



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00720

(22) Data de depozit: 11/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. 3/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
BIOLOGIE ȘI NUTRIȚIE ANIMALĂ
BALOTEȘTI, CALEA BUCUREȘTI NR. 1,
BALOTEȘTI, IF, RO

(72) Inventatori:
• GHEORGHE ANCA, STR. 23 AUGUST
NR. 16, BL. P32, SC. I, ET. 1, AP. 4,
OTOPENI, IF, RO;
• HĂBEANU MIHAELA, STR. REZERVEI,
NR. 66B, AP. 76, ET. 4, LOCALITATEA ROȘU,
COMUNA CHIAJNA, IF, RO;

• CIURESCU GEORGETA, STR. TRAIAN,
NR. 5, BL. P8, SC. 2, ET. 1, AP. 12, OTOPENI,
IF, RO;
• LEFTER NICOLETA AURELIA,
STR. APUSULUI, NR. 96, BL. F, SC. 2, ET. 9,
AP. 165, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• IDRICEANU LAVINIA, STR. PIEȚEI, NR. 18,
ETAJ 2, AP. 17, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DUMITRU MIHAELA,
STR. INDEPENDENȚEI, NR. 40,
COMUNA CORBEANCA, IF, RO

(54) NUTREȚ COMBINAT CU CALITĂȚI FUNCȚIONALE
PENTRU FURAJAREA FAZIALĂ A PUILOR DE CARNE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un nutreț combinat cu calități funcționale bazat pe utilizarea unui amestec furajer n - 3 mix și adaos probiotic, destinat furajării faziale a puilor de carne în scopul îmbunătățirii microflorei intestinale, a stării de sănătate și a performanțelor productive. Nutrețul combinat conform invenției este constituit în procente masice, din 38,82...44,74% porumb, 14...20% șrot soia, 30% amestec furajer n - 3 mix, 4...5,5% gluten porumb, 1...3,3% ulei, 0,24...0,3% DL - Metionină, 0,25...0,38% L - Lizină, 1,1...1,33% carbonat de calciu, 1...1,3% fosfat monocalcic, 0,30% sare, 0,06 premix colină, 0,01% fitază, 1% premix vitamino - mineral pentru pui de carne și adaos de 0,02 g probiotic pe

bază de *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație 1×10^9 UFC/g), nutrețul combinat având următoarea compoziție chimică: 89,21...89,48% substanță uscată, 19,4...22,42% proteină brută, 1,16...1,44% lizină, 0,88...1,08 metionină + cistină, 0,79...0,96% calciu, 0,6...0,69% fosfor, 4,26...5,14% celuloză, 3,69...5,98% grăsime, 40,11...43,45% acid linoleic, 16,36...21,29% acid α - linolenic, 1,91...2,70% raport acizi grași n - 6: n - 3 și 12,69...13,44 MJ/kg energie metabolizabilă.

Revendicări: 4



NUTREȚ COMBINAT CU CALITĂȚI FUNCȚIONALE PENTRU FURAJAREA FAZIALĂ A PUILOR DE CARNE

Invenția se referă la un nutreț combinat bazat pe utilizarea unui amestec furajer bogat în acizi grași omega-3 (AF n-3 mix) și adaos de probiotic destinat furajării faziale a puilor de carne, în scopul îmbunătățirii microflorei intestinale, stării de sănătate și implicit a performanțelor productive.

Este cunoscut faptul că nutrețul combinat clasic destinat alimentației puilor de carne reprezintă o asociere a unor materii prime energetice, proteice, precum și adaos de vitamine și minerale prin includerea de premix vitamino-mineral într-o proporție care să permită satisfacerea cerințelor nutriționale specifice categoriei de vârstă și producție. Prin urmare, nutrețul combinat clasic asigură funcția primară a hranei, respectiv necesarul de substanțe nutritive pentru creștere, dezvoltare și obținerea de produse.

Șrotul de soia este cunoscut ca fiind sursa clasică de proteine utilizată în hrana puilor de carne datorită conținutului proteic ridicat (42-48% proteină brută) și echilibrat în aminoacizi esențiali necesari asigurării cerințelor, însă disponibilitatea redusă, dependența de import și prețul ridicat sunt dezavantaje care au impus găsirea de soluții alternative locale (ex: leguminoase, proteaginoase, etc.).

Dezavantajele nutrețului combinat clasic sunt acelea că, în mod obișnuit, nu conține materii prime vegetale bogate în acizi grași (AG) polinesaturați în proporții benefice pentru sănătate (ex: omega-3, considerați biocompuși activi) și nici componente antimicrobiene (ex: bacterii lactice), care să asigure prin efectul lor terapeutic complementar prevenirea sau limitarea unor patologii digestive și intestinale, făcând astfel trecerea la o nutriție științifică modernă, bazată pe sănătate.

În contextul actual al creșterii interesului consumatorilor de produse naturale, sigure și sănătoase, cercetările au fost orientate pe de o parte către utilizarea în hrana puilor de carne a unor materii prime furajere bogate în AG omega-3 sau a unor surse leguminoase locale, și pe de altă parte în asocierea acestora cu aditivi furajeri microbieni cu efect probiotic, care ar putea reprezenta o modalitate practică de a îndeplini aceste cerințe.

Din gama largă de alimente funcționale, semințele de in (*Linum usitatissimum* L.) au câștigat atenție datorită nutrienților săi unici, componente care pot oferi o varietate de beneficii pentru sănătate, inclusiv prevenirea bolilor cardiovasculare (Thompson și Cunnane, 2003). Pe lângă faptul că sunt considerate cea mai bogată sursă vegetală de



acid α -linolenic (omega-3; 50-62% în ulei, sau 22% în semințe) și lignani (0,2-13,3 mg/g), semințele de in sunt considerate sursă esențială de fibre (28% în greutate), din care 25% sub formă solubilă (Muir, 2006; Singh și col. 2011).

