

## SIERU MIKROFLORAS ANALĪZE

### ANALYSIS OF CHEESE MICROFLORA

**Alla Mikelsons, Inga Ciproviča**

LLU, Pārtikas tehnoloģijas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Food Technology, Latvia

[Inga.Ciprovica@llu.lv](mailto:Inga.Ciprovica@llu.lv)

#### ABSTRACT

Cheese microflora consists of starter, secondary and adventitious microorganisms. Adventitious microflora mostly are heterofermentative lactobacilli that originate from raw milk and factory environment. This flora opposite to starter cultures increase during ripening reaching  $10^8$  cfu  $g^{-1}$ , and contribute to the formation of typical desirable or atypical flavour and texture of product. The aim of the paper was to establish diversity and changes in dynamic of *Lactobacillus* spp. during ripening of Krievijas cheese. Three different Krievijas cheeses were chosen for further analysis. Strain identification and counting of colony forming units were made for unripened sample right away after salting, then after 15, 30, 45, and 60 days samples ripened at 6 °C and 12 °C. Serial dilutions of each cheese sample (1:10 000, 1:100 000, and 1 000 000) in saline were made. *Lactobacillus* was cultivated using MRS media. Strain identification was performed by the API 50 CHL system (BioMerieux, Marey l'Etoile, France). Analysis were accomplished for unripened sample then after 15, 30, 45 and 60 days of ripening. Isolates were grouped by gram reaction by the 3% KOH method and catalase reaction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method. Obtained results shown that all isolated *Lactobacillus* were Gram positive, catalase negative. Diversity of *Lactobacillus* indicated prevalence of *Lactobacillus curvatus* in Krievijas cheese. Moreover *Lactobacillus plantarum* 1, *L.delbrueckii* ssp. *lactis* 1, *L. acidophilus* 3, *Leuconostoc lactis* were isolated from Krievijas cheese samples. *Lactobacillus plantarum* 1 was isolated only from samples ripened at 12°C. Concentration of colony forming units after 60 days of ripening is higher in cheese ripened at 6°C.

**KEY WORDS:** cheese, API, *Lactobacillus* spp., ripening condition.

#### IEVADS

Sieru mikroflora ir ļoti daudzveidīga, tās sastāvā ietilpst pienskābes baktēriju ieraugi, sekundārā un netipiskā mikroflora. Ieraugu un sekundāro mikrofloru pievieno pienam, lai attiecīgajai siera šķirnei nodrošinātu garšas, smaržas un konsistences īpašības. Savukārt netipiskā mikroflora nonāk produktā ar izejvielu un tālāk jebkurā pārstrādes procesā, sieram saskaroties ar gaisu, tehnoloģiskajām iekārtām, sālījumu, u.c., būtiski ietekmējot tā kvalitāti. Siera mikrofloras raksturīgākie pārstāvji apkopoti 1.tabulā.

**Siera mikrofloras raksturīgākie pārstāvji**  
**Typical representatives of cheese microflora (Stiles, Holzappel, 1997)**

Ierauga mikroflora	Sekundārā mikroflora	Netipiskā mikroflora
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>	<i>shermanii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Penicillium camamberti</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Pencillium roqueforti</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Candida valida</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
		<i>Pediococcus spp.</i>

Mikrofloras daudzveidība un attīstības intensitāte sieros ir atkarīga no ūdens aktivitātes ( $a_w$ ), sāls satura, pH, nogatavināšanas temperatūras, red-oks potenciāla un nitrātu/nitrītu satura. Ierauga mikrofloras dzīvotspēju sieros nosaka laktozes saturs, līdz ar tās pārraudzēšanu samazinās ierauga sastāvā esošo *Lactococcus spp.* un *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus spp.*, u.c. pienskābes baktēriju dzīvotspēja un paātrinās šūnu atmiršanas process. Sieru mikroflorā dominējošās kļūst netipiskās pienskābes baktērijas. Netipisko pienskābes baktēriju koncentrācija no  $10^2$  KVV  $g^{-1}$  nogatavināšanas sākumā sasniedz  $10^{8-9}$  KVV  $g^{-1}$  pāris nedēļu laikā (Fox et al., 1998).

