tikai vienas šķirnes sieraos, bet arī dažādu ražotāju siera paraugos. Tajā pat laikā citādas atziņas ir atspoguļotas Fitzsimons u.c. (1999) un Crow u.c. (2001) darbos. Gatavojot Čederas sieru, tajā noteiktie mezofīlie *Lactobacillus* spp. pārstāvi bija līdzīgi pat Īrijas un Jaunzēlandes uzņēmumos ražotajos produktos. Arī trijos uzņēmumos ražotajā Čederas sierā novēroja līdzības *Lactobacillus* ģintsugu prevalēšanā. Tātad var secināt, ka atšķirības analizēto sieru mikrofloras sastāvā ir jāsaista ar tehnoloģisko parametru niansēm, siera pH, lietotā ierauga veidu u.c. faktoriem.

Darbā analizēto sieru salīdzināšana ar pasaulē pazīstamajiem puscietajiem sieriem apstiprina, ka Latvijā ražotajos puscietajos sieraos netipisko pienskābes baktēriju sugu daudzveidība ir līdzīga no Čederas un Goudas sieriem izdalītajām. Cogan un Beresford (2002) atzīmē, ka nogatavināšanas laikā Čederas sierā ir vērojama mezofīlo *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum* un *L.curvatus* dominēšana.

Literatūras un eksperimentālo datu apkopojums parāda, ka no Krievijas un Holandes sieriem izolētās netipiskās pienskābes baktēriju sugas un to asociācijas uzskatāmas par tradicionālāko visbiežāk izolēto netipisko Eiropas sieru mikrofloru. Līdzās netipisko pienskābes baktēriju sugām, analizēts netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits komerciālajos Holandes un Krievijas sieraos.

Beresford (2003) apgalvo, ka netipiskās pienskābes baktērijas strauji vairojas sierā pirmajās 10 – 20 nogatavināšanas nedēļās, sasniedzot 10^7 KVV g^{-1} . Pēc tam to koncentrācija ir relatīvi nemainīga. Savukārt komerciālos sieros maksimālās koncentrācijas nepārsniedz 10^6 KVV g^{-1} . Atšķirību starp autoru atziņām un eksperimentu datiem varētu skaidrot ar izejvielas kvalitāti, kuras dēļ ražošanā tiek variētas pasterizācijas un nogatavināšanas temperatūras, sūkalu skābumu graudu apstrādes laikā, ilgāku graudu apstrādi pēc otrās uzsildīšanas un nātrija nitrāta klātbūtni sieros.

Vidējais koloniju veidojošo vienību skaits Krievijas sieros ir mazāks nekā Holandes sieros (attiecīgi, 5,53 lg un 6,06 lg KVV g^{-1}), kas skaidrojams ar niansēm abu sieru ražošanas tehnoloģijā.

Vērtējot pienskābes baktēriju sugu daudzveidību un kvantitatīvo sastāvu komerciālajos Krievijas un Holandes sieros un gūstot atziņas zinātniskajā literatūrā par sugu mainību tajos nogatavināšanas laikā, pētījumā tālāk apzinātas aromātveidojošo vielu koncentrācijas Holandes un Krievijas sieros, analizēta to loma sieru sensoro īpašību veidošanā.

2. Identificētās aromātveidojošās vielas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros

Laktozes, olbaltumvielu, un tauku pārvērtību rezultātā veidojas vairāki simti dažādu vielu. Būtiska nozīme ir nevis vienas vai otras vielas daudzumam sierā, bet to savstarpējam attiecībām (Ozola, Ciproviča, 2002).

Komerčiālajos Krievijas un Holandes sieros identificēto aromātveidojošo vielu apkopojums dots 4.tabulā.

4.tabula / Table 4

Identificēto aromātveidojošo vielu apkopojums un to koncentrācijas komerciālajos sieros, $\mu g\ kg^{-1}$ The concentrations of identified aroma compounds detected in commercial cheeses, $\mu g\ kg^{-1}$

Aromātveidojošās vielas / Aroma compounds	'Limbažu' Holandes	'Limbažu' Krievijas	Trikāts Krievijas
	Vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze / Mean $\pm$ standard deviation		
etiķskābe / acetic acid	113.69 ^c $\pm$ 14.02	446.00 ^a $\pm$ 11.06	186.08 ^b $\pm$ 17.97
sviestskābe / butyric acid	95.32 ^c $\pm$ 13.10	229.23 ^b $\pm$ 16.86	322.03 ^a $\pm$ 40.89
heksānskābe / hexanoic acid	30.79 ^c $\pm$ 4.44	69.78 ^b $\pm$ 9.53	134.65 ^a $\pm$ 19.10
oktānskābe / octanoic acid	25.20 ^b $\pm$ 6.19	31.86 ^b $\pm$ 8.89	74.88 ^a $\pm$ 13.96
nonānskābe / nonanoic acid	2.79 $\pm$ 2.21	n.k.	
dekānskābe / decanoic acid	1.09 $\pm$ 0.49	n.k.	
etanols / ethanol	56.41 ^b $\pm$ 4.44	156.53 ^a $\pm$ 5.60	156.53 ^a $\pm$ 5.60
3-metilbutān-1-ols / 3-methylbutan-1-ol	1.11 $\pm$ 0.18	0.93 $\pm$ 0.55	1.35 $\pm$ 0.01

4. tabulas nobeigums / The end of Table 4

Aromātveidojošās vielas / Aroma compounds	'Limbažu' Holandes	'Limbažu' Krievijas	Trikātas Krievijas
	Vidējā vērtība ± standartnovirze / Mean ± standard deviation		
pentān-1-ols / pentan-1-ol	n.k.	0.39 ^a ± 0.06	0.32 ^a ± 0.09
heksān-1-ols / hexan-1-ol	0.005 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.003
2-metilpentān-3-ols / 2-methylpentan-3-ol	1.03 ^b ± 0.31	6.08 ^a ± 0.51	6.24 ^a ± 0.61
propān-2-ons / propan-2-one	12.32 ^b ± 1.11	39.52 ^a ± 1.677	39.14 ^a ± 5.22
butān-2-ons / butan-2-one	53.07 ^b ± 5.49	69.86 ^b ± 2.91	230.47 ^a ± 8.94
pentān-2-ons / pentan-2-one	321.53 ^a ± 34.85	181.31 ^b ± 5.03	186.36 ^b ± 12.32
diacetils / diacetyl	321.53 ^a ± 34.85	181.31 ^b ± 5.03	186.36 ^b ± 12.32
heptān-2-ons / heptan-2-one	8.73 ± 0.66	8.50 ± 0.28	8.67 ± 0.29
acetoīns / acetoin	88.95 ^b ± 12.11	325.48 ^a ± 15.78	310.26 ^a ± 1.34
nonān-2-ons / nonan-2-one	0.77 ^b ± 0.15	2.71 ^a ± 0.14	2.33 ^a ± 0.46
nonanāls / nonanal	1.82 ± 0.31	1.52 ± 0.05	1.77 ± 0.16
3-metilbutanāls / 3-metilbutanal	n.k.	0.23 ± 0.01	n.k.
acetaldehīds / acetaldehyde	2.67 ^a ± 0.39	0.28 ^a ± 0.06	1.19 ^b ± 0.05
benzaldehīds / benzaldehyde	0.52 ^a ± 0.08	n.k.	0.205 ^b ± 0.001
fenilacetaldehīds / phenylacetaldehyde	1.16 ^b ± 0.16	3.71 ^a ± 0.44	n.k.
toluols / toluene	n.k.		1.18 ± 0.26
naftalīns / naphthalene	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001
etilacetāts / ethylacetate	n.k.	0.003 ± 0.001	n.k.
etilbutirāts / ethylbutyrate	0.31 ^b ± 0.06	0.75 ^a ± 0.12	n.k.
δ-dekalaktons / δ-decalactone	1.67 ^b ± 0.25	6.35 ^a ± 0.64	3.77 ^a ± 0.55
δ-dodekalaktons / δ-dodecalactone	0.86 ^b ± 0.12	2.81 ^a ± 0.25	1.83 ^a ± 0.25
dimetiltrisulfīds / dimethyltrisulfide	2.42 ^b ± 0.42	3.70 ^a ± 0.16	3.49 ^a ± 0.43
metionāls / methional	0.05 ^a ± 0.01	n.k.	0.02 ^b ± 0.00

^{a,b,c} – paraugi ar vienādiem burtiem aromātveidojošās vielas koncentrācijas ietvaros būtiski neatšķiras ($p > 0.05$). Burti sakārtoti no aromātveidojošās vielas augstākās koncentrācijas uz zemāko / samples with a similar letter superscripts do not differ significantly ($p > 0.05$) within concentration of aroma compound. Letters are subordinated from the highest concentration value to the least;

n.k.- nav konstatēts / not detected

Kopumā paraugos tika noteiktas: etiķskābe, sviestskābe, heksānskābe, oktānskābe, nonānskābe un dekānskābe. Tās veidojas tauku metabolismā, produktam piešķirot netīru, rūgtenu un ziepju garšu. Tā kā oglekļa atomu skaits taukskābēs nepārsniedz 12, pamatojoties uz *Acree* un *Arn* (2004) pētījumu atziņām, var atzīmēt to nozīmi siera sensoro īpašību veidošanā.

Etanols, 3-metilbutān-1-ols, pentān-1-ols, heksān-1-ols un 2-metilpentān-3-ols tika konstatēti gan Krievijas, gan Holandes siera. Spirti veidojas ogļhidrātu, olbaltumvielu un tauku metabolisma rezultātā un literatūrā raksturoti kā vielas, kas

sieram piešķir gan saldu un ziedu, gan tauku, alkohola un rūgtenu smaržu (Singh et al., 2003; Fox et al., 2000; Molimard, Spinner, 1996).

Saskaņā ar *Qian* un *Burbank* (2007) datiem, aldehīdi veidojas taukskābju autooksidēšanas ceļā, bet daži sazarotās ķēdes aldehīdi - no aminoskābēm *Strecker* degradācijā. Saskaņā ar *Acree* un *Arn* (2004) pētījumu rezultātiem, aldehīdiem ir zems uztveršanas sliekšnis, tāpēc tie ir uzskatāmi par nozīmīgiem aromāta veidotājiem sierā. Sieros konstatētais 3-metilbutanāls veidojas no leicīna, piedaloties *Lc.lactis* fermentiem (Christensen et al., 1999; McSweeney, Sousa, 2000). Acetaldehīds uzskatāms par piruvāta metabolisma produktu, var rasties arī no triptofāna *Lactococcus* spp. ietekmē (Christensen et al., 1999; Fox et al., 2000). Savukārt nonanāls veidojas no nepiesātinātām taukskābēm β -oksidēšanās laikā. *Avsar* u.c. (2004) pamato, ka 3-metilbutanāls sieros asociējas ar rieksu smaržu. Acetaldehīdam, atkarībā no tā koncentrācijas produktā, piemīt salds vai ass, bet nonanālam - zaļas zāles aromāts (Fox et al., 2000).

Ketoni siera smaržu papildina ar ziedu un augļu notīm. Analizējamajos paraugos tika identificēti propān-2-ons, butān-2-ons, pentān-2-ons, diacetils, heptān-2-ons, acetoīns un nonān-2-ons. Lielākā daļa ketonu veidojas no β -ketoskābēm (Tunick, 2007). Diacetila veidošanās notiek ierauga mikroorganismu darbības rezultātā laktozes un citrātu pārvērtībās. Šī viela kalpo arī kā prekursors acetoīna veidošanā. *Wilkinson* un *Kilcawley* (2007) uzsver diacetila, acetoīna un butān-2-ona veidošanos citrātu pārvērtību rezultātā Goudas sierā ierauga un netipisko pienskābes baktēriju ietekmē.

Četri benzola gredzenu saturošie savienojumi konstatēti aromatveidojošo vielu vidū. Toluols, kurš veidojas gan no β -karotīna (Molimard, Spinnler, 1996), gan uzglabājot sasaldētā veidā sieru, iepakotu modificētā gāzu vidē, (Bosset et al., 2000), un naftalīns produktā asociējas ar darvas un fēču smaržu (Drake et al., 2001). Benzaldehīds un fenilacetaldehīds ir savienojumi ar mandeļu un rožu smaržu. To veidošanā iesaistīts triptofāns un fenilalanīns (Christensen et al., 1999).

Esteri, kuru veidošanā piedalās taukskābes un etanols, tika identificēti Krievijas un Holandes sieros. Sieram tie piešķir ziedu vai augļu garšu (Singh et al., 2003; Molimard, Spinnler, 1996).

No laktoniem - δ -dekalaktons un δ -dodekalaktons ir noteikti komerciālo sieru paraugos. Sieros laktoni veidojas no hidroksiskābēm intramolekulārā esterifikācijā. Saskaņā ar *Acree* un *Arn* (2004) datiem, dekalaktons un dodekalaktons ir uzskatāmi par svarīgākajiem laktoniem sierā. Produkta smaržas buķeti laktoni papildina ar augļu notīm.

Paraugos konstatēti arī sēru saturošie savienojumi – metionāls un dimetiltrisulfīds. Pēdējais veidojas metāntiola oksidēšanās rezultātā (Bonnarme et al., 2000; McSweeney, Sousa, 2000) un produktā asociējas ar ķiploku smaržu. Savukārt metionāls veidojas *Strecker* degradācijā un sieram piešķir vārītu kartupeļu garšu un smaržu. Zemā uztveršanas sliekšņa dēļ šie savienojumi ievērojami ietekmē siera garšas un smaržas veidošanos (Curioni un Bosset, 2002).

Atšķirības noteiktajās aromātveidojošajās vielās ir vērojamas gan starp Holandes un Krievijas sieriem, gan starp divu dažādu ražotāju paraugiem. Analizējot

aromātveidojošās vielas, redzams, ka toluols ir noteikts tikai AS 'Trikātas piens' sierā, bet etilbutirāts un fenilacetaldehīds AS 'Rīgas piena kombināts' paraugos. Tas tikai norāda uz bioķīmisko procesu norises atšķirībām, ko ietekmē arī siera mikrofloras kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs.

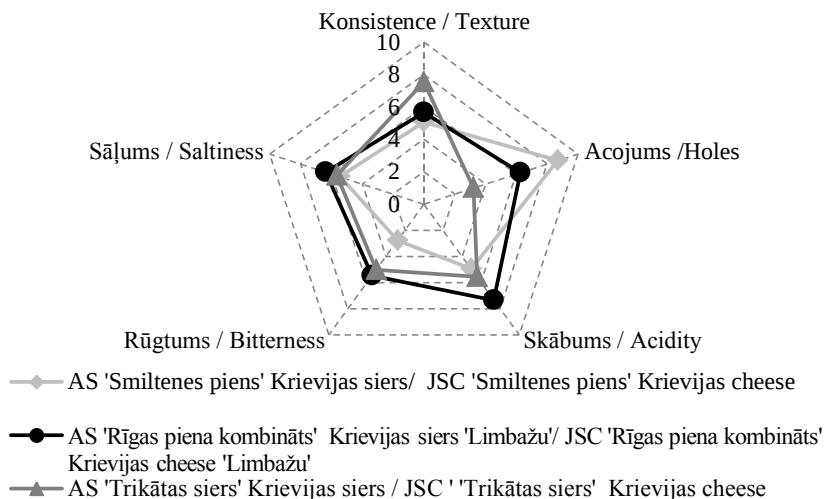
Individuāli noteiktās aromātveidojošās vielas komerciālajos sieros spēj veidot patīkamas garšas un aromāta nianšes, tomēr kombinācijās var izraisīt neraksturīgu sensoro buketi. Bez tam sensorās īpašības negatīvi ietekmē spirtu, aldehīdu un ketonu koncentrācijas pieaugums sierā. Kā minēts iepriekš, šo vielu veidošanā piedalās gan ierauga, gan netipiskās pienskābes baktērijas. Pat vienas šķirnes sieros aromātveidojošo vielu koncentrācija ir atšķirīga, līdzīgi kā identificētās netipiskās pienskābes baktēriju sugas. Veiktā aromātveidojošo vielu un to koncentrāciju noteikšana komerciālajos sieros vēl nedod pamatu apgalvot par netipisko pienskābes baktēriju nevēlamo ietekmi uz siera garšu un aromātu.

3. Komerčiālo Krievijas un Holandes sieru sensoro īpašību novērtējums

Krievijas siera sensorās vērtēšanas rezultāti ir parādīti 2.attēlā. Veicot dispersijas analīzi, noskaidrots, ka būtiska atšķirība pastāv sieru konsistencē, acojumā, skābumā un rūgtumā.

Tjūkija testa rezultāti parādīja, ka par skābāku un rūgtāku tika atzīts AS 'Rīgas piena kombināts' 'Limbažu' Krievijas siers. Savukārt AS 'Trikātas siers' Krievijas siers ir novērtēts kā ciets, ar sieram neraksturīgu acojumu. AS 'Smiltenes piens' Krievijas siers ir ieguvis augstāko vērtējumu acojumā, kā arī ir mazāk rūgts un sāļš. Analizējot siera garšas defektus un to izcelsmi, rūgta garša ir viena no galvenajām problēmām siera ražošanā, izmantojot mezofīlos ieraugus (Singh et al., 2003).

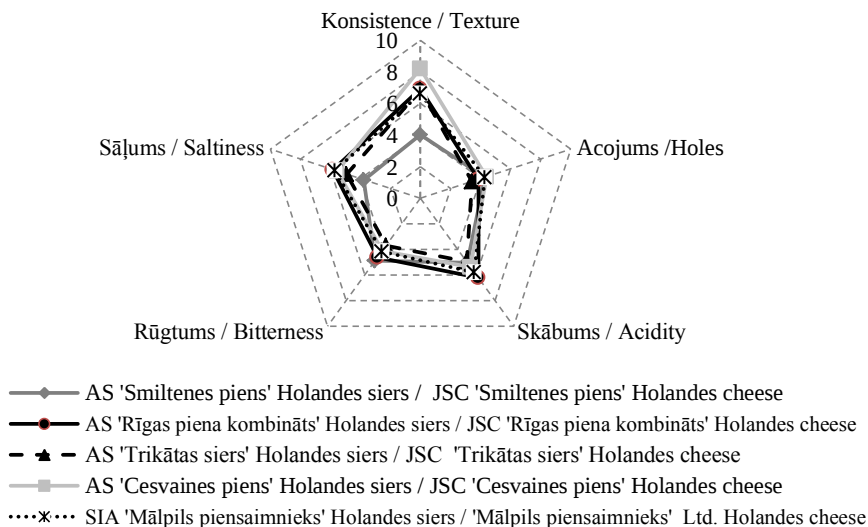
Paaugstināta nogatavināšanas temperatūra intensificē fermentatīvos procesus un sekmē netipisko pienskābes baktēriju augšanu, tā rezultātā veidojas siers ar dažādiem defektiem. Savukārt pazeminātas nogatavināšanas temperatūras veicina rūgtas garšas veidošanos, kavējot primārās olbaltumvielu hidrolīzes produktu tālākās pārvērtības. Ar bioķīmisko procesu norisi nogatavināšanas laikā un siera mikrofloras sastāvu var skaidrot atšķirības analizēto sieru sensoro īpašību intensitātē.



2. att. Komerčiālo Krievijas sieru sensoro īpašību staru diagramma

Fig. 2. Star diagram of sensory properties of commercial Krievijas cheeses

Lielākā daļa Holandes sieru (3. att.) tika novērtēti līdzīgi, atšķirības konstatētas tikai sieru konsistencē un sāļumā.



3. att. Komerčiālo Holandes sieru sensoro īpašību staru diagramma

Fig. 3. Star diagram of sensory properties of commercial Holandes cheeses

Saskaņā ar Tjūkija testa rezultātiem, AS 'Cesvaines piens' ražoto produktu vērtētāji atzina par cietu un sāļu. Savukārt AS 'Rīgas piena kombināts' Holandes siers tika novērtēts kā sāļākais.

Siera konsistence un sāļums ir atkarīgi no ražošanas procesa. Konsistence ir atkarīga arī no izejvielas sastāva un siera nogatavināšanas apstākļiem. Banks (2007) akcentē pievienotā ierauga, fermentu preparāta un sāls daudzuma, siera graudu apstrādes ilguma nozīmi siera konsistences veidošanā.

Saskaņā ar Lawrence u.c. (1987) pirmās divas nogatavināšanas nedēļas visvairāk ietekmē siera konsistenci, jo α_{s1} kazeīns tiek hidrolizēts līdz α_{s1-I} kazeīnam, piedaloties recināšanas fermentiem. Rezultātā siers iegūst mīkstāku konsistenci. Konsistences izmaiņas turpinās nogatavināšanas laikā, piedaloties ierauga un netipisko pienskābes baktēriju izdalītajām proteīnāzēm un peptidāzēm. To rezultātā veidojas amonjaks un citi ūdenī šķīstošie slāpekļa savienojumi, kas paaugstina siera pH un ietekmē konsistenci (Fox et al., 2000).

Komerčiālo sieru konsistence vērtēta arī ar struktūrmehāniskā analizatora palīdzību, mērot paraugu saspiešanas spēku. Nosakot siera elastību un veicot dispersijas analīzi, noskaidrots, ka pastāv būtiskas atšķirības starp Holandes un Krievijas sieru elastību ($p < 0,05$). Lietojot Tjūkija testu, noskaidrots, ka atšķirības pastāv starp visiem Holandes siera paraugiem, izņemot visciētākos - AS 'Trikātas piens' un AS 'Smiltenes piens' sierus, bet Krievijas sieriem - blīvākā un cietākā konsistence tika noteikta AS 'Rankas piens' Krievijas sieram. AS 'Rīgas piena kombināts' paraugam ar tirdzniecības marku 'Old Farmer' konstatēta visplastiskākā konsistence, kura no maksimālās vērtības atšķiras par 45 %.

Salīdzinot Holandes un Krievijas sieru mikrofloru, redzams, ka netipisko pienskābes baktēriju sugas atšķiras ne tikai vienas šķirnes sierā, bet arī dažādu ražotāju siera paraugos. Atšķirības analizēto sieru mikroflorā ir jāsasaista ar tehnoloģisko parametru niansēm, siera pH, lietotā ierauga veidu u.c. faktoriem. Literatūras un eksperimentālo datu apkopojums apstiprina, ka no komerciālajiem Krievijas un Holandes sieriem izolētās netipiskās pienskābes baktēriju sugas un to asociācijas, uzskatāmas par tradicionālāko visbiežāk izolēto netipisko siera mikrofloru.

Analizējot aromātveidojošo vielu koncentrācijas komerciālajos Krievijas un Holandes sieros, atšķirības vērojamas gan starp abu šķirņu sieriem, gan starp divu dažādu ražotāju vienas šķirnes paraugiem. Tas tikai norāda uz bioķīmisko procesu norises atšķirībām, ko ietekmē arī mikrofloras kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs. Tā rezultātā ievērojami atšķiras komerciālo sieru sensorie rādītāji.

4. *Lactobacillus* spp. eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieru paraugos

Siera nogatavināšanas sākumā strauji samazinās ierauga pienskābes baktēriju koncentrācija, atbrīvojot ceļu netipisko pienskābes baktēriju vairošanai.

Ierauga mikrofloras dzīvotspēju sierā nosaka laktozes saturs. Līdz ar tās pārraudzēšanu, samazinās ierauga *Lactococcus* spp. un *Leuconostoc* spp. augšana, paātrinās šūnu atmiršana. Sierā mikroflorā dominējošās kļūst netipiskās pienskābes

baktērijas, kuru kvantitāte, augšanas ātrums un sugu daudzveidība ir atkarīga no piena mikrofloras, tehnoloģiskā procesa režīmiem un siera nogatavināšanas apstākļiem.

5. un 6. tabulās ir apkopotas no Krievijas sieriem izolētās pienskābes baktēriju sugas un parādīta sugu mainība gan temperatūras, gan nogatavināšanas ilguma ietekmē.

5. tabula / Table 5

Ekspperimentālo Krievijas sieru mikroflora, nogatavinot 6 °C temperatūrā
The microflora of experimental Krievijas cheeses ripened at 6 °C

Nogatavināšanas ilgums, dienas / Ripening time, days	Krievijas siers I / Krievijas cheese I	Krievijas siers II / Krievijas cheese II	Krievijas siers III / Krievijas cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>L.curvatus</i>	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L.curvatus</i>	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> 3
15 dienas / 15 days	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L.curvatus</i>		
30 dienas / 30 days	<i>L.curvatus</i>	<i>L.curvatus</i>	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L.acidophilus</i> 3
45 dienas / 45 days		<i>L.helveticus</i>	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
60 dienas / 60 days		<i>L.paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8133	<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>L.acidophilus</i> 3

Nenogatavinātā un 15 dienas nogatavinātā Krievijas sierā I tika konstatēts ierauga *Lc.lactis* subsp.*lactis* 2 pārstāvis, pārējā nogatavināšanas laikā 6 °C dominēja *L.curvatus*.

Nogatavināšanas sākumā Krievijas sierā II konstatēta ierauga mikrofloras: *Lc.lactis* subsp.*lactis* 2, *Lc.lactis* subsp.*lactis* 1 klātbūtne un vērojama *L.curvatus* prevalēšana līdz 30. nogatavināšanas dienai 6 °C temperatūrā. No 6 °C temperatūrā 45 dienas nogatavināta parauga izolēta *L.helveticus*. Williams un Banks (1997) ziņo par *L.helveticus* izolēšanu no 6 – 9 mēnešus nogatavināta Čederas siera, pieskaitot šo sugu netipiskajām pienskābes baktērijām. Citi pētījumi liecina, ka puscietajiem sieriem *L.helveticus* lieto proteolīzes veicināšanai un sensoro īpašību uzlabošanai, tātad arī nogatavināšanas paātrināšanai (Beresford et al., 2001; Drake et al., 1997).

6. tabula / Table 6

Ekspperimentālo Krievijas sieru mikroflora, nogatavinot 12 °C temperatūrā
The microflora of experimental Krievijas cheeses ripened at 12 °C

Nogatavināšanas ilgums, dienas / Ripening time, days	Krievijas siers I / Krievijas cheese I	Krievijas siers II / Krievijas cheese II	Krievijas siers III / Krievijas cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1 <i>L.curvatus</i>	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L.curvatus</i>	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> 3
15 dienas / 15 days	<i>L.curvatus</i>	<i>L.plantarum</i> 1	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.brevis</i>

6. tabulas nobeigums / The end of Table 6

Nogatavināšanas ilgums, dienas / Ripening time, days	Krievijas siers I / Krievijas cheese I	Krievijas siers II / Krievijas cheese II	Krievijas siers III / Krievijas cheese III
30 dienas / 30 days	<i>L.curvatus</i>	<i>L.plantarum</i> 1	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.curvatus</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
45 dienas / 45 days		<i>L.plantarum</i> S4	<i>L.curvatus</i> , <i>Leu.lactis</i>
60 dienas / 60 days		<i>L.paracasei</i> MH55, <i>L.plantarum</i> DSPV 354T	

Nogatavinot Krievijas sieru II 12 °C temperatūrā, visu nogatavināšanas laiku tajā konstatēts *L.plantarum* 1.

Nogatavinot Krievijas sieru III 12 °C temperatūrā, *Leu.lactis* saglabā dzīvotspēju visu paraugu nogatavināšanas laiku. *Leuconostoc* ģints sugas pieder pie heterofermentatīvām pienskābes baktērijām, kuras nelielās koncentrācijās lēni producē pienskābi. Vairāki autori uzskata, ka *Leuconostoc* spp. neatbilst tipiskām ierauga pārstāvēm sieros un ir piederīgas netipiskajām pienskābes baktērijām (Thunell, 1995). Krievijas sierā III, kurā tika konstatēta *Leu.lactis* dominēšana visā nogatavināšanas laikā, atšķirās arī koloniju veidojošo vienību skaita dinamika (4. att.). Var secināt, ka *Leuconostoc* spp. izdzīvošana un augšanas intensitāte sieros ir atkarīga no sugas un celma īpašībām. Savukārt nogatavināšanas sākumā izolētos *L.acidophilus* 3, *L.brevis* un *L.delbrueckii* subsp.*delbrueckii* nomaina *L.curvatus*. Atšķirīga situācija vērojama Krievijas sierā III, paraugus nogatavinot 6 °C. *Leu.lactis*, kuru identificē sierā nogatavināšanās sākumā, pamazām izkonkurē *L.acidophilus* 3 un *L.delbrueckii* subsp.*lactis* 1. Sugu daudzveidību šajā sierā var skaidrot ar ierauga sastāvu un īpašībām. Ierauga baktēriju paātrinātas atmiršanas rezultātā, arī augstākā sākotnējā siera pH (6.att.), produktā iekļuvušās netipiskās pienskābes baktērijas vairojas nepiespiesti (4.att.) un tajā novēro dažādu *Lactobacillus* ģints sugu dominēšanu noteiktā nogatavināšanas posmā.

Veicot biežāk identificēto *L.plantarum* 1 un *L.curvatus* DNS fragmenta sekvenēšanu, noskaidrots, ka *L.curvatus* nukleotīdu sekvenca 6 °C 60 dienas nogatavinātam sieram atbilst *L.paracasei* subsp.*paracasei* celmam JCM 8133, bet 12 °C 60 dienas nogatavinātam sieram – *L.paracasei* celmam MH55. Savukārt no 12 °C 45 un 60 dienas nogatavinātiem siera paraugiem izolētais *L.plantarum* 1 atbilst, attiecīgi, *L.plantarum* celmiem S4 un DSPV 354T. API 50 CHL sistēma, kas lietota Gram⁺ *Lactobacillus* identificēšanai fenotipiski, parādīja apmierinošus rezultātus, nosakot mikroorganismu ģinti. Pēc Tynkkynen (1999) un viņa līdzautoru vārdiem, tās precizitāte ir ievērojami vājāka, identificējot mikroorganismus līdz sugai. To var skaidrot ar faktu, ka pirmssākumos sistēma bija domāta *Lactobacillus* ģints identificēšanai medicīnas vajadzībām (Coeuret et al., 2003), kā papildus sistēma netipiskajiem fermentācijas modeļiem (Arhné et al., 1989; Chamba, 2000; Coeuret et

al., 2003). *Muyanja* (2003), *Temmerman* (2004) un līdzautori secināja, ka fenotipiskās metodes ir ierobežotas reproducējamības ziņā, ar zemu taksonomisko izšķirtspēju, un itin bieži ļauj veikt identifikāciju tikai ģints līmenī.

Eksperimentālajos Holandes sieros identificētās pienskābes baktērijas apkopotas 7. un 8.tabulā.

Nogatavinātā Holandes sierā I un II ir konstatēta ierauga mikrofloras klātbūtne. Holandes sierā I, sākot ar 15. nogatavināšanas dienu un līdz nogatavināšanas beigām, dominēja *L. paracasei* subsp.*paracasei*. No 6 °C temperatūrā nogatavinātā parauga tika izolēts arī *L.curvatus* un no 12 °C nogatavinātā parauga - *L.rhamnosus*.

Holandes sierā II vērojama *L. paracasei* subsp.*paracasei* dominēšana līdz 45. dienai, nogatavinot 6 °C temperatūrā, un *L.plantarum* 1 prevalēšana no 30. līdz 60. nogatavināšanas dienai 12 °C temperatūrā.

7. tabula / Table 7

Eksperimentālo Holandes sieru mikroflora, nogatavinot 6 °C temperatūrā
The microflora of experimental Holandes cheeses ripened at 6 °C

Nogatavināšanas ilgums, dienas / Ripening time, days	Holandes siers I / Holandes cheese I	Holandes siers II / Holandes cheese II	Holandes siers III / Holandes cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1
15 dienas / 15 days	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1		<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L.curvatus</i>
30 dienas / 30 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2, <i>L.curvatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3	<i>L.curvatus</i>
45 dienas / 45 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.curvatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 3, <i>L.curvatus</i>	<i>L.plantarum</i> 1
60 dienas / 60 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2	<i>L.curvatus</i>	<i>L.curvatus</i>

Holandes siera III mikroflorā vērojama *L.curvatus* prevalēšana, nogatavinot paraugus 6 °C temperatūrā. Šī netipiskās mikrofloras pārstāve nav konstatēta nenogatavinātā un 45 dienas nogatavinātā paraugā, no kura izolēta tikai *L.plantarum* 1. Nogatavinot sierus 12 °C temperatūrā, nogatavināšanas beigās tika izolēta *L.plantarum* 1, bet nogatavināšanas vidū konstatēta ierauga mikroflora un *L.paracasei* subsp.*paracasei* 1.

Eksperimentālo Holandes sieru mikroflora, nogatavinot 12 °C temperatūrā
The microflora of experimental Holandes cheeses ripened at 12 °C

Nogatavināšanas ilgums, dienas / Ripening time, days	Holandes siers I / Holandes cheese I	Holandes siers II / Holandes cheese II	Holandes siers III / Holandes cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2	<i>Leu.lactis</i> , <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 1
15 dienas / 15 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2, <i>L.rhamnosus</i>	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1, <i>Lc.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 2, <i>L.curvatus</i>
30 dienas / 30 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 2	<i>L.plantarum</i> 1	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1
45 dienas / 45 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1		<i>L.plantarum</i> 1
60 dienas / 60 days	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 1, <i>L.rhamnosus</i>		

Holandes siera III mikroflorā vērojama *L.curvatus* prevalēšana, nogatavinot paraugus 6 °C temperatūrā. Šī netipiskās mikrofloras pārstāve nav konstatēta nenogatavinātā un 45 dienas nogatavinātā paraugā, no kura izolēta tikai *L.plantarum* 1. Nogatavinot sierus 12 °C temperatūrā, nogatavināšanas beigās tika izolēta *L.plantarum* 1, bet nogatavināšanas vidū konstatēta ierauga mikroflora un *L.paracasei* subsp.*paracasei* 1.

Pēc Copolla u.c. (1997) un Fitzsimons (1999) datiem, no sieriem visbiežāk izolē *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* un *L.curvatus*. Analizējot iegūtos rezultātus, nonākam pie līdzīgām atziņām, izolēto netipisko pienskābes baktēriju pārstāvji eksperimentālajos sieraos ir *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* un *L.curvatus*. Dažādi autori cenšas atšķirīgi skaidrot netipisko pienskābes baktēriju vairošanai pieejamos un izmantojamos substrātus (Diggin et al., 1999; Williams, Banks, 1997; Fox et al., 1998; Williams et al., 2000; Thomas, 1987; Rapposch et al., 1999; Lane et al., 1997; Cogan, Beresford, 2002). Substrātu daudzveidība mainās nogatavināšanas laikā, ar to varētu skaidrot arī mezofilo pienskābes baktēriju vairošanās ātrumu un populācijas heterogenitāti.

