



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01382

(22) Data de depozit: 21.12.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• ȘTEFAN AURORA LILIANA,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• LUPU CARMEN, INTRAREA BĂRSEI
NR.5, BL.G3, SC.A, ET.2, AP.24,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **TULPINĂ DE DROJDIE CU ACTIVITATE ANTAGONISTĂ ȘI
FERMENTATIVĂ**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* L30b, cu număr de depozit DSM 23648 la DSZM, destinată producerii concomitente de bioetanol și bioproduse pentru protecția plantelor din cereale contaminate cu micotoxine. Tulpina este puternic antagonistă față de mai multe ciuperci producătoare de micotoxine, în special cele care produc înroșirea grâului și contaminează recolta cu

fusariotoxine, are o capacitate ridicată de fermentare a hidrolizatorilor de cereale, este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene, și își păstrează aceste caracteristici și după realizarea fermentației alcoolice.

Revendicări: 1



TULPINA DE DROJDIE CU ACTIVITATE ANTAGONISTA SI FERMENTATIVA

Inventia se refera la o tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648, care prezintă și activitate antagonistă față de agenții fitopatogeni producători de micotoxine și capacitate de fermentare alcoolică, și care este destinată producerii concomitente de bioetanol și bioproduse pentru protecția plantelor din cereale contaminate cu micotoxine.

Sunt cunoscute mai multe tipuri de drojdii antagoniste ciupercilor fitopatogene și toxigene, care infectează cerealele în timpul vegetației și contaminează recolta cu micotoxine. Brevetul SUA 6562337 descrie diferite tulpini de drojdii, *Torula aurea* (NRRL Y-30213), o drojdie neidentificată (NRRL Y-30214), *Torula* sp. (NRRL Y-30215) și *Cryptococcus nodaensis* (NRRL Y-30216) antagoniste față de ciupercile fitopatogene și toxigene din grupul *Fusarium graminearum* care produc înroșirea spicului. Autorii au revenit și au reclasificat tulpinile ca *Cryptococcus aureus* (NRRL Y-30213 și NRRL Y-30215) și *Cryptococcus flavescens* (NRRL Y-30216) (Dunlap et al., 2007, *FEMS Yeast Res.* 7:449–458). Brevetul SUA7570193 descrie tulpina WRL-076 de *Pichia anomala* (număr de depozit NRRL Y-30842), care are acțiuni antagonistă față de ciupercile toxigene din grupul *Aspergillus flavus*, care pot infecta porumbul în timpul vegetației contaminând recolta cu aflatoxine. Brevetul SUA 7601346 descrie tulpina AS55.2 de *Aureobasidium pullulans* (NRLL Y-50291) care este antagonistă față de *Fusarium graminearum*.

Nu s-au descris până în prezent tulpini de drojdii care să prezinte concomitent antagonism față de ciupercile fitopatogene și toxigene, rezistență la micotoxinele produse de aceste ciuperci, capacitate de a fermenta hidrolizatele de cereale contaminate cu micotoxine și rezistență bună la șocurile osmotice. Astfel de tulpini ar fi utile pentru valorificarea complexă a cerealelor contaminate cu micotoxine în timpul vegetației peste limita maximă admisibilă, prin fermentarea plămezilor obținute prin solubilizarea / fluidificarea și zaharificarea măcinișului de cereale contaminate cu micotoxine. Biomasa de drojdii antagoniste co-produsă în astfel de sisteme de fermentație alcoolică ar reprezenta o materie primă valoroasă pentru biopesticide / amelioratori de sol active față de speciile toxigene de ciuperci fitopatogene și toxigene.

Tulpina L30b de *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648 la Autoritatea de Depozit Internațională DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig - Germania), este antagonistă față de o serie de ciuperci fitopatogene și toxigene, inclusiv față de cele care produc boli ale

Haesen

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2010 01382
Data depozit 21-12-2010

cerealelor și are capacitate de a produce fermentație alcoolică prin cultivare anaerobă pe hidrolizatele de cereale, inclusiv pe cele contaminate cu micotoxine.

