



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00250**

(22) Data de depozit: **13/05/2021**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2023** BOPI nr. **6/2023**

(41) Data publicării cererii:
29/10/2021 BOPI nr. **10/2021**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **LUPU CARMEN, INTRAREA BÂRSEI,
NR.5, BL.G3, AP.45, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 133114 A2; "ȘROTUL DE CAMELINĂ ȘI
ȘROTUL DE IN, SURSE ALTERNATIVