



MD 190 Y 2010.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **190** ⁽¹³⁾ **Y**
(51) Int. Cl.: *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 13/14 (2006.01)
A23C 13/16 (2006.01)
A23J 3/16 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2009 0196 (22) Data depozit: 2009.10.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.04.30, BOPI nr. 4/2010
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ "INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE", MD (72) Inventatori: COEV Ghenadie, MD; BUREȚ Elena, MD; ȘVEȚ Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ "INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE", MD (74) Reprezentant: ȘURGALSCHI Ecaterina	

(54) **Procedeu de obținere a masei bacteriene pentru produse lactate acide combinate**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la industria laptelui, și anume la un procedeu de obținere a masei bacteriene pentru produse lactate acide combinate.

Procedeu, conform invenției, include prepararea mediului nutritiv pe baza hidrolizatelor de lapte de vacă degresat și lapte de soia, obținute separat prin hidroliză sub acțiunea unui ferment proteolitic cu filtrarea, diluarea cu apă în raport de 1:1, ajustarea pH până la 7,0...7,2, sterilizarea la temperatura de 121°C timp de 10 min și răcirea ulterioară. După aceasta urmează amestecarea

2
hidrolizatelor de lapte de vacă și de soia în raport de 1:1 cu agitare continuă, adăugarea a 3...5% de amestec de culturi de bacterii lactice *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* în raport de 5:3:2, respectiv, și cultivarea la pH 6,7...6,8 și temperatura de 30°C timp de 8...10 ore.

Revendicări: 3

Descriere:

Invenția se referă la industria laptelui, și anume la un procedeu de obținere a maelei bacteriene pentru produse lactate acide combinate.

5 Crearea maelelor bacteriene pentru fabricarea produselor lactate acide combinate este importantă, deoarece după valoarea lor proteinele de soia, ce intră în componența acestor produse sunt egale cu proteinele de origine animală, se asimilează ușor de organismul omului matur și al copilului și, spre deosebire de laptele de vacă, nu provoacă reacții alergice.

10 Din punct de vedere biochimic procesul de fermentare a laptelui de soia are unele deosebiri față de procesul de fermentare a laptelui de vacă, de aceea selectarea culturilor bacteriene și crearea maelelor pentru produse lactate acide combinate prezintă o problemă permanentă.

15 Este cunoscut procedeul de obținere a maelei bacteriene pentru produse lactate acide, care include prepararea mediului nutritiv în baza hidrolizatului de lapte de soia obținut prin aplicarea pepsinei cu adaos de NaCl, pepton, lactoză, acid ascorbic, înșămânțarea ulterioară cu culturi de bifidobacterii și/sau lactobacterii (speciile *Lactobacillus acidophilus* și *Lactobacillus bulgaricus*) și/sau streptococi lactici (specia *Streptococcus thermophilus*) în cantitate de 5% vol. și cultivarea timp de 18 ore [1].

20 Dezavantajul procedurii constă în faptul că pentru sporirea potențialului nutritiv în mediu se introduc suplimentar mai multe substanțe stimulatoare, iar înșămânțarea mediului se efectuează cu culturi de bifidobacterii și culturi lactice termofile, care cu toate că sunt adaptate și fermentează mediul de soia, nu sunt specifice pentru fabricarea smântânii tradiționale și a laptelui acru, totodată durata de cultivare este îndelungată.

25 Cea mai apropiată soluție este procedeul, care prevede prepararea mediului nutritiv pe baza hidrolizatelor de lapte de vacă obținute prin hidroliză sub acțiunea fermentului proteolitic cu adaos de glucoză, citrat de Na, extract de drojdie, sulfat de Mn, apă; introducerea culturii bacteriene în cantitate de 5%, compusă din tulpini vâscoase de *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. lactis biovar diacetylactis* în proporție de 1:2:2; acumularea celulelor se efectuează cu neutralizarea periodică a mediului timp de 10 ore, apoi urmează separarea biomasei și liofilizarea. Pe lângă aceasta, în momentul introducerii culturii bacteriene și peste 4...6 ore de cultivare în mediu se introduc 0,3...0,5% de extract alcoolic din coji de semințe de floarea-soarelui, care stimulează de 1,4 ori acumularea celulelor peste 10 ore de cultivare în comparație cu mediul de cultură martor. Se obține o maia bacteriană cu titrul 10^7 (50 mln) UFC/cm³ [2].