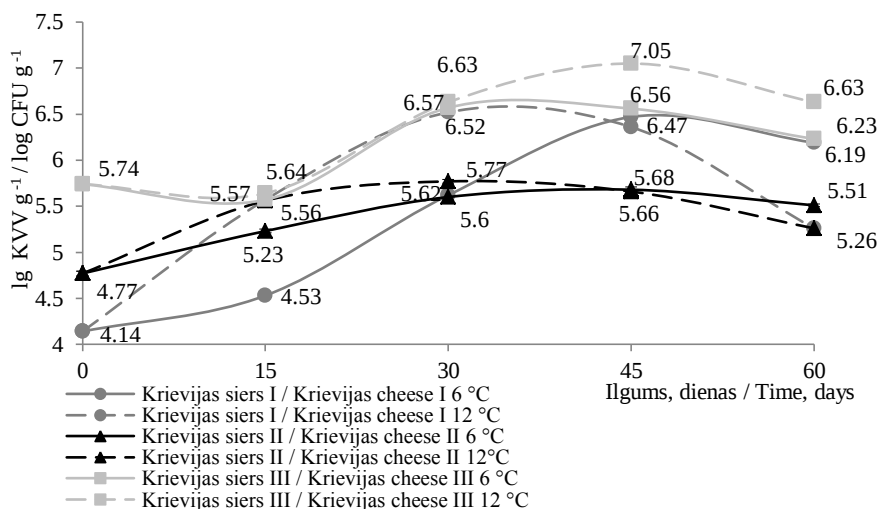
Saskaņā ar Fitzsimons u.c. (2001) un Williams u.c. (2002) konstatēto, dominējošās netipisko pienskābes baktēriju sugas parasti mainās nogatavināšanas laikā un nogatavināšanas beigās ir pārstāvētas ar vienu *Lactobacillus* sugu. Pēc šo autoru domām jaunos sieraos dominē *L.paracasei*, *L.plantarum* un *L.brevis*, bet nogatavinātos *L.paracasei*. Analizējot Čederas sieru (Īrija), pirmajās nedēļās konstatēta *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* un dažu neidentificētu pārstāvju klātbūtne, bet beigās tikai *L.paracasei* (Fitzsimons et al., 2001). Pie līdzīgām atziņām

nonākam, analizējot 12. un 13. tabulu datus, tomēr 10. un 11. tabulās atspoguļotais ļauj apgalvot, ka sugu dominēšana ir atkarīga no sieru šķirnes, nogatavināšanas ilguma un citiem faktoriem.

Mikrofloras daudzveidība un vairošanās intensitāte eksperimentālajos sieros ir atkarīga no ūdens aktivitātes, sāls satura, pH, temperatūras, oksidēšanās-reducēšanas potenciāla un nitrātu/nitrītu satura. Līdz ar to nākamajā nodaļā vērtēta netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dinamika iepriekšminēto faktoru ietekmē.

5. Netipisko pienskābes baktēriju skaita dinamika eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros nogatavināšanas laikā

Sugu mainību un mikrofloras kvantitāti raksturo netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits eksperimentālajos Krievijas (4.att.) un Holandes sieros (5.att.).



4.att. Netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dinamika eksperimentālajos Krievijas sieros nogatavināšanas laikā

Fig.4. The dynamics of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in experimental Krievijas cheeses during ripening

Lielākais koloniju veidojošo vienību skaits noteikts Krievijas sierā III, bet mazākais Krievijas sierā I. To var skaidrot ar siera ražošanas īpatnībām - dažādu ieraugu lietošanu, piena sastāvu un kvalitāti. Netipisko pienskābes baktēriju skaita pieaugums jau nogatavināšanas sākumā vērojams Krievijas sierā I un II, pie tam 12 °C temperatūrā mikroorganismu augšanas tempi ir straujāki nekā 6 °C temperatūrā.

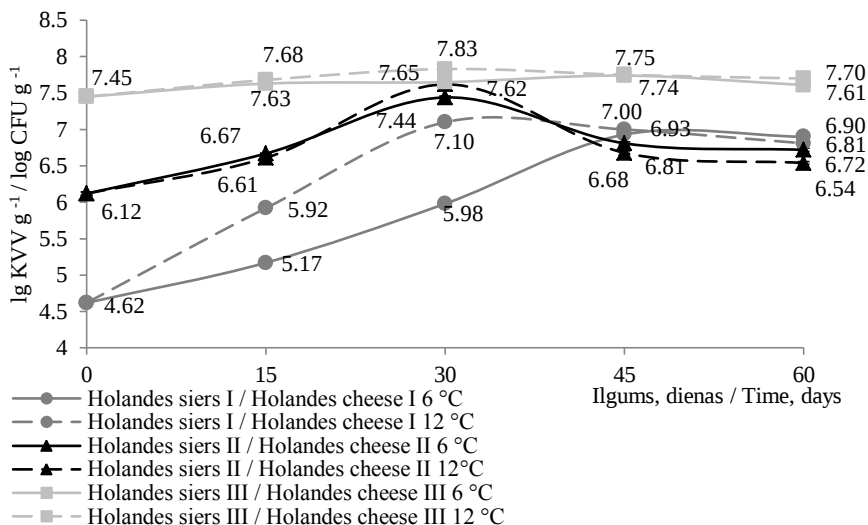
Straujāki augšanas tempi skaidrojami gan ar mezofīlo baktēriju darbības optimumam tuvāku temperatūru, gan ar barības vielu pietiekamību. Krievijas sierā III šajā laikā vērojams neliels koloniju veidojošo vienību kritums. To var skaidrot ar izvēlētajā ierauga sastāvu, kombinējot kultūras ar lielāku proteolītisko un lipolītisko aktivitāti, arī straujāku ierauga baktēriju atmiršanu utilizētās laktozes dēļ.

Netipisko pienskābes baktēriju skaita samazinājums augstākā temperatūrā nogatavinātiem Krievijas siera I un II paraugiem vērojams ap 30. nogatavināšanas dienu, tajā pat laikā 6 °C temperatūrā nogatavinātiem paraugiem koloniju veidojošo vienību skaits pakāpeniski pieaug un maksimumu sasniedz tikai ap 45. dienu. Savukārt 6 °C nogatavinātā Krievijas sierā III, netipiskās pienskābes baktērijas maksimālo koncentrāciju sasniedz pēc 30 dienām un 12 °C temperatūrā pēc 45 dienām. To iespējams skaidrot ar intensīvākām proteolīzes reakcijām augstākā temperatūrā, ko sekmē no ierauga baktērijām atbrīvojušās proteināzes un peptidāzes, kā arī peptīdu un brīvo aminoskābju pieejamību netipisko pienskābes baktēriju vairošanai. Maksimālais koloniju veidojošo vienību skaits svārstās no 5,77 lg KVV g⁻¹ Krievijas sierā II līdz 6,63 lg KVV g⁻¹ Krievijas sierā III, nogatavinot 6 °C temperatūrā, un no 5,77 lg KVV g⁻¹ Krievijas sierā II līdz 7,05 lg KVV g⁻¹ Krievijas sierā III, nogatavinot 12 °C temperatūrā. Krievijas sierā III, kurā tika konstatēta *Leu.lactis* dominēšana nogatavināšanas laikā (6. tab.), atšķīrās arī koloniju veidojošo vienību skaita dinamika. Līdz ar to varam secināt, ka netipisko pienskābes baktēriju izdzīvošana un augšanas intensitāte ir atkarīga no sugas un celma īpašībām, nogatavināšanas temperatūras.

Analizējot Holandes sierus, vērojama līdzīga situācija. *Lactobacillus* spp. maksimālo koncentrāciju Holandes sierā I un III sasniedza ap 30. dienu 12 °C un ap 45. dienu, nogatavinot 6 °C.

Apkopojot literatūras datus par temperatūras ietekmi uz netipisko pienskābes baktēriju vairošanos, ir atrastas vairākas atziņas. *Shakel-Ur-Rehman* (2000) ar līdzautoriem ziņo, ka sierā, kurš nogatavināts 1 °C temperatūrā, netipisko pienskābes baktēriju populācija ir par 3 lg mazāka nekā 8 °C nogatavinātā. Pie līdzīga viedokļa pieturās arī citi autori, kuri uzskata, ka nogatavināšanas temperatūra būtiski ietekmē netipisko pienskābes baktēriju augšanu sierā (Folkertsma et al., 1996; Fenelon et al., 1999).

Nogatavināšanas temperatūra būtiski neietekmē netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita izmaiņas Holandes sierā II un abos temperatūras režīmos nogatavinātie paraugi maksimālo vērtību sasniedz ap 30. nogatavināšanas dienu.



5.att. Netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dinamika eksperimentālajos Holandes sieros nogatavināšanas laikā

Fig.5. The dynamics of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in experimental Holandes cheeses during ripening

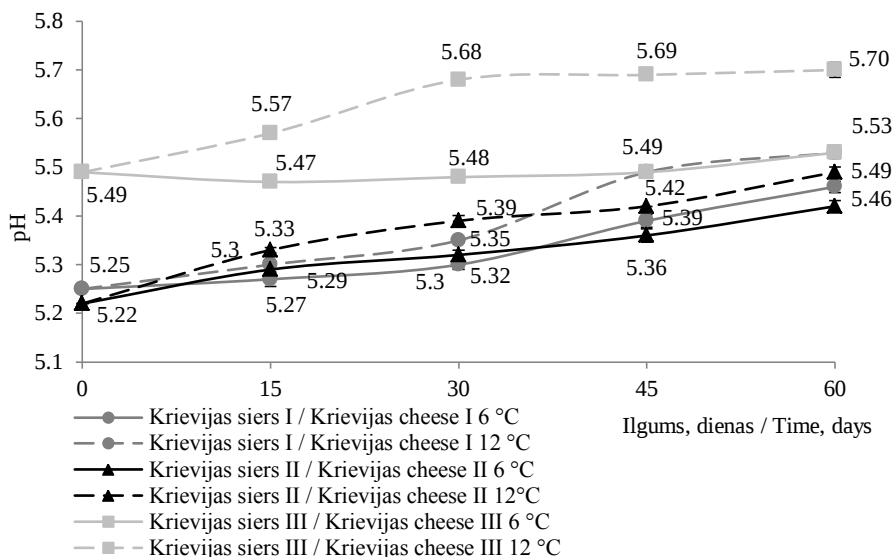
Netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dinamika sieros ir mainīga, maksimumu sasniedzot ap 30. vai ap 45. nogatavināšanas dienu, nogatavinot sieros, attiecīgi, 12 un 6 °C. Nogatavināšanas beigās Holandes sieros netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits svārstās no 6,54 līdz 7,70 lg KVV g⁻¹ un Krievijas sieros no 5,26 līdz 6,63 lg KVV g⁻¹. Netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita izmaiņas paraugos parāda, ka to pieaugums ir atkarīgs no nogatavināšanas temperatūras, ierauga sastāva un tā īpatnībām, barības vielu pieejamības u.c. faktoriem.

6. pH dinamika eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru nogatavināšanas laikā

pH ir viens no svarīgākajiem faktoriem siera nogatavināšanas laikā, sekmējot fermentu darbību un regulējot mikroorganismu augšanu (Kinstedt, 2005; Lawlor et al., 2001).

Ievērtējot Krievijas siera ražošanas tehnoloģiskās nianšes, sieram pēc presēšanas pH sasniedz 5,2 – 5,3. Straujāku ierauga pienskābes baktēriju vairošanos sierā novēro ilgstoši presējot un izturot produktu pirms sālīšanas pienskābās rūgšanas procesa intensifikācijai. Šajā procesā tiek pārraudzēta lielākā daļa laktozes, radot Krievijas sieram raksturīgo skābumu pH 5,22 – 5,25 robežās. Pēc dažādu speciālistu domām

pH Krievijas siera nogatavināšanas sākumā ir ap 5,28 (Белова и др., 1984), kas sakrīt ar eksperimentālo Krievijas sieru I un II rezultātiem, attiecīgi, pH 5,25 un 5,22 (6. att.).



6.att. pH dinamika eksperimentālajos Krievijas siera nogatavināšanas laikā
Fig.6. The dynamics of pH in experimental Krievijas cheeses during ripening

Kā jau iepriekš minēts, galvenā loma Krievijas siera nogatavināšanā ir pienskābes baktērijām un to producētajiem fermentiem. Белова u.c. (1984) min, ka maksimālo koncentrāciju ierauga pienskābes baktērijas sasniedz 5. nogatavināšanas dienā, tālāk novērojot pakāpenisku to satura samazināšanos. Pamatojoties uz minēto atziņu, pH pieaugumu Krievijas siera sākotnējā nogatavināšanas laikā līdz 15. dienai jāskaidro gan ar pienskābās rūgšanas turpināšanos, gan ar pienskābes izmantošanu tālākās pārvērtībās. Nogatavinot sieru 6 °C temperatūrā, pH dinamika notiek lēnāk nekā 12 °C.

Dispersijas analīze parādīja, ka pastāv būtiskas atšķirības starp eksperimentālajiem Krievijas siera nogatavinātiem 6 un 12 °C temperatūrā. Analizējot pH izmaiņas nogatavināšanas laikā, jāuzsver, ka, līdzās ierauga mikroflorai, Krievijas siera nogatavināšanā darbojas arī *L.curvatus*, *L.plantarum*, *L.paracasei* un *Leu.lactis* (5. un 6. tab.).

Vairāki autori norāda sierā palikušās laktozes hidrolīzes laiku piecas dienas (Rotaru et al., 2008), pretēji siera tehnoloģijas grāmatās (Eck, 1996; Ozola, 1997; Белова и др., 1984; Диланян, 1973) minētajām līdz 15 dienām.

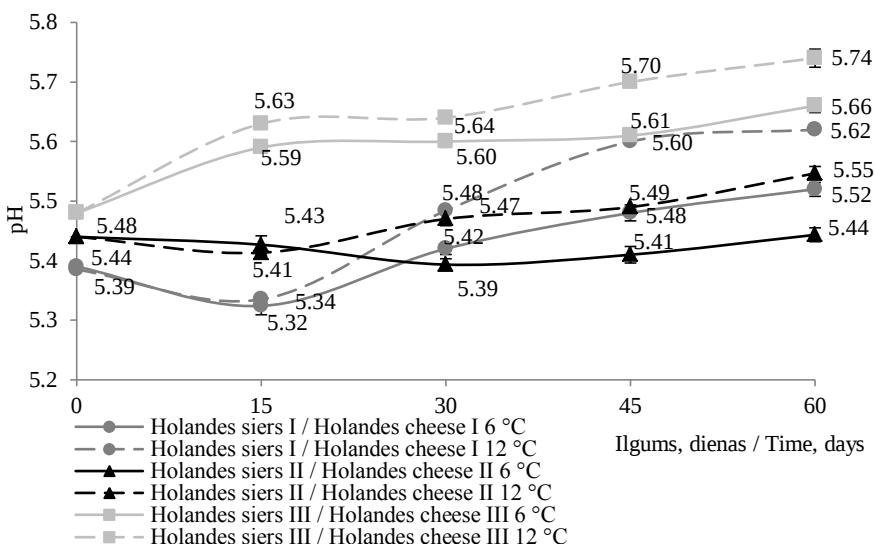
Galvenais laktozes pārvērtību produkts ir pienskābe, kuras koncentrācija ir atkarīga no vairākiem faktoriem, t.sk. pienskābes baktēriju ierauga sastāva. Homofermentatīvās pienskābes baktērijas pilnībā pārvērš piena cukuru pienskābē, *Leuconostoc* spp. un aromātveidojošās *Lactococcus* spp. līdzās pienskābei rada arī

spirtus, organiskās skābes, ogļskābo gāzi, acetoīnu un diacetilu. Pienskābās rūgšanas procesu, t.sk. pH dinamiku, sierā nosaka pienskābes baktēriju sugu attiecības ieraugā, to funkcionālās īpašības un siera ražošanas procesā iekļuvusī mikroflora.

Eksperimentālo sieru pH nogatavināšanas beigās svārstās robežās no 5,42 līdz 5,7, tas atšķiras no dažādās sieru tehnoloģiskajās instrukcijās minētā, Krievijas sieram sasniedzamā, pH 5,25 – 5,35.

Būtiski atšķiras pH dinamika Krievijas sierā ar paātrināto nogatavināšanu. pH izmaiņas tajos ir līdzīgas Holandes sierā notiekošajām (7. att.). Tas skaidrojams ar paātrinātu proteolīzi un sārmaino proteolīzes produktu veidošanos un rezultējas straujākā pH dinamikā no 5,49 līdz 5,70 Krievijas sierā un no 5,48 līdz 5,74 Holandes sierā.

Vērojot pH izmaiņas Holandes sieros I un II, var secināt, ka pirmajās 15 nogatavināšanas dienās pH samazinās neatkarīgi no izvēlētās nogatavināšanas temperatūras. Dažādos avotos norādītais Holandes sieru pH pēc 3 dienu nogatavināšanas sasniedz 5,2 – 5,25. Šajā pētījumā eksperimentālo sieru sākotnējais pH nebija zemāks kā 5,39. Atšķirības skaidrojamas gan ar tehnoloģiskā procesa niansēm, gan lietoto ieraugu veidu (šķidrāis vai liofilizētais) un piena kvalitāti. Bez tam, jāmin ievērojami atšķirīgais laktozes saturs pienā – 5,3 %, salīdzinot ar literatūrā doto informāciju (4,7 %) (Горбарова, 1984), un augstais laktozes saturs sūkalās – 5 % (prakses dati).



7.att. pH dinamika eksperimentālajos Holandes sieros nogatavināšanas laikā
Fig.7. The dynamics of pH of experimental Holandes cheeses during ripening

Atšķirības vērojamas arī pH dinamikā, mainot ierauga sastāvu, Holandes sieriem.

Lai pārliecinātos par pH ietekmi gan uz siera elastību, gan ūdens aktivitāti, veikta minēto rādītāju korelācijas analīze. Iegūtie rezultāti rāda, ka pastāv cieša negatīva lineāra sakarība starp pētāmajiem lielumiem, t.i. pieaugot pH, siera konsistence kļūst plastiskāka. Tas apstiprina vairāku autoru teikto (Fox et al., 2000; Folkertsma et al., 1996; Aston et al., 1985), ka nogatavināšanas laikā, pieaugot ūdenī šķīstošo slāpekļa savienojumu daudzumam un pienskābes izmantošanas pakāpei, notiek pH palielināšanās un a_w samazināšanās. a_w eksperimentālajos Krievijas sieros nogatavināšanas laikā mainās no 0,994 līdz 0,960, bet Holandes sieros no 0,995 līdz 0,971. Marcos un Esteban (1982) atzīmē, ka tikko pagatavotā sierā ūdens aktivitāte ir robežās 0,985-0,997, bet nogatavināšanas laikā ir vērojams tās pakāpenisks samazinājums līdz 0,940-0,980. Saskaņā ar Beresford u.c. (2001) pētījumu atziņām, ūdens aktivitātes samazinājumu nogatavināšanas laikā var skaidrot ar ūdens iztvaikošanu, ūdens patērēšanu hidrolīzes reakcijās, kā arī tauku un olbaltumvielu hidrolīzes laikā radušos mazmolekulāro savienojumu akumulāciju. Šie savienojumi veicina arī pH kāpumu un elastīgākas siera konsistences iegūšanu.