Tulpina L30b de *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648, prezintă următoarele avantaje:

- creștere bogată pe mediile uzuale utilizate pentru cultivarea drojdiilor;
- rezistență mare la uscăre și la concentrații ridicate de alcool, ca urmare a selecției prin șoc osmotic;
- randament de fermentare alcoolică și productivitate orară corespunzătoare utilizării practice.

În continuare se da un exemplu de realizare a invenției.

Tulpina de drojdie antagonista *Saccharomyces cerevisiae* L30b a fost izolată de pe struguri din zona Prahova, România. Pentru izolarea primară s-a utilizat mediul de cultura: glucoză 5%, acid tartaric 0,5% (pH puternic acid 2,5), agar 2%. Coloniile cu aspect de drojdie au fost apoi supuse șocului osmotic. S-au folosit diferite concentrații de glicerol în apă pentru a se obține soluții cu activitatea apei de 0,881, 0,780, 0,648; activitatea apei în aceste soluții a fost verificată cu un aparat Aqualab (Decagon Service, SUA). Din coloniile cu aspect de drojdie s-au realizat suspensii în tampon fiziologic salin, care au fost echilibrate cu soluțiile de șoc osmotic prin echilibrare pe baie de apă la 25°C. Socul osmotic a fost realizat prin injectarea rapidă a 50 μl de suspensie de drojdie în 950 μl de soluție de soc osmotic. După 3 min s-au reluat 100 μl din suspensia supusă șocului osmotic care au fost trecute pe o soluție de glicerol 0,51% ($a_w = 0,993$). Microorganismele care au supraviețuit șocului osmotic au fost cultivate pe mediul YPGA (glucoza 20g; peptona 10g; extract de drojdie 5g; agar 20g; apa distilată sterilă 1000 ml) și purificate prin reluarea pe mediu YPGA a coloniilor izolate. Pentru identificarea tulpinii L30b s-au folosit caracteristici morfologice, fiziologice și moleculare (secvența 26S rDNA D1/D2).

Tulpina de drojdie antagonista L30b se prezintă sub forma de colonii alungite, fără bordura, de culoare crem, aderente, cremoase, iar pe mediul nutritiv se asigură obținerea unei densități celulare de peste $7,5 \times 10^9$ ufc / ml. Caracterile morfologice ale tulpinii L30b. Colonia: *forma*: alungită, fără bordura; *aspectul suprafeței*: netedă, aderentă; *transparența*: translucidă; *consistența*: cremoasă; *culoarea*: crem. Celule: *forma*: ovale-rotunde; *aranjament*: în perechi; *culoarea pe agar*: crem; *suprafața pe agar*: stralucitoare; *textura pe agar*: moale. Diviziunea celulară: *înmugurire*: multipolară; *fisiunea*: absentă. Creșterea filamentelor: *pseudomiceliu*: absent; *miceliu*: absent; *conexiuni de fixare*: absente. Spori asexuali: *balistospori*: absenti; *artrospori*: absenti; *clamidospori*: absenti. Spori sexuali: *ascospori*: prezenți; *forma ascospori*: rotundă;



Attesce

pereti ascospori: netezi; forma asca: ovala; conjugarea: prezenta; teliospori: absenti. In conformitate cu cheia de determinare morfologica la nivel de specie adaptata dupa Stelling-Dekker tulpina L30b a fost identificată ca fiind *Saccharomyces cerevisiae*.

Caracterele fiziologice ale tulpinii de drojdie antagoniste L30b sunt: *Temperatura de dezvoltare: optima 30⁰ C; minima 6⁰ C; maxima: 40⁰ C. Fermentatia semi-anaeroba: glucoza, galactoza, sucroza, maltoza, rafinoza = utilizare pozitiva (+); lactoza, melinioza, amidon solubil = nu se dezvoltă cultura (-). Utilizarea aeroba si cresterea (ca singura sursa de azot): NH₄ 2SO₄: utilizare pozitiva (+). KNO₃, etilamina: nu se dezvoltă cultura (-). Utilizarea aeroba si cresterea: glucoza; galactoza; sucroza; maltoza, trehaloza, melizitoza, etanol; glicerol = utilizare pozitiva (+); celobioza, lactoza; melibioza, inulina, amidon solubil, xyloza; D arabinoza; riboza, eritritol; manitol; sorbitol, acid succinic= nu se dezvoltă cultura (-).* Caracteristicile fiziologice sunt specifice tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae*.