30 Dezavantajul procedurii constă în compoziția complexă a mediului nutritiv și prepararea lui îngreuiată, cultura de tulpini de bacterii lactice mezofile, specifică pentru smântână și lapte acru, nu este adaptată pentru fermentarea laptelui de soia și titrul maelei bacteriene obținute este relativ mic.

35 Problema pe care o soluționează invenția constă în simplificarea și sporirea eficacității procedurii de obținere a maelei bacteriene cu activitate înaltă pentru fabricarea produselor lactate acide combinate cu calitate maximal apropiată de calitatea produselor tradiționale din lapte de vacă.

40 Soluționarea problemei se realizează prin aceea că procedeul de obținere a maelei bacteriene pentru produse lactate acide combinate include prepararea mediului nutritiv pe baza hidrolizatelor de lapte degresat de vacă și lapte de soia, obținute separat prin hidroliză sub acțiunea unui ferment proteolitic, cu filtrarea, diluarea cu apă în raport de 1:1, ajustarea pH-ului până la 7,0...7,2, sterilizarea la temperatura de 121°C timp de 10 min și răcirea ulterioară, amestecarea hidrolizatelor de lapte de vacă și de soia în raport de 1:1 cu agitare continuă, adăugarea a 3...5% de amestec de culturi de bacterii lactice *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* în raport de 5:3:2, respectiv, și cultivarea la pH-ul 6,7...6,8 și temperatura de 30°C timp de 8...10 ore.

45 Amestecul de culturi de bacterii lactice conține tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis* CNMN - LB - 02, CNMN - LB - 03, CNMN LB - 05, tulpini de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* CNMN - LB - 08, CNMN - LB - 13 și tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB - 04, CNMN - LB - 15 sau tulpini de *Lactococcus lactis ssp. Lactis* CNMN - LB - 18, CNMN - LB - 19, CNMN - LB - 20, tulpini de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* CNMN - LB - 21, CNMN - LB - 22 și tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB - 23, CNMN - LB - 24.

55 Hidroliza se efectuează sub acțiunea pancreatinei luate în cantitate de 2...4 g/dm³, la temperatura de 40°C, timp de 18...24 ore.

60 Rezultatul constă în aceea că utilizarea amestecului natural de hidrolizate de lapte de vacă și lapte de soia pentru obținerea maelei bacteriene permite de a spori titrul de bacterii lactice cultivate, datorită îmbogățirii mediului nutritiv, care se prepară în mod mai simplificat ca urmare a excluderii necesității adăugării diferitor substanțe stimulatoare de creștere a microorganismelor.

La introducerea în mediul pe bază de hidrolizat de lapte de vacă a hidrolizatului de soia, acesta se îmbogățește cu peptide, aminoacizi și hidrocarburi de origine vegetală, cât și cu vitamine și microelemente care stimulează creșterea, totodată bacteriile în prealabil se adaptează la componentele mediului de origine vegetală, pentru fermentarea căruia sunt destinate.

MD 190 Y 2010.04.30

4

Date despre obținerea maiei bacteriene pentru produse lactate acide combinate, care este compusă din culturi mezofile și cultivată în mediu nutritiv pe bază de amestec de hidrolizate de lapte de vacă și lapte de soia, în sursele de informație accesibile n-au fost găsite.

5 Autorii au izolat tulpini de bacterii lactice mezofile din produse lactate acide de fermentație spontană din gospodării țărănești din diferite regiuni ale Republicii Moldova; au stabilit posibilitatea dezvoltării lor în mediu compus din hidrolizate de lapte de soia și lapte de vacă; au fost stabilite regimurile de obținere a hidrolizatelor prin acțiunea fermentului pancreatic, în baza maiei obținute a fost fabricat produsul „smântână combinată” cu calități de smântână tradițională din lapte de vacă.