7. Identificētās aromātveidojošās vielas eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru nogatavināšanas laikā

Katrā analizētajā paraugā konstatētas - etiķskābe, sviestskābe, heksānskābe, oktānskābe, kā arī atsevišķos sieros - propionskābe, nonānskābe, dekānskābe, dodekānskābe un oktadekānskābe. Krievijas sierā II, neatkarīgi no nogatavināšanas apstākļiem, noteikta oktadekānskābe. Propionskābe konstatēta tikai Holandes sierā II, kā arī būtiskas atšķirības sviestskābes un heksānskābes koncentrācijās konstatētas tikai Holandes sierā II, nogatavinot 12 °C. Tieši īso un vidējo ķēžu taukskābes ir svarīgas siera garšas un smaržas veidošanā. Tās var veidoties lipolīzes rezultātā, aminoskābju pārvērtībās, laktozes hidrolīzē vai no aldehīdiem un ketoniem.

Eksperimentālajos sieros identificēti arī spirti, kuri produktam piešķir, atkarībā no koncentrācijas un veida, saldas, alkohola vai rūgtenas notis, dažreiz to klātbūtne sierā rada garšas nesabalansētību.

Butān-2-ols ir uztverts Krievijas siera I paraugos, kuri nogatavināti 12 °C. Daži autori norāda uz netipisko pienskābes baktēriju lomu butān-2-ona un butān-2-ola veidošanā (Hannon et al., 2006). 3-metilbutān-1-ols tika identificēts Krievijas sieros, kā arī 12 °C nogatavinātā Holandes sierā III. 2-metilpentān-3-ols noteikts tikai Krievijas sierā I. Savukārt pentān-1-ola klātbūtne konstatēta Krievijas sierā I, kā arī 6 °C temperatūrā nogatavinātā Holandes sierā III.

Paraugos noteikti gan lineārās, gan sazarotās ķēdes aldehīdi. Lineārās ķēdes aldehīdi var veidoties no nepiesātinātām taukskābēm β -oksīdēšanās laikā, kā arī no aminoskābēm *Strecker* degradācijas ceļā. Sazarotās ķēdes aldehīdi ir atvasināti no izoleicīna un leicīna (McSweeney et al., 2000; Yvon et al., 2000). Atkarībā no koncentrācijas, aldehīdi piedod sieram saldu vai zaļas zāles garšu (Curioni, Bosset, 2002).

Nonanāls noteikts gan Holandes I un II, gan Krievijas I un II sieros. Šis aldehīds konstatēts arī Holandes sierā III, nogatavinot 6 °C. Heksanāla klātbūtne noteikta Krievijas sieros I un III, kā arī 6 °C temperatūrā nogatavinātā Holandes sierā II, bet oktadekānāla - Holandes sierā III.

3-metilbutanāls ir identificēts 12 °C nogatavinātos Holandes sieros II un III, arī Krievijas sierā II neatkarīgi no nogatavināšanas temperatūras. 3-metilbutanāla un acetaldehīda klātbūtne vērojama Krievijas sierā I visā nogatavināšanas laikā.

No ketoniem visvairāk siera garšu un smaržu ietekmē pentān-2-ons, diacetils un heptān-2-ons (Carbonell et al., 2002). Butān-2-ons konstatēts Krievijas sieros I un III, kā arī Holandes sierā II. Savukārt diacetils un acetoīns ir identificēti Holandes un Krievijas siera paraugos neatkarīgi no nogatavināšanas temperatūras. Atšķirības heptān-2-ona koncentrācijā konstatētas Holandes sieros I un II, nogatavinot 12 °C. Propān-2-ona klātbūtne noteikta tikai Krievijas sierā I. 6 un 12 °C nogatavinātos Holandes siera III paraugos identificēti pentān-2-ons un nonān-2-ons. Pentān-2-ona klātbūtne Krievijas sierā I noteikta visu nogatavināšanas laiku, bet citos paraugos šī viela nav konstatēta. Nonān-2-ons identificēts Holandes I un II, arī Krievijas I sieros neatkarīgi no nogatavināšanas apstākļiem, bet Krievijas sierā III tikai 12 °C temperatūrā nogatavinātā paraugā. Undekān-2-ons un oktān-2-ons, attiecīgi, noteikti 6 un 12 °C nogatavinātā Holandes sierā III. Krievijas sierā I undekān-2-ons konstatēts visu nogatavināšanas laiku.

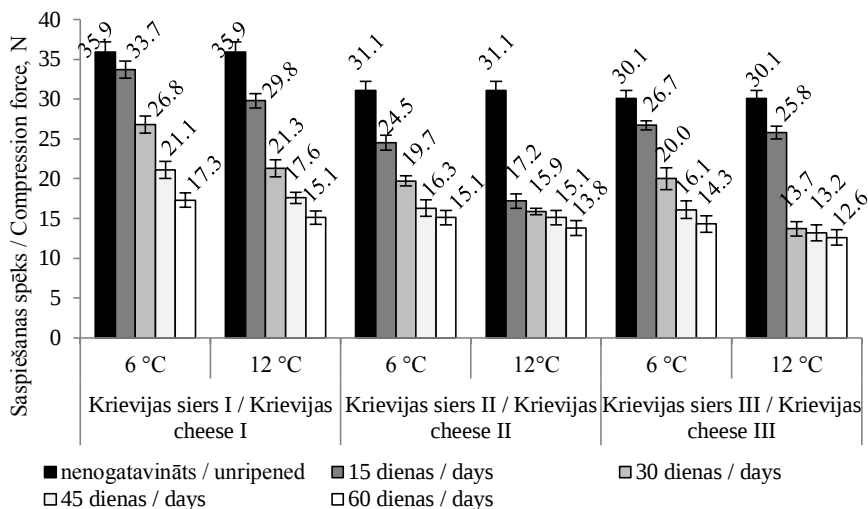
Analizētajos paraugos noteikti arī laktoni. δ -nonalaktona klātbūtne konstatēta Holandes sieros, bet δ -dodekalaktons un δ -dekalaktons Krievijas sierā I.

Saskaņā ar *Engels* (1997) un līdzautoru, kā arī *Neeter* un *De Jong* (1992) pētījumiem, Goudas sierā ir identificētas 13 aromātveidojošās vielas, kuras ir nozīmīgas siera sensoro īpašību veidošanā. Diacetils, sviestskābe, butanons, heksanāls un pentanāls, 3-metilbutanāls, 3-metilbutān-2-ons, metāntiols, dimetilsulfīds, 2-metilpropanols un dimetiltrisulfīds. Minētās vielas apzinātas arī eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros.

Kopumā 44 aromātveidojošās vielas ir noteiktas eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros. Aromātveidojošās vielas ir ogļhidrātu, tauku un olbaltumvielu metabolisma produkti, to izcelsme var tikt saistīta ar piena kvalitāti un sierā esošās mikrofloras darbību. Tātad lielāka loma atšķirīgās siera garšas un smaržas veidošanā ir jāuzņemas mikrofloras daudzveidībai un koncentrācijai tajos.

8. Elastības izmaiņas eksperimentālajos Krievijas un Holandes sieros nogatavināšanas laikā

Siera elastību ietekmē siera sastāvs, fizikāli-ķīmiskie rādītāji, bioķīmisko procesu norises ātrums un radušos savienojumu koncentrācija, to tālākās pārvērtības siera nogatavināšanā. Siera elastības raksturošanai mērīts siera saspiešanas spēks (8. un 9. att.).



**8.att. Elastības izmaiņas eksperimentālajos Krievijas sieros
nogatavināšanas laikā**
**Fig.8. The changes of elasticity in experimental Krievijas cheeses
during ripening**

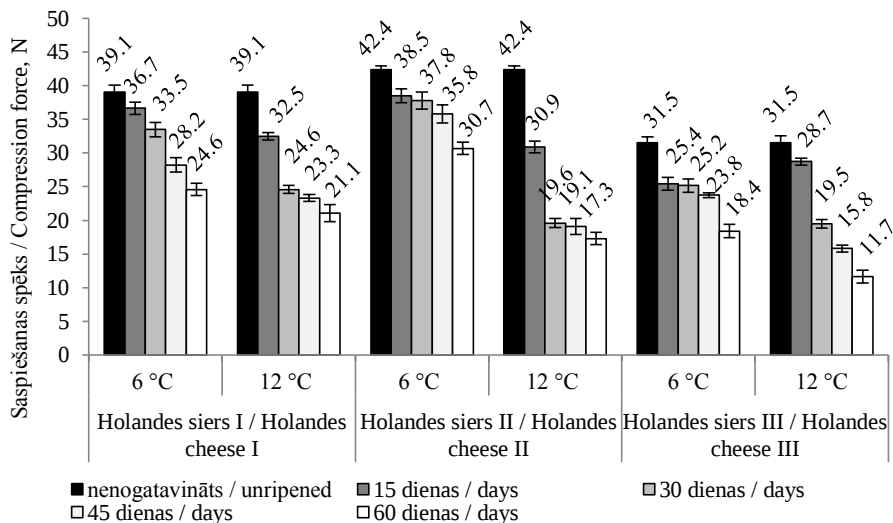
Siera struktūra pēc presēšanas ir viendabīga, tomēr masa ir rupja un cieta. Nogatavinot sieru, tā konsistence izmainās. Siera masas struktūrmehānisko īpašību izmaiņas perifērijā notiek intensīvāk nekā siera centrālajā daļā, masas noblīvēšanas un apžāvēšanas dēļ. Līdzās siera masas noblīvēšanai notiek olbaltumvielu hidrolīze. Lielākai daļai sieru α_{s1} kazeīns tiek hidrolizēts Phe₂₃ – Phe₂₄ peptīdsaitē ar sierā palikušā himozīna palīdzību agrīnajā nogatavināšanas laikā. α_{s1} kazeīna hidrolīzes produkts ir hidrofobs, tas veicina ūdens iztvaikošanu un siera cietības samazināšanos (Горбатова, 1984).

Krievijas sieru elastības dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka paraugu elastību būtiski ietekmē nogatavināšanas temperatūra ($p < 0,05$). Visos paraugos vērojams pakāpenisks elastības pieaugums. 12 °C nogatavinātajiem paraugiem elastības izmaiņas notiek straujāk. Piemēram, Aston u.c. (1985) un Folkertsma u.c. (1996) konstatēja, ka, paaugstinot nogatavināšanas temperatūru, paātrinās proteolīze un sierā vērojamas konsistences izmaiņas plastiskākas un maigākas struktūras virzienā ar straujāku garšas un smaržas veidošanos.

Nogatavināšanas beigās mīkstākā konsistence bija Krievijas sieram III. To iespējams skaidrot ar lietotā ierauga īpatnībām, proteolīzes un lipolīzes procesu straujāku norisi nogatavināšanas laikā. Līdzīga aina vērojama arī Holandes siera paraugiem (9.att.).

Holandes sieru elastība ir atkarīga no nogatavināšanas temperatūras ($p < 0,05$). Lēnāk elastības izmaiņas notiek paraugos zemākā nogatavināšanas temperatūrā.

Nogatavinot sieru zemāka temperatūrā, kavētu bioķīmisko procesu dēļ, sieram ir stingrāka un cietāka konsistence.



9.att. Elastības izmaiņas eksperimentālajos Holandes sieros nogatavināšanas laikā

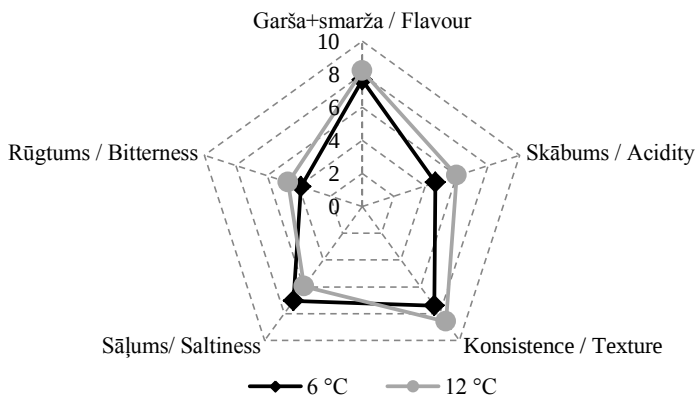
Fig.9. The changes of elasticity in Holandes cheese samples during ripening

Siera elastība ir atkarīga no κ -kazeīna ķīmiskā sastāva, īpaši kalcija satura tajā. Ja pH ir zemāks par 5,3, no kompleksa atšķēlās koloidālais kalcija fosfāts, ja pH ir virs 5,3, kalcijš saistās ar olbaltumvielām. Līdz ar pH izmaiņām siera nogatavināšanā un olbaltumvielu pārvērtībām no ūdenī nešķīstošām līdz šķīstošām, palielinās saistītā un samazinās brīvā ūdens saturs tajā. Pieaugot pH no 4,9 līdz 5,4, siera masa kļūst elastīgāka un plastiskāka.

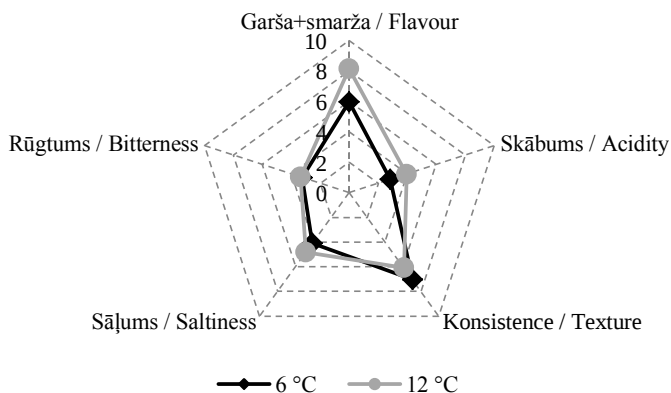
Lielākai daļai 12 °C nogatavinātu eksperimentālo Holandes un Krievijas siera paraugu, novērojams straujāks elastības pieaugums no 15. līdz 30. nogatavināšanas dienai. Analizējot pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dinamiku, tieši šajā laikā ir intensīva mikroorganismu vairošanās, tātad arī barības vielu patēriņš. Rezultātā veidojas tauku un olbaltumvielu metabolisma starpprodukti un galaprodukti, radot plastiskāku un elastīgāku siera konsistenci.

9. Eksperimentālo Krievijas un Holandes sieru sensoro īpašību novērtējums

Lai analizētu nogatavināšanas temperatūras ietekmi uz sensoro īpašību veidošanos Krievijas un Holandes sieros, veikta sensorā analīze 60 dienas nogatavinātajiem eksperimentālajiem Krievijas siera III un Holandes siera III paraugiem (10. un 11.att.).



10. att. Eksperimentālā Krievijas siera III sensoro īpašību staru diagramma
Fig.10. Star diagram of sensory properties of experimental Krievijas cheese III



11.att. Eksperimentālā Holandes siera III sensoro īpašību staru diagramma
Fig.11. Star diagram of sensory properties of experimental Holandes cheese III

Dispersijas analīzes rezultāti parādīja, ka Krievijas siera III paraugi atšķirās ar skābumu un konsistenci, 6 °C nogatavinātais paraugs bija cietāks un mazāk skābs. Savukārt Holandes sierā III atšķirība vērojama tikai garšā un smaržā. Vērtēšanā noskaidrots, ka 12 °C nogatavinātajam sieram garša un smarža ir izteiktāka.

Vērtētāji ir atzīmējuši izteiktāku Krievijas siera III skābumu, kas nogatavināts 12 °C. To var skaidrot ar mikrofloras ietekmi. *Leuconostoc* spp. būtiski atšķiras no citām netipiskajām pienskābes baktērijām. To primārā funkcija ir producēt acetātu, oglekļa

dioksīdu, diacetilu, acetoīnu un 2,3-butāndionu, kas rodas citrātu metabolismā (Waagner Nielsen, 2004). Producējot ogļskābo gāzi, *Leuconostoc* spp. ir atbildīgas par acojuma veidošanos Edamas, Goudas, arī Holandes sieros, kamēr diacetils un acetoīns veido biežpienam un mājas sieram raksturīgo smaržu. Smaržas nianses rezultējas arī analizēto paraugu garšā. Bez tam *Leuconostoc* spp. ir bagāti ar starpšūnu proteolītiskajiem fermentiem un esterāžu aktivitāti. Tas var skaidrot atšķirības Krievijas sierā III, nogatavinot 12 °C. *Leuconostoc* spp. var sekundāri ietekmēt siera kvalitāti, sekmējot proteolīzi un lipolīzi. Tomēr šai atziņai ir nepieciešami precizējumi, jo pētnieciskie darbi atbildes nesniedz.

12 °C nogatavinātā parauga izteiktāka, elastīgāka konsistence ir skaidrojama ar olbaltumvielu hidrolīzes pakāpi. Nogatavinot sierus augstākā temperatūrā, straujāk pieaug brīvo aminoskābju un amonjaka saturs, kā arī nogatavināšanas sākumā radusies pienskābe tiek racionāli izmantota tālākajos pārvērtību procesos. Notiekošās pārvērtības sekmē pH kāpumu, ietekmējot plastiskākas siera konsistences iegūšanu (Waagner Nielsen, 2004).

Izteiktāku garšu un smaržu Holandes sieram III var skaidrot ne tikai ar augstāku nogatavināšanas temperatūru, bet arī ar izmantoto ieraugu. Apstākļos, kad ir intensificēti visi šūnā notiekošie procesi, notiek ātrāka ierauga baktēriju šūnu atmiršana un atbrīvojas endogēnie fermenti, kuri piedalās proteolīzes un lipolīzes reakcijās. Rezultātā veidojas siera garšu un smaržu bagātinājošas aromātveidojošas vielas, kā arī tiek paātrināta siera nogatavināšana.

