Invenţia se referă la industria laptelui, în particular la un procedeu de cultivare a bacteriilor lactice.
Procedeele de preparare a culturilor de producţie a produselor acido-lactice sunt, în general, aceleaşi pentru toate aceste produse, având la bază metoda clasică, variind numai condiţiile de termostatare în faza de fermentare a mediului de cultură în funcţie de componenţa microbiologică a culturii dorite a fi selecţionată [1].
Una din problemele majore în procesul de cultivare a bacteriilor lactice, care nu este eliminată în metodele şi instalaţiile cunoscute, constă în dificultatea de a menţine optimă şi stabilă compoziţia mediului de cultură. această compoziţie se modifică în timp, ca urmare a consumării materiilor nutritive de către microorganisme, cât şi ca urmare a formării metabolice de noi substanţe. În problema abordată sunt esenţiale consumarea lactozei disponibile, care trebuie menţinută la nivelul conţinutului optim, şi formarea acidului lactic.
metoda clasică de cultivare a bacteriilor lactice aleasă ca soluţia cea mai apropiată propuse, constă în sterilizarea (pasteurizarea) laptelui la temperatura de 63-72°C timp de 0,5 h, răcirea laptelui de la temperatura de sterilizare până la temperatura de însămânţare (40-48°C) timp de 0,25-0,5 h, adăugarea în lapte a culturii liofilizate de însămânţare, cultivarea lor la temperatură constantă de 36-40°C şi separarea [2].
Din punct de vedere tehnologic, cultivarea bacteriilor lactice este inhibată de două procese însoţitoare:
1) creşterea progresivă a pH-ului în mediul de cultură, urmată de conversia lactozei în acid lactic;
2) acumularea de grupe lactice.
Aceste două efecte conjugate au un efect nefast asupra randamentului de creştere şi dezvoltare celulară.
În metodele cunoscute nu se elimină anionul lactat, principal inhibator al dezvoltării celulare.
Astfel, dezavantajele metodei clasice, ca şi ale tuturor metodelor cunoscute de preparare a fermenţilor lactici, sunt pierderile mari de celule în timpul procesului fermentativ şi productivitatea redusă de... bacteriilor lactice, care are drept consecinţă reducerea ritmului de creştere a populaţiei de celule şi creşterea costurilor culturilor finale selecţionate. Prin urmare, conform datelor statistice de laborator creşterea bacteriei lactice de la concentraţia iniţială de 5-50 celule/cm^3 până la concentraţia finală de 20-30 milioane celule/cm^3 durează 8-12 h.
Problema tehnică, pe care o soluţionează grupul propus de invenţii, constă în elaborarea unei tehnologii de cultivare a bacteriilor lactice, care să asigure un ritm înalt de creştere a lor în timpul procesului fermentativ şi să reducă considerabil costurile culturilor finale selecţionate.
Problema tehnică abordată se soluţionează prin realizarea metodei propuse de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici, care constă în sterilizarea şi răcirea laptelui până la temperatura de însămânţare, adăugarea în lapte a culturii liofilizate de însămânţare, formarea şi fermentarea mediului de cultură în regim de agitare la temperatură constantă şi selecţia fermenţilor lactici crescuţi.
Conform primei variante de realizare a metodei propuse, după formare, mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, acidul lactic, format în perioada de fermentare, se elimină prin eluţie continuă în faza apoasă mobilă, care în regim de recirculaţie se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat, se eliberează de acidul lactic şi se returnează în mediul de cultură, după fermentare, mediul de cultură se separă de matricea poroasă, iar matricea se regenerează.
C. Hot.
Conform variantei a treia de realizare a procedeului propus, în mediul de cultură fluid se imersează o matrice solidă insolubilă, din categoria răşinilor schimbătoare de anioni, dotate cu grupări OH^- schimbabile, de tipul R^+OH^-, cu care, în perioada de fermentare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare şi regenerare a răşinei într-o soluţie de hidroxid de sodiu, se fixează continuu anionul lactat, iar cu gruparea OH^- eliberată se realizează neutralizarea concomitentă a protonului cu formare de fază apoasă, care se separă de mediul de cultură şi se returnează în mediul de regenerare, şi cu extracţia şi separarea acidului lactic de mediul de regenerare.
Ca agent bazic se utilizează o fază dispersă lichidă, formată dintr-o substanţă organică din categoria chelaţilor, dizolvată într-un lichid gras, comestibil, din clasa uleiurilor vegetale şi grăsimilor animale, fixarea continuă a acidului lactic se realizează prin organizarea unei mişcări relative între faza dispersă şi mediul de cultură, iar, înainte de evacuare, se efectuează separarea fazei disperse de mediul de cultură.
Ca agent se poate utiliza de asemenea matrice solidă insolubilă, spre exemplu p argilă din categoria celor folosite în medicină ca pansamente gastrice, care se regenerează prin spălare şi impregnare într-o soluţie de hidroxid de sodiu.
În toate aceste variante, procedeul de fermentare se realizează timp de 2-3 h.
Rezultatul tehnic obţinut prin realizarea grupului propus de invenţii constă în:
- reducerea de 4 ori a perioadei de realizare a fazei de cultivare a bacteriilor lactice;
- creşterea de 2-3 ori a productivităţii de preparare a culturilor finale;
- intensificarea cu 50-70% a ritmului de creştere a bacteriilor în procesul fermentativ;
- reducerea cu 30-60& a costurilor fermenţilor preparaţi pentru producerea industrială a produselor acido-lactice (laptelui acru, chefirului, laptelui bătut, brânzeturilor etc.), în funcţie de procedura folosită;
- utilizarea unor materiale ieftine, accesibile, cu durată de viaţă practic nelimitată, care nu afectează proprietăţile alimentare ale produselor lactate şi care nu prezintă nici un risc pentru sănătatea consumatorului;
- obţinerea suplimentară a acidului lactic – un produs preţios pentru industriile alimentară, chimică, pielăriei, medicină şi zootehnie.
Obţinerea rezultatului tehnic, indicat mai sus, se datorează faptului că în grupul propus de invenţii:
- acidul lactic care inhibă creşterea şi multiplicarea celulară în prepararea fermenţilor lactici, folosiţi la fabricarea brânzeturilor şi produselor acido-lactice, se elimină din mediul de cultură;