Mazărea (*Pisum sativum* L.) este considerată un ingredient furajer valoros pentru hrana păsărilor datorită conținutului ridicat în proteină, energie și a profilului în aminoacizi comparabil cu cel din soia (Nalle și col., 2011; Tufarelli și col., 2012). Utilizarea leguminoaselor este limitată din cauza conținutului în factori antinutriționali (ex: acid fitic, taninuri condensate, lectine, protează, etc.) compuși care influențează valoarea nutritivă a mazărei (Collins și col., 2006) și care pot afecta fiziologia tractusului gastro-intestinal (TGI) al puilor de carne (Salgado și col., 2002). Microorganismele gastro-intestinale au rol major în absorbția energiei, a substanțelor nutritive și a răspunsului la factorii antinutriționali (Choct și col., 2006).

Probioticele sunt „microorganisme vii care, administrate în cantități adecvate, conferă un beneficiu sănătății gazdei” (FAO/OMS, 2001). Bacteriile lactice, în special tulpinile de *Lactobacillus*, sunt frecvent utilizate ca probiotice datorită capacității de a modula în mod benefic microbiota intestinală a păsărilor, de a dezvolta și stimula sistemul imunitar intestinal cu impact asupra sănătății (Mountzouris și col. 2007; Attia și col. 2017; De Cesare și col. 2020). Tulpinile de *Lactobacillus* au o capacitate ridicată de aderare la epiteliul intestinal și sunt capabile să populeze intestinul puilor de carne încă din prima zi de la ecloziune (Fuller, 1973), fiind considerate a fi flora bacteriană normală a TGI la pui (Kizerwetter-Swida și Binek, 2005).

S-a demonstrat că tulpinile de *Lactobacillus* au efecte pozitive asupra performanțelor productive (Smith 2014), calității cărnii (Mountzouris și col. 2007), modularea microflorei intestinale și inhibarea patogenilor (Patterson și Burkholder 2003). Mecanismele de acțiune includ concurența pentru nutrienții disponibili, stimularea imunitară și modificarea metabolismului microbial și al gazdei (Al-Sagan și col. 2020). Factorii majori care afectează eficacitatea probioticelor sunt tulpina bacteriană, doza (unități formatoare de colonii/pasăre/zi), perioada de tratament și metoda de administrare, respectiv prin furaj sau apă (Gallazzi și col., 2008). Tulpina de *L. acidophilus* D2/CSL a fost izolată din TGI al puilor sănătoși fiind cunoscută pentru capacitatea sa de a echilibra microbiota intestinală (Bianchi și col. 1985) și este considerată un aditiv furajer sigur pentru păsări, inclusiv pentru puii de carne, consumatori și mediul înconjurător (EPSA, 2017).

În literatura de specialitate sunt redată o serie de formule de nutrețuri combinate



ce au în compoziție materii prime bogate în AG polinesaturați destinate alimentației păsărilor.

RO 132521 A2 (Panaite și col. 2018; BOPI nr. 5/2018) se referă la o rețetă furajeră pentru pui de carne, ce determină obținerea de carne îmbogățită în AG polinesaturați omega-3. Rețeta conform invenției este constituită pentru faza de creștere, respectiv finisare din 50,22% respectiv 59,61% porumb, 35,54% respectiv 23,26% șrot de soia, 2,00% șrot de cătină, 2,20% respectiv 8% șrot de in, 5,04% respectiv 2,41% ulei vegetal, 0,13% respectiv 0,36% lizină, 0,29% respectiv 0,32% metionină, 0,05% colină, 1,58% respectiv 1,45% carbonat de calciu, 1,24% respectiv 1,15% fosfat dicalcic, sare și 1% amestec vitamino-mineral, având un conținut de acid α -linolenic de 3,89 g/100g acizi grași totali, respectiv 9,48 g/100 g acizi grași totali. Această rețetă furajeră conține șrot de in ca sursă de AG polinesaturați, însă prezintă următoarele dezavantaje: i). compoziția chimică a șrotului de in este diferită ca urmare a metodei de procesare comparativ cu semințele de in; ii). rețeta furajeră este destinată pentru 2 faze de creștere: creștere, respectiv finisare; iii). compoziția furajeră are ca scop principal obținerea de carne îmbogățită în AG omega-3, și nu face referire la efectele acesteia asupra stării de sănătate la nivel de microfloră intestinală; iv). rețeta furajeră nu conține probiotice bacteriene.

RO 127937 A0 (Criste și col., 2012; BOPI nr. 11/2012) prezintă un nutreț combinat pentru alimentația găinilor ouătoare, care, conform invenției, conține 3.....7% semințe de in, 25....29% porumb, 20% grâu, 10% mazăre, 3% gluten de porumb, 20....21% soia nedegresată, 3....3,5% șrot de soia, 1,2% fosfat monocalcic, 8,76% cretă furajeră, 0,35% sare, 0,17% metionină, 0,06% colină și 1% premix, având 18,40% conținut de proteină brută, 6,61% acid linolenic, 54,97% acid linoleic și 280 ppm/kg conținut vitamină E. Acest nutreț are în compoziție atât semințe de in, cât și mazăre în diferite procente masice, însă prezintă următoarele dezavantaje: i). nutrețul este destinat alimentației găinilor ouătoare, o altă categorie de vârstă și producție, cu cerințe nutriționale complet diferite comparativ cu cele pentru pui de carne; ii). materiile prime vizate respectiv semințele de in și mazăre, nu sunt utilizate sub formă de amestec furajer într-o anumită pondere; iii). nutrețul combinat are ca scop principal obținerea de ouă îmbogățite în AG omega-3; iv). nutrețul nu include în structură probiotice bacteriene.