Identificarea pe baza secvenței 26S rDNA D1/D2 s-a realizat prin aplicarea unui protocol de lucru caracterizat prin următoarele etape: obținerea de culturi pure – colonii izolate, tehnica însămânțării prin epuizarea ansei; extracția ADN-ului din drojdii; electroforeză în gel pentru detectarea ADN-ului; amplificarea secvenței 26S rDNA D1/D2 prin tehnica PCR și electroforeză în gel; purificarea ADN-ului care codifică pentru 26S rDNA D1/D2; amplificare enzimatică a acizilor nucleici înainte de secvențializare; precipitarea și uscarea ADN-ului codificând pentru 26S rDNA D1/D2. Secvențierea nucleotidică a fost realizată cu metoda *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele au fost analizate folosind programul *CHROMAS 2.33* (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 26S rDNA D1/D2 obținute cu secvențele existente în Banca de gene *NCBI* (National Center for Biotechnology Information), s-a realizat cu ajutorul programului *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool).

Secventa D1/D2 pentru L30b:

AAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGG
 CAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAG
 GGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGG
 GTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGT
 CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
 ATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTT
 TGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCA
 GACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCAC



TGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTC
GGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGT
AAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTGA

Identificare specie: *Saccharomyces cerevisiae* (100% secventa D1/D2).

Identificarea tulpinii de drojdie antagonista L30b la nivel de specie ca fiind *Saccharomyces cerevisiae* a fost confirmată cu numarul D4481 de catre serviciul de identificare de la National Collection of Yeast Cultures din Norwich - Marea Britanie

Conditiiile pentru depozitare pe termen lung pentru tulpina L30b sunt liofilizare sau crioprezervare (pastrare in azot lichid sau inghetare mecanica la temperaturi cuprinse intre -80⁰ si -135⁰C). Pentru testarea viabilitatii, celulele de drojdie dintr-o eprubeta sunt repicate pe mediul YPGA si sunt cultivate timp de 3 zile la temperatura de 30⁰C. Alternativ, o suspensie provenita dintr-o eprubeta cu drojdie este testata microscopic in vederea cuantificarii viabilitatii celulelor (hemacitometru + violet metil/albastru de metilen) si se considera viabile daca mai mult de 90% dintre celule nu sunt colorate).

Tulpina L30b prezintă antagonism semnificativ *in vitro* față de mai multe ciuperci producătoare de micotoxine (tab.1), și în special față de cele care produc înroșirea grâului și contaminează recolta cu fusariotoxine, inclusiv deoxinivalenol.

Tab. 1. Antagonismul tulpinii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* L30b numarul DSM 23648 față de ciuperci fitopatogene producătoare de micotoxine.

Fitopatogen / micotoxine	coef. x4 zile*	coef. x 8 zile*	Comportare la 8 zile
<i>Fusarium graminearum</i> DSM 4527/ fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium graminearum</i> DSM 67638 / fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,1	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium culmorum</i> , CBS 250.52 / fusariotoxine - trichotecene - DON	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium verticilloides</i> CBS 119825 / Fusariotoxine - fumonisine	0,2	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Fusarium verticilloides</i> ATCC 38932 / Fusariotoxine - fumonisine	0,1	0,2	Puternic antagonist (PA)
<i>Aspergillus flavus</i> F.00048 / aflatoxine	0,3	0,4	Antagonist (A)
<i>Penicilium expansum</i> F.00601 / patulina	0,2	0,2	Puternic antagonist (PA)

* Antagonism (A) cu atât mai puternic (PA) cu cât valorile coeficientului x sunt mai apropiate de valoarea 0; calcularea coeficientului x s-a realizat pe baza raportului dintre razele interne (i) și externe (e) ale ciupercii test (A) și a drojdiei (B), după formula : $x = iA/iB \times eB/Ea$.



Capacitatea de fermentare a hidrolizatorilor de cereale contaminate cu micotoxine a fost testată pe un hidrolizat realizat din făină de grâu contaminată cu deoxinivalenol (DON) la un nivel de 1400 µg/kg, nivel peste limita admisibilă de 1,2 ppm. Într-un vas de reacție din inox, prevăzut cu manta rezistentă la abur 1 bar, 121°C, de 10 l, s-au adus 1360 g făină de grâu, conținând circa 818 g amidon, care au fost dispersate cu 3 l apă distilată, amestecându-se până la formarea unei paste. Vasul de reacție conținând pasta de făină de grâu a fost menținut timp de 5 min la 105 °C pentru a se produce gelatinizarea amidonului. După autoclavare flaconul a fost răcit la 95°C și incubat la această temperatură. În pasta de făină de grâu la 95°C s-au adăugat 5 g de α -amilază bacteriană (activitate enzimatică > 1500 U / kg), 3 ml soluție dintr-o soluție 1 mM de clorură de calciu (conținând 1 µM de Ca^{2+} per ml, respectiv 4 mg de ioni de calciu pentru 100 g de pastă de amidon = 40 mg/kg = 40 ppm Ca^{2+}). Suspensia gelifiată a fost incubată la 95°C timp de 2 ore. La sfârșitul perioadei de incubare s-a verificat solubilizarea amidonului, adăugând peste 2.3 ml suspensie fluidizată, răcită la temperatura camerei, 0,1 ml soluție de iod în iodură de potasiu (preparată prin dizolvarea 2 g iod și 5 g iodura de potasiu în 100 ml apă distilată). Cu această soluție de iod amidonul formează o culoare albastră specifică, iar maltodextrinele rezultate prin solubilizarea amidonului / fluidificarea suspensiei de făină gelifiate generează o culoare roșiatică, a cărei intensitate descrește cu gradul de hidroliză. Soluția rezultată prin fluidificarea făinii de grâu a fost răcită la 55°C și s-au adăugat 7,5 ml de amiloglucozidază fungică (activitate enzimatică > 2000 U/kg). S-a incubat timp de 8 ore pentru zaharificare; la final s-au prelevat probe de 1 ml în care s-au determinat grupările reducătoare cu reactiv DNS. Soluția de zaharuri fermentescibile rezultată a fost adusă la 6000 ml cu apă distilată, pentru a se obține o soluție conținând 150 g/l. Peste cei 6000 ml apă distilată s-au adus 300 ml *Saccharomyces cerevisiae* L30b, suspensie conținând 10^7 ufc/ml. S-a procedat la fermentare timp de 42 de ore, după care drojdiile au fost separate și retestate din punct de vedere al antagonismului față de o tulpină de *Fusarium graminearum* DSM 4527 producătoare de deoxinivalenol DON.

S-a constatat că tulpina de drojdie și-a menținut capacitatea antagonistă *in vitro*. În cursul fermentației au fost monitorizați principalii parametri specifici, respectiv concentrația de etanol (și parametrii derivați precum randamentul și productivitatea volumetrică) și concentrația de glucoză (determinată prin lichid cromatografie) și numărul de drojdii încapsulate, determinate prin tehnica unităților formatoare de colonii, după realizarea primei diluții în soluție 2% de citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul de alginat de calciu. Condițiile analizei lichid cromatografice prin care s-au determinat simultan concentrația de alcool și de glucoză au fost: Sistem Agilent 1290 Infinity LC,

coloana Hi-Plex H 8 μm, 300 x 7,7 mm, p/n: PL1170-6830; eluent: acid sulfuric 5 mM; gradient isocratic; flux de 0,7 ml/min., volum injectat 20 μl, temperatură 60°C, presiune 4.6 MPa (46 bari), detector cu indice de refracție, menținut la 55°C. Rezultatele sunt prezentate în tab. 2.