- contrar metodelor cunoscute, care nu elimină anionul lactat, principalul inhibator 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 invenţii, este realizată prin folosirea de materiale insolubile, cu grad de puritate alimentar şi cu caracter bazic;
- materiale insolubile performante şi de interes tehnologic, care corespund cerinţelor de mai sus, pot fi obţinute pe bază de răşini schimbătoare de anioni;
- materiale insolubile performante şi de interes tehnologic, care corespund cerinţelor de mai sus, pot fi de asemenea obţinute pe bază de argile anionice de hidrotalcit, având o structură similară cu cea a oansamentelor gastrice folosite în tratarea hiperacidităţii la oameni;
- argilele anionice de tip hidrotalcit, cu grad de puritate alimentar pot fi sintetizate în laborator pe bază de carbonat de calciu, magneziu şi aluminat de sodiu, după o perioadă de îmbătrânire de 6 săptămâni;
- argile anionice pot fi condiţionate sub formă de pastile poroase sau sub formă de plăci, ce pot fi introduse în mediul de cultură, în vederea eliminării acidului lactic;
- după multiplicarea şi creşterea celulară, pastilele sau plăcile de argilă insolubilă pot fi extrase, spălate şi regenerate cu NaOH;
- durata de viaţă (folosire) a unor astfel de materiale şi dispozitive este practic nelimitată.

se dă în continuare şi exemple de realizare a grupului propus de invenţii în legătură şi cu fig. 1, în care este prezentată schema tehnologică a procesului de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici prin metoda imobilizării mediului de cultură şi eluţiei continue a acidului lactic în faza apoasă mobilă (prima variantă); fig. 2, în care este prezentată schema tehnologică a procesului de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici prin metoda menţinerii mediului de cultură în stare fluidă şi fixării continue a acidului lactic cu o fază dispersă lichidă sau pe o matrice solidă insolubilă cu caracter bazic şi grad de puritate alimentar (varianta a doua); fig. 3, în care este prezentată schema tehnologică a procesului de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici prin metoda menţinerii mediului lapte-cultură în stare fluidă şi fixării continue a grupării lactat pe o matrice solidă insolubilă, din categoria răşinilor schimbătoare de anioni, în forma OH (varianta a treia).