Lai gan netipiskās pienskābes baktērijas ir homofermentatīvas, fakultatīvi heterofermentatīvas un obligāti heterofermentatīvas, dominējošie netipisko pienskābes baktēriju pārstāvji sieros pieder pie fakultatīvi heterofermentatīvajiem. Tie laktozi pārraudzē glikolītiskā ceļā, bet glikonskābi utilizē fruktozes 6-fosfoketolāzes ceļā. Visbiežāk no sieriem izolē *L.casei*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.rhamnosus* un *L.curvatus* (Coppola et al., 1997, Fitzsimons et al., 1999). Sugu pārstāvniecība mainās nogatavināšanas laikā. Jaunos sieros dominē *L.paracasei*, *L.plantarum* un *L.brevis*, bet nogatavinātos *L.paracasei*, u.c.

Analizējot mazumtirdzniecībā iegādājamus Latvijas uzņēmumos ražotos Krievijas sierus, tajos noteikts *L.curvatus* vai *L.curvatus* un *L.plantarum*, vai *L.curvatus* un *L.acidophilus* asociācijas (Miķelsone, Ciproviča, 2009). Katram sieram ir sava raksturīgā mikroflora, pat vienas šķirnes dažādu ražotāju sieriem mikrofloras sastāvs varbūt atšķirīgs.

Zinātniskajā literatūrā diskusijas par mezofīlo pienskābes baktēriju, pie kurām pieder gan ierauga, gan netipiskās, augšanas dinamiku un sasaisti ar laktozes saturu sierā tiek nepārtraukti turpinātas. Kā minēts iepriekš, nogatavināšanas sākumā (līdz 15. dienai) laktozi pilnībā pārraudzē ierauga mikroflora (Turner, Thomas, 1980). Samazinoties laktozes saturam, ierauga mikroorganismi pamazām atmirst, tajā pat laikā mezofīlie netipisko pienskābes baktēriju pārstāvji turpina vairoties. Tas nozīmē, ka sierā ir citi šo mikroorganismu augšanai pieejamie substrāti. Netipisko pienskābes baktēriju enerģijas avoti ir no glikomakropeptīdiem atvasināti cukuri un tauku lodīšu apvalkos esošie glikoproteīni (Fox et al., 1998; Williams et al., 2000). Arī riboze, kas atbrīvojas ierauga šūnu atmiršanas rezultātā, ir jāuzskata par netipiskās mikrofloras enerģijas avotu (Thomas, 1987; Rapposch et al., 1999). Citi autori (Lane et al., 1997) uzskata, ka šūnu lizāts nav galvenais netipiskās mikrofloras barības avots un ir apstiprinājumi, ka tā nemaz nav spējīga utilizēt ribozi. Pie citiem sierā esošajiem netipisko pienskābes baktēriju augšanas substrātiem tiek minēti citrāti un arginīns. Vērojot daudzveidīgo

netipisko pienskābes baktēriju pārstāvniecību sieros, to augšanai piemērotos apstākļus un barības vielu pieejamību, jautājums par to lomu sieru kvalitātes veidošanā aktuāls ir katram sieru ražotājam. Tāpēc vienīgais veids kā nodrošināt sieru kvalitāti, ir apzināt sieru mikrofloras raksturīgākos pārstāvjus, to mainību nogatavināšanas laikā un analizēt proteolīzes, lipolīzes un glikolīzes produktus, saistot ar sieru sensorajām īpašībām. Līdz ar to pētnieciskā darba mērķis bija noskaidrot Krievijas siera mikrofloras mainību nogatavināšanas laikā.

## MATERIĀLS UN METODE

Pētījumiem izvēlēti Latvijā ražotie Krievijas siera paraugi ar 2.tabulā dotajiem kvalitātes rādītājiem.

2.tabula/Table 2

### Analizēto sieru kvalitātes rādītāji Quality parameters of analysed cheese

Siers Cheese	Tauku saturs sausnā, % Fat in dry matter, %	Ūdens saturs, % Moisture content, %	Sāls saturs, % Salt content, %	<i>E.coli</i> , KVV g <sup>-1</sup> <i>E.coli</i> , CFU g <sup>-1</sup> *
Krievijas siers I / Krievijas cheese I	50±3	40-44	1.0-1.6	m≤100 M<1000 KVV g <sup>-1</sup> n=5, c=2
Krievijas siers II / Krievijas cheese II	50±2	≤43	≤1.8	
Krievijas siers III / Krievijas cheese III**	50±3	40-44	1.0-1.6	

\*- *Eiropas Padomes un Parlamenta Regula 2073/2005*

\*\*- *ierauga sastāvs papildināts ar pienskābes baktēriju sugām (Lactococcus lactis subsp.lactis, Lactococcus lactis subsp.cremoris), kurām ir lielāka lipolītiskā un proteolītiskā aktivitāte*