Mikrofloras kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs, to darbības rezultātā radušās vielas, veido sieriem noteiktas sensorās īpašības. Ar šo atziņu var skaidrot arī atšķirīgās sieru sensorās īpašības, vērtējot komerciālos un eksperimentālos Holandes un Krievijas sierus.

IETEIKUMI SIERA RAŽOTĀJIEM

Ņemot vērā tik pretrunīgo informāciju zinātniskajā literatūrā par netipisko pienskābes baktēriju ietekmi uz sieru aromāta veidošanu, ražotājiem ieteicami dažādi risinājumi siera kvalitātes nodrošināšanā:

- 1) *Lactobacillus* spp. augšanas inhibēšana, lietojot pārtikas piedevas, antimikrobiālas vielas vai aizsargkultūras;
- 2) attiecīgajai siera šķirnei noteiktās nogatavināšanas temperatūras uzturēšana;
- 3) specifisku mezofilo *Lactobacillus* ģints sugu / celmu kombinēšana ieraugos, nodrošinot tikai kontrolētu sugu / celmu dominēšanu netipisko pienskābes baktēriju mikroflorā sieru nogatavināšanas laikā;
- 4) netipisko pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita limitu noteikšana pienā un citi apstrādes procesi;
- 5) biofilmu klātbūtnes kontrole iekārtu virsmās.

Netipisko pienskābes baktēriju populāciju var kontrolēt, pievienojot konservantus, bez ievērojamas ietekmes uz ierauga pienskābes baktēriju darbību. Konservanti samazina mezofilo *Lactobacillus* spp. augšanas intensitāti, bet pilnībā neinhibē tos. Konservantu pievienošana neietekmē proteolīzi, sieros var novērot pat

augstāku aminoskābju koncentrāciju. Nav īsti izzināts, kas sekmē to pieaugumu. To skaidro ar konservantu izsauktu ierauga pārstāvju autolīzi un endofermentu atbrīvošanos.

Ierauga baktērijas ir spējīgas producēt bakteriocīnus. Tie inhibē mezofilās *Lactobacillus* spp. Saskaņā ar literatūras atziņām, ierauga sastāvā iekļaujot lakticīnu un citas bakteriocīnus producējošās pienskābes baktēriju sugas, netipiskās pienskābes baktērijas siera netiek konstatētas līdz pat 6. nogatavināšanas mēnesim.

Bez minēto bakteriocīnu pievienošanas var pieminēt aizsargkultūras, kuras atrod arvien plašāku pielietojumu siera ražošanā. Tās ne tikai nomāc patogēnu, arī raugu un pelējumu vairošanos produktos, bet ierobežo heterofermentatīvo pienskābes baktēriju augšanu.

Lai kontrolētu siera nogatavināšanas ātrumu un mezofilo pienskābes baktēriju augšanas dinamiku, vairāki zinātnieki ir piedāvājuši nogatavināšanas temperatūras samazināšanu. Samazinot nogatavināšanas temperatūru, tiek kavēta mezofilo pienskābes baktēriju augšana, tomēr siera no tām atbrīvot nav iespējams. Arī šajā pētījumā konstatēts, ka netipisko pienskābes baktēriju koncentrācija 6 un 12 °C temperatūrā nogatavinātos siera atšķīrās vismaz par vienu lg vērtību, augstāka koncentrācija konstatēta 12 °C nogatavinātos siera. Minētā atziņa ir jāņem vērā, jo nogatavināšanas temperatūra ir pakārtota bioķīmisko procesu norises ātrumam konkrētā siera ražošanā. Jebkura izmaiņa būtiski ietekmē kompleksos siera sensoros rādītājus. Ar šo atziņu var skaidrot atšķirīgos eksperimentālo Holandes un Krievijas siera sensoros rādītājus: garšu un smaržu, Krievijas siera arī konsistenci.

Mezofilo pienskābes baktēriju izolēšana no siera un to pievienošana pienam siera ražošanā, ir plaši pētīta un praktizēta pēdējos gados. Pētījumu atziņas ir ļoti dažādas, vieni autori uzrāda to pozitīvo efektu, citi ziņo par negatīvo ietekmi uz siera aromātu. Skaidrojumu tik atšķirīgām pētniecisko darbu atziņām jāmeklē atlasīto celmu aromāta potenciālā un pievienoto celmu augšanas iespējām siera. Jaunākie pētnieciskie rezultāti norāda uz pozitīvu efektu, pievienojot no siera izolēto pienskābes baktēriju sugu (*L.helveticus*, *L.plantarum*, *L.paracasei*) konkrētus celmus. Lai gan tas ir perspektīvākais virziens siera ražošanā, tomēr Latvijā vēl nepārbaudīts. Te ir nepieciešami pētījumi, ņemot vērā nianse salda siera ražošanā.

Turklāt netipisko pienskābes baktēriju darbības kavēšanai siera, t.sk. iespējamo defektu novēršanai, būtu ieteicams kontrolēt to īpatnību pienā, nosakot attiecīgos limitus vai praktizēt termizāciju, paredzot pienu pārstrādes uzņēmumā uzglabāt ilgāk nekā 12 h. Dažādās pasaules valstīs noteiktie kritiskie limiti mezofilajām netipiskajām pienskābes baktērijām 1ml pienā ir 10^2 KVV. Cenšoties izpildīt to kritēriju, rodas iespējas siera ražošanai novirzīt kvalitatīvu pienu, mazināt iespējamus siera defektus.

Netipiskās pienskābes baktērijas ir aktīvas biofilmu veidotājas. Īpaši jāatzīmē *L.curvatus* radītās biofilmas. Tās ir ļoti izturīgas iekārtu sanitārās apstrādes procesos. Arī analizētajos komerciālajos un eksperimentālajos Krievijas un Holandes siera konstatēto *L.curvatus* klātbūtni, pat dominēšanu visā siera nogatavināšanas laikā, var skaidrot ar biofilmu esamību siera ražošanas tehnoloģiskajās iekārtās. To novēršanai

ieteicama biežāka sanitārās apstrādes līdzekļu rotācija vai regulārāka biofilmu kontrole iekārtu virsmās.

Minētie pasākumi var palīdzēt celt Holandes un Krievijas sieru konkurētspēju un nodrošināt nemainīgu produkta kvalitāti.

SECINĀJUMI

1. Latvijas piena pārstrādes uzņēmumos ražotajos Holandes un Krievijas sieros konstatētas pastāvīgas fakultatīvi heterofermentatīvās *Lactobacillus* ģints sugas.
2. Izolēto netipisko pienskābes baktēriju sugu vidū **komerciālajos** Holandes sieros dominēja *L.paracasei* subsp. *paracasei* 1 un *L.paracasei* subsp.*paracasei* 2, bet Krievijas sieros – *L.curvatus* un *L.plantarum* 2. Analizētajos komerciālajos sieros biežāk konstatētas netipisko pienskābes baktēriju asociācijas nevis vienas sugas dominēšana.
3. Izolēto netipisko pienskābes baktēriju sugu vidū **eksperimentālajos** Holandes sieros dominēja *L.paracasei* subsp.*paracasei*, *L.plantarum*, *L.curvatus* un *L.rhamnosus*, bet Krievijas sieros – *L.curvatus*, *L.paracasei* subsp.*paracasei*, *L.plantarum* un *Leu.lactis*.
4. Identificētās *Lactobacillus* spp. un *Leu.lactis* labi adaptējas mainīgajos siera nogatavināšanas parametros, to populāciju un vairošanās ātrumu ietekmē siera esošo substrātu daudzveidība.
5. Eksperimentālajos sieros netipisko pienskābes baktēriju sugas variē nogatavināšanas laikā un procesa beigās ir pārstāvētas ar vienu *Lactobacillus* ģints sugu, biežāk *L.curvatus*, *L.paracasei* subsp.*paracasei* vai *L. plantarum*.
6. Izvēlētās nogatavināšanas temperatūras un ilgums ietekmē pienskābes baktēriju sugu daudzveidību eksperimentālajos Holandes un Krievijas sieros. Dažādos uzņēmumos ražotie vienas šķirnes sieri atšķiras ar *Lactobacillus* ģints pārstāvjiem un koloniju veidojošo vienību skaitu. Tas apstiprina darbā izvirzīto hipotēzi, ka ražošanas un nogatavināšanas apstākļi konkrētā uzņēmumā būtiski ietekmē mikrofloras daudzveidību sierā.
7. Noteikto aromātveidojošo vielu sastāvs neatšķiras eksperimentālajos vienas šķirnes sieros, bet to koncentrāciju nosaka ierauga veids, siera mikroflora, izvēlētās nogatavināšanas temperatūras un ilgums.
8. Netipiskās pienskābes baktērijas sierā rada lielāku butān-2-ola, butān-2-ona un metionāla koncentrāciju, to darbības rezultātā veidojas arī 3-metilbutanāls un dimetiltrisulfīds. Šo vielu koncentrācija sierā sekmē atšķirīgas garšas un aromāta īpašības.
9. Pētījumā konstatēta cieša korelācija starp pH, a_w un elastību eksperimentālajos Holandes un Krievijas sieros. Tā norāda uz bioķīmisko un mikrobiālo procesu norises intensitāti siera nogatavināšanā.
10. Netipisko pienskābes baktēriju darbību ieraugs ar lielāku proteolītisko un lipolītisko aktivitāti būtiski ietekmēt nevar, tomēr pH pieauguma dinamika, pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits un to vairošanās ātrums, arī

sugu daudzveidība Krievijas III un Holandes III sieros atšķiras no citiem eksperimentālajiem sieriem.

11. Iegūtie pētījuma rezultāti nedod pamatu netipisko pienskābes baktēriju klātbūtni sierā vērtēt negatīvi, to ietekme ir atkarīga no sugas un celma īpatnībām, koloniju veidojošo vienību skaita produktā.
12. *L.curvatus*, dominēšana siera nogatavināšanā, rada konkrētajai šķirnei neraksturīgu garšu un aromātu, aromātveidojošo vielu sastāva, satura un kombināciju dēļ. Biežāk to novēro 6 °C nogatavinātā sierā.
13. Ieteicamā Krievijas un Holandes sieru nogatavināšanas temperatūra 12 °C veicina *L.paracasei* un *L.plantarum* vairošanos, kuras uzlabo siera sensoros rādītājus. Atsevišķu šo sugu celmus varētu perspektīvi lietot sieru ražošanā, gan nogatavināšanas procesa paātrināšanai, gan sensoro īpašību pilnveidei.

TOPICALITY OF THE RESEARCH

Cheeses manufactured in Latvia should be characterized as a product of a changing quality. Quality of cheese is determined by several factors, in certain order being: quality of milk, production technology, cleanness of equipment and technological premises. Cheese is a product which obtains its properties during several weeks, months, even years, so within a certain period of time. During this time relevant defects will show up if any of the above mentioned factors are exceeded.

Basis of the cheese manufacturing – the raw milk – is a natural growth medium for microorganisms. Composition and quality of microflora are determined not only by hygiene observation in the places of milk production and processing, rapidity of milk cooling and temperature, but also by microflora in the air of dairy environment, on the surface of equipments and premises. An integral part of milk microflora is the non-starter lactic acid bacteria - *L.casei subsp. paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus*, *L.curvatus*, *L.brevis*, *L.fermentum*; *Leu.lactis*, *Leu.cremoris*; *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.durans* and *Pediococcus spp.*: *P.pentosaceus*, *P.acidilactici*.

Pasteurization regime selected in cheese manufacturing is able to destroy essential microflora, enzymes and pathogens in milk. It should be noted that inactivation level of microorganisms depends on the count of microorganisms, growth phase and other factors. Bactofugation, microfiltration, and application of food additives, cannot significantly decrease the proportion of *Lactobacillus spp.* and *Leuconostoc spp.* in milk. Defects caused by non-starter lactic acid bacteria are found in all dairy products, but the most problematic they are in cheeses.

Early blowing caused by non-starter lactic acid bacteria is often mixed up with coliform bacteria. Non-starter lactic acid bacteria, mostly heterofermentative, produce diacetyl and acetoin, and high amounts of carbon dioxide. Carbon dioxide forms many small holes in cheese, and sometimes a significant gas pressure results in a sponge-like cheese texture. Identical defect is caused by coliform bacteria. This defect occurs during the beginning of cheese ripening while there is lactose in it. Notwithstanding the both defects express equally, but the causative agents are different. Technological methods to fight coliform bacteria differ as well. If milk is produced according to hygienic requirements, food additives are not necessary for decreasing of activity of coliform bacteria. Over consumption of sodium nitrate is not beneficial for consumers. Cheesemakers are confused about the defect, its origin and possible solution. Moreover, the produced aroma compounds – diacetyl and acetoin can impart the product with uncharacteristic flavour similar to cottage cheese.

Alongside with the above mentioned defects, a bitter taste of cheeses is also detected. Such taste could be produced also by the non-starter lactic acid bacteria. Enzymes produced by *Lactobacillus spp.* are able to hydrolyze casein forming the bitter peptides, which influence flavour characteristics of cheese.

It should be mentioned that non-starter lactic acid bacteria after autolysis of starter bacteria become the dominating microflora. They have different functions in

cheese ripening, including formation of aroma, controlling of the growth of pathogens, hydrolysis of proteins, etc, some of them have even probiotic functions.

The non-starter lactic acid bacteria could not be evaluated unambiguously. Individual strains of species are used for acceleration of cheese ripening, stimulation of hydrolysis of proteins and enhancement of concentration of the free amino acids contributing to flavour and aroma of a well ripened cheese. It should be noted that the role of non-starter lactic acid bacteria in determination of the cheese quality is still unclear. The only way how to ensure quality of cheese by controlling the biochemical processes and analysing the diversity of microflora during the ripening, are corrections in the technological process.

The following **hypothesis** has been created: manufacturing and ripening conditions at the cheese plant have significant impact on the diversity of microflora and formation of the sensory properties in semi-hard cheeses.

Hypothesis is confirmed by the **theses under defence**:

- 1) manufacturing and ripening conditions have an impact on the qualitative and quantitative content of the non-starter lactic acid bacteria in cheeses;
- 2) higher ripening temperature facilitates more rapid formation of the desirable sensory properties in cheeses.

Object of the research:

Latvian Krievijas and Holandes cheeses.

Aim of the research:

to investigate diversity of non-starter lactic acid bacteria in Holandes and Krievijas cheeses and to evaluate their impact on the quality of the product.

Objectives of the research:

- 1) to investigate species of *Lactobacillus* genus in commercial Krievijas and Holandes cheeses;
- 2) to analyse the sensory, physical and chemical parameters of commercial Krievijas and Holandes cheeses;
- 3) to investigate variability of species of *Lactobacillus* genus in experimental cheeses during ripening;
- 4) to evaluate impact of the selected temperature at ripening and time on the growth rate of non-starter lactic acid bacteria in experimental cheeses;
- 5) to analyse changes of the sensory, physical and chemical properties of experimental cheeses ripened at different temperature;
- 6) to detect aroma compounds in cheeses, dynamics of their formation and impact on the quality of cheese.

Novelties of the research and the scientific importance:

- 1) microflora of Krievijas and Holandes cheeses has been investigated, identification of species and strains of *Lactobacillus* genus performed and the impact of microflora on the quality of cheese analysed;
- 2) impact of the ripening regimes on the growth rate of non-starter lactic acid bacteria in cheeses has been evaluated;
- 3) the aroma compounds in cheeses and their impact on the sensory qualities of cheeses have been studied.

The economic significance of the work:

Research on the diversity of non-starter lactic acid bacteria and dynamics of their changes in cheese ripening and the role in formation of the sensory properties enable to enhance competition of Krievijas and Holandes cheeses and to ensure quality of the product.

APPROBATION OF THE RESEARCH WORK

The research results have been presented at international scientific conferences and symposium in Latvia, Lithuania, Estonia, Germany, New Zealand and Norway (see the list on pages 6).

The results of the work have been summarized and published in the Latvian and English languages and two are submitted to be published (see the list on page 7).

MATERIALS AND METHODS

Time and venue of the research

Research reflected in this doctoral thesis has been performed from January, 2008 till September, 2010, at:

- ✓ the Laboratories: of Microbiology; of Sensory Evaluation; of Food Analysis; of Packaging Material of the Department of Food Technology of Latvia University of Agriculture;
- ✓ the Laboratory of the Department of Microbiology and Biotechnology of the Faculty of Biology of the University of Latvia;
- ✓ Laboratory of the Department of Food Science of the Faculty of Life Sciences of the University of Copenhagen.

Object of the research:

In order to study the non-starter lactic acid bacteria species in semi-hard cheeses and to evaluate their impact on the quality of cheeses, including sensory characteristics, in the first series of the research, commercial semi-hard cheeses ripened by mesophilic lactic acid bacteria and available in retail sales were analysed. Commercial cheeses were manufactured by dairy enterprises of Latvia, according to technical requirements of the enterprise and recommendations of the Branch Standards LPCS 10:2001 „Krievijas Cheese" and LPCS 11:2001 „Holandes Cheese". Characteristics of the analysed cheeses are provided in Table 1.

After obtaining research data on variety of non-starter lactic acid bacteria species in commercial Holandes and Krievijas cheeses, further in the second series of the research, samples of unripened cheeses of certain manufacturers have been analysed. The particular enterprises for analysis of experimental cheese samples were selected, taking as a basis amount of the processed milk in the enterprise, location, amount of cheese production, level of technological modernization and the quality of cheese.

Further in the text for characterization of experimental cheeses and interpretation of results the following designations are used - Krievijas cheese I, Krievijas cheese II, Holandes cheese I, Holandes cheese II, Krievijas cheese III and Holandes cheese III.

Experimental cheeses of the JSC 'Rīgas piena kombināts' and JSC 'Smiltenes piens' are manufactured according to the technical requirements of the enterprise or the Branch Standard. The attenuated starter with a higher proteolytic and lipolytic activity used for Holandes and Krievijas cheese III. This starter is being used to accelerate the ripening process and increase the sensory properties of cheeses.

