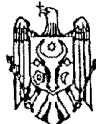




MD 2969 F1 2006.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 2969 (13) F1  
(51) Int. Cl.: A23C 9/12 (2006.01); C12N 1/02 (2006.01)  
C12N 11/02 (2006.01); C12N 11/14 (2006.01)  
C12R 1/225 (2006.01); C12R 1/46 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<b>Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării</b>	
(21) Nr. depozit: a 2004 0245 (22) Data depozit: 2004.10.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  2006.02.28, BOPI nr. 2/2006
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: AZZOUZ Abdelkrim, RO; SAJIN Tudor, MD; NISTOR Ileana Denisa, RO; CRĂCIUN Alexandru, MD; DUCA Gheorghe, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice (variante)

(57) Rezumat:

1 Invenția se referă la industria laptelui, în particular la un procedeu de cultivare a bacteriilor lactice.

Procedeul de cultivare a bacteriilor lactice include pregătirea mediului de cultură, care conține lapte sterilizat și răcit până la temperatura de înșămânțare, adăugarea în mediul pregătit a culturii de bacterii lactice, cultivarea și separarea lor. Pentru înșămânțare se utilizează bacterii lactice, crescute pe un mediu nutritiv ce constă din iaurt: lapte pasteurizat sau din lapte bătut: lapte de vacă proaspăt pasteurizat, luate în raportul de volum de 1:10, și liofilizate, care se adaugă în mediul de cultură prin agitare la temperatură constantă, după aceea, conform primei variante, mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, cultivarea bacteriilor lactice se efectuează la temperatura de 36...40°C timp de 2...3 ore cu eliminarea acidului lactic format prin eluție continuă în fază apoasă mobilă, care se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat și după separarea acidului lactic de faza apoasă se returnează în mediul de cultură.

Procedeul de cultivare a bacteriilor lactice conform variantei a doua include introducerea în mediul de

2 cultură a unui agent bazic cu grad de puritate alimentară, insolubil în el, care în perioada cultivării fixează  
5 continuu acidul lactic format în mediul de cultură cu realizarea continuă a ciclului de introducere, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic.

Procedeul de cultivare a bacteriilor lactice conform variantei a treia include imersarea în mediul de cultură a  
10 unei matrice solide insolubile din rășini schimbătoare de anioni, completate cu grupări OH schimbabile, de tipul R<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>, cu care, în perioada de cultivare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a rășinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, se fixează  
15 continuu anionul lactic, iar cu gruparea OH liberă se realizează neutralizarea concomitentă a protonului cu formarea fazei apoase, care se separă de mediul de cultură cu extragerea și separarea ulterioară a acidului lactic.

Revendicări: 8  
Figuri: 3

MD 2969 F1 2006.02.28

## MD 2969 F1 2006.02.28

3

### Descriere:

Invenția se referă la industria laptelui, în particular la un procedeu de cultivare a bacteriilor lactice.

Procedeele de dezvoltare a culturilor pentru producerea produselor acido-lactice sunt, în general, aceleași pentru toate aceste produse, având la bază metoda clasică, variind numai condițiile de termostatare în faza de fermentare a mediului de cultură în funcție de componența microbiologică a culturii dorite a fi selecționată [1].

Dezavantajele acestor procedee de cultivare a bacteriilor lactice constau în dificultatea de a menține compoziția mediului de cultură optimă și stabilă. Compoziția mediului se modifică în timp pe măsura consumării substanțelor nutritive de către microorganisme și în urma formării metabolice de noi substanțe.

Procedeu clasic de cultivare a bacteriilor lactice care servește ca cea mai apropiată soluție constă în sterilizarea (pasteurizarea) laptelui la temperatura de 63...72°C timp de 0,5 h, răcirea laptelui până la temperatura de însămânțare (40...48°C) timp de 0,25...0,50 h, adăugarea în lapte a culturii liofilizate de însămânțare, cultivarea bacteriilor la temperatura de 36...40°C și separarea lor [2].

Din punct de vedere tehnologic, cultivarea bacteriilor lactice este inhibată de două procese:

- 1) creșterea progresivă a pH-ului în mediul de cultură, urmată de conversia lactozei în acid lactic;
- 2) acumularea de grupe lactice.

Aceste două procese conjugate au un efect nefast asupra randamentului de creștere și dezvoltare celulară.

În procedeele cunoscute nu se elimină anionul lactic, principalul inhibitor al dezvoltării celulare.

Astfel, dezavantajele procedeuului clasic sunt pierderile mari de bacterii în procesul fermentativ și productivitatea redusă de bacterii lactice, care are drept consecință reducerea ritmului de creștere a bacteriilor și creșterea prețului de cost al culturilor finale selecționate. Prin urmare, conform datelor statistice de laborator creșterea bacteriilor lactice de la concentrația inițială de 5...50 celule/cm<sup>3</sup> până la concentrația finală de 20...30 milioane celule/cm<sup>3</sup> durează 8...12 h.

Problema pe care o soluționează grupul propus de invenții constă în elaborarea unei tehnologii de cultivare a bacteriilor lactice, care să asigure un ritm înalt de creștere a lor în timpul procesului fermentativ și să reducă considerabil prețul de cost al culturilor finale selecționate.

Problema abordată se soluționează prin realizarea procedeuului de cultivare a bacteriilor lactice ce include pregătirea mediului de cultură, care conține lapte sterilizat și răcit până la temperatura de însămânțare, adăugarea în mediul pregătit a culturii de bacterii lactice, cultivarea și separarea lor. Pentru însămânțare se utilizează bacterii lactice, crescute pe un mediu nutritiv ce constă din iaurt: lapte pasteurizat sau din lapte bătut: lapte de vacă proaspăt pasteurizat, luate în raportul de volum de 1:10, și liofilizate, care se adaugă în mediul de cultură prin agitare la temperatură constantă, după aceea, conform primei variante, mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, cultivarea bacteriilor lactice se efectuează la temperatura de 36...40°C timp de 2...3 ore cu eliminarea acidului lactic format prin eluție continuă în fază apoasă mobilă, care se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat și după separarea acidului lactic de faza apoasă se returnează în mediul de cultură.

Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice conform variantei a doua include introducerea în mediul de cultură a unui agent bazic cu grad de puritate alimentară, insolubil în el, care în perioada cultivării fixează continuu acidul lactic format în mediul de cultură cu realizarea continuă a ciclului de introducere, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic.

Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice conform variantei a treia include imersarea în mediul de cultură a unei matrice solide insolubile din rășini schimbătoare de anioni, completate cu grupări OH<sup>-</sup> schimbabile, de tipul R<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>, cu care, în perioada de cultivare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a rășinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, se fixează continuu anionul lactic, iar cu gruparea OH<sup>-</sup> liberă se realizează neutralizarea concomitentă a protonului cu formarea fazei apoase, care se separă de mediul de cultură cu extragerea și separarea ulterioară a acidului lactic.

În toate aceste variante, procedeu de fermentare se realizează timp de 2...3 h.

Rezultatul obținut prin realizarea grupului propus de invenții constă în:

- reducerea de 4 ori a perioadei de realizare a fazei de cultivare a bacteriilor lactice;
- creșterea de 2...3 ori a productivității de creștere a culturilor finale;
- intensificarea cu 50...70% a ritmului de creștere a bacteriilor în procesul fermentativ;
- reducerea cu 30...60% a prețului de cost al bacteriilor lactice pentru producerea industrială a produselor acido-lactice (laptelui acru, chefirului, laptelui bătut, brânzeturilor etc.), în funcție de procedeu realizat;
- utilizarea unor materiale ieftine, accesibile, cu durată de viață practic nelimitată, care nu afectează proprietățile alimentare ale produselor lactice și care nu prezintă nici un risc pentru sănătatea consumatorului;
- obținerea suplimentară a acidului lactic – un produs prețios pentru industriile alimentară, chimică, pielăriei, medicină și zootehnic.

## MD 2969 F1 2006.02.28

4

Obținerea rezultatului indicat se datorează faptului că în grupul propus de invenții:

- acidul lactic care inhibă creșterea și multiplicarea celulară a bacteriilor lactice, folosite la fabricarea brânzeturilor și produselor acido-lactice, se elimină din mediul de cultură;
  - contrar metodelor cunoscute, care nu elimină anionul lactic, principalul inhibitor al dezvoltării celulare, tehnologia propusă preconizează fixarea acestui ion de către materiale schimbătoare de anioni;
  - eliminarea acidului lactic, care constituie principalul obiectiv al prezentului grup de invenții, este realizată prin folosirea de materiale insolubile, cu grad de puritate alimentar și cu caracter bazic;
  - materiale insolubile performante și de interes tehnologic, care corespund cerințelor de mai sus, pot fi obținute pe bază de rășini schimbătoare de anioni;
  - materiale insolubile performante și de interes tehnologic, care corespund cerințelor de mai sus, pot fi de asemenea obținute pe bază de argile anionice de hidrotalcit, având o structură similară cu cea a pansamentelor gastrice folosite în tratarea hiperacidității la oameni;
  - argilele anionice de tip hidrotalcit, cu grad de puritate alimentar pot fi sintetizate în laborator pe bază de carbonat de calciu, magneziu și aluminat de sodiu, după o perioadă de îmbătrânire de 6 săptămâni;
  - argilele anionice pot fi condiționate sub formă de pastile poroase sau sub formă de plăci, ce se introduc în mediul de cultură pentru eliminarea acidului lactic;
  - după multiplicarea și creșterea celulară, pastilele sau plăcile de argilă insolubilă pot fi extrase, spălate și regenerare cu NaOH;
  - durata de viață (folosire) a unor astfel de materiale și dispozitive este practic nelimitată.
- Invențiile se explică prin desenele din fig. 1...3, care reprezintă:
- fig. 1, schema tehnologică a procedurii de cultivare a bacteriilor lactice prin imobilizarea mediului de cultură și eluția continuă a acidului lactic în faza apoasă mobilă (*prima variantă*);
  - fig. 2, schema tehnologică a procedurii de cultivare a bacteriilor lactice prin menținerea mediului de cultură în stare fluidă și fixarea continuă a acidului lactic cu o fază dispersă lichidă sau pe o matrice solidă insolubilă cu caracter bazic și grad de puritate alimentar (*varianta a doua*);
  - fig. 3, schema tehnologică a procedurii de cultivare a bacteriilor lactice prin menținerea mediului lacte-cultură în stare fluidă și fixarea continuă a grupării lactat pe o matrice solidă insolubilă, din categoria rășinilor schimbătoare de anioni, în forma OH (*varianta a treia*).
- Comun pentru toate variantele procedurii de cultivare a bacteriilor lactice este sterilizarea (pasteurizarea) laptelui la temperatura de 63...72°C timp de 0,5 h, răcirea laptelui până la temperatura de înșămânțare (40...48°C) timp de 0,25...0,50 h, adăugarea în lapte a culturii liofilizate de înșămânțare, cultivarea lor timp de 2...3 h în regim de agitare la temperatură constantă de 36...40°C și separarea bacteriilor lactice (fig. 1...3).
- Ca produse inițiale se folosesc laptele proaspăt și una din culturile tradiționale utilizate în industria laptelui, cum ar fi *Lactobacillus bulgaricus* (pentru fermentarea laptelui), *Lactobacillus acidophilus* (pentru fermentarea acidă a laptelui), *Lactobacillus casei* (pentru fermentarea și maturarea brânzeturilor), *Lactobacillus longum* (pentru coagularea laptelui), *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus leichmanni*, *Streptococcus lactis* (cu acțiune acidă), *Streptococcus cremoris* (pentru asigurarea consistenței cremoase a laptelui), *Streptococcus thermophilus* (pentru fermentarea laptelui), *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus cytrovorus* și *Streptococcus paracytrovorus* (cu acțiune aromatizantă), *Bacterium shermani* (pentru fermentația propionică a laptelui) etc.
- Compoziția mediului de cultură include:
- iaurt, lapte bătut sau alt mediu în care au fost crescute bacteriile lactice – 1 ml;
  - lapte pasteurizat sau lapte de vacă proaspăt pasteurizat – 10 ml;
  - cultiuri lactice specifice din grupul celor enumerate mai sus.
- Conform primei variante a procedurii propus (fig. 1), mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, acidul lactic, format în perioada de fermentare, se elimină prin eluție continuă în faza apoasă mobilă, care în regim de recirculație se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat, se eliberează de acidul lactic și se returnează în mediul de cultură, după fermentare, mediul de cultură se separă de matricea poroasă, iar matricea se regenerează.
- Ca produse inițiale se folosesc lapte proaspăt, apă și una din culturile tradiționale enumerate mai sus.
- Ca matrice poroase se folosesc matrice solide din categoriile polimerilor organici și minerali, spre exemplu de tipul argilei montmorilonit, sau matrice poroase semisolidă din categoriile celulozei și gelurilor.
- Conform variantei a doua (fig. 2), în mediul de cultură fluid se imersează un agent bazic cu grad de puritate alimentar, insolubil în mediul de cultură, cu care, în perioada fermentării, se fixează continuu acidul lactic prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic de mediul de regenerare.
- Ca agent bazic se utilizează:
- a) o fază dispersă lichidă, formată dintr-o substanță organică din categoria chelaților, dizolvată într-un lichid gras, comestibil, din clasa uleiurilor vegetale și grăsimilor animale, fixarea continuă a acidului lactic