Krievijas siers gatavots atbilstoši uzņēmumu normatīvi-tehniskajā dokumentācijā noteiktajām prasībām. Pētījumiem izmantoti 3 nenogatavināta siera paraugi. Siera paraugi laboratorijā nogādāti tajā pašā dienā, kad izņemti no sālījuma un apžāvēti. Saņemtie paraugi analizēti uzreiz un tālāk pārvietoti nogatavināšanai, iepakojot polimēra materiāla plēvē. Siers nogatavināts LLU Pārtikas tehnoloģijas katedras laboratorijās, izvēloties 2 nogatavināšanas režīmus 6°C un 12°C temperatūrā un 75-85% relatīvajā mitrumā. Nogatavināšanas temperatūras izvēlētas, pamatojoties uz normatīvi-tehniskajā dokumentācijā noteiktajiem parametriem, kā arī, lai modelētu iespējamās mikrofloras sastāva izmaiņas šajā laikā.

Paraugi analizēti nogatavināšanas sākumā un tālāk ik pēc 15 dienām 60 dienu laikā. Sieri nogatavināti 60 dienas, atbilstoši Krievijas sieru nogatavināšanas režīmu un ilguma rekomendācijām. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaits noteikts, lietojot MRS barotni. Sagatavotie paraugi, šādās atšķaidījuma pakāpēs 1:10 000, 1: 100 000, 1:1 000 000, inkubēti 37°C 48 h. Izaugušās kolonijas mikroskopētas, ar mērķi izdalīt tīrkultūras veidošanai raksturīgākos pārstāvjus. Tīrkultūras pavairošana veikta 37°C 48 h.

Līdzās veiktajiem izmeklējumiem, veikts krāsojums pēc Grama, lietojot Gregersena metodi, un katalāzes tests ar 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Lactobacillus* ģints sugu identifikācija veikta, lietojot API 50 CHL testu (Bio Merieux, Mareyl'Etoile, Francija), pamatojoties uz fermentējamo substrātu krāsu reakcijām un to profilu analīzi. Sugas noteikšanai lietota API LAB plus version 4.0 (Bio Merieux) programma. Visas analīzes veiktas 3 atkārtojumos katrai atšķaidījumu sērijai.

## REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Krievijas siera ražošanā tiek lietots mezofilo pienskābes baktēriju ieraugs (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*). Pamatojoties uz siera ražošanas īpatnībām, pievienojot vairāk ierauga, intensificējot pienskābo rūgšanu siera graudu apstrādes laikā un paildinot siera izturēšanu starp presēšanu un sālīšanu, laktoze tiek pārraudzēta 2-3 nogatavināšanas dienu laikā. Nogatavināšanas sākumā strauji sarūk ierauga pienskābes baktēriju koncentrācija, atbrīvojot ceļu netipisko pienskābes baktēriju vairošanai. Netipisko pienskābes baktēriju kvantitāte, augšanas ātrums un sugu daudzveidība ir atkarīga gan no piena mikrofloras, tehnoloģiskā procesa režīmiem un nogatavināšanas apstākļiem siera ražošanā. 3. un 4.tabulā ir apkopotas no Krievijas sieriem izdalītās pienskābes baktēriju sugas.

3.tabula/Table 3

### Krievijas siera paraugu mikrofloras analīze, nogatavinot to 60C temperatūrā Microflora analysis of Krievijas cheese ripened at 60C

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>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
15 dienas / 15 days	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp.lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>delbrueckii</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
30 dienas / 30 days	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i>
45 dienas / 45 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>bulgaricus</i>
60 dienas / 60 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp. lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>

**Krievijas siera paraugu mikrofloras analīze, nogatavinot to 12oC temperatūrā**  
**Microflora analysis of Krievijas cheese ripened at 12oC**