CN 104187178 (Huang, 2014) prezintă o compoziție furajeră pentru hrănirea găinilor ouătoare, care conține porumb, șrot de soia, gluten de porumb, făină de lucernă, calciu, ulei de pește, semințe de in, drojdie îmbogățită cu seleniu, oligoelemente și



premix de vitamine, fosfat dicalcic și vitamina E, în vederea îmbogățirii ouălor în AG omega-3 și reducerea cu aprox. 50% a conținutului în colesterol al acestora, comparativ cu ouăle clasice. Această compoziție conține semințe de in, însă prezintă următoarele dezavantaje: i). este destinată alimentației găinilor ouătoare, categorie cu cerințe nutriționale diferite comparativ cu puii de carne; ii). conține și ulei de pește, ca sursă bogată de AG omega-3; iii). are ca scop principal obținerea de ouă îmbogățite în AG omega-3; iii). conține drojdie - sursă de probiotice non-bacteriene.

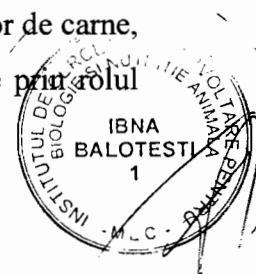
Cercetări proprii anterioare cu privire la utilizarea a 6...12% semințe de in extrudat și adaos de *L. acidophilus* D2/CSL în hrana puilor de carne (Gheorghe și col., 2020) au evidențiat efectele pozitive complementare asupra stării de sănătate și rolul probiotic în echilibrarea microflorei intestinale. Acest studiu nu face referire la utilizarea boabelor de mazăre, ca ingredient proteic, în structura nutrețului combinat pentru puii de carne.

Problema tehnică, obiectivă, pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui nutreț combinat bazat pe utilizarea unui amestec furajer bogat în AG omega-3 (AF n-3 mix) realizat din semințe de in și mazăre, destinat furajării faziale a puilor de carne. În particular, prezenta invenție face referire și la utilizarea tulpinii de *L. acidophilus* D2/CSL concomitent cu AF n-3 mix, pentru potențarea efectelor asupra organismului gazdă, pe de o parte prin aportul de nutrienți esențiali pentru sănătate (ex: AG omega-3, aminocizi, lignani, etc.), și pe de altă parte prin acțiunea probiotică a bacteriilor lactice, care asigură legătura între nutriție și sănătate, conferind astfel calități funcționale produsului.

Soluția la această problemă, așa cum reiese din descriere și revendicări, constă în obținerea unui nutreț combinat ce conține un amestec furajer format din semințe de in (20%) și mazăre boabe (80%), precum și adaos de 0,02 g/kg nutreț *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație $1,0 \times 10^9$ UFC/g).

Nutrețul combinat, conform invenției, înlătură dezavantajele specificate anterior prin aceea că prezintă o asociere de materii prime furajere care permit un optim nutrițional, un aport de compuși bioactivi (acid α -linolenic) și adaos de probiotic cu efect antimicrobian și de modulare a microflorei intestinale, în special în contextul interzicerii utilizării antibioticelor ca promotori de creștere în industria furajelor pentru păsări din ianuarie 2006 (Regulation 1831/2003/EC; Ordinul 199/2006).

Nutrețul combinat cu calități funcționale pentru furajarea fazială a puilor de carne, conform invenției, are ca obiectiv principal îmbunătățirea stării de sănătate prin rolul imunomodulator și de modificare a compoziției microflorei intestinale.



Nutrețul combinat destinat furajării faziale (start, creștere, finisare) a puilor de carne, conform invenției revendicate, este constituit, în procente masice, din: porumb 38,82...40,71...44,74%, șrot soia 20...18...14%, amestec furajer n-3 mix 30%, gluten porumb 5,50...5,00...4,00%, ulei 1,00...2,10...3,30%, DL-Metionină 0,30...0,25...0,24%, L-Lizină 0,38...0,27...0,25%, carbonat calciu 1,33...1,20...1,10%, fosfat monocalcic 1,30...1,10...1,00%, sare 0,30%, premix colină 0,06%, fitază 0,01%, premix vitamino-mineral pentru pui de carne 1,00% și adaos de 0,02 g/kg nutreț *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație $1,0 \times 10^9$ UFC/g).

Nutrețul combinat, conform invenției revendicate, prezintă următoarea compoziție chimică: 89,48...89,29...89,21% substanță uscată; 22,42...21,20...19,40% proteină brută; 1,44...1,29...1,16% lizină; 1,08...0,94...0,88% metionină+cistină; 0,96...0,87...0,79% calciu; 0,69...0,66...0,60% fosfor; 4,26...4,96...5,14% celuloză; 3,69...5,12...5,98% grăsime, 40,11...42,45...43,45% acid linoleic; 21,29...18,50...16,36% acid α -linolenic; 1,91...2,33...2,70% raport n-6: n-3; 12,69...12,98...13,44 MJ/kg energie metabolizabilă.

Nutrețul combinat destinat furajării faziale a puilor de carne, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- asigură sub aspect cantitativ și calitativ necesarul de substanțe nutritive pentru pui de carne în faza de start, creștere și finisare;
- preamestecul lipo-proteic AF n-3 mix format din 1 parte semințe de in și 4 părți mazăre permite o mai bună absorbție a nutrienților datorită conținutului în compuși bioactivi tipul AG omega-3;
- permite asocierea și potențarea efectelor biocompușilor activi din AF n-3 mix cu cele antibacteriene din aditivul furajer cu efect probiotic *L. acidophilus* D2/CSL, cu efecte pozitive asupra performanțelor productive;
- are efecte benefice asupra stării de sănătate prin reducerea lipidelor plasmatice (total colesterol, trigliceride) și creșterea concentrației de proteine totale, indicând că AF n-3 mix poate stimula sinteza de proteine asociate imunității.
- îmbunătățește microflora intestinală prin proliferarea populațiilor bacteriene benefice în detrimentul celor patogene, fapt reflectat și în performanțele productive obținute;
- se reduce gradul de poluare prin dejecții prin includerea bacteriilor lactice;
- aditivul furajer *L. acidophilus* D2/CSL este considerat sigur pentru păsări, inclusiv pentru puii de carne, consumatori și mediul înconjurător (EPSA, 2017).
- nu prezintă risc pentru operator și toxicitate pentru păsări, în cazul respectării condițiilor de păstrare și termenului de depozitare.