Comun pentru toate variantele invenţiilor propuse este realizarea metodei de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici prin sterilizarea (pasteurizarea) laptelui la temperatura de 63-72°C timp de 0,5 h, răcirea laptelui de la temperatura de sterilizare până la temperatura de însămânţarea (40-48°C) timp de 0,25-0,5 h, adăugarea în lapte a culturii liofilizate de însămânţate, formarea şi fermentarea mediului de cultură timp de 2-3 h în regim de agitare la temperatură constantă de 36-40°C şi selecţia fermenţilor lactici crescuţi (fig. 1-3).

Ca produse iniţiale se folosesc laptele proaspăt şi una din culturile tradiţionale utilizate în industria laptelui, cum ar fi Lactobacillus bulgaricus (pentru fermentarea laptelui), Lactobacillus acidophilus (pentru fermentarea acidă a laptelui), Lactobacillus casei (pentru fermentarea şi maturarea brânzeturilor), Lactobacillus longum (pentru coagularea laptelui), Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus leichamanni, Streptococcus lactis (cu acţiune acidă), Streptococcus cremonis (pentru asigurarea consistenţei cremoase a laptelui), Streptococcus thermophillus (pentru fermentarea laptelui), Streptococcus diacetilactis, Streptococcus cytrovorus şi Streptococcus paracytrovorus (cu acţiune aromatizantă), Bacterium shermani (pentru fermentaţia propionică a laptelui) etc.

Compoziţia mediului de cultură constituie:

iaurt, lapte bătut sau alt mediu în care au fost crescute bacteriile lactice – 1 ml;

lapte pasteurizat sau lapte proaspăt vacă pasteurizat – 10 ml;

culturi lactice specifice din grupul celor enumerate mai sus.

Conform primei variante a metodei propuse (fig. 1), mediul de cultură se imobilizează într-o matrice poroasă, acidul lactic, format în perioada de fermentare, se elimină prin eluţie continuă în faza apoasă mobilă, care în regim de recirculaţie se separă de matricea cu mediul de cultură imobilizat, se eliberează de acidul lactic şi se returnează în mediul de cultură, după fermentare, mediul de cultură se separă de matricea poroasă, iar matricea se regenerează.

Ca produse iniţiale se folosesc laptele proaspăt, apa şi una din culturile tradiţionale utilizate în industria laptelui şi enumerate mai sus.

Ca matrice poroase se folosesc matrice solide din categoriile polimerilor organici şi minerali, spre exemplu de tipul argilei montmorilonit, sau matrice poroase semisolide din categoriile celulozei şi gelurilor. Produsele obţinute sunt bacterii lactice crescuţi şi acidul lactic

În varianta 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 şi regenerare a agentului bazic şi de extracţie şi separare a acidului lactic de mediul de regenerare.

Ca agent bazic se utilizează:

a) o fază dispersă lichidă, formată dintr-o substanţă organică din categoria chelaţilor, dizolvată într-un lichid gras, comestibil, din clasa uleiurilor vegetale şi grăsimilor animale, fixarea continuă a acidului lactic se realizează prin organizarea unei mişcări relative între faza dispersă şi 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 şi impregnare într-o soluţie de hidroxid de sodiu.