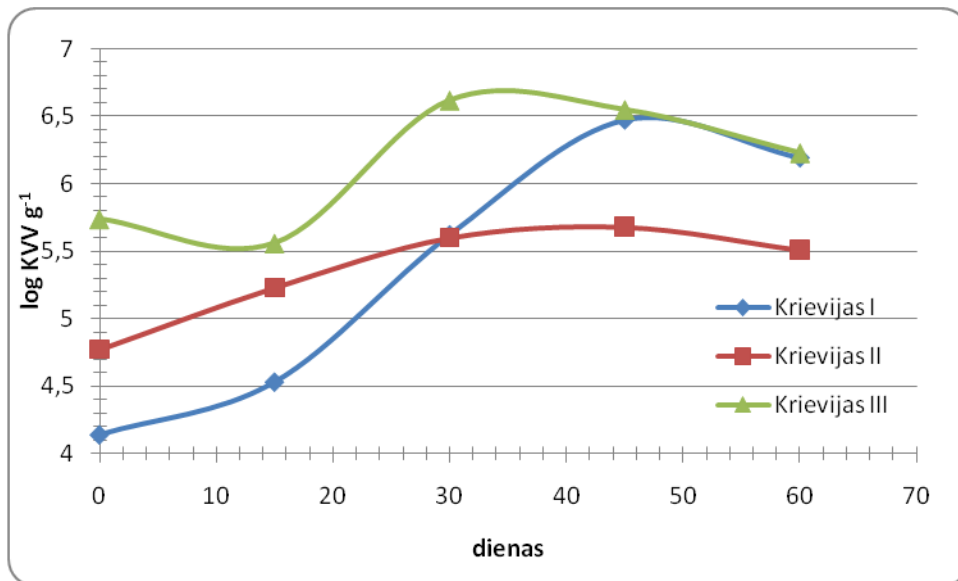
Nogatavināšanas ilgums, dienas Ripening time, days	Krievijas siers I Krievijas cheese I	Krievijas siers II Krievijas cheese II	Krievijas siers III Krievijas cheese III
Nenogatavināts / Unripened	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp.lactis 1</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 1</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. lactis 2</i> <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus 3</i>
15 dienas / 15 days	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
30 dienas / 30 days			<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii ssp.</i> <i>delbrueckii</i>
45 dienas / 45 days		<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Leuconostoc lactis</i>
60 dienas / 60 days		<i>Lactobacillus</i> <i>curvatus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum 1</i>	

Analizētajos paraugos ir novērota pienskābes baktēriju sugu mainība, piemēram, Krievijas sieros I un II līdz 30 dienām, nogatavinot tos 6°C temperatūrā, un līdz 15 dienām, nogatavinot 12°C temperatūrā. Pēc minētā nogatavināšanas laika sieros dominēja *Lactobacillus curvatus* un *Lactobacillus plantarum 1*. Tas sasauca ar Fitzsimons un līdzautoru (2001) un Williams un līdzautoru (2002) pētījumu atziņām, ka nogatavināšanas laikā novērojama netipisko pienskābes baktēriju sugu mainība, bet sieros nogatavināšanas beigās ir pārstāvēta tikai viena *Lactobacillus* ģints suga.

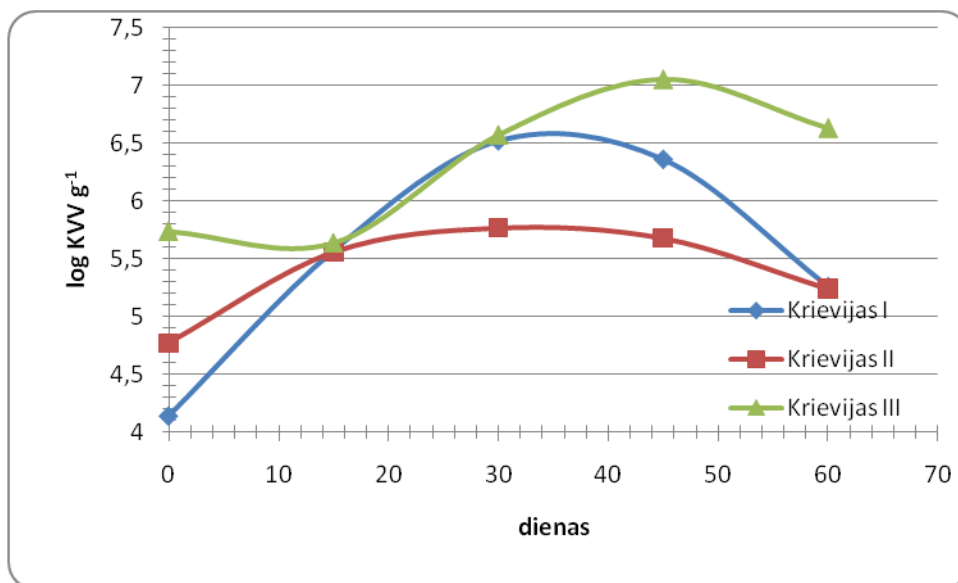
Atšķirīga situācija vērojama Krievijas siera III analīzē, nogatavinot paraugus 6°C. Redzam, ka *Leuconostoc lactis* pamazām izkonkurē *Lactobacillus acidophilus 3* un *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis 1*. Sugu daudzveidību šajā sierā ir jāskaidro ar izmainīto ieraugu sastāvu un īpašībām, jo šī produkta ražošanā lietotajam ieraugam sastāvs ir papildināts ar pienskābes baktēriju sugām, kurām ir lielāka proteolītiskā un lipolītiskā aktivitāte.