Se prezintă, în continuare, un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu de realizare a 100 kg nutreț combinat (NC) conform invenției revendicate, destinat furajării faziale a puilor de carne:

- se realizează și se omogenizează preamestecul lipo-proteic AF n-3 mix compus din 20% semințe de in și 80% mazăre;
- diferența de materii prime din structura nutrețului combinat se dozează, după care se macină într-o moară cu ciocănele;
- se realizează și se omogenizează timp de 6 minute nutrețul complet pe faze de creștere astfel:

i). *pentru faza de start*: 38,82 kg porumb, 20 kg șrot soia, 30 kg *amestec furajer n-3 mix*, 5,50 kg gluten porumb, 1,00 kg ulei, 0,30 kg DL-Metionină, 0,38 kg L-Lizină, 1,33 kg carbonat calciu, 1,30 kg fosfat monocalic, 0,30 kg sare, 0,06 kg premix colină, 0,01 kg fitază, 1 kg premix vitamino-mineral și adaos de 0,02 g/kg nutreț *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație $1,0 \times 10^9$ UFC/g).

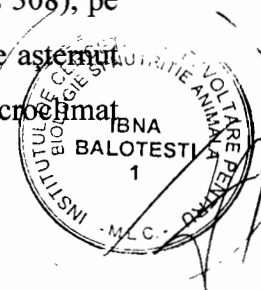
ii). *pentru faza de creștere*: 40,71 kg porumb, 18 kg șrot soia, 30 kg *amestec furajer n-3 mix*, 5,00 kg gluten porumb, 2,10 kg ulei, 0,25 kg DL-Metionină, 0,27 kg L-Lizină, 1,20 kg carbonat calciu, 1,10 kg fosfat monocalic, 0,30 kg sare, 0,06 kg premix colină, 0,01 kg fitază, 1 kg premix vitamino-mineral și adaos de 0,02 g/kg nutreț *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație $1,0 \times 10^9$ UFC/g).

iii). *pentru faza de finisare*: 44,74 kg porumb, 14 kg șrot soia, 30 kg *amestec furajer n-3 mix*, 4,00 kg gluten porumb, 3,30 kg ulei, 0,24 kg DL-Metionină, 0,25 kg L-Lizină, 1,10 kg carbonat calciu, 1,00 kg fosfat monocalic, 0,30 kg sare, 0,06 kg premix colină, 0,01 kg fitază, 1 kg premix vitamino-mineral și adaos de 0,02 g/kg nutreț *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație $1,0 \times 10^9$ UFC/g).

Nutrețul combinat complet astfel obținut, se prezintă sub formă de sub *formă de făină* cu o granulație de 2,8 mm, și este destinat furajării puilor de carne pe faze de creștere (start, creștere și finisare). Produsul are o valabilitate de 45 zile de la data fabricației în condiții de păstrare la temperatura mediului ambiant și depozitare în spații corespunzătoare.

Se prezintă în continuare efecte ale utilizării nutrețului combinat trifazial validate prin teste pe puii de carne.

Testul biologic s-a efectuat pe un efectiv de 400 pui broiler (hibrid Ross 308), pe o perioadă de 42 zile. Puii au fost crescuți într-o hală experimentală la sol, pe așternut permanent, în țarcuri separate pentru fiecare lot/repetiție, în condiții de microclimat



controlat. Programul de lumină utilizat a fost de 23 ore lumină: 1 oră întuneric în prima săptămână de viață, apoi perioada de lumină a fost redusă treptat până la 20 ore lumină: 4 oră întuneric. Hrana și apa au fost asigurate *ad-libitum*.

Puii au fost repartizați în 4 loturi omogene cu câte 100 pui/lot (4 loturi x 5 repetiții x 20 pui/lot) astfel: martor (M) și experimental (AF n-3 mix), cu și fără adaos de probiotic (*L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, 1.0×10^9 UFC/g nutreț).

Amestecul furajer bogat în AG omega 3 (n-3 mix) utilizat în elaborarea noului nutreț combinat trifazial a fost alcătuit conform structurii prezentate în tabelul 1, și a fost caracterizat din punct de vedere chimic pentru evaluarea compoziției și a valorii nutritive (tabelul 2).

Tabelul 1. Structură a preamestecului AF n-3 mix îmbogățit în acizi grași omega 3

Ingrediente	Pondere de includere (%)
Semințe de in	20
Mazăre	80
Total	100

Determinările analitice au fost efectuate prin metode standardizate (ISO), conforme OJEU, (2009): metoda gravimetrică pentru substanța uscată (6496:2001) și cenușă (2171:2010); metoda Kjeldahl (5983-2:2009) pentru proteină brută; metoda extracției cu solvenți organici (6492:2001) pentru grăsime brută; metoda clasică cu filtrare intermediară (6865:2002) pentru celuloza brută; cromatografie HPLC pentru profilul în aminoacizi; gazcromatografie pentru acizi grași; spectrometrie de absorbție atomică pentru conținutul în minerale.

Din analiza chimică a AF n-3 mix (tabelul 2), reiese faptul că acesta are un conținut proteic (19,82% PB) și energetic ridicat (12,31 MJ/kg EM), intermediar surselor din care provine (semințe de in și mazăre), un profil în aminoacizi esențiali echilibrat și se remarcă prin conținutul ridicat în acid α -linolenic (22,11%) și un raport acid linoleic: acid α -linolenic redus (1,69%).