În varianta a treia (fig. 3), după formare, în mediul de cultură fluid se imersează o matrice solidă insolubilă, din categoria răşinilor schimbătoare a anioni, dotate cu grupări OH schimbabile, de tipul $R^{+}OH^{-}$, cu care, în perioada de

fermentare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare şi regenerare a răşinei într-o soluție de hidroxid de sodiu, se fixează continuu anionul lactat, iar cu gruparea OH eliberată se realizează neutralizarea concomitentă a protonului cu formare de fază apoasă, care se separă de mediul de cultură şi se returnează în mediul de regenerare, şi cu extracția şi separarea acidului lactic de mediul de regenerare.
Modalitățile de realizare a procedeului de cultivare a bacteriilor lactice în variantele propuse sunt condiționate de trei factori esențiali:
1) viteza de fixare a grupării lactat;
2) viteza de eliminare (înlăturare) a grupării lactat şi de regenerare;
3) capacitatea de fixare a grupării lactat.
Separarea acidului lactic din mediul de regenerare sau din soluția apoasă se realizează printr-o procedură cunoscută, spre exemplu, prin tratarea cu hidroxid de calciu, astfel încât produsul final este lactatul de calciu. După depunerea precipitatului, lichidul este decantat, iar sedimentul este trecut prin filtru. Lichidul se tratează cu 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 fie ca atare în industrie, fie purificat prin recristalizarea lactatului de calciu şi tratarea ulterioară cu acid sulfuric, obținându-se acid lactic liber.
Exemple:
Dată fiind complexitatea soluțiilor tehnice adoptate şi propuse în prezentul grup de invenții, s-a realizat un studiu statistic al procesului de cultivare a bacteriilor lactice cu ajutorul unui program factorial, care a ținut cont de efectele individuale ale tuturor parametrilor, cât şi de interacțiunile acestora care pot fi eventual sinergetice. Un astfel de studiu a necesitat un număr mic de încercări experimentale, realizate în timp scurt şi cu costuri neglijabile.
Metodologia testărilor experimentale includea realizarea a două serii de experimente.
În prima din ele, s-a realizat procedeul 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 şi de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), în proporție volumică „iaurt/Lapte pasteurizat" sau „Lapte bătut/lapte proaspăt vacă pasteurizat" de 1:10.
În cazul „lapte bătut/lapte proaspăt vacă pasteurizat" compoziția mediului lapte-cultură constituia:
lapte bătut MAMY'S Lactate, Sibiu – 1 ml;
lapte proaspăt vacă pasteurizat – 10 ml;
culturi lactice specifice din grupul celor enumerate mai sus.
Compoziția laptelui proaspăt vacă pasteurizat (valoare energetică
64 kcal/100 g):
- substanțe nutritive – 100 g;
- grăsime – 2 g;
- hidrocarbonați – 3,9 g;
- proteine – 3,2 g;
- calciu – 125 mg;
- substanțe uscate – 11 g.
După un anumit timp, bacteriile lactice începeau să se dezvolte, într-un mediu în care acidul lactic format în decursul procesului mecrobiologic, prin una din variantele propuse de realizare a metodei de dezvoltare şi creştere celulară, era parțial şi progresiv eliminat din mediul lapte-cultură-fermentarea I.
În acelaşi condiții de temperatură şi aciditate s-a stabilit, că ritmul de creştere şi dezvoltare a populației de celule nu depinde substanțial de mediul lapte-cultură utilizat, de aceea în exemplele ce urmează sunt prezentate rezultatele medii pentru ambele mediuri lapte-cultură.
În seria a doua de experimente, maiaua (mediul de cultură crescută), 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 creştere 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:
- între 0 – 2,5 nesatisfăcător;
- între 2,5 – 5 insuficient;
- între 5 – 7 acceptabil;
- între 7 – 9 bun;
- între 9 – 10 foarte bun.
Exemplul 1. Dezvoltarea şi creşterea celulară a fermenților lactici prin metoda imobilizării mediului de cultură şi eluției continue a acidului lactic în faza apoasă mobilă (prima variantă).
Pentru fermentarea I, laptele pasteurizat, după încălzirea până la temperatura de 45°C s-a însămânțat în mod direct cu cultură de bacterii Lactobacillus bulgaricus crescută în mediu de iaurt (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), care s-a adăugat în proporție volumică de 1:10. 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 lapte s-a adăugat în