10 Utilizarea acestei maiei bacteriene permite de a obține produse dietetice cu valoarea nutritivă înaltă, ușor asimilabile, pe care le pot utiliza și persoanele cu reacție negativă la lactoză sau cu probleme de exces de colesterol în organism.

Datele cercetărilor sunt prezentate în tab. 1-3.

Tabelul 1

15

Dinamica multiplicării celulelor de bacterii lactice pe parcursul cultivării în mediu compus (în raport 1:1) din hidrolizate sterile de lapte de vacă și lapte de soia (pH 6,8), inoculat cu 5% cultură, la temperatura de 30°C

Durata de cultivare, ore	Titrul, UFC/cm ³ suspensie culturală
inițial	25 x 10 ⁶
2	50 x 10 ⁶
4	70 x 10 ⁶
6	700 x 10 ⁶
8	11000 x 10 ⁶ (1,1 x 10 ¹⁰)
10	11000 x 10 ⁶ (1,1 x 10 ¹⁰)

20 Din tab. 1 se vede că valoarea maximă a titrului culturii a fost atinsă peste 8 ore de cultivare, constituind 1,1 x 10¹⁰ UFC/cm³. Aceasta demonstrează că cultura s-a dezvoltat și s-a multiplicat, iar titrul a crescut considerabil (de 440 ori). Deci, mediul declarat posedă potențial nutritiv înalt, iar culturile cultivate în acest mediu peste 8 ore ating titrul 1,1 x 10¹⁰ UFC/cm³, care este cu 3 ordine mai sus ca în procedeul luat drept cea mai apropiată soluție (10⁷ UFC/cm³).

25

Tabelul 2

Caracteristicile tehnologice ale maiei bacteriene destinate fabricării produselor lactate (inocul 5%, termostatare 30°C)

Indici	Cerințe tehnologice pentru maiaua bacteriană pentru smântână și lapte acru tradiționale	Caracteristici	
		în mediu de lapte de vacă integral pasteurizat	în mediu de amestec de lapte de vacă integral cu lapte de soia pasteurizate
Durata de formare a coagulului, ore	max. 7	7,0	6,5
Aspectul, consistența coagulului	Omogen, consistență moderat de densă, cremoasă nu se sparge la scuturare	Omogen, consistență moderat de densă, cremoasă nu se sparge la scuturare	Omogen, consistență moderat de densă, cremoasă nu se sparge la scuturare
Gustul, mirosul coagulului	Omogen, consistență moderat de densă, cremoasă nu se sparge la scuturare	Curat de lapte fermentat	Curat de lapte fermentat, cu miros ușor și plăcut de soia
Aciditatea titrabilă, °T	75...90	80...81	78...79
Sinereza (eliminarea zerului prin centrifugare), ml	max. 2,5	2,2	2,5
Aromogeneza (diacetil+acetoină după reacția bazică fără creatină; apariția culorii roz) min	max. 25	23	25
Aspectul microscopic al celulelor	Coci, diplococi separați și în lanțuri scurte, medii și lungi	Coci, diplococi separați și în lanțuri scurte, medii și lungi	Coci, diplococi separați și în lanțuri scurte, medii și lungi

30

MD 190 Y 2010.04.30

5

Din tab. 2 se vede că maiaua bacteriană demonstrează activitate tehnologică înaltă atât în mediul pe bază de lapte de vacă integral, cât și în mediul pe bază de amestec pasteurizat de lapte de vacă integral și lapte de soia și posedă caracteristici ce corespund cerințelor tehnologice pentru maielele tradițional utilizate la producerea smântânii și laptelui acru obținute din lapte de vacă.