## MD 2969 F1 2006.02.28

5

se realizează prin organizarea unei mișcări relative între faza dispersă și mediul de cultură, iar, înainte de evacuare, se efectuează separarea fazei disperse de mediul de cultură.

b) o matrice solidă insolubilă, spre exemplu o argilă din categoria celor folosite în medicină ca pansamente gastrice, care se regenerează prin spălare și impregnare într-o soluție de hidroxid de sodiu.

5 În varianta a treia (fig. 3), după formare, în mediul de cultură fluid se imersează o matrice solidă insolubilă, din categoria rășinilor schimbătoare de anioni, completate cu grupări OH schimbabile, de tipul  $R^+OH$ , cu care, în perioada de fermentare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a rășinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, se fixează continuu anionul lactic, iar cu gruparea OH eliberată se realizează neutralizarea concomitentă a protonului cu formarea fazei apoase, care se separă  
10 de mediul de cultură și se returnează în mediul de regenerare, și cu extracția și separarea acidului lactic de mediul de regenerare.

Modalitățile de realizare a procedurii de cultivare a bacteriilor lactice în variantele propuse sunt condiționate de trei factori esențiali:

- 1) viteza de fixare a grupării lactat;
- 15 2) viteza de eliminare (înlăturare) a grupării lactat și de regenerare;
- 3) capacitatea de fixare a grupării lactat.

Separarea acidului lactic din mediul de regenerare sau din soluția apoasă se realizează printr-un procedeu cunoscut, spre exemplu, prin tratarea cu hidroxid de calciu cu obținerea lactatului de calciu. După depunerea precipitatului, lichidul este decantat, iar sedimentul este trecut prin filtru. Lichidul se tratează cu  
20 acid sulfuric până la reacție acidă pentru descompunerea de calciu. După filtrarea sulfatului de calciu format, soluția diluată de acid lactic se concentrează până la aproximativ 50%, obținându-se o soluție concentrată, numită „acid lactic de uz tehnic”. Prin concentrarea acidului lactic la presiune scăzută până la concentrația de 50...80% se obține acid lactic brut, care poate fi folosit în industrie, fie purificat prin recristalizarea lactatului de calciu și tratarea ulterioară cu acid sulfuric, obținându-se acid lactic liber.

25 Dată fiind complexitatea soluțiilor tehnice adoptate și propuse în prezentul grup de invenții, s-a realizat un studiu statistic al procedurii de cultivare a bacteriilor lactice cu ajutorul unui program factorial, care a ținut cont de efectele individuale ale tuturor parametrilor, cât și de interacțiunile acestora care pot fi eventual sinergice. Un astfel de studiu a necesitat un număr mic de încercări experimentale, realizate în timp scurt și cu cheltuieli neglijabile.

30 Metodologia testărilor experimentale include realizarea a două serii de experimente.

În prima din ele, s-a realizat procedeu de cultivare a bacteriilor lactice. Pentru însămânțarea laptelui pasteurizat (producător S.C. Prolabac S.A., Bacău, aciditate 14...16°T, grăsime 1,8%) sau a laptelui proaspăt de vacă pasteurizat, s-au utilizat culturi bacteriene crescute în mediu de iaurt și de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), în proporție volumică „iaurt/Lapte pasteurizat” sau „Lapte  
35 bătut/lapte proaspăt vacă pasteurizat” de 1:10.

În cazul „lapte bătut/lapte proaspăt vacă pasteurizat” compoziția mediului lapte-cultură conține:

- lapte bătut MAMY'S Lactate, Sibiu – 1 ml;
- lapte proaspăt vacă pasteurizat – 10 ml;
- culturi lactice specifice din grupul celor enumerate mai sus.
- 40 Compoziția laptelui proaspăt vacă pasteurizat (valoarea energetică  
64 kcal/100 g):
- substanțe nutritive – 100 g;
- grăsime – 2 g;
- hidrocarbonați – 3,9 g;
- 45 proteine – 3,2 g;
- calciu – 125 mg;
- substanțe uscate – 11 g.

După un anumit timp, bacteriile lactice începeau să se dezvolte, acidul lactic format la realizarea uneia  
50 din variantele propuse ale procedurii de cultivare a bacteriilor lactice era parțial și progresiv eliminat din mediul lapte-cultură-fermentarea I.

În aceleași condiții de temperatură și aciditate s-a stabilit că ritmul de creștere și dezvoltare a populației de bacterii lactice nu depinde substanțial de mediul lapte-cultură utilizat, de aceea în exemplele ce urmează sunt prezentate rezultatele pentru ambele medii lapte-cultură.