proporţie volumică de 1:10 cultură de bacterii Lactobacillus acidophilus crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).
Formarea şi fermentarea mediului de cultură s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. După formare, mediul de cultură s-a imobilizat într-o matrice poroasă, acidul lactic, format în perioada de fermentare, s-a eliminat prin eluţie continuă în faza apoasă mobilă, care în regim de recirculaţie s-a separat de matricea cu mediul de cultură imobilizat, s-a eliberat de acidul lactic şi 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 soluţia apoasă s-a realizat prin procedura cunoscută, descrisă mai sus.
Durata perioadei de fermentare depindea de doza agentului de reducere a concentraţiei acidului lactic, care în această variantă s-a variat prin variaţia cantităţii de matrice de imobilizare şi a gradului de separare (îndepărtare) a acidului lactic din soluţia apoasă. Ca criteriu a începerii perioadei de fermentare a fost aleasă concentraţia iniţială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m^3 iar ca criterii a finalizării perioadei de fermentare a fost aleasă concentraţia finală a populaţiei de bacterii de 25 milioane celule/m^3.
În această variantă sau studiat trei modalităţi alternative de realizare a metodei de eluţie continuă (scăderea în concentraţie) a acidului lactic:
1) mediul de cultură a fost imobilizat în pat fix, în condiţii în care acidul lactic n-a fost antrenat de nici una din faze, mediul lapte-cultură menţinându-şi compoziţia 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 semi-solidă şi eluţia continuă a acidului lactic în faza apoasă mobilă.
S-a stabilit că prima modalitate ridică la un moment dat problema de consum excesiv a mediului de cultură şi a posibilităţii de reciclare ceea ce conduce la creşterea costurilor tehnologice.
Inconvenientul major al celei de a doua modalităţi 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 a acidului lactic în faza apoasă, mobilă, care trebuie separată.
A treia modalitate alternativă s-a dovedit a fi cea mai judicioasă, care a şi fost adoptată ca soluţie tehnică optimă pentru prima variantă a grupului de invenţii propus.
Problema s-a redus la realizarea unei matrice poroase, la care dimensiunea porilor să permită dezvoltarea unei mase bacteriene şi care să poată fi reutilizată în încercările ulterioare - cerinţe la care corespund polimerii organici, celuloza, gelurile şi polimerii minerali de tip montmorilonit.
După selecţia fermenţilor lactici crescuţi pentru fiecare probă din fermentarea I, aceştea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienţei culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h determinându-se viteza medie de creştere a acidităţii laptelui.
Exemplul 2. Dezvoltarea şi creşterea celulară a fermenţilor lactici prin metoda menţinerii mediului de cultură în stare fluidă şi fixării continue a acidului lactic cu o fază dispersă lichidă (varianta a doua , a).
Pentru fermentarea I, laptele pasteurizat, după încălzirea până la temperatura de 45°C s-a însămânţat în mod direct cu cultură de bacterii Lactobacillus bulgaricus crescută în mediu de iaurt (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), care s-a adăugat în proporţie volumică de 1:10, 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 însămânţare de 45°C timp de 0,3 h, în lapte s-a adăugat în proporţie volumică de 1:10 cultură de bacterii Lactobacillus acidophilus crescute în mediu de lapte bătut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).
Formarea şi fermentarea mediului de cultură s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. După formare, 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 şi regenerare a agentului bazic şi de extracţie şi separare a acidului lactic de mediul de regenerare.
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 diverşi fixatori de acid lactic, s-a stabilit, că în acest scop se potrivesc mai bine substanţele organice ce fac parte din categoria chelaţilor (o clasă de agenţi complexanţi), şi anume acelea din ele, care au o mare afinitate pentru acizi. Aceşti compuşi, înainte de adăugarea în mediul de cultură,
s-au dizolvat într-un lichid comestibil gras (ulei vegetal sau grăsime animală).
Durata perioadei de fermentare depindea de doza agentului de reducere a concentraţiei acidului lactic, care în această variantă s-a variat prin variaţia cantităţii de agent bazic insolubil. Ca criteriu a începerii perioadei de fermentare a fost aleasă concentraţia iniţială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m^3 iar ca criteriu a finalizării perioadei de fermentare a fost aleasă concentraţia finală a populaţiei de bacterii de 25 milioane celule/m^3.
După selecţia fermenţilor lactici crescuţi pentru fiecare probă din fermentarea I, aceştea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienţei culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h şi determinându-se viteza medie de creştere a acidului laptelui.
Exemplul 3. Dezvoltarea şi creşterea celulară a fermenţilor lactici prin metoda menţinerii mediului de cultură în stare fluidă şi fixării continue a acidului lactic pe o matrice solidă insolubilă cu caracter bazic şi grad de puritate alimentar (varianta a doua, b).