The samples of cheese after salting were delivered to the laboratory of Dairy and Meat Products of the Department of Food Technology of Latvia University of Agriculture, where samples were packed in a polymer material film, and ripened at laboratories of the Department of Food Technology of Latvia University of Agriculture for 60 days at 6 °C and 12 °C.

Ripening temperature was chosen taking as a basis Latvian cheese making traditions and conclusions in research articles relating variability of microflora (6 °C), and the recommended ripening parameters (12 °C) in the manufacturing technology of Krievijas and Holandes cheeses.

At the same time the both ripening regimes help understand better the influence of microflora on the quality of cheese, including the formation of sensory properties.

Structure of the study

Structure of the study of commercial and experimental Krievijas and Holandes cheeses is given in Figure 1.

Parameters and methods of analyses

Determination of the pH was performed to all experimental cheese samples, according to LVS ISO 5546:2010 'Caseins and caseinates – determination of the pH', by using pH-meter, 3520 pH Meter'-JENWAY (Barloworld Scientific Ltd., Essex, UK).

Determination of cheese elasticity was performed by measuring its compression force in commercial and experimental cheese samples. The structure analyzer TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, UK) was used, applying a 25.4 mm tip (P/1S – Ball Stainless), while measuring the cheese compression force (test speed 2 mm s⁻¹, depth of press 5 mm, force applied 0.0493 N). Texture Exponent 32 program was used for processing of the results.

Determination of water activity was performed for experimental cheese samples only, by using Meter AquaLab LITE (Decagon Inc, USA). Samples for determination of water activity were measured in triplicate (with accuracy ± 0,015). Prior to sample analyzing calibration of the equipment was performed by means of 0.5M KCl (Lot 932375, Decagon).

Identification of aroma compounds using the solid phase microextraction was made for three samples of commercial cheese and all experimental cheeses. Analysis for each sample was performed in triplicate. A part of analyses were made in the Laboratory of the Department of Food Science of the Faculty of Life Sciences of the University of Copenhagen, identifying aroma compounds in unripened and ripened at 6 and 12 °C temperature Krievijas cheese I and commercial cheese samples. The gas chromatograph Hewlett-Packard 1530A with a tandem mass spectrometer Hewlett-Packard 5973 were used for analyses.

Aroma compounds in Krievijas cheese II, III, Holandes cheese I, II and III unripened and ripened samples at 6 and 12 °C temperature within certain time, were identified at the Laboratory of Packaging Material of the Department of Food Technology of Latvia University of Agriculture, by using Clarus 500 GC/MS (PerkinElmer®) gas chromatograph with a tandem mass spectrometer.

Order for extraction of aroma compounds for unripened and ripened at 6 and 12 °C temperature Krievijas cheese I and commercial cheeses: four grams of sample was weighed in glass bottle with volume 15 ml and screwed with aluminium cap. Until analysis the sample was kept at temperature 5 °C in the autosampler Combi Pal autosampler (CTC Analytics, Switzerland). Aroma compounds of the sample melting and reaching equilibrium in volatile phase at 60 °C for 15 minutes, then extraction of aroma compounds on the CAR/PDMS coated fiber (75 µm) (Supelco, Bellafonte, PA) continued 50 minutes.

Order for extraction of aroma compounds for Krievijas cheese II, III, Holandes cheese I, II and III unripened and ripened samples at 6 and 12 °C temperature. Four grams of sample was weighed in glass bottle with volume 20 ml and screwed with aluminium cap. Aroma compounds of the sample melting and reaching equilibrium in volatile phase at 70 °C for 30 minutes, then extraction of aroma compounds on the CAR/PDMS coated fiber (75 µm) (Supelco, Bellafonte, PA) continued 50 minutes.

In both cases isolation of aroma compounds in headspace was performed by gas chromatograph equipped with capillary column J&W Scientific DB-Wax column (30m x 0.25mm x 0.25 µm). Oven temperature from 40 °C and sample holding time 2 min were gradually increased up to 160 °C with ascent 6 °C min⁻¹ and from 160 °C up to 210 °C with ascent 10 °C min⁻¹. Detector temperature was 250 °C. Flow rate of the carrier gas (helium) 1ml min⁻¹ and mode “*splitless*” was used. Desorption of isolated aroma compounds longed for two minutes at 250 °C. Identification of isolated aroma compounds with mass selective detector. Ionization performed with 70 eV energy and 250 °C input temperature. Identification of aroma compounds was made according to mass spectrum analogy with mass spectra libraries.

In samples, analyzed at University of Copenhagen, aroma compounds were identified both on qualitative and quantitative basis. In cheeses analyzed at Latvia University of Agriculture, aroma compounds were identified only on quality basis. In the results section the peak area of the target compound is used for data comparison.

Sensory evaluation was performed in five Holandes and three Krievijas cheeses, as well as experimental samples of Krievijas and Holandes cheese III. Experimental samples for evaluation were chosen in order to determine microflora impact on the samples of cheese ripened at different temperature and to analyze intensity of sensory parameters in cheeses by means of accelerated proteolysis and lipolysis.

Evaluation of all cheeses was performed according to ISO 4121:1987, analyzing intensity of sensory parameters of cheese - colour, texture, holes and flavour. Trained panelists took part in the evaluation of samples.

Determination of *Lactobacillus* spp. was performed in all analyzed samples of commercial and experimental cheeses, according to LVS ISO 15214:1998 by using MRS agar media (Scharlau, Spain). Media was prepared according to LVS CEN

ISO/TS 11133-1:2009. Sample dilutions were performed according to LVS EN ISO 8261:2002 and ISO 6887-5:2010.

Colony forming units of the lactic acid bacteria were determined by means of ISO 15214:1998. The chosen parameters for cultivation of lactic acid bacteria in MRS agar were 72 hours at 37 °C, taking as a basis regimes recommended in the scientific literature (Coeuret et al., 2003).

Identification of *Lactobacillus* spp. colonies was performed taking as a basis fermentation of carbohydrates by using API 50 CHL (BioMerieux, France). The program APILAB Plus version 4.0 (BioMerieux) was used for identification of the isolated colonies up to species.

Isolation of DNA was performed for most frequently identified representatives of *Lactobacillus* spp. species - *L.plantarum* 1, *L.curvatus*, by using PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.).

Polymerase chain reaction analysis. Polymerase chain reaction analysis was performed for confirmation of the isolated *Lactobacillus* species.

The obtained sequences were analyzed at *Staden Package 1.6.0. release* (<http://staden.sourceforge.net/>) and compared to sequences available in the data base BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Data mathematical treatment was performed by using StatistiXL and Microsoft Excel programs. For the processing of results, single factor analysis of variance, Tukey's test and correlation analysis were used. The mean and the standard deviation of experimental data were determined.

RESULTS AND DISCUSSIONS

1. *Lactobacillus* spp. in commercial Krievijas and Holandes cheeses

During analysis of commercial Krievijas cheeses, *L.curvatus* and *L.plantarum* 2 associations were identified, and domination of one species was determined. Each cheese has characteristic microflora, and microflora composition even in cheese of the same variety made by different manufacturers can differ (Tab. 2).

Non-starter lactic acid bacteria were isolated from all commercial cheeses. One of the main sources of non-starter lactic acid bacteria is milk. *Lactobacillus* spp. can survive during pasteurization or get into cheese from starter, equipment, brine, and packaging material. This was observed during production of Cheddar cheese, while manufacturing the product in the presence of *L.curvatus* and *L.fermentum* biofilms was made. In the ripened cheese different strains of *L.curvatus* were found (Somers et al., 2001). It should be mentioned that biofilms made by *L.curvatus* can survive cleaning and sanitising treatments. *L.curvatus* is the dominating non-starter lactic acid bacteria species in Krievijas cheeses obtained in commercial samples.

L.plantarum was determined in Krievijas cheeses of JSC 'Trikātas piens' and JSC 'Rīgas piena kombināts', and is one of the most frequently found representatives of non-starter lactic acid bacteria that get into cheese from milk, production equipment or air (Fox et al., 2000). In its turn, *L.acidophilus* in Krievijas cheese of JSC 'Rankas piens' is an evidence of it gain entry into cheese from air, the dairy

environment and the surfaces of equipments, because *L.acidophilus* is widely used in production of fermented milk products.

After summarizing the above mentioned information, *L.curvatus* found in commercial Krievijas cheeses could be explained by the presence of biofilms in the cheese manufacturing equipment. After making such a conclusion, we can only advice a more frequent rotation of sanitising detergents and control presence of biofilms in enterprises.

Microflora in Holandes cheeses (Tab. 3) was represented by *L.paracasei* subsp.*paracasei* 1, *L.paracasei* subsp.*paracasei* 2 and *L.rhamnosus* associations, and only in the product of JSC 'Valmieras piens' was found association *L. curvatus* and *L. plantarum* 2. All these species, according to researches by Coppola et al. (1997) and Fitzsimons et al. (1999), are considered a non-starter microflora, which most frequently are being isolated from semi-hard cheeses.

Comparing the microflora in Krievijas and Holandes cheeses, it is evident that non-starter lactic acid bacteria species differ not only in cheeses of the same variety, but also in samples of cheese by different producers. At the same time, other considerations are reflected in the works by Fitzsimons et al. (1999), Crow et al. (2001), Antonsson et al. (2001) and de Angelis et al. (2001). When manufacturing Cheddar cheese, the mesophilic representatives of *Lactobacillus* spp. were similar to those found in the products of different enterprises even in Ireland and New Zealand. Similar conclusions have made authors when analyzing *Herrgård* cheese (Sweden) and mare milk cheeses manufactured in Italy. Also in Cheddar cheese manufactured by three enterprises, similarities with prevailing species of *Lactobacillus* genus were found. Thus a conclusion follows that no cheese production unit has its own unique microflora. Differences in microflora composition in analyzed cheeses should rather be connected with nuances of technological parameters, pH of cheese, type of the used starter, and other factors.

Comparison of the analyzed cheeses in this work with the popular in the world semi-hard cheeses confirms that the diversity of non-starter lactic acid bacteria species in semi-hard cheeses produced in Latvia is similar to those species isolated from Cheddar and Gouda cheeses. Cogan and Beresford (2002) notify that during ripening of Cheddar cheese the domination of mesophilic *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum* and *L.curvatus* is observed. This supports considerations about the most frequently isolated mesophilic heterofermentative lactic acid bacteria species, including Latvia's cheeses.

Literature and experimental data summary shows that the non-starter lactic acid bacteria species and their associations isolated from Krievijas and Holandes cheeses are to be considered the most traditional and most frequently isolated non-starter microflora in Europe's cheeses. Alongside with non-starter lactic acid bacteria species, count of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in commercial Holandes and Krievijas cheeses was analyzed.

Beresford (2003) states that non-starter lactic acid bacteria multiply rapidly in cheese during the first 10 – 20 weeks of ripening, reaching amount of 10^7 CFU g⁻¹. Later their concentration remains relatively unchangeable. In its turn, the maximum

concentrations in commercial cheeses do not exceed 10^6 CFU g⁻¹. The difference between the authors' considerations and experimental data could be explained by the quality of raw material, due to which the temperature of pasteurization and ripening is varied during production, by the acidity of whey during the grain processing, by a longer grain processing after the cooking and the presence of sodium nitrate in cheeses.

The average count of the colony forming units in Krievijas cheeses is less than in Holandes cheeses (5.53 log and 6.06 log CFU g⁻¹ respectively), which could be explained by the nuances in production technology of both cheeses.

After evaluating diversity and quantitative composition of lactic acid bacteria species in commercial Krievijas and Holandes cheeses, and taking into consideration information in scientific literature about the variability of species during cheese ripening, further in the research concentrations of aroma compounds in Holandes and Krievijas cheeses are studied and their role in formation of sensory properties of cheeses is analyzed.

2. Identified aroma compounds in commercial Krievijas and Holandes cheeses

As a result of lactose, protein and fat metabolism several hundreds of different compounds originate. Sensory properties are influenced as well by the content of fat, protein and salt in cheese. Essentially important is not as much the amount of one or another compound in cheese, as their proportions. The actual role of aroma compounds in formation of a certain flavour could not be always determined, because each one has sensory properties different from cheese (Ozola, Ciproviča, 2002).

Summarization of the identified aroma compounds in commercial Krievijas and Holandes cheeses is given in Table 4.

In totality, in the samples were detected: acetic acid, butyric acid, hexanoic acid, octanoic acid, nonanoic acid and decanoic acid. Their formation takes place in fat metabolism, imparting the product with impure, bitter and soapy taste. As the number of carbon atoms in fatty acids does not exceed 12, their role in formation of the sensory properties in cheese could be admitted, taking as a basis the research by Acree and Arn (2004).

Ethanol, 3-methylbutan-1-ol, pentan-1-ol, hexan-1-ol and 2-methylpentan-3-ol were detected both in Krievijas and Holandes cheeses. Alcohols are produced as a result of metabolism of carbohydrates, proteins and fats, and in literature they are characterized as compounds imparting cheese with both sweet and floral, fat, alcohol, and bitter flavour (Singh et al., 2003; Fox et al., 2000; Molimard, Spinner, 1996).

According to data by Qian and Burbank (2007), aldehydes originate as a result of fatty acid auto-oxidation, but several branched chain aldehydes – from amino acids through the Strecker degradation. According to results of the research by Acree and Arn (2004), aldehydes have a low perception threshold, therefore they should be regarded as significant aroma contributors in cheese. 3-methylbutanal detected in cheeses originates from leucine, with participation of *Lc.lactis* enzymes (Christensen et al., 1999; McSweeney, Sousa, 2000). Acetaldehyde should be considered a product

of pyruvate metabolism, can originate also under the influence of *Lactococcus* spp. from tryptophan (Christensen et al., 1999; Fox et al., 2000). Nonanal in its turn is produced by unsaturated fatty acids during β -oxidation. Avsar et al. (2004) proves that 3-methylbutanal in cheeses associates with nut flavour. Acetaldehyde depending on its concentration in the product adds sweet or strong aroma, but nonanal – flavour associated with green grass (Fox et al., 2000).

Ketones add flavour of flowers and fruits to the cheese aroma. In the analysed samples were identified: propan-2-one, butan-2-one, pentan-2-one, diacetyl, heptan-2-one, acetoin and nonan-2-one. The most part of ketones originate from β -ketoacids (Tunick, 2007). Formation of diacetyl takes place as a result of activity of starter microorganisms in transformations of lactose and citrates. This compound acts also as a precursor in formation of acetoin. Wilkinson and Kilcawley (2007) emphasize formation of diacetyl, acetoin and butan-2-one as a result of transformations of citrates in Gouda type cheeses under the influence of starter and non-starter lactic acid bacteria.

Four benzene derivatives were detected among the aroma compounds. Toluene which originates both from β -carotene (Molimard, Spinnler, 1996) and storing cheese frozen, wrapped in a modified gas environment (Bosset et al., 2000), and naphthalene in the product associate with odour of pitch and faeces (Drake et al., 2001). Benzaldehyde and phenylacetaldehyde are compounds with flavour of almond and roses. In their formation tryptophan and phenylalanine (Christensen et al., 1999) are involved.

Esters, in the formation of which fatty acids and ethanol take part, were identified in Krievijas and Holandes cheeses. They impart cheese with flavour of flowers and fruits (Singh et al., 2003; Molimard, Spinnler, 1996).

From lactones - δ -decalactone and δ -dodecalactone were detected in commercial cheese samples. Lactones in cheese originate from hydroxy fatty acids in intramolecular esterification. According to data by Acree and Arn (2004), δ -decalactone and δ -dodecalactone are considered to be the most important lactones in cheese. Lactones add fruit notes to the flavour in product.

Sulphur compounds – methional and dimethyltrisulfide were detected in the samples as well. The previous mentioned forms as a result of methanthiol oxidation (Bonnarme et al., 2000; McSweeney, Sousa, 2000) and in the product associates with an odour of garlic. Methional in its turn originates from the Strecker degradation and imparts cheese with taste and flavour of boiled potatoes. Due to the low threshold of perception these compounds have a significant impact on formation of cheese taste and flavour (Curioni and Bosset, 2002).

Differences in the detected aroma compounds are observed both between the Holandes and Krievijas cheeses, and between the samples by two different producers. When analyzing aroma compounds it was evident that toluene was identified only in cheese by JSC 'Trikātas piens', but ethylbutyrate and phenylacetaldehyde - in the samples by JSC 'Rīgas piena kombināts'. These points indicate differences in biochemical processes, which are influenced as well by the quantitative and qualitative content of microflora in cheese.

Individually detected aroma compounds in commercial cheeses are able to impart pleasant flavour notes, however, in certain combinations uncharacteristic aroma can occur. Apart from that, sensory properties are influenced negatively by increase of concentration of alcohols, aldehydes and ketones in cheeses. As mentioned before, in formation of these compounds both starter and non-starter lactic acid bacteria are involved. Concentration of aroma compounds differs even in cheeses of one variety, similarly to the identified non-starter lactic acid bacteria species. Detection of aroma compounds in cheeses and determination of their concentrations give no reason yet to assure the undesirable impact of non-starter lactic acid bacteria on the cheese flavour.

3. Evaluation of sensory properties of commercial Krievijas and Holandes cheeses

Evaluation results of the sensory properties of Krievijas cheese are provided in Figure 2. A significant difference in the texture, holes, acidity and bitterness of cheeses was found by the dispersion analysis.

Tukey's test results show that Krievijas 'Limbažu' cheese of the JSC 'Rīgas piena kombināts' is more acid and bitter than others. Krievijas cheese of the JSC 'Triķātas siers' in its turn was evaluated as hard, without holes. Krievijas cheese of the JSC 'Smiltēnes piens' gained the highest evaluation in the respect of holes, as well as being less bitter and salty. If analyze cheese taste defects and their origins, bitter taste is one of the main problem in cheese manufacturing when using mesophilic starters (Singh et al., 2003).