Tabelul 2. Compoziția chimică, profilul în aminoacizi și acizi grași esențiali ai amestecului furajer n-3 mix

Specificație	AF n-3 mix
Substanță uscată, %	88,17
Proteină brută, %	19,82
Grăsime brută, %	4,50
Celuloză brută, %	9,60



Substanțe extractiv neazotate, %	50,77
Calciu, %	0,29
Fosfor, %	0,47
Energie metabolizabilă (MJ/kg)	12,31
<i>Aminoacizi esențiali (g/100 g PB)</i>	
Lizină	1,42
Metionină + Cistină	0,68
Treonină	0,90
Arginină	1,84
<i>Acizi grași esențiali (% total acizi grași ester metil)</i>	
Acid linoleic (C18:2 n-6)	37,34
Acid α -linolenic (C18:3 n-3)	22,11
Raport linoleic: α -linolenic	1,69

Pe baza analizelor chimice ale materiilor prime furajere și în conformitate cu recomandărilor nutriționale ale hibridului (Ross 308 Aviagen, 2014) au fost elaborate nutrețurile combinate (NC) faziale pentru pui de carne.

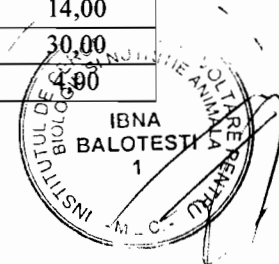
Pentru furajarea fazială a puilor de carne s-a utilizat un NC clasic (M) pe bază de porumb, șrot soia, gluten porumb, ulei, aminoacizi de sinteză (DL-metionină, L-lizină HCl), carbonat calciu, fosfat monocalcic, sare, premix colină, fitază și premix vitamino-mineral (tabelul 3). Nutrețul combinat experimental (AFn-3 mix), s-a diferențiat prin includerea amestecului furajer n-3 mix pe bază de semințe de in și mazăre, conform structurii prezentate în tabelul 1.

În plus, atât la lotul M, cât și la lotul n-3 mix, la variantele pozitive în structura NC trifazial s-a introdus probioticul *L. acidophilus* D2/CSL (concentrație bacteriană de $1,0 \times 10^9$ CFU/g), sub formă de pulbere, în doză de 0,02 g/kg NC.

Analiza chimică brută a nutrețurilor combinate trifaziale elaborate (tabelul 4) a confirmat faptul că acestea au fost echilibrate energo-proteic, cu un conținut similar în lizină și aminoacizi cu sulf, precum și minerale (calciu și fosfor), în conformitate cu recomandările nutriționale ale hibridului (Ross 308 Aviagen, 2014).

Tabelul 3. Structura nutrețurilor combinate (NC) faziale pentru pui de carne testate

	Faze de creștere					
	Start (1-10 zile)		Creștere (11-24 zile)		Finisare (25-42 zile)	
Variante NC	M ¹	AFn-3 mix ²	M	AFn-3 mix	M	AFn-3 mix
Ingrediente (%)						
Porumb	58,07	38,82	60,33	40,71	64,34	44,74
Șrot soia	30,00	20,00	28,00	18,00	24,00	14,00
AF n-3 MIX	0	30,00	0	30,00	0	30,00
Gluten porumb	5,50	5,50	5,00	5,00	4,00	4,00



Ulei vegetal	1,50	1,00	2,30	2,10	3,50	3,30
Fosfat monocalcic	1,30	1,30	1,00	1,10	1,00	1,00
Carbonat calciu	1,48	1,33	1,38	1,20	1,20	1,10
Sare	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Lizină	0,49	0,38	0,39	0,27	0,36	0,25
DL-Metionină	0,29	0,30	0,23	0,25	0,23	0,24
Colină HCl 50%	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Fitază (Aextra PHY5000 L)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Premix vitamino-mineral ³	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Probiotic <i>L. acidophilus</i> ⁴	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Total	100	100	100	100	100	100

¹NC M, nutreț combinat martor; ²NC AFn-3 mix, nutreț combinat AFn-3 mix.

³Premixul vitamino-mineral inclus în nutrețul combinat conține/Kg nutreț: 1 100 000 UI vitamina A; 200 000 UI vitamina D3; 2700 UI vitamina E; 300 mg vitamina K3; 200 mg vitamina B1; 400 mg vitamina B2; 1485 mg vitamina B3; 2700 mg vitamina B5; 300 mg vitamina B6; 4 mg vitamina B7; 100 mg vitamina B9; 1,8 mg vitamina B12; 2000 mg vitamina C; 8000 mg Mn; 8000 mg Fe; 500 mg Cu; 6000 mg Zn; 152 mg I; 18 mg Se; 37 mg Co; 6000 mg antioxidant.

⁴Probiotic *L. acidophilus* D2/CSL (CECT 4529, concentrație 1.0×10^9 CFU/g) = 0,02 g/kg NC.

Din analiza profilului în acizi grași ai nutrețurilor combinate trifaziale elaborate (tabelul 4) reiese faptul că nutrețului combinat trifazial (n-3 mix), conform invenției revendicate, a avut concentrații ridicate de acid α -linolenic (5,60 ori în faza de start; 4,23 ori în faza de creștere; 3,20 ori în faza de finisare), ca urmare a includerii în structură a 30% AF n-3 mix, comparativ cu nutrețul clasic. De asemenea, raportul n-6: n-3 s-a redus cu 13,8% în faza de start, 19% în faza de creștere și 25,9% în faza de finisare în cazul nutrețului combinat n-3 mix, conform invenției revendicate, comparativ cu nutrețul martor.