Pentru fermentarea I, laptele pasteurizat, după încălzirea până la temperatura de 45°C s-a însămânțat în mod direct cu cultură de bacterii Lactobacillus bulgaricus crescută în mediu de iaurt (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), care s-a adăugat în proporție volumică de 1:10. 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 lapte s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii Lactobacillus acidophilus crescute în mediu de lapte băut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).
Formarea şi fermentarea mediului de cultură s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. După formare, 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 şi regenerare a agentului bazic şi de extracție şi separare a acidului lactic de mediul de regenerare.
În această variantă, soluția tehnică propusă presupune că mediul de cultură rămâne fluid şi acidul lactic format se fixează pe nişte matrice (suprafețe) mobile sau imobile cu caracter bazic.
S-au căutat 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 cost redus de fabricație.

O astfel de suprafață poate fi realizată relativ uşor, pornind de la o răşină de tip anionic clasic. S-a găsit, însă, o variantă mai avantajoasă, pornind de la un hidrocalcit – variantă asemănătoare cu cea utilizată pentru tratamentul hiperacidității stomacale (argile, folosite în medicină ca pansamente gastrice).
Suprafața poate fi uşor fabricată în laborator conform unei proceduri standard. Totodată, hidrocalciții sunt mult mai ieftini decât răşinile schimbătoare de ioni.
Durata perioadei de fermentare depindea de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă s-a variat prin variația cantității de hidrocalcit. Ca criteriu a începerii perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m^3 iar ca criteriu a finalizării perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m^3.
După selecția fermenților lactici crescuți pentru fiecare probă din fermentarea I, aceştea 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 şi determinându-se viteza medie de creştere a acidității laptelui.
Exemplul 4. Dezvoltarea şi creşterea celulară a fermenților lactici prin metoda menținerii mediului lapte-cultură în stare fluidă şi fixării continue a grupării lactat pe o matrice solidă insolubilă, din categoria răşinilor schimbătoare de anioni, în forma OH (varianta a treia).
Pentru fermentarea I, laptele pasteurizat, după încălzirea până la temperatura de 45°C s-a însămânțat în mod direct cu cultură de bacterii Lactobacillus bulgaricus crescută în mediu de iaurt (producător MAMY'S Lactate, Sibiu), care s-a adăugat în proporție volumică de 1:10. 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 lapte s-a adăugat în proporție volumică de 1:10 cultură de bacterii Lactobacillus acidophilus crescute în mediu de lapte băut (producător MAMY'S Lactate, Sibiu).
Formarea şi fermentarea mediului de cultură s-a realizat în regim de agitare la temperatură constantă de 37°C. După formare, în mediul de cultură fluid s-a imersat o matrice solidă insolubilă, din categoria răşinilor schimbătoare de anioni, dotate cu grupări OH schimbabile, de tipul R^+OH^-, cu care, în perioada de fermentare, prin realizarea continuă a ciclului de imersare, evacuare şi regenerare a răşinii într-o soluție de hidroxid de sodiu, s-a fixat continuu anionul lactat, iar cu gruparea OH eliberată s-a realizat neutralizarea concomitentă a protonului cu formare de fază apoasă, care s-a separat din mediul de cultură şi s-a returnat în mediul de regenerare, şi cu extracția şi 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 şi mici cantități de apă.
Dat fiind, că răşinile schimbătoare de anioni au capacități ridicate de schimb dar viteze de fixare scăzute, după realizare fazei de dezvoltare şi creştere celulară a fermenților, matricea se evacuează din mediul de cultură, se spală şi se regenerează într-o soluție de hidroxid de sodiu pentru utilizare repetată.
În mediul de cultură, între răşină şi mediul de cultură, are loc schimbul ionic:
$R^+OH^- + Lactat^- \rightarrow R^+ Lactat^- + OH^-$,
iar în mediul de regenerare, între soluția de hidroxid de sodiu şi răşina încărcată – schimbul ionic invers:
$R^+Lactat^- + OH^- \rightarrow R^+ OH^- + Lactat^-$,
în care $R^+ OH^-$ este răşina schimbătoare de anioni; $Lactat^-$ - anionul lactat; OH^- - grupa hidroxil.
Durata perioadei de fermentare depindea de doza agentului de reducere a concentrației acidului lactic, care în această variantă s-a variat prin variația cantității de răşină schimbătoare de anioni. Ca criteriu a începerii perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația inițială de celule în mediul cultură-lapte de 20 celule/m^3 iar ca criteriu a finalizării perioadei de fermentare a fost aleasă concentrația finală a populației de bacterii de 25 milioane celule/m^3.