5 Excepție prezintă gustul și mirosul ușor, plăcut de soia ceea ce este normal pentru un produs combinat.

Activitatea tehnologică a combinațiilor privind obținerea smântânii din amestec de lapte de vacă și lapte de soia a fost încercată în amestec compus din lapte de vacă integral pasteurizat și lapte de soia pasteurizat (în raport de 1:1), normalizat la conținutul de grăsimi lactice de 10%, inoculat cu

10 2% de cultură, termostatat la 30°C.

Caracteristicile și indicii smântânii obținute din lapte de vacă sunt prezentați în tab. 3.

Tabelul 3

Indici	Caracteristici	
	Smântână combinată (din amestec de lapte de vacă și lapte de soia)	Smântână (din lapte de vacă), cerințe tehnologice
Durata de coagulare, ore	12	12...16
Aspectul coagulului (produsului)	Omogen, moderat de dens, smantanos, fin, nu este vascos	Omogen, dens până la moderat, se admite puțină vâscozitate și granulozitate neînsemnată
Gustul și mirosul	Curat de lapte fermentat, specific pentru smântână, cu miros ușor și plăcut de soia	Gust de lapte fermentat specific pentru smântână
Aciditatea titrabilă, °T	88	60...90
Fracția masică de grăsime, %	10	10
Conținutul de microorganisme lactice în 1 cm ³ de produs, UFC	1 x 10 ⁸	min. 1 x 10 ⁶

15 Din tab. 3 este evident că, în general, caracteristicile produsului obținut – smântână combinată, corespund cerințelor tehnologice pentru smântână de lapte de vacă. La smântâna combinată se menționează un coagul mai fin; pe lângă gustul de lapte fermentat se mai simte un gust și un miros ușor și plăcut de soia, ceea ce este normal pentru un produs combinat.

Exemple concrete de realizare

20 *Exemplul 1*

Mediul nutritiv se prepară în modul următor: se efectuează hidroliza laptelui degresat de vacă și a laptelui de soia în procese separate sub acțiunea pancreatinei, introdusă în cantitate de 2...4 g/dm³, timp de 21...24 ore. Apoi hidrolizatele se diluează cu apă distilată în raport de 1:1, se ajustează până la pH-ul 7,2, se sterilizează la temperatura de 121°C timp de 10 min, se răcesc și se introduc în condiții aseptice în vasul de cultivare, câte 500 ml în fiecare, în total 1000 ml de mediu, se agită continuu (viteza de 200 rot./min). Mediul se încălzește până la temperatura de cultivare de 30°C, apoi se introduc 5% (50 cm³) de amestec de culturi de bacterii lactice mezofile *Lactococcus lactis ssp.lactis* CNMN - LB - 02, CNMN - LB - 03, CNMN LB - 05, *Lactococcus lactis ssp.cremoris* CNMN - LB -08, CNMN - LB - 13, *Lactococcus lactis ssp.lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB- 04, CNMN - LB -15 în raport de 5:3:2, respectiv, ca rezultat pH-ul mediului scade până la 6,7, care se menține în continuu prin injectarea periodică (automată) a soluției bazice NaOH (20%). Activitatea și productivitatea culturii în procesul de cultivare se determină prin măsurarea densității optice la intervale de 2 ore pe parcursul cultivării (valori ce corespund anumitor titre – UFC/cm³, determinate prin măsurarea densității optice și paralel însămânțarea periodică a probelor

25 de suspensie prelevate și calcularea numărului de celule viabile în 1cm³ de suspensie, după metoda celui mai probabil număr, conform GOST 10444.11), până la obținerea titrului de 10¹⁰ UFC/cm³ timp de 8 ore.

Exemplul 2

Mediul nutritiv este compus și se prepară în același mod ca în exemplul 1. În mediul nutritiv se introduc 3% (30 cm³) de cultură de bacterii lactice mezofile *Lactococcus lactis ssp.lactis* CNMN - LB - 18, CNMN - LB - 19, CNMN - LB - 20, *Lactococcus lactis ssp.cremoris* CNMN - LB -21, CNMN - LB - 22 *Lactococcus lactis ssp.lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB - 23, CNMN - LB - 24 în raport de 5:3:2, respectiv, ca rezultat pH-ul mediului scade până la 6,8 și este menținut pe parcursul cultivării, conform exemplului 1. Cultivarea se efectuează până la obținerea titrului de

40 10¹⁰ UFC/cm³ timp de 10 ore.