Tabelul 4. Compoziția chimică și profilul în acizi grași a nutrețurilor combinate faziale testate

Specificație	Faze de creștere					
	Start (1-10 zile)		Creștere (11-24 zile)		Finisare (25-42 zile)	
Variante NC	M ¹	AFn-3 mix ²	M	AFn-3 mix	M	AFn-3 mix
<i>Compoziție chimică</i>						
Energie metabolizabilă (MJ/kg)	12,82	12,69	13,00	12,98	13,46	13,44
Substanță uscată, %	89,92	89,48	89,26	89,29	89,36	89,21
Proteină brută, %	22,59	22,42	21,30	21,20	19,45	19,40
Lizină, %	1,44	1,44	1,29	1,29	1,16	1,16
Metionină + cistină, %	1,08	1,08	0,94	0,94	0,88	0,88
Calciu, %	0,96	0,96	0,87	0,87	0,79	0,79
Fosfor total, %	0,70	0,69	0,65	0,66	0,61	0,60
Grăsime, %	3,81	3,69	4,63	5,12	5,27	5,98
Celuloză, %	3,51	4,26	4,40	4,96	3,94	5,14
<i>Acizi grași (% total acizi grași ester metil)</i>						
Acid palmitic (C16:0)	14,97	10,68	12,06	10,75	13,84	12,41
Acid stearic (C18:0)	3,56	3,60	3,30	3,29	3,58	3,68
Acid oleic (C18:1n-9)	24,34	22,58	25,51	23,38	23,26	22,37



Acid linoleic (C18:2n-6)	51,70	40,11	52,8	42,45	52,65	43,45
Acid α -linolenic (C18:3n-3)	3,80	21,29	4,37	18,50	5,12	16,36
Acid eicosadienoic (C20:2n-6)	0,17	0,17	0,20	0,19	0,15	0,16
Acid arachidonic (C20:4n-6)	0,32	0,31	0,29	0,21	0,45	0,36
Acid docosadienoic (C22:2n-6)	0,14	0,18	0,25	0,22	0,19	0,17
Σ AGS ³	18,53	14,28	15,36	14,04	17,42	16,09
Σ AGM ⁴	24,34	22,58	25,51	23,38	23,26	22,37
Σ AGP ⁵	56,13	62,06	57,91	61,57	58,56	60,5
Σ n-6	52,33	40,77	53,54	43,07	53,44	44,14
Σ n-3	3,80	21,29	4,37	18,50	5,12	16,36
Raport n-6: n-3	13,77	1,91	12,25	2,33	10,44	2,70

¹NC M, nutreț combinat martor; ²NC AFn-3 mix, nutreț combinat AFn-3 mix.
³AGS, acizi grași saturați; ⁴AGM, acizi grași mononesaturați; ⁵AGP, acizi grași polinesaturați.

Administrarea în hrana puilor de carne a NC trifazial, conform invenției revendicate, contribuie la obținerea de performanțe productive comparabile, redate în tabelul 5. În plus, adaosul de probiotic a îmbunătățit performanțele productive (cu 3,2 % sporul mediu zilnic și 1% consumul specific), însă diferențele nu au fost semnificative pe plan statistic.

În continuare este prezentat profilul plasmatic lipoproteic (tabelul 6) al puilor de carne la vârsta de 42 zile. Nutrețul combinat îmbunătățit prin adaos AF n-3 mix și probiotic, conform invenției, are un efect hipolipidemic, reducând concentrația de colesterol total (cu 2,5%) și trigliceride (cu 14%). Totodată, crește concentrația în proteine totale, indicând că amestecul n-3 mix (cu 18,9%) ce conține preponderent mazăre poate stimula sinteza de proteine asociate imunității.

Tabelul 5. Performanțe productive

Item	Probiotic	Spor, total perioada (g)	Spor mediu zilnic (g)	Consum mediu zilnic (g)	Consum specific (g:g)
M	Nu	2577,53	61,36	108,78	1,773
AFn-3 mix	Nu	2516,08	59,91	106,20	1,772
M	Da	2656,54	63,25	110,71	1,750
AFn-3 mix	Da	2599,47	61,89	108,62	1,755
SEM		39,61	0,94	1,17	0,01
Efecte					
Dietă					
M		2617,03	62,31	109,75	1,761
AFn-3 mix		2557,77	60,90	107,42	1,764
Probiotic <i>L. acidophilus</i> D2/CSL					
Nu		2546,81	60,64	107,51	1,772
Da		2628,10	62,57	109,66	1,753
Valoare P					
Dietă		0,093	0,093	0,382	0,087
Probiotic		0,200	0,200	0,416	0,330
Diferențe nesemnificative P>0,05.					



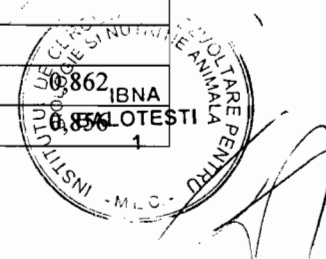
Tabelul 6. Profilul lipo-proteic plasmatic

Item	Probiotic	TC mg/dl	TG mg/dl	Glu mg/dl	TPro g/dl	Alb g/dl	Cre mg/dl	AU mg/dl
M	Nu	134,40	61,00	275,00	2,84	1,18	0,46	7,76
AFn-3 mix	Nu	130,80	53,80	263,40	3,08	1,20	0,56	7,32
M	Da	128,00	58,60	270,60	2,64	1,16	0,44	7,84
AFn-3 mix	Da	125,20	50,30	257,80	3,14	1,18	0,48	7,76
SEM		1,37	2,01	3,54	0,06	0,02	0,02	0,26
Efecte								
Dietă								
M		131,20	59,80	272,80	2,74	1,18	0,45	7,80
AFn-3 mix		128,00	51,50	260,60	3,11	1,17	0,52	7,54
Probiotic <i>L. acidophilus</i> D2/CSL								
Nu		132,60	57,40	269,20	2,96	1,19	0,46	7,54
Da		126,60	52,10	264,20	2,89	1,17	0,51	7,80
Valoare P								
Dietă		0,076	0,040	0,097	0,005	1,000	0,130	0,640
Probiotic		0,028	0,059	0,484	0,559	0,757	0,281	0,647
TC, total cholesterol; TG, trigliceride; Glu, glucide; TPro, total proteine, Alb, albumine, Cre, creatinină; AU, acid uric. Diferențe ne semnificative P>0,05; Diferențe semnificative P<0,05.								