După selecţia fermenţilor lactici crescuţi pentru fiecare probă din fermentarea I, aceştea s-au folosit în fermentarea II, metodologia căreia este descrisă mai sus, fermentarea II de încercare a eficienţei culturilor crescute în fermentarea I realizându-se la temperatura de 36°C timp de 7 h şi determinându-se viteza medie de creştere a acidităţii laptelui.
Rezultatele statistice, obţinute la testarea celor trei variante ale metodei de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici şi la determinarea gradului de eficienţă a fermenţilor crescuţi în tehnologia de coagulare a laptelui şi a proprietăţilor organoleptice a produselor acido-lactice coagulate sunt prezentate în tabelele 1-3.
Intensificarea ritmului de creştere a fermenţilor lactici I s-a calculat cu formula:

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

în care R este ritmul de dezvoltare şi creştere celulară a culturii în perioada de fermentare în prezenţa agentului de reducere a acidului lactic; R_0 – ritmul mediu de dezvoltare şi creştere celulară a culturii 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)

Proba	Temperatura de fermentare, [°C]	Dozaj agent de reducere a acidului lactic, [g]	Timpul necesar de fermentare, [h]	Viteza medie de creştere a acidităţii mediului de cultură în perioada de fermentare, [°T/h]	Intensificarea ritmului de creştere a fermenţilor lactici, [%]
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 dezvoltare şi creştere a fermenţilor lactici (perioada de fermentare) se reduce de 4 ori, iar intensificarea ritmului de creştere a populaţiei de celule în procesul fermentativ creşte cu 50-70%.

Tabelul 2

Fermentarea II (fermentul lactic obţinut în fermentarea I + 50 ml lapte)

Proba din fermentarea I	Temperatura de fermentare, °C	Durata de fermentare, [h]	Viteza medie de creştere a acidităţii 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

Astfel, în etapa fermentării I, s-a stabilit, că viteza de dezvoltare celulară a culturii lacto-bacteriene este invers proporţională cu viteza creşterii acidităţii mediului de cultură (tabelul 1), iar în cea de a doua etapă (fermentarea II), s-a observat fenomenul invers: viteza coagulării laptelui, adică eficienţa utilizării fermentului lactic, obţinut prin metodele propuse, în tehnologia de producere a produselor acido-lactice, este direct proporţională cu viteza de creştere a acidităţii laptelui însămânţat (tabelul 2).
Produsele acido-lactice obţinute prin fermentarea II cu probele optime de cultură 5 şi 6 crescută prin fermentarea I conform variantelor propuse ale metodei de dezvoltare şi creştere celulară a fermenţilor lactici au atestat cele mai înalte note de apreciere în ce priveşte aspectul, consistenţa, gustul şi mirosul (tabelul 3).

Tabelul 3

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

Proprietăţi organo-leptice:	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
Consistenţă	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