MD 190 Y 2010.04.30

6

(57) Revendicări:

1. Procedeu de obținere a masei bacteriene pentru produse lactate acide combinate, care include prepararea mediului nutritiv pe baza hidrolizatelor de lapte de vacă degresat și lapte de soia, obținute separat prin hidroliză sub acțiunea unui ferment proteolitic, cu filtrarea, diluarea cu apă în raport de 1:1, ajustarea pH până la 7,0...7,2, sterilizarea la temperatura de 121°C timp de 10 min și răcirea ulterioară, amestecarea hidrolizatelor de lapte de vacă și de soia în raport de 1:1 cu agitare continuă, adăugarea a 3...5% de amestec de culturi de bacterii lactice *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* în raport de 5:3:2, respectiv, și cultivarea la pH 6,7...6,8 și temperatura de 30°C timp de 8...10 ore.

2. Procedeu, conform revendicării 1, în care amestecul de culturi de bacterii lactice conține tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis* CNMN - LB - 02, CNMN - LB - 03, CNMN LB - 05, tulpini de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* CNMN - LB - 08, CNMN - LB - 13 și tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB - 04, CNMN - LB - 15 sau tulpini de *Lactococcus lactis ssp. Lactis* CNMN - LB - 18, CNMN - LB - 19, CNMN - LB - 20, tulpini de *Lactococcus lactis ssp. cremoris* CNMN - LB - 21, CNMN - LB - 22 și tulpini de *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* CNMN - LB - 23, CNMN - LB - 24.

3. Procedeu, conform revendicării 1, în care hidroliza se efectuează sub acțiunea pancreatinei luate în cantitate de 2...4 g/dm³, la temperatura de 40°C, timp de 18...24 ore.

(56) Referințe bibliografice:

1. RU 2169472 C2 2000.11.27
2. SU 151 03350 A1 1996.01.20

Director adjunct Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

pentru cerere de brevet de invenție de scurtă durată conform art.52(2) a Legii nr. 50/2008

(21) Nr. depozit: s 2009 0196		
(22) Data depozit: 2009.10.19		
(51) IPC: Int. Cl.: C12N 1/20 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01) A23C 13/14 (2006.01) A23C 13/16 (2006.01) A23J 3/16 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Procedeu de obținere a masei bacteriene pentru produse lactate acide combinate (71) Solicitantul: INSTITUȚIA PUBLICĂ "INSTITUTUL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE HORTICULTURĂ ȘI TEHNOLOGII ALIMENTARE", MD		
I. Condiția de unitate a invenției ☐ satisface ☐ nu satisface. Notă:		
II. Minimul de documente consultate: MD, EA		
III. Domeniul de documentare: Indicii IPC (ultima redacție): Int. Cl.: C12N 1/20 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01) A23C 13/14 (2006.01) A23C 13/16 (2006.01) a) A23J 3/16 (2006.01) b) Termeni caracteristici, cuvinte-cheie, sinonime: hidrolizat de lapte de vaca, hidrolizat de lapte de soia, bacterii mezofile, гидролизат коровьего молока, гидролизат соевого молока, мезофильные бактерии		
IV. Documente considerate a fi relevante		
Categoria	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Relevant față de revendicarea nr.
A	MD 2969 G2 2006.10.31	1-3
A	MD 145 Y 2010.02.28	1-3
A	MD 1541 G2 2000.09.30	1-3
A	RU 2169472 C2 2000.11.27	1-3
A	SU 151 03350 A1 1996.01.20	1-3
Categorii de documente citate		
A - document care definește stadiul anterior în general		O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere etc.
X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care fundamentează invenția
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după această dată		D - Document menționat în descrierea cererii de brevet
Data finalizării documentării 2010.02.15		
Examinatorul Colesnic Inesa		