Tab.2. Evoluția unor parametri specifici fermentației hidrolizatului de făină de grâu contaminat cu DON prin utilizarea drojdiilor antagoniste L30b

Timp fermentație	25	40
Concentrație etanol (%g/g)	7,64	9,05
Randament etanol (g/g)	0,42	0,53
Productivitate volumetrică (g/l/h)	3,03	0,51
Concentrație glucoză	89,2	3,64
Număr celule drojdie ($\times 10^9$ ufc)	0,52	7,25

Aceste rezultate din tab. 2 arată o capacitatea ridicată de fermentare a hidrolizatelor de cereale contaminate cu micotoxine de către drojdiile antagoniste în paralel cu o multiplicare semnificativă. A fost testată capacitatea drojdiei recuperate după fermentare, de a limita producerea de ascospori de către ciuperca *Fusarium graminearum* Schw. DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch) pe substrat solide. Ciuperca toxigenă, forma conidială, *F. graminearum*, a fost cultivată pe mediu înclinat cartof – glucoză - agar. După 7 zile de creștere cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la 10^5 ufc/ml și inoculată (0,1 ml / g) peste paie de grâu sterilizate prin autoclavare. Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, concomitent sau ulterior) cu drojdiile recuperate după fermentație (0,1 ml dintr-o suspensie 10^5 ufc/ml pentru 1 g de paie) și cu inocul de reluat de pe mediu YEM agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost incubate timp de 21 zile, la 25°C, și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiat (2 lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost reumectat de două ori pe săptămâna. Captarea ascosporilor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop 25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile s-a lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost reumectat abundent cu 7 ml de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apotecii. Spori captați în uleiul siliconi au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în trei



repetiții, iar întregul experimentul a fost repetat o dată. Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele sunt prezentate în tab.3. de mai jos.

Tab.3. Influența aplicării suspensiilor de drojdie antagonistă *S. cerevisiae* L30b asupra producerii de ascospori de către *Fusarium graminearum* DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea*).

Varianta experimentală	Ascospori ($\times 10^5$) per cm^2 de substrat	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427, 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie	14,8 a	-
Pre-inoculat cu drojdii L30b recuperate după fermentație 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	1,91 c	12,91%
Inoculat concomitent cu drojdii L30b recuperate după fermentație 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	2,88 bc	19,46%
Post-inoculat cu drojdii L30b recuperate după fermentație 0,1 ml suspensie 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	5,17 b	34,93%
Pre-inoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	1,82 c	12,30%
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	2,44 bc	16,49%
Post-inoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10^5 ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie <i>Fusarium graminearum</i> DSM5427 10^5 ufc/ml per g de paie	4,52 b	30,54%

* valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman la 0,05 nivel de încredere.

Rezultatele din tab.3. demonstrează că drojdie L30b este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene *F. graminearum*, și că își păstrează aceste caracteristici și după fermentația alcoolică.

TULPINA DE DROJDIE CU ACTIVITATE ANTAGONISTA SI FERMENTATIVA

Revendicare

Tulpina L30b de *Saccharomyces cerevisiae*, depozitată cu numărul DSM 23648 la Autoritatea de Depozit Internațională DSMZ, caracterizată prin aceea că este puternic antagonistă față de mai multe ciuperci producătoare de micotoxine, și în special față de cele care produc înroșirea grâului și contaminează recolta cu fusariotoxine, are o ridicată capacitate de fermentare a hidrolizatelor de cereale, inclusiv a celor care sunt contaminate cu micotoxine, și în particular fusariotoxine, este eficientă în reducerea dezvoltării și sporulării ciupercilor fitopatogene și toxigene și își păstrează aceste caracteristici și după ce realizează fermentația alcoolică.



H. H. H. H. H.