55 În seria a doua de experimente, maioua (mediul de cultură crescut), obținută în procesul de fermentare I, era folosită la coagularea laptelui pasteurizat (producător S.C. Prolabac S.A., Bacău, aciditate 14...16°T, grăsime 1,8%) - fermentarea II, pentru determinarea gradului de eficiență a fermentului lactic preparat, care era estimat în funcție de viteza de creștere a acidității laptelui însămânțat în procesul de fermentare II.

Prin probe organoleptice s-au determinat proprietățile produsului acido-lactic (aspectul, consistența, gustul, mirosul), fiecare răspuns apreciindu-se cu note de la 0 la 10 conform următorului punctaj:

- 60 0 ... 2,5 nesatisfăcător;
- 2,5 ... 5 insuficient;

## MD 2969 F1 2006.02.28

6

- 5 ... 7 acceptabil;
- 7 ... 9 bun;
- 9 ... 10 foarte bun.

*Exemplul 1* (prima variantă)

5 Laptele proaspăt de vacă s-a sterilizat prin pasteurizare la temperatura de 70°C timp de 0,5 h. După răcirea laptelui până la temperatura de înșămânțare de 45°C timp de 0,3 h, în lapte s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii *Lactobacillus acidophilus* crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).

10 Cultivarea bacteriilor lactice s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. Mediul de cultură s-a imobilizat într-o matrice poroasă, acidul lactic, format în perioada de fermentare, s-a eliminat prin eluție continuă în faza apoasă mobilă, care în regim de recirculație s-a separat de matricea cu mediul de cultură imobilizat, s-a eliberat de acidul lactic și s-a returnat în mediul de cultură. După fermentare, mediul de cultură s-a separat de matricea poroasă, iar matricea s-a regenerat. Separarea acidului lactic din mediul de regenerare sau din soluția apoasă s-a realizat prin procedeul cunoscut, descris mai sus.

15 Durata perioadei de fermentare depinde de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă a fost dozată prin variația cantității de matrice de imobilizare și a gradului de separare (îndepărtare) a acidului lactic din soluția apoasă. Drept criteriu de începere a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m<sup>3</sup>, iar în calitate de criteriu de finalizare a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m<sup>3</sup>.

20 În această variantă au fost studiate trei modalități alternative de realizare a procesului de eluție continuă (scăderea în concentrație) a acidului lactic:

- 1) mediul de cultură a fost imobilizat în pat fix, în condiții în care acidul lactic n-a fost antrenat de nici una din faze, mediul lapte-cultură menținându-și compoziția constantă;
- 2) mediul de cultură a fost continuu dializat prin traversarea unei membrane de dializă;
- 3) imobilizarea mediului lapte-cultură într-o matrice solidă sau semisolidă și eluția continuă a acidului lactic în faza apoasă mobilă.

25 S-a stabilit că prima modalitate ridică la un moment dat problema de consum excesiv a mediului de cultură și a necesității de reciclare, ceea ce conduce la creșterea cheltuielilor tehnologice.

30 Inconvenientul major al celei de a doua modalități a constat în valori foarte mici ale randamentului, datorită mecanismului cinetic relativ lent al procesului de difuziune a acidului lactic în timpul traversării membranei. Principala problemă rezultă din preocuparea de a asigura un bun transfer al acidului lactic în faza apoasă mobilă, care trebuie separată.

35 A treia modalitate alternativă s-a dovedit a fi cea mai judicioasă, care a și fost adoptată ca soluție tehnică optimă pentru prima variantă a grupului de invenții propus.

Problema s-a redus la realizarea unei matrice poroase din polimeri organici, celuloză, geluri și polimerii minerali de tip montmorilonit, la care dimensiunea porilor să permită dezvoltarea unei mase bacteriene și care să poată fi reutilizată în încercările ulterioare.

40 După selecția bacteriilor lactice crescute pentru fiecare probă din fermentarea I, acestea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienței culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h determinându-se viteza medie de creștere a acidității laptelui.

*Exemplul 2* (varianta a doua, a)

45 Laptele proaspăt de vacă a fost sterilizat prin pasteurizare la temperatura de 70°C timp de 0,5 h. După răcirea laptelui până la temperatura de înșămânțare de 45°C timp de 0,3 h, în el s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii *Lactobacillus acidophilus* crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).

50 Cultivarea bacteriilor lactice s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. În mediul de cultură fluid se imersează un agent bazic cu grad de puritate alimentar, insolubil în mediul de cultură, cu care, în perioada fermentării, se fixează continuu acidul lactic prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic de mediul de regenerare.

55 În această variantă mediul de cultură fluid nu mai este fixat, dar prezintă o fază fluidă mobilă. Ca agent bazic insolubil s-a utilizat o fază dispersă lichidă, care traversează mediul lapte-cultură, iar, înainte de evacuare, aceasta s-a separat de mediul de cultură. Prin încercarea unor diverși fixatori de acid lactic, s-a stabilit că în acest scop se potrivesc mai bine substanțele organice din categoria chelaților (o clasă de agenți complexanți) care au o mare afinitate pentru acizi. Acești compuși, înainte de adăugarea în mediul de cultură, s-au dizolvat într-un lichid alimentar gras (ulei vegetal sau grăsime animală).

60 Durata perioadei de fermentare depinde de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă a fost dozată prin variația cantității de agent bazic insolubil. Drept criteriu de începere a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20

## MD 2969 F1 2006.02.28

7

celule/m<sup>3</sup>, iar în calitate de criteriu de finalizare a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m<sup>3</sup>.

După selecția bacteriilor lactice crescute pentru fiecare probă din fermentarea I, acestea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienței culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h și determinându-se viteza medie de creștere a acidității laptelui.

*Exemplul 3 (varianta a doua, b)*

Laptele proaspăt de vacă s-a sterilizat prin pasteurizare la temperatura de 70°C timp de 0,5 h. După răcirea laptelui până la temperatura de însămânțare de 45°C timp de 0,3 h, în el s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii *Lactobacillus acidophilus* crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).