În continuare se prezintă rezultatele privind pH-ul intestinal și populația bacteriană la nivel intestinal, respectiv în ileon (tabelul 7) și cecum (tabelul 8). Utilizarea nutrețului combinat revendicat are efecte pozitive asupra populațiilor benefice atât în ileon, cât și în cecum, în detrimentul populațiilor patogene, respectiv s-a observat o creștere semnificativă a numărului de *Lactobacillus* spp. și reducerea semnificativă a populațiilor de *E. coli*, concomitent cu reducerea raportului *Lactobacillus*: *E. coli*. Acest fapt întărește și aduce argumente suplimentare în sprijinul ipotezei că bacteriile acidolactice au efect inhibitor asupra bacteriilor patogene din tractusul gastro-intestinal, iar prin asocierea AF n-3 mix cu probioticul *L. acidophilus* D2/CSL efectele sunt potențate, acțiunea acestora fiind sinergică.

Tabelul 7. pH și microfloră intestinală (log₁₀ UFC/g) - ileon

Item	Probiotic	pH	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> : <i>E. coli</i> ratio
M	Nu	6,40	6,208	6,393	7,394	0,865
AFn-3 mix	Nu	6,44	6,207	6,373	7,427	0,858
M	Da	6,42	6,161	6,372	7,410	0,860
AFn-3 mix	Da	6,46	6,182	6,375	7,466	0,854
SEM			0,005	0,002	0,008	0,001
Efecte						
Dietă						
M		6,41	6,184	6,382	7,402	0,862
AFn-3 mix		6,46	6,195	6,374	7,447	0,856



Probiotic <i>L. acidophilus</i> D2/CSL						
Nu		6,42	6,208	6,383	7,410	0,861
Da		6,44	6,172	6,373	7,438	0,857
Valoare <i>P</i>						
Dietă		0,712	0,091	0,003	0,0001	0,0001
Probiotic		0,341	0,0001	0,001	0,012	0,004
Dieta x Pro		0,992	0,089	0,0001	0,235	0,875
Diferențe ne semnificative $P > 0,05$; Diferențe semnificative $P < 0,05$.						

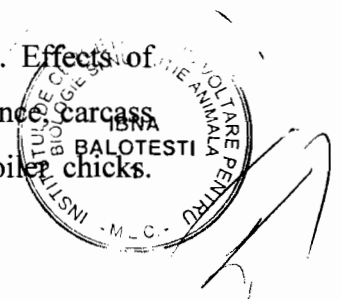
Tabelul 8. pH și microfloră intestinală (\log_{10} UFC/g) - cecum

Item	Probiotic	pH	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus: E. coli</i> ratio
M	Nu	6,85	8,816	9,193	11,45	1,24
AFn-3 mix	Nu	6,95	8,834	9,198	11,51	1,26
M	Da	6,94	8,797	9,163	12,36	1,34
AFn-3 mix	Da	6,98	8,735	9,164	12,05	1,31
SEM			0,009	0,004	0,121	0,013
Efecte						
Dietă						
M		6,89	8,807	9,178	11,90	1,30
AFn-3 mix		6,96	8,785	9,181	11,78	1,28
Probiotic <i>L. acidophilus</i> D2/CSL						
Nu		6,90	8,825	9,196	11,48	1,25
Da		6,96	8,766	9,164	12,20	1,33
Valoare <i>P</i>						
Dietă		0,881	0,002	0,345	0,451	0,442
Probiotic		0,377	0,0001	0,001	0,001	0,001
Dieta x Pro		0,618	0,0001	0,504	0,273	0,284
Diferențe ne semnificative $P > 0,05$; Diferențe semnificative $P < 0,05$.						



Bibliografie

1. Attia YA, Al-Harhi MA, El-Shafey AS, Rehab YA, Kim WK. 2017. Enhancing tolerance of broiler chickens to heat stress by addition with vitamin E, vitamin C and/or probiotics. *Ann Anim Sci.* 17:1–15.
2. Al-Sagan AA, Al-Yemni AH, Al-Abdullatif AA, Attia YA, Hussein EOS. 2020. Effects of different dietary levels of blue lupine (*Lupinus angustifolius*) seed meal with or without probiotics on the performance, carcass criteria, immune organs, and gut morphology of broiler chickens. *Frontiers Vet Sci.* 7: 124.
3. Bianchi SB, Camaschella P, Lavezzari D. 1985. Les lactobacilles spécifiques du poulet. Leur influence sur la microflore du tube digestif. *Microbiol Aliment Nutr.* 3:73–82.
4. Choct M, 2009. Managing gut health through nutrition. *Br. Poult. Sci.*, 50: 9-15.
5. Collins CL, Eason PJ, Dunshea FR, Higgins TJV, King RH. 2006. Starch but not protein digestibility is altered in pigs fed transgenic peas containing α -amylase inhibitor. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 1894-1899.
6. Criste RD, Panaite TD, Ropotă M, Olteanu M, Bercau AM, Pricop F, Untea AE, Duca RC, Dragomir C. 2012. RO 127937 A0. Nutreț combinat pentru alimentația găinilor ouătoare. BOPI nr. 11/2012.
7. De Cesare A, Sala C, Castellani G, Astolfi A, Indio V, Giardini A, Manfreda G. 2020. Effect of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) supplementation in drinking water on chicken crop and caeca microbiome. *PLoS One* 15(1):e0228338.
8. EFSA, 2017. Safety and efficacy of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (*Lactobacillus acidophilus* CECT 4529) as a feed additive for chickens for fattening. 15(4): 4762.
9. FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO: Córdoba, Argentina, p. 1–34.
10. Gheorghe A, Lefter NA, Idriceanu L, Ropotă M, Hăbeanu M. 2020. Effects of dietary extruded linseed and *Lactobacillus acidophilus* on growth performance, carcass traits, plasma lipoprotein response, and cecal bacterial populations in broiler chicks.