Elevated ripening temperature intensifies fermentative processes and stimulates the growth of non-starter lactic acid bacteria, thus resulting in various defects in cheeses. Low ripening temperature in its turn contributes to formation of bitter taste, hindering further transformations of products of the primary hydrolysis of proteins. By the biochemical processes during the cheese ripening and by the content of microflora in cheese could be explained differences of the sensory properties in the analyzed cheeses.

The most part of Holandes cheeses (Fig. 3) were evaluated similarly, differences were detected only in texture and saltiness.

According to the Tukey's test results, products manufactured by the JSC 'Cesvaines piens' were evaluated as too hard and bitter by panelists. Holandes cheese by the JSC 'Rīgas piena kombināts' was evaluated as the most bitter one.

Texture and bitterness of cheese is dependant on the manufacturing process. Texture depends on the composition of raw materials and cheese ripening conditions. Banks (2007) in the formation of cheese texture stresses significance of the added starter, rennet, amount of salt and duration of grain processing.

According to data by Lawrence et al. (1987) in the first two weeks of ripening the cheese texture is influenced at the greatest extent, because α_{s1} casein is hydrolysed up to α_{s1} -I casein, with participation of rennet. Cheese obtains a softer texture as a result. Changes in texture continue during ripening, involving proteinases and peptidases released by the starter and non-starter lactic acid bacteria. As a result

ammonium and other water-soluble nitrogen compounds are formed that increase the pH of cheese and influence its texture (Fox et al., 2000).

Texture of commercial cheeses was evaluated also by texture analyzer measuring the compression force of the samples. By dispersion analysis and determination of cheese elasticity significant differences were found between the elasticity of Holandes and Krievijas cheeses ($p < 0.05$). Use of Tukey's test helped to detect the differences – in Holandes cheeses they exist among all samples, except the hardest ones – cheeses of JSC 'Trikātas piens' and JSC 'Smiltēnes piens', but in Krievijas cheeses – the hardest texture was of Krievijas cheese of the JSC 'Rankas piens'. In the sample of JSC 'Rīgas piena kombināts' with trade mark 'Old Farmer', the most elastic texture was detected that differs from the maximum value for 45%.

Comparing the microflora in Krievijas and Holandes cheeses, it is evident that non-starter lactic acid bacteria species differ not only in cheeses of the same variety, but also in samples of cheese by different producers. Differences in microflora of the analyzed cheeses should entail nuances of technological parameters, the pH of cheese, type of the used starter, and other factors. Summarization of literature and experimental data confirm that non-starter lactic acid bacteria species and their associations isolated from commercial Krievijas and Holandes cheeses are to be considered the most traditional and most frequently isolated non-starter microflora in cheeses.

Analyzing concentrations of aroma compounds in commercial Holandes and Krievijas cheeses, differences were observed between the two varieties of cheeses, and between the samples of the same variety but different producers. This only points to differences in biochemical processes, which are influenced as well by the quantitative and qualitative content of microflora. As a result the sensory properties of commercial cheeses differ considerably.

4. *Lactobacillus* spp. in experimental samples of Krievijas and Holandes cheeses

In the beginning of cheese ripening concentration of the starter lactic acid bacteria decrease rapidly, thus liberating space for multiplication of the non-starter lactic acid bacteria.

Viability of starter microflora in cheeses is determined by the content of lactose and citrate. Alongside with its fermentation, the growth of starter *Lactococcus* spp. and *Leuconostoc* spp. decreases, and the cell lysis increases. In cheese microflora, the non-starter lactic acid bacteria become the most dominating, which quantity, growth rate and diversity of species depend on milk microflora, regimes of technological processes and cheese ripening conditions.

In the Tables 5 and 6, summarization about the lactic acid bacteria species isolated from Krievijas cheeses is provided, as well as variability of species both under the influence of temperature and duration of ripening.

In unripened and ripened for 15 days Krievijas cheese I representative of the starter *Lc.lactis* subsp.*lactis* 2 was detected; *L.curvatus* dominated during the rest of the ripening time at 6 °C.

In the beginning of ripening the following representatives of starter microflora were detected in Krievijas cheese II: presence of *Lc.lactis* subsp.*lactis* 2, *Lc.lactis* subsp.*lactis* 1 and prevalence of *L.curvatus* until the 30th ripening day at temperature 6 °C. From a sample ripened for 45 days at temperature 6 °C *L.helveticus* was isolated. Williams and Banks (1997) report on isolation of *L.helveticus* from Cheddar cheese ripened for 6 – 9 months, considering this species as non-starter lactic acid bacteria. Other researchers prove that *L.helveticus* in semi-hard cheeses is used for improving of proteolysis and enhancement of sensory properties, so for acceleration of ripening as well (Beresford et al., 2001; Drake et al., 1997). During ripening of Krievijas cheese II at temperature 12 °C, a presence of *L.plantarum* 1 was detected.

When ripening Krievijas cheese III at temperature 12 °C, *Leu.lactis* maintained its viability during the ripening. Species of *Leuconostoc* genus belong to heterofermentative lactic acid bacteria, which slowly produce lactic acid at low concentrations. Several authors consider that *Leuconostoc* spp. do not fit starter representatives in cheeses and belong to non-starter lactic acid bacteria (Thunell, 1995). In Krievijas cheese III, where *Leu.lactis* domination was detected during the entire ripening, dynamics of colony forming units differed as well (Fig. 4). A conclusion could be made that survival and growth intensity of *Leuconostoc* spp. in cheeses depends on species and strain characteristics. The isolated *L.acidophilus* 3, *L.brevis* and *L.delbrueckii* subsp.*delbrueckii* in the beginning of ripening were substituted by *L.curvatus* in the end of ripening.

A different situation was observed in Krievijas cheese III, when ripening the samples at 6 °C. *Leu.lactis* identified in cheese in the beginning of ripening, but *L.acidophilus* 3 and *L.delbrueckii* subsp.*lactis* 1 dominate at the end of ripening. Diversity of species in this cheese could be explained by composition and characteristics of the starter. As a result of increased autolysis of starter bacteria, as well as within the higher initial pH of cheese (Fig. 6), the non-starter bacteria grow relatively rapidly (Fig. 4), and domination of different species of *Lactobacillus* genus was observed during a particular stage of ripening.

DNA fragment sequencing of most frequently identified *L.plantarum* 1 and *L.curvatus* revealed that nucleotide sequence of *L.curvatus* of ripened cheese for 60 days at 6 °C conforms with the strain *L.paracasei* subsp.*paracasei* JCM 8133, but in cheese ripened for 60 days at 12 °C – with the strain *L.paracasei* MH55. In their turn, the isolated *L.plantarum* 1 from cheese samples ripened for 45 and 60 days at 12 °C conform with the strains *L.plantarum* S4 and *L.plantarum* DSPV 354T respectively.

API 50 CHL system applied for identification of Gram⁺ *Lactobacillus* phenotypically showed satisfactory results when determining genus of microorganisms. According to Tynkkynen (1999) and co-authors, its precision is considerably lower when identifying microorganisms up to species. This could be explained by the fact that the system initially was intended for identification of *Lactobacillus* genus for medical needs (Coeuret et al., 2003) as a supplementary system for atypical fermentation models (Arhné et al., 1989; Chamba, 2000; Coeuret et al., 2003). Muyanja (2003), Temmerman (2004) and co-authors concluded that the

phenotypical methods are limited in respect of reproductivity, with low taxonomic resolution, and they often allow identification only at the level of genus.

In the unripened Holandes cheese I and II presence of starter microflora was detected (Tab. 7 and 8). In Holandes cheese I, starting from the 15th day of ripening until the end of ripening, *L. paracasei* subsp.*paracasei* dominated. From the sample ripened at temperature 6 °C, *L.curvatus* was isolated as well, but from the sample ripened at 12 °C - *L.rhamnosus*.

In Holandes cheese II domination of *L. paracasei* subsp.*paracasei* was observed until the 45th day, ripening at temperature 6 °C, and prevalence of *L.plantarum* 1 from the 30th until the 60th day of ripening, at temperature 12 °C.

In microflora of Holandes cheese III prevalence of *L.curvatus* was observed, when ripening the samples at temperature 6 °C. This representative of non-starter microflora was not detected in the unripened sample and the ripened for 45 days, from which only *L.plantarum* 1 was isolated. In its turn, when cheeses was ripened at temperature 12 °C, *L.plantarum* 1 was isolated by the end of ripening, but the starter microflora and *L.paracasei* subsp.*paracasei* 1 were detected in the middle of ripening.

According to the data by Copolla et al. (1997) and Fitzsimons (1999), most frequently *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* and *L.curvatus* are isolated from cheeses. When analyzing the obtained results, considerations were similar. Representatives of the isolated non-starter lactic acid bacteria in experimental cheeses are *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* and *L.curvatus*. Different authors try to explain differently the available and applicable nutrients for the growth of non-starter lactic acid bacteria (Diggin et al., 1999; Williams, Banks, 1997; Fox et al., 1998; Williams et al., 2000; Thomas, 1987; Rapposch et al., 1999; Lane et al., 1997; Cogan, Beresford, 2002). Variety of substrates changes during ripening; the growth rate and population heterogeneity of the mesophilic lactic acid bacteria could be explained by this as well.

According to the findings by Fitzsimons et al. (2001) and Williams et al. (2002), the dominating non-starter lactic acid bacteria species usually change during the cheese ripening, and are represented by one *Lactobacillus* species by the end of ripening. In the opinion of these authors, *L.paracasei*, *L.plantarum* and *L.brevis* dominate in unripened cheeses, but *L.paracasei* – in ripened cheeses. When analyzing Cheddar cheese (Ireland), during the first weeks *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* and presence of some unidentified representatives were detected, and by the end – only *L.paracasei* (Fitzsimons et al., 2001). Similar considerations follow when analyzing data in the Tables 12 and 13, however, data reflected in Tables 10 and 11 allow asserting that domination of species depends on the cheese variety, duration of ripening and other factors.

Diversity of microflora and its growth intensity in experimental cheeses depend on water activity, salt content, pH, ripening temperature, oxidation-reduction potential and the nitrate and nitrite content. Therefore in the next chapter the dynamics of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria under the influence of the above mentioned factors is evaluated.

5. The dynamics of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening

Variability of species and quantity of microflora is characterized by the count of colony forming units of lactic acid bacteria in experimental Krievijas (Fig. 4) and Holandes (Fig. 5) cheeses.

The greatest amount of colony forming units was determined in Krievijas cheese III, but the least - in Krievijas cheese I. It could be explained by the manufacturing peculiarities of cheese – use of different starters, as well as by content and quality of milk. Increase in non-starter lactic acid bacteria growth rate even in the beginning of ripening was observed in Krievijas cheeses I and II, moreover, the growth rate was higher at temperature 12 °C than at temperature 6 °C. More rapid growth rates are explained both by temperature closer to optimum of the mesophilic bacteria activity and availability of nutrients. In Krievijas cheese III at that time a little decrease the colony forming units of lactic acid bacteria was observed. It could be explained by composition of the chosen starter, combining modified microorganisms with higher proteolytic and lipolytic activity, also by more rapid lysis of the starter bacteria due to utilized lactose.

Decreasing of count of non-starter lactic acid bacteria in the samples of Krievijas cheese I and II ripened at higher temperature was observed around the 30th day of ripening; at the same time in the samples ripened at temperature 6 °C the count of colony forming units gradually increased and reached its maximum only around the 45th day. In its turn, in Krievijas cheese III ripened at 6 °C, non-starter lactic acid bacteria reached their maximum concentration after 30 days, but at temperature 12 °C - after 45 days. This could be explained by more intense proteolytic reactions at higher temperature, which are facilitated by proteinases and peptidases released by the starter bacteria, as well as by availability of peptides and amino acids for multiplication of the non-starter lactic acid bacteria. Count of the colony forming units varied in samples ripened at 6 °C from 5.77 log CFU g⁻¹ in Krievijas cheese II up to 6.63 log CFU g⁻¹ in Krievijas cheese III, and from 5.77 log CFU g⁻¹ in Krievijas cheese II up to 7.05 log CFU g⁻¹ in Krievijas cheese III, ripened at 12 °C. In Krievijas cheese III, where *Leu.lactis* domination during ripening was detected (Tab. 6), dynamics of colony forming units differed as well. Thus a conclusion follows that survival of the non-starter lactic acid bacteria and their growth intensity depends on the species and strain characteristics and ripening temperature.

Summarizing data found in literature about influence of temperature on lactic acid bacteria multiplication, several considerations were found. Shakel-Ur-Rehman (2000) and co-authors report that in cheese ripened at temperature 1 °C, population of the non-starter lactic acid bacteria is for 3 log less than in cheese ripened at 8 °C. Other authors have similar opinions that ripening temperature influences considerably the growth of non-starter lactic acid bacteria in cheese (Folkertsma et al., 1996; Fenelon et al., 1999).

When analyzing Holandes cheeses, similar situation was observed. *Lactobacillus* spp. its maximum concentration in Holandes cheese I and III reached around the 30th day when ripened at 12 °C, and around the 45th day, when ripened at 6 °C.

Ripening temperature had no significant influence on changes of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in Holandes cheese II, and samples ripened at the both temperature regimes reached their maximum value around the 30th day of ripening.

Dynamics of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in cheeses was changeable, reaching its maximum around the 30th or the 45th day of ripening, with temperature at ripening 12 and 6 °C respectively. By the end of ripening the count of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria varied from 6.54 up to 7.70 log CFU g⁻¹ in Holandes cheeses, and from 5.26 up to 6.63 log CFU g⁻¹ in Krievijas cheeses. Changes in the count of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria show that their increase depends on temperature at ripening, composition and characteristics of the starter, availability of nutrients and other factors.

6. The dynamics of pH in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening

pH is one of the most important factors during cheese ripening, enhancing activity of enzymes and regulating the growth of microorganisms (Kinstedt, 2005; Lawlor et al., 2001).

Due to production technology peculiarities of Krievijas cheese, the pH in cheese after pressing rises up to 5.2 – 5.3. More rapid multiplication of lactic acid bacteria in cheeses is observed at prolonged pressing before brining for intensification of lactic acid fermentation process. In this process the most part of lactose is fermented, creating characteristic acidity of Krievijas cheese with pH 5.22 – 5.25. In opinion of different experts, the pH in Krievijas cheeses in the beginning of ripening is approximately 5.28 (Белова и др., 1984), which corresponds to the results of experimental Krievijas cheeses I and II (Fig. 6), respectively, pH 5.25 and 5.22. As mentioned above, lactic acid bacteria and their enzymes have the main role in ripening of Krievijas cheese. Белова et al. (1984) mention that starter bacteria reach the maximum concentration in the 5th day of ripening, further a gradual decrease is observed. Taking as a basis this consideration, increase of pH in Krievijas cheeses during the beginning of ripening up to the 15th day must be explained both by continuation of lactic acid fermentation and use of lactic acid in further chemical processes. When ripening cheese at 6 °C, the pH dynamics was slower than at 12 °C.

Dispersion analysis revealed significant differences between experimental Krievijas cheeses ripened at 6 and 12 °C. When analyzing changes of the pH during ripening, it should be emphasized that alongside with the starter microflora, in the ripening of Krievijas cheeses *L.curvatus*, *L.plantarum*, *L.paracasei* and *Leu.lactis* (Tab. 5 and 6) also take part.

The pH in experimental cheeses by the end of ripening varied from 5.42 up to 5.7, which differs from data mentioned in various cheese technology instructions, where pH suggested for Krievijas cheese is 5.25 – 5.35.

Dynamics of the pH differ considerably in Krievijas cheeses with accelerated ripening. Changes of the pH in them are similar to those taking place in Holandes

cheeses (Fig. 7). This should be explained by accelerated proteolysis and formation of alkaline products of proteolysis that results in faster pH dynamics from 5.49 up to 5.70 in Krievijas cheese and from 5.48 up to 5.74 in Holandes cheese.

Several authors (Rotaru et al., 2008) state the duration time of hydrolysis of the residual lactose in cheese – five days, to the contrary of cheese technology books (Eck, 1996; Ozola, 1997; Белова и др., 1984; Диланян, 1973) which state 15 days.

The main lactose transformation product is lactic acid, the concentration of which depends on several factors, including the composition of starter. Homofermentative lactic acid bacteria hydrolyze milk sugar completely into lactic acid, *Leuconostoc* spp. and heterofermentative *Lactococcus* spp. alongside with lactic acid produce also alcohols, organic acids, carbon dioxide, acetoin and diacetyl. Lactic acid fermentation process, including the pH dynamics, is determined in cheeses by proportions of lactic acid bacteria species in the starter, by their functional characteristics and microflora having penetrated during the cheese making.

When observing changes of the pH in Holandes cheeses I and II, the conclusion follows that during the first 15 days of ripening the pH decreases irrespective of temperature chosen at ripening. As indicated in different sources, the pH of Holandes cheeses rises up to 5.2 – 5.25 after 3 days of ripening. Differences could be explained by the peculiarities of technological process, the type of used starters (liquid or freeze-dried) and the quality of milk. Apart from that, the considerably distinctive content of lactose in milk should be mentioned – 5.3 %, if compare with that given in literature (4.7 %) (Гопбарова, 1984), and the high content of lactose in whey – 5 % (data obtained in practice).

Differences were observed as well in the pH dynamics by changing the content of starter, in Holandes cheeses.

In order to make sure of influence of the pH both on cheese elasticity and the water activity, correlation analysis of the mentioned parameters was performed. It was tested in this work whether the changes in cheese elasticity and reduction of water activity could be explained by the rise of the pH during ripening. The obtained results reveal a strong negative linear correlation between the parameters under study, i.e. at the increase of the pH, the texture of cheese becomes more elastic. This supports opinion of several authors (Fox et al., 2000; Folkertsma et al., 1996; Aston et al., 1985), that during cheese maturation while the amount of water-soluble nitrogen compounds and the use of lactic acid increase, the rise of the pH value and reduction of water activity takes place. Water activity in experimental Krievijas cheeses during ripening varied from 0.994 up to 0.960, but in Holandes cheeses from 0.995 up to 0.971. It is not in contradiction to findings of other researchers. Marcos and Esteban (1982) admit that water activity in unripened cheese is 0.985-0.997, and its gradual decrease up to 0.940-0.980 is observed during ripening. According to findings by Beresford et al. (2001), decrease of water activity during ripening could be explained by water evaporation, water consumption in hydrolytic reactions, as well as for accumulation of low-molecular compounds produced in reactions of fat and protein hydrolysis. These compounds contribute to rise of the pH and more elastic texture of cheese.