Cultivarea bacteriilor lactice s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. În mediul de cultură fluid se imersează un agent bazic cu grad de puritate alimentară, insolubil în mediul de cultură, cu care, în perioada fermentării, se fixează continuu acidul lactic prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic de mediul de regenerare.

În această variantă, soluția tehnică propusă presupune că mediul de cultură rămâne fluid și acidul lactic format se fixează pe niște matrice (suprafețe) mobile sau imobile cu caracter bazic.

S-au ales suprafețe care să satisfacă următoarele condiții:

- să prezinte o capacitate de adsorbție fizică suficientă pentru fiecare ciclu de contact în mediul lapte-cultură;

- să nu aibă proprietăți de schimb cationic, altfel, gruparea lactat nu va putea fi evacuată;

- să fie schimbătoare de anioni pentru a permite în mod prioritar eliminarea grupării lactat;

- să fie o suprafață regenerabilă;

- să aibă o durată de viață mare;

- să prezinte inerție în raport cu ceilalți constituenți ai mediului de cultură;

- să aibă un preț redus.

O astfel de suprafață poate fi realizată relativ ușor, de exemplu dintr-o rășină de tip anionic clasic. S-a găsit, însă, o variantă mai avantajoasă, de exemplu un hidrocalcit – variantă asemănătoare cu cea utilizată pentru tratamentul hiperacidității stomacale (argile, folosite în medicină ca pansamente gastrice).

Suprafața poate fi ușor fabricată în laborator conform unei proceduri standard. Totodată, hidrocalciții sunt mult mai ieftini decât rășinile schimbătoare de ioni.

Durata perioadei de fermentare depinde de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă a fost dozată prin variația cantității de hidrocalcit. Drept criteriu de începere a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m<sup>3</sup>, iar în calitate de criteriu de finalizare a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m<sup>3</sup>.

După selecția bacteriilor lactice crescute pentru fiecare probă din fermentarea I, acestea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienței culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h și determinându-se viteza medie de creștere a acidității laptelui.

*Exemplul 4 (varianta a treia)*

Laptele proaspăt de vacă s-a sterilizat prin pasteurizare la temperatura de 70°C timp de 0,5 h. După răcirea laptelui până la temperatura de însămânțare de 45°C timp de 0,3 h, în el s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii *Lactobacillus acidophilus* crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).

Cultivarea bacteriilor lactice s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. În mediul de cultură fluid s-a imersat o matrice solidă insolubilă, din categoria rășinilor schimbătoare de anioni, completate cu grupări OH schimbabile, de tipul R<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>, cu care, în perioada de fermentare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a rășinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, s-a fixat continuu anionul lactic, iar cu gruparea OH eliberată s-a realizat neutralizarea concomitentă a protonului cu formarea fazei apoase, care s-a separat din mediul de cultură și s-a returnat în mediul de regenerare, și cu extracția și separarea acidului lactic de mediul de regenerare.

În acest caz se elimină doar gruparea lactat. Protonul se neutralizează de către o grupare hidroxil, formându-se și mici cantități de apă.

Dat fiind că rășinile schimbătoare de anioni au capacități ridicate de schimb dar viteze de fixare scăzute, după realizarea fazei de dezvoltare și creștere celulară a bacteriilor lactice, matricea se evacuează din mediul de cultură, se spală și se regenerează într-o soluție de hidroxid de sodiu pentru utilizare repetată.

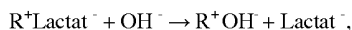
În mediul de cultură, între rășină și mediul de cultură, are loc schimbul ionic:

$$R^+OH^- + Lactat^- \rightarrow R^+Lactat^- + OH^-$$

## MD 2969 F1 2006.02.28

8

iar în mediul de regenerare, între soluția de hidroxid de sodiu și rășina încărcată are loc schimbul ionic invers:



în care  $R^+OH^-$  este rășina schimbătoare de anioni;  $Lactat^-$  - anionul lactic;  $OH^-$  - grupa hidroxil.

5 Durata perioadei de fermentare depinde de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă a fost dozată prin variația cantității de rășină schimbătoare de anioni. Drept criteriu de începere a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m<sup>3</sup>, iar în calitate de criteriu de finalizare a perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m<sup>3</sup>.

10 După selecția bacteriilor lactice pentru fiecare probă din fermentarea I, acestea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienței culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h și determinându-se viteza medie de creștere a acidității laptelui.

15 Rezultatele statistice, obținute la testarea celor trei variante ale procedurii de cultivare a bacteriilor lactice și la determinarea gradului de eficiență a lor crescuți în tehnologia de coagulare a laptelui și proprietățile organoleptice ale produselor acido-lactice coagulate sunt prezentate în tabelele 1-3.

Intensificarea ritmului de creștere a bacteriilor lactice  $I$  s-a calculat după formula:

$$I = \frac{R - R_0}{R_0} \cdot 100, [\%],$$

20 în care  $R$  este ritmul de creștere a bacteriilor lactice în perioada de fermentare în prezența agentului de reducere a acidului lactic;  $R_0$  - ritmul mediu de creștere a bacteriilor lactice în perioada de fermentare în lipsa agentului de reducere a acidului lactic.

Tabelul 1

Fermentarea I (1 ml iaurt sau lapte bătut + 10 ml lapte pasteurizat)

25

Proba	Temperatura de fermentare, °C	Doza agentului de reducere a acidului lactic, g	Timpul necesar de fermentare, h	Viteza medie de creștere a acidității mediului de cultură în perioada de fermentare, °T/h	Intensificarea ritmului de creștere a bacteriilor lactice, %
1	37	0	8,0...12,0	7,50...20,00	0
2	37	0,33	6,0	5,00...10,50	14...31
3	37	0,66	4,0	4,50...7,50	26...40
4	37	0,99	3,0	4,00...7,00	37...53
5	37	1,32	2,5	3,00...5,00	41...58
6	37	1,65	2,0	1,50...4,50	50...70
7	37	1,98	3,5	2,00...5,50	45...62

Din tabelul 1 se observă că perioada de realizare a fazei de creștere a bacteriilor lactice (perioada de fermentare) se reduce de 4 ori, iar intensificarea ritmului de creștere a populației de bacterii în procesul fermentativ crește cu 50...70%.