Italian Journal of Animal Science. 19(1): 822-832.

11. Fuller R. 1973. Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. J.Appl. Microbiol. 36: 131-139.

12. Gallazzi D, Giardini A, Mangiagalli MG, Marelli S, Ferrazzi V, Orsi C, Cavalchini LG. 2008. Effects of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL on laying hen performance. Ital J Anim Sci. 7:27–37.

13. Huang Y. 2014. CN104187178. Feed composition useful for feeding laying hens, comprises corn, soybean meal, corn gluten meal, alfalfa meal, stone powder, fish oil, linseed, selenium-enriched yeast, trace elements and vitamin premix, dicalcium phosphate, and vitamin E.

14. Kizerwetter-Swida M, Binek M. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. Polish J. Microbiol., 54: 287-294.

15. Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poult Sci. 86:309–317.

16. Muir AD. 2006. Flax lignans-analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. J AOAC Int., 89:1147-57.

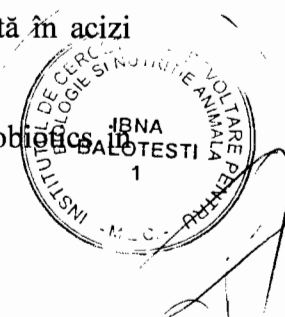
17. Nalle CL, Ravindran V, G. Ravindran. 2011. Nutritional value of peas (*Pisum sativum* L.) for broilers: Apparent metabolisable energy, apparent ileal amino acid digestibility and production performance. Anim. Prod. Sci., 51:150–155.

18. OJEU (Official Journal of the European Union L 54). 2009. Commission Regulation (EC) No. 152/2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.

19. OJEU (Official Journal of the European Union). 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. OJEU 20.10.2010, Series L 276: 33-79.

20. Panaite TD, Criste RD, Ropotă M, Olteanu M, Criste IV, Vasile G, Soica C. 2018. RO 132521 A2. Rețetă furajeră pentru obținerea de carne de pui îmbogățită în acizi grași polineasaturați omega 3. BOPI nr. 5/2018.

21. Patterson JA, Burkholder KM. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poult Sci. 82:627–631.



22. Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lallès JP. 2002. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. *Livestock Produc. Sci.*, 74 (2):191-202.
23. Singh KK, Mridula D, Rehal J, Barnwal P. 2011. Flaxseed: a potential source of food, feed, and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51:210–222.
24. Smith JM. 2014. A review of avian probiotics. *J Avian Med Surg.* 28:87–94.
25. Thompson LU, Cunnane SC. 2003. Flaxseed in human nutrition. 2nd ed. Champaign: AOCS Publishing.
26. Tufarelli V, Naz S, Khan RU, Mazzei D, Laudadio V. 2012. Milk quality, manufacturing properties and blood biochemical profile from dairy cows fed peas (*Pisum sativum* L.) as dietary protein supplement. *Arch. Tierzucht* 55:132–139.
27. Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition.
28. Ordinul ANSVSA 199/2006.



REVENDICĂRI:

1. Nutrețul combinat destinat furajării faziale (start, creștere, finisare) a puilor de carne, caracterizat prin aceea că, este constituit, în procente masice, din: porumb 38,82...40,71...44,74%, șrot soia 20...18...14%, *amestec furajer n-3 mix 30%*, gluten porumb 5,50...5,00...4,00%, ulei 1,00...2,10...3,30%, DL-Metionină 0,30...0,25...0,24%, L-Lizină 0,38...0,27...0,25%, carbonat calciu 1,33...1,20...1,10%, fosfat monocalcic 1,30...1,10...1,00%, sare 0,30%, premix colină 0,06%, fitază 0,01%, premix vitamino-mineral pentru pui de carne 1,00% și adaos de probiotic 0,02 g din masa nutrețului.
2. Nutreț combinat, conform revendicării 1, în structura căruia se introduce un *amestec furajer n-3 mix 30%*, ca sursă de acizi grași omega-3, format în procente masice din 20% semințe de in și 80% mazăre boabe, având o valoare energetică de 12,31 MJ/kg energie metabolizabilă, proteină brută 19,82% și acid α -linolenic 22,11%.
3. Nutreț combinat, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că include în structură un probiotic pe bază de *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (concentrație de $1,0 \times 10^9$ CFU/g) sub formă de pulbere, în proporție de 0,02 g din masa nutrețului.
4. Nutrețul combinat, conform revendicării 1, prezintă următoarea compoziție chimică: 89,48...89,29...89,21% substanță uscată; 22,42...21,20...19,40% proteină brută; 1,44...1,29...1,16% lizină; 1,08...0,94...0,88% metionină+cistină; 0,96...0,87...0,79% calciu; 0,69...0,66...0,60% fosfor; 4,26...4,96...5,14% celuloză; 3,69...5,12...5,98% grăsime, 40,11...42,45...43,45% acid linoleic; 21,29...18,50...16,36% acid α -linolenic; 1,91...2,33...2,70% raport n-6: n-3; 12,69...12,98...13,44 MJ/kg energie metabolizabilă.