7. The identified aroma compounds in experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening

In each of the analysed sample were detected - acetic acid, butyric acid, hexanoic acid, octanoic acid, and in individual cheeses – propionic acid, nonanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid and octadecanoic acid. In Krievijas cheese II irrespectively to ripening conditions, octadecanoic acid was found. Propionic acid was detected only in Holandes cheese II, and substantial differences in concentrations of butyric acid and hexanoic acid were also detected only in Holandes cheeses II, ripened at 12 °C. The short- and medium-chain fatty acids in particularly are important in formation of cheese taste and flavour. They can originate as a result of lipolysis, in amino acid transformations, lactose hydrolysis or from aldehydes and ketones.

In the experimental cheeses also alcohols were identified that impart the product with sweet, alcohol or bitter taints depending on their concentration; sometimes they cause taste imbalance in cheese.

Butan-2-ol was identified in the samples of Krievijas cheese I, which were ripened at 12 °C. Some authors point to the role of non-starter lactic acid bacteria in formation of butan-2-one and butan-2-ol (Hannon et al., 2006). 3-methylbutan-1-ol was identified in Krievijas cheeses, as well as in Holandes cheese III ripened at 12 °C. 2-methylpentan-3-ol was detected only in Krievijas cheese I. Pentan-1-ol in its turn was detected in Krievijas cheese I, as well as in Holandes cheese III ripened at 6 °C.

In the samples both the linear and the branched chain aldehydes were detected. Linear chain aldehydes can originate from unsaturated fatty acids during β -oxidation and from amino acids through the Strecker degradation. Branched chain aldehydes are derived from isoleucine and leucine (McSweeney et al., 2000; Yvon et al., 2000). Depending on concentration, aldehydes impart cheese with sweet taste or that of green grass and green plants (Curioni, Bosset, 2002).

Nonanal was detected both in Holandes cheese I and II and in Krievijas cheeses I and II. It should be emphasized that this aldehyde was detected also in Holandes cheese III, ripened at 6 °C. Hexanal in its turn was detected in Krievijas cheeses I and III, and in Holandes cheese II ripened at temperature 6 °C, but octadecanal – in Holandes cheese III. 3-methylbutanal was identified in Holandes cheese II and III ripened at 12 °C, as well as in Krievijas cheese II irrespectively of ripening conditions. 3-methylbutanal and acetaldehyde were observed in Krievijas cheese I during the beginning of ripening.

From ketones detected in the samples, cheese taste and flavour are influenced mainly by pentan-2-one, diacetyl and heptan-2-one (Carbonell et al., 2002). Butan-2-one was detected in Krievijas cheeses I and III, as well as in Holandes cheese II. Diacetyl and acetoin were identified in the Holandes and Krievijas cheeses irrespectively of temperature at ripening. Differences in concentration of heptan-2-one were detected in Holandes cheeses I and II, ripened at 12 °C. Propan-2-one was detected only in Krievijas cheese I. In the samples of Holandes cheese III ripened at 6 and 12 °C,

pentan-2-one and nonan-2-one were identified respectively. Pentan-2-one in Krievijas cheese I was detected during the entire ripening period, but in other samples this compound was not detected. Nonan-2-one was identified in Holandes cheeses I and II, and in Krievijas cheeses I irrespective of ripening conditions, but in Krievijas cheese III only in the sample ripened at temperature 12 °C. Undecan-2-one and octan-2-one were detected in Holandes cheese III, in the samples ripened at 6 and 12 °C respectively. In Krievijas cheese I undecan-2-one was detected during the entire ripening period.

In the analysed samples were detected lactones. δ -nonalactone was detected in Holandes cheeses, but δ -dodecalactone and δ -decalactone in Krievijas cheese I.

According to researches by Engels (1997) and co-authors, as well as Neeter and De Jong (1992), in Gouda cheese 13 aroma compounds were identified, which are important in formation of sensory properties of cheese: diacetyl, butyric acid, butanone, hexanal and pentanal, 3-methylbutanal, 3-methylbutan-2-one, methanethiol, dimethylsulfide, 2-methylpropanol and dimethyltrisulfide. The mentioned compounds were detected in experimental Krievijas and Holandes cheeses.

The aroma compounds are products of carbohydrate, fat and protein metabolism, their origin could be connected with quality of milk and activity of the microflora in cheese. It means that a greater role in formation of the diverse taste and flavour in cheeses should be delegated to the diversity and concentration of microflora in them.

8. Changes of elasticity in Krievijas and Holandes cheeses during ripening

Cheese elasticity is determined by composition of cheese, physical and chemical parameters, rate of biochemical processes and concentration of the produced compounds, and their further transformations during cheese ripening. All factors could not be listed, because they are not determined by one produced compound, but their proportions. For characterization of cheese elasticity, cheese compression force was measured (Fig. 8 and 9).

Structure of cheese after pressing is homogeneous, but its mass is coarse and hard. Cheese texture changes during cheese ripening. Ripened cheese has a stronger and harder upper layer, and more elastic central part. The physical properties of cheese mass do not change equally; changes in the periphery are more intensive than in the central part due to the mass getting compressed and dried up. Alongside with cheese mass compressing protein hydrolysis takes place. In the most part of cheeses, α_{s1} casein is hydrolyzed in peptide chain Phe₂₃ – Phe₂₄ by residues of chymosin in cheese during the early ripening. The product of α_{s1} casein hydrolysis is hydrophobic; it contributes to water evaporation and decreasing of cheese hardness (Горбарова, 1984).

Results of dispersion analysis showed that elasticity of the samples is substantially influenced by the ripening temperature ($p < 0.05$). A gradual increase of elasticity was observed in all samples during ripening. In samples ripened at 12 °C changes of elasticity are more rapid. For example, Aston et al. (1985) and Folkertsma et al. (1996) found that if ripening temperature is increased, rate of proteolysis speeds

up, and the observed changes of texture in cheese have a direction towards more elastic and softer structure with a more rapid formation of taste and flavour.

The softest texture by the end of ripening was detected in Krievijas cheese III. It could be explained by the specific of used starter, more rapid processes of proteolysis and lipolysis during ripening. Similar situation was observed with samples of Holandes cheese.

Cheese elasticity depends on the chemical composition of κ -casein, especially on the content of calcium in it. Lactic acid produced as a result of lactic acid fermentation demineralizes κ -casein. If the pH is lower than 5.3, colloidal calcium phosphate splits off from the complex; if the pH is above 5.3, calcium binds with proteins. Alongside with changes of the pH during cheese ripening and transformations of protein from water-insoluble to water-soluble, the content of bound water in cheese increases and of free water decreases. Increasing pH from 4.9 up to 5.4, cheese mass becomes more elastic. The content of bound water in Holandes type cheeses is 8-11 % (Горбатова, 1984). At increasing of the amount of bound water, a_w decreases and the growth rate of the non-starter lactic acid bacteria changes as well. The content of salt in cheese also has an impact on cheese elasticity, facilitating protein capacity power to bind water.

Elasticity of experimental Holandes cheeses depends on the ripening temperature ($p < 0.05$). Slower changes of elasticity take place in the samples at lower ripening temperature. When ripening cheese at lower temperature, it obtains a stronger and harder texture due to delayed biochemical processes.

In the most part of experimental samples of Holandes and Krievijas cheeses ripened at 12 °C, a more rapid increase of elasticity was observed from the 15th up to 30th day of ripening. Analysis of the dynamics of the colony forming units of lactic acid bacteria revealed that during this time is the most intensive growth of microorganisms, and consumption of nutrients. As a result, formation of intermediate-products and end-products of fat and protein metabolism takes place, creating a more elastic cheese texture.

9. Evaluation of sensory properties of experimental Krievijas and Holandes cheeses

In order to analyze impact of the temperature chosen at ripening on formation of the sensory properties in Krievijas and Holandes cheeses, sensory analysis of Krievijas cheese III and Holandes cheese III samples was performed (Fig. 10 and 11).

The samples of Krievijas cheese II differed ($p < 0.05$) in acidity and texture; the sample ripened at 6 °C was harder and less acid. In Holandes cheeses III the difference was only in taste and flavour. Evaluation detected that cheese ripened at 12 °C has a more pronounced taste and flavour.

Panelists have marked a more pronounced acidity in Krievijas cheese III, ripened at 12 °C. It could be explained by the impact of microflora. *Leuconostoc* spp. differ considerably from all other non-starter lactic acid bacteria. Their primary function is to produce acetate, carbon dioxide, diacetyl, acetoin and 2,3-butanedione, which originates in metabolism of citrates (Waagner Nielsen, 2004). When producing CO₂,

Leuconostoc spp. are responsible for formation of holes in Edam, Gouda, as well as Holandes cheeses, while diacetyl and acetoin impart the product with flavour characteristic to the cottage cheese. Apart from that, *Leuconostoc* spp. are rich with intracellular proteolytic enzymes and activity of esterases. This can explain differences in profile of aroma compounds for Krievijas cheese III, ripened at 12 °C. It should be emphasized that *Leuconostoc* spp. can have a secondary influence on the cheese quality, facilitating proteolysis and lipolysis. However, this consideration needs more precise definition, because the research works provide no answers.

The more pronounced and elastic texture of the sample ripened at 12 °C could be explained by the level of protein hydrolysis. When ripening cheese at higher temperature, the content of amino acids and ammonium grows more rapidly, and also lactic acid produced in the beginning of ripening is used efficiently in further transformative processes. These transformations facilitate rise of the pH, contributing to formation of a more elastic cheese texture (Waagner Nielsen, 2004).

A more pronounced flavour of Holandes cheese III could be explained not only by higher ripening temperature, but also by starter. In conditions when all the processes in a cell are intensified, a more rapid cell lysis of the starter bacteria composition and properties takes place, and endogenous enzymes are released that participate in proteolysis and lipolysis. As a result aroma compounds are produced enriching cheese with intense flavour, as well as cheese ripening is accelerated.

The qualitative and quantitative composition of microflora and compounds produced as a result of their activity impart cheese with certain sensory properties. By this consideration the diversity of the sensory properties in cheese could be explained, when evaluating commercial and experimental Holandes and Krievijas cheeses.

RECOMMENDATIONS FOR CHEESE MANUFACTURERS

Taking into account so contradictory information in scientific literature about impact of non-starter lactic acid bacteria on formation of cheese flavour, various solutions are recommended for manufacturers to assure the quality of cheeses:

- 1) inhibition of *Lactobacillus* spp. growth by use of food additives, antimicrobial agents or protective cultures;
- 2) maintenance of the ripening temperature recommended for the relevant cheese varieties;
- 3) combination of specific *Lactobacillus* genus species / strains in starters in order to ensure domination of only controlled species / strains in microflora of the non-starter lactic acid bacteria during cheese ripening;
- 4) the definition of limits of the count of colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in milk and others treatment processes;
- 5) control of presence of biofilms on equipment surfaces.

The population of non-starter lactic acid bacteria could be controlled by adding of preservatives without significant impact on activity of the starter lactic acid bacteria. Preservatives slow down the growth intensity of the

mesophilic *Lactobacillus* spp., however, do not inhibit them completely. Preservatives do not alter the rate of proteolysis in cheeses, but even a higher concentrations of free amino acids are observed. It is not clear what contributes to this increase. It could be explained by autolysis of starter and liberation of intracellular enzymes caused by the preservatives.

Starter bacteria are able to produce bacteriocins. They inhibit growth of mesophilic *Lactobacillus* spp. According to information in literature, non-starter lactic acid bacteria were not isolated from cheeses until the 6th month of ripening, if lactic acid bacteria species producing lactacin and other bacteriocins were included in starters.

Apart from adding of the mentioned bacteriocins, the use of protective cultures in cheese manufacturing is increasing as well. They inhibit pathogens, including yeasts and moulds, and restrict the growth of heterofermentative lactobacilli as well.

In order to control the rate of cheese ripening and the growth dynamics of mesophilic non-starter lactic acid bacteria, some researchers have suggested decreasing of ripening temperature. Decreased ripening temperature slows down the growth rate of mesophilic non-starter lactic acid bacteria, but it is impossible to liberate cheese from their presence. Also this study reveals that the concentration of non-starter lactic acid bacteria differs between cheeses ripened at 6 and 12 °C at least by 1 log. Higher concentrations were found in cheeses ripened at 12 °C. These findings should be taking into account, because the temperature at ripening is subordinated to the rate of biochemical processes in manufacture of a particular cheese variety. Any change has a significant impact on the whole complex of the sensory properties of cheese. By this consideration the different sensory properties in the experimental Krievijas and Holandes cheeses could be explained: taste and flavour, and in Krievijas cheese – also texture.

Isolation of mesophilic lactic acid bacteria from cheeses, and adding them to milk in cheese manufacturing, has been widely studied and practiced recently. Research results are very different, starting from positive effects on cheese quality and up to negative impact on flavour.

Such controversial statements could be explained by the flavour potential of the selected strains and growth facilities of the added strains in cheeses. Recent research results indicate a positive effect of addition of certain strains of lactic acid bacteria species that have been isolated from cheeses. Although this is a promising direction in cheese manufacture, it has not been tried in Latvia yet. Taking into account the nuances of cheese manufacture, additional research is needed in order to introduce application of lactic acid bacteria isolated from cheeses.

Besides the described solutions to ensure the quality of cheeses, in order to slow down activity of non-starter lactic acid bacteria in cheese, and thus eliminating possible defects, it is recommended to control their proportion in milk by limitation of count of the colony forming units of non-starter lactic acid bacteria in milk, or practise milk termization if milk is intended for storage longer than 12h. The

critical limits of mesophilic non-starter lactic acid bacteria as stated in different countries is 10^2 CFU in 1 ml of milk.

As an effort to meet this criteria, high-quality milk is used in cheese manufacturing that diminishes occurrence of potential defects in cheese. Non-starter lactic acid bacteria, especially *L.curvatus*, form biofilms which are resistant to the effect of cleaning and sanitising processes. Presence or prevalence of *L.curvatus* in the analyzed commercial and experimental Krievijas and Holandes cheeses during ripening could also be explained by biofilms on surfaces of the cheese manufacturing equipment. As preventive measures a more often rotation of sanitising detergents or a more regular control of the presence of biofilms on equipments surfaces is recommended.

The mentioned measures can help to raise competitiveness of Krievijas and Holandes cheeses and ensure unchangeable quality of the product.

CONCLUSIONS

1. In Holandes and Krievijas cheeses manufactured at Latvian dairy enterprises identified invariable facultatively heterofermentative species of *Lactobacillus* genus.
2. *L.paracasei* subsp. *paracasei* 1 and *L.paracasei* subsp. *paracasei* 2 were dominant non-starter lactic acid bacteria isolated from **commercial** Holandes cheeses, whereas *L.curvatus* and *L.plantarum* 2 were dominant species in commercial Krievijas cheeses. In analysed commercial cheeses more often identified association of non-starter lactic acid bacteria rather than dominance of single species.
3. *L.paracasei* subsp. *paracasei*, *L.plantarum*, *L.curvatus* and *L.rhamnosus* were dominant non-starter lactic acid bacteria isolated from **experimental** Holandes cheeses, whereas *L.curvatus*, *L.paracasei* subsp. *paracasei*, *L.plantarum* and *Leu.lactis* were prevalence species in experimental Krievijas cheeses.
4. Identified *Lactobacillus* spp. and *Leu.lactis* well-adapted to variable parameters of cheese ripening, and their population and growth rate are dependant on diversity of substrate in cheeses.
5. The prevalence species of non-starter lactic acid bacteria in experimental cheeses varies during ripening and at the end of ripening were represented by one species of *Lactobacillus* genus, more often *L.curvatus*, *L.paracasei* subsp. *paracasei* or *L.plantarum*.
6. Diversity of lactic acid bacteria species in experimental Krievijas and Holandes cheeses depends on selected ripening temperature and time. Representatives of *Lactobacillus* genus and its colony forming units differs between same variety cheeses manufactured at different plants. This proved the hypothesis created in the doctoral thesis that manufacturing and ripening conditions at cheese plant have significant impact on the diversity of microflora.
7. Composition of detected aroma compounds was not differ between experimental same variety cheeses, but their concentrations depend

on starter type, the initial microflora of cheese, and selected ripening temperature and time.

8. Greater concentration of butan-2-ol, butan-2-one and methional in cheeses was formed by non-starter lactic acid bacteria, also 3-methylbutanal and dimethyltrisulfide originated from action of non-starter lactic acid bacteria. The concentrations of these compounds impart cheeses with different flavour notes.
9. The close correlation was determined between changes of pH, a_w and elasticity in experimental Krievijas and Holandes cheeses. This indicates intensity of biochemical and microbiological processes during ripening.
10. Attenuated starter with a higher proteolytic and lipolytic activity have not significantly affected on the activity of non-starter lactic acid bacteria although increase in pH dynamics, count of colony forming units, growth rate and diversity of species of non-starter lactic acid bacteria in Krievijas III and Holandes III cheeses differs from other experimental cheeses.
11. The obtained results does not give rise to evaluate action of non-starter lactic acid bacteria in cheeses negatively. Their impact depends on the species and strain characteristics and count of colony forming units in product.
12. Domination of *L.curvatus* during ripening impart cheese with atypical for these variety flavour notes due to diversity, concentration and combination of aroma compounds. Frequently this occurred in cheese ripened at 6 °C.
13. Recommended cheese ripening temperature - 12 °C for Krievijas and Holandes cheeses, contribute to growth of *L.paracasei* and *L.plantarum*, which improves cheese sensory properties. Individual strains of these species could be used perspective to cheese manufacture, to accelerate ripening, and to enhance sensory properties.