30

Tabelul 2

Fermentarea II (bacteriilor lactice obținute în fermentarea I + 50 ml lapte)

Proba din fermentarea I	Temperatura de fermentare, °C	Durata de fermentare, h	Viteza medie de creștere a acidității laptelui, °T/h
1	36	7	5,14...6,43
2	36	7	7,71...8,86
3	36	7	8,00...9,29
4	36	7	9,71...10,57
5	36	7	10,00...12,00
6	36	7	10,00...12,00
7	36	7	9,14...11,71

35 Astfel, în prima etapă (fermentarea I), s-a stabilit că viteza de dezvoltare lacto-bacteriană este invers proporțională cu viteza creșterii acidității mediului de cultură (tabelul 1), iar în cea de a doua etapă (fermentarea II) s-a observat fenomenul invers: viteza coagulării laptelui, adică eficiența utilizării bacteriilor lactice, obținute prin procedeele propuse, în tehnologia de producere a produselor acido-lactice, este direct proporțională cu viteza de creștere a acidității laptelui însământat (tabelul 2).

## MD 2969 F1 2006.02.28

9

Produsele acido-lactice obținute prin fermentarea II cu probele optime de cultură 5 și 6 crescute prin fermentarea I conform variantelor propuse ale procedurii de cultivare a bacteriilor lactice au atestat cele mai înalte note de apreciere în ce privește aspectul, consistența, gustul și mirosul (tabelul 3).

Tabelul 3

5

Notele medii de apreciere organoleptică a produselor acido-lactice obținute prin fermentarea II cu probele de cultură crescute prin fermentarea I

Proprietăți organoleptice	Proba 1			Proba 2			Proba 3			Proba 4			Proba 5			Proba 6			Proba 7		
Aspect	6	7	6	7	8	7	6	8	7	7	9	7	8	9	7	9	9	8	8	8	7
Consistență	6	6	6	6	7	7	8	8	7	8	9	7	8	9	7	10	9	8	7	7	7
Gust	6	6	5	6	7	6	7	8	6	7	8	7	9	8	8	9	10	9	8	7	6
Miros	7	7	6	7	6	8	7	8	8	8	9	7	8	9	8	9	9	8	8	8	7

10

### (57) Revendicări:

15 1. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, ce include pregătirea mediului de cultură, care conține lapte sterilizat și răcit până la temperatura de însămânțare, adăugarea în mediul pregătit a culturii de bacterii lactice, cultivarea și separarea lor, **caracterizat prin aceea că** pentru însămânțare se utilizează bacterii lactice, crescute pe un mediu nutritiv ce constă din iaurt:lapte pasteurizat sau din lapte bătut:lapte de vacă proaspăt pasteurizat luate în raportul de volum de 1:10, și liofilizate, care se adaugă în mediul de cultură prin agitare la temperatură constantă, după care mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, cultivarea bacteriilor lactice se efectuează la temperatura de 36...40°C cu eliminarea acidului lactic format prin eluție continuă în fază apoasă mobilă, care se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat și după separarea acidului lactic de faza apoasă se returnează în mediul de cultură.

20 2. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în calitate de matrice se utilizează o matrice poroasă solidă din polimeri organici și minerali, de tipul argilei montmorilonit.

25 3. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în calitate de matrice se utilizează o matrice poroasă semisolidă din celuloză și geluri.

30 4. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, ce include pregătirea mediului de cultură, care conține lapte sterilizat și răcit până la temperatura de însămânțare, adăugarea în mediul pregătit a culturii de bacterii lactice, cultivarea și separarea lor, **caracterizat prin aceea că** pentru însămânțare se utilizează bacterii lactice, crescute pe un mediu nutritiv ce constă din iaurt:lapte pasteurizat sau din lapte bătut:lapte de vacă proaspăt pasteurizat luate în raportul de volum de 1:10, și liofilizate, care se adaugă în mediul de cultură prin agitare la temperatură constantă, cultivarea bacteriilor lactice se efectuează la temperatura de 36...40°C, totodată în mediul de cultură se introduce un agent bazic cu grad de puritate alimentar, insolubil în el, care în perioada cultivării fixează continuu acidul lactic format în mediul de cultură cu realizarea continuă a ciclului de introducere, evacuare și regenerare a agentului bazic și de extracție și separare a acidului lactic.

35 5. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** în calitate de agent bazic se utilizează faza dispersă lichidă a unei substanțe organice din categoria chelaților, dizolvate într-o grăsime lichidă alimentară din clasa uleiurilor vegetale și grăsimilor animale, iar fixarea continuă a acidului lactic se realizează prin mișcarea fazei disperse față de mediul de cultură, totodată înainte de evacuarea agentului bazic se separă faza dispersă de mediul de cultură.

40

## MD 2969 F1 2006.02.28

10

6. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** în calitate de agent bazic se utilizează o matrice solidă insolubilă, spre exemplu o argilă folosită în medicină, care se regenerează prin spălare și impregnare într-o soluție de hidroxid de sodiu.

5 7. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, ce include pregătirea mediului de cultură, care conține lapte sterilizat și răcit până la temperatura de însămânțare, adăugarea în mediul pregătit a culturii de bacterii lactice, cultivarea și separarea lor, **caracterizat prin aceea că** pentru însămânțare se utilizează bacterii lactice, crescute pe un mediu nutritiv ce constă din iaurt:lapte pasteurizat sau din lapte bătut:lapte de vacă proaspăt pasteurizat luate în raportul de volum de 1:10, și liofilizate, care se adaugă în mediul de cultură prin agitare la temperatură constantă, cultivarea bacteriilor lactice se efectuează la temperatura de 10 36...40°C, totodată în mediul de cultură se imersează o matrice solidă insolubilă din rășini schimbătoare de anioni, completate cu grupări OH schimbabile, de tipul R<sup>+</sup>OH, cu care, în perioada de cultivare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare și regenerare a rășinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, se fixează continuu anionul lactic, iar cu gruparea OH liberă se realizează neutralizarea 15 concomitentă a protonului cu formarea fazei apoase, care se separă de mediul de cultură cu extragerea și separarea ulterioară a acidului lactic.

8. Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice, conform revendicărilor 1...7, **caracterizat prin aceea că** cultivarea se realizează timp de 2...3 ore.

20

### (56) Referințe bibliografice:

1. Chintescu G. Îndrumător pentru tehnologia produselor lactate. București, Editura Tehnica, 1982, p. 175...177
2. Constantin I. Milică. Biotehnologiile viitorului. Iași, Editura Ion Ionescu de la Brad, 1999, p. 232...233

**Șef Secție:** GUȘAN Ala

**Examinator:** BANTAȘ Valentina

**Redactor:** LOZOVANU Maria

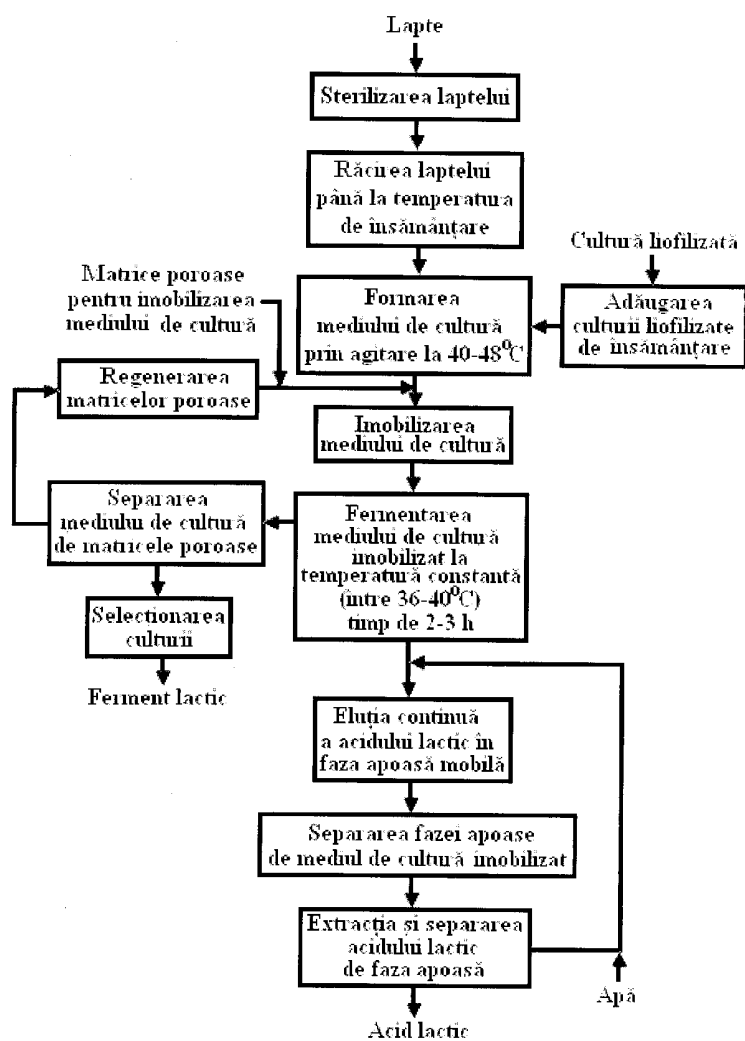


Fig. 1

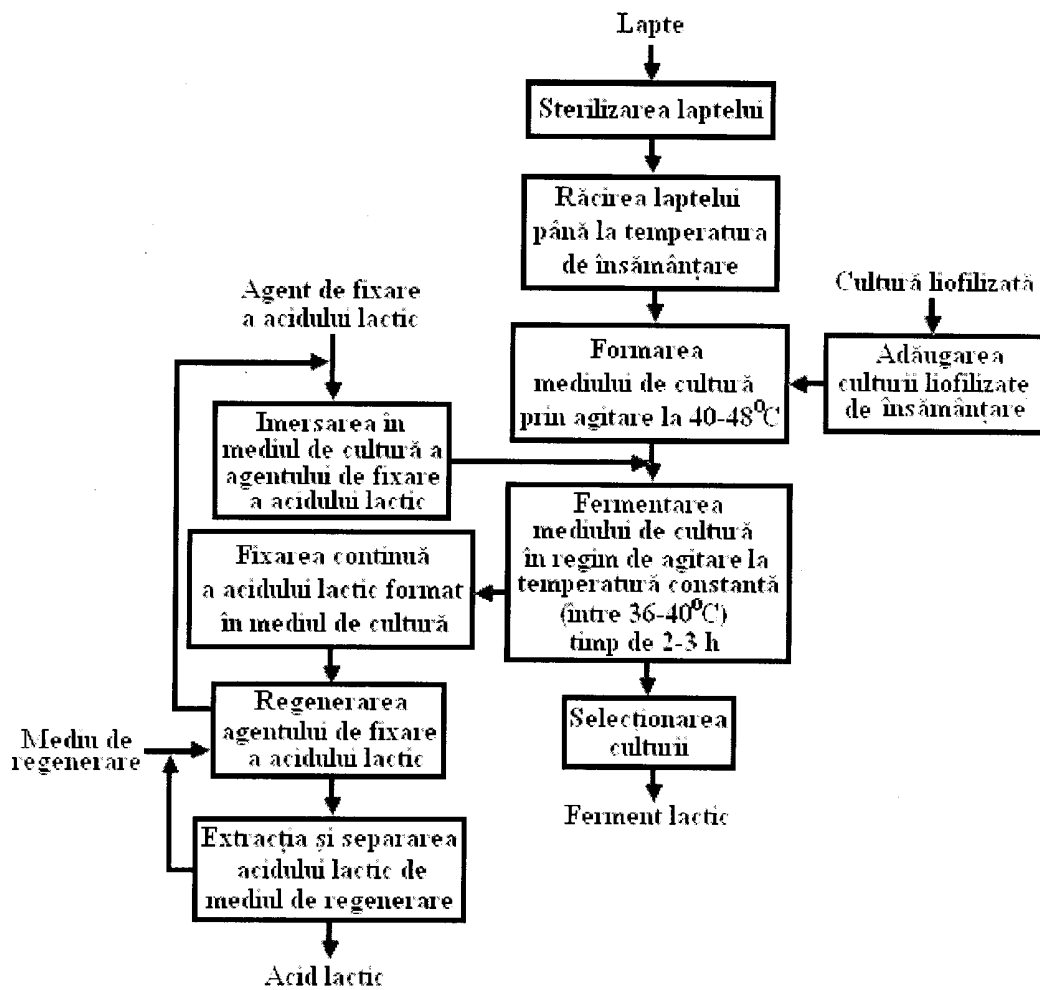


Fig. 2

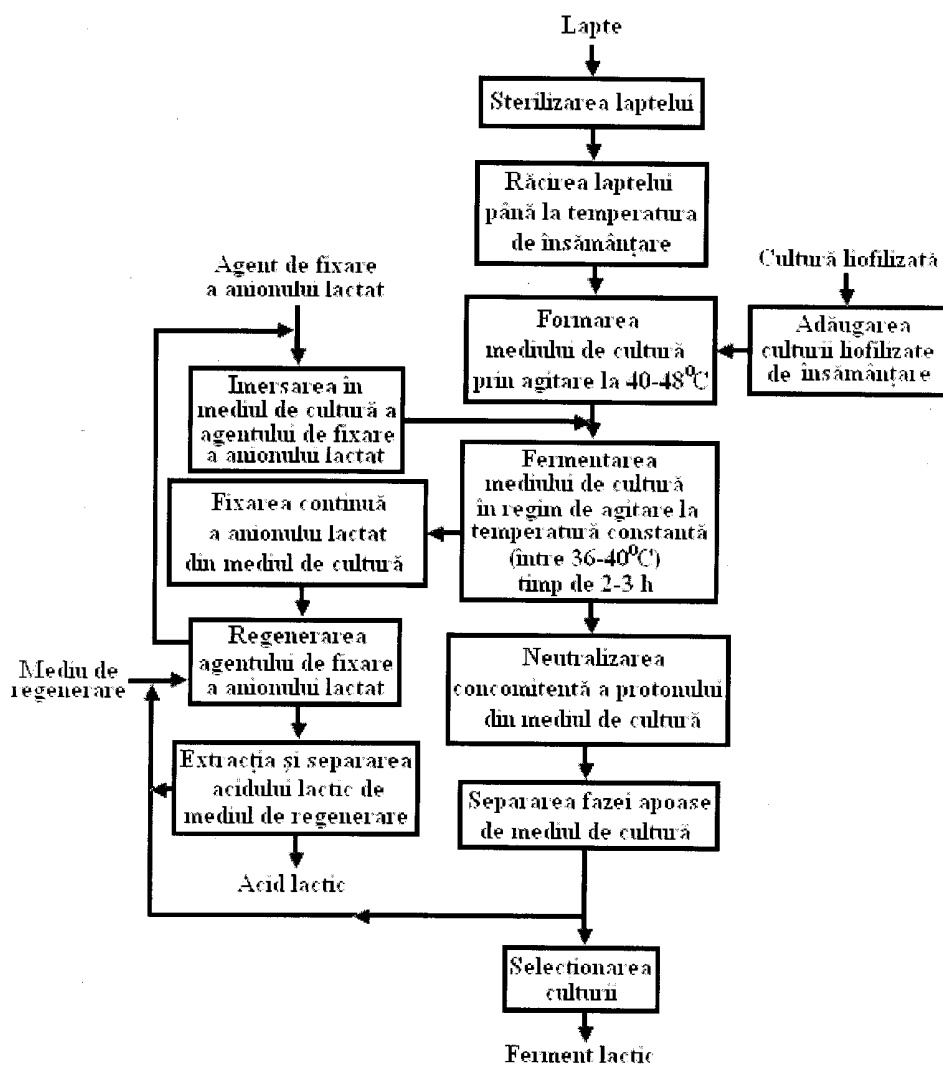


Fig. 3

## RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0245		(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.10.04		(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.:            32) data :            33) țara : (51) <sup>7</sup> : A 23 C 9/12, C 12 N 1/02, 11/02, 11/14 Alți indici de clasificare: <b>Titlul</b> : Metodă de dezvoltare și creșterea celulară a fermenților lactici (variante) (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici: bacterii lactice, matrice poroase, imobilizarea microorganismelor, separarea acidului lactic		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
MD 1994-2004 EA 1996-2004 SU fonf BRTȘ Int. Cl. <sup>7</sup> A 23 C 9/12, C 12 N 1/02, 11/02, 11/14		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Chintescu G. Îndrumător pentru tehnologia produselor lactate. București, Editura Tehnica, 1982, p. 175...177	1, 4, 7
A	Constantin I. Milică. Biotehnologiile viitorului. Iași, Editura „Ion Ionescu de la Brad”, 1999, p.232...233	1, 4, 7
A	Лагода И.В. и др. Получение и применение бактериального концентрата термофильных молочнокислых стрептококков. Совершенствование методов селекции и приготовления заквасок в молочной промышленности. Сб. научн. трудов. М., Легкая и пищ. Пром., 1984, с. 29...31	1, 4, 7
A	Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. М., Пищевая промышленность, 1975, с. 148...158	1, 4, 7
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
<b>* categoriile speciale ale documentelor consultate:</b>		<b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
<b>A</b> - document care definește stadiul anterior general		<b>T</b> - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
<b>E</b> - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		<b>X</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
<b>L</b> - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări		<b>Y</b> - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu

sau pentru un motiv expres ( se va indica motivul)	unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	<b>&amp;</b> - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării 2005. 12.15	
Examinatorul	Bantaș Valentina