Arī 12°C temperatūrā nogatavinot Krievijas siera III paraugus, var novērot, ka *Leuconostoc lactis* saglabā savu dzīvotspēju visu sieru nogatavināšanas laiku, bet konkurencē par pastāvēšanu *Lactobacillus acidophilus 3*, *Lactobacillus brevis* un *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* zaudē pozīcijas, ļaujot nostiprināties *Lactobacillus curvatus* domināncei.

Sugu mainību (3.4. tabula) un mikrofloras kvantitāti raksturo pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita dati, kas apkopoti 1. un 2.attēlā.



1.attēls. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo baktēriju skaita izmaiņu dinamika, nogatavinot sierus 6°C temperatūrā  
 Figure 1. The dynamic of colony forming units changes in cheese ripened at 6°C



2.attēls. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo baktēriju skaita izmaiņu dinamika, nogatavinot sierus 12°C temperatūrā  
 Figure 2. The dynamic of colony forming units changes in cheese ripened at 12°C

Nogatavinot Krievijas sieru 6°C temperatūrā, *Lactobacillus ssp.* maksimālo koloniju veidojošo vienību skaitu sasniedza ap 45.dienu, izņemot Krievijas sieru III, kurā pienskābes baktēriju maksimālā koncentrācija tiek sasniegta ap 30.dienu. 12°C nogatavinātajā Krievijas sierā I un II *Lactobacillus ssp.* augstāko skaitu sasniedz ap 30.nogatavināšanas dienu, bet Krievijas sierā III pienskābes baktēriju intensīva augšana turpinājās līdz 45.dienai. Pienskābes baktēriju koloniju veidojošo vienību skaita izmaiņas paraugos parāda, ka to pieaugums ir atkarīgs no nogatavināšanas temperatūras (Folkertsma et al., 1996), ierauga sastāva un tā īpašībām.

## SECINĀJUMI

1. Analizētajos Krievijas sieru I, II un III paraugos nogatavināšanas beigās ir novērojama tendence dominēt vienai no *Lactobacillus* ģints sugām.
2. Sieru mikrofloras sastāvs ir atkarīgs no nogatavināšanas temperatūras.
3. Ierauga sastāvs un pilnveidotās tā funkcijas sieru mikrofloras kvalitatīvo sastāvu būtiski ( $p \leq 0.05$ ) ietekmēt nespēj.

## LITERATŪRA

1. Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Grazia, L. Survey of lactic acid bacteria during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggano cheese. - Journal of Dairy Research. 1997; 64: 305-310.
2. Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic bacteria in mature Cheddar cheese. - Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65: 3418-3426.
3. Folkertsma, B., Fox, P.E., McSweeney, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. - International Dairy Journal. 1996; 6:1117-1134.
4. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Lynch, C.M. Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. - Australian Journal of Dairy Technology. 1998; 53: 83-89.
5. Lane, C.N., Fox, P.F., Walsh, E.M., Folkertsma, B., McSweeney, P.L.H. Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. - Lait. 1997; 77: 561-573.
6. Miķelsons, A., Ciproviča, I. Diversity of non starter lactic acid bacteria in Latvian semi hard cheeses. - Annual 15th International Scientific Conference Proceedings „Research for rural development 2009”. 2009; 15: 103-107.
7. Rapposch, S., Eliskases-Lechner, F., Ginzinger W. Growth of facultatively heterofermentative lactobacilli on starter cell suspensions. - Applied Environmental Microbiology. 1999; 65: 5597-5599.
8. Stiles, M.E., Holzappel, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. - International Journal of Food Microbiology. 1997; 36: 1-29.
9. Thomas, T.D. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. - New Zealand Journal of Dairy Science and Technology. 1987; 22: 25- 38.
10. Turner, K.W., Thomas, T.D. Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. - New Zealand Journal of Dairy Science and Technology. 1980; 15: 265-276.
11. Williams, A.G., Withers, S.E., Banks, J.M. Energy source of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. - International Dairy Journal. 2000; 10: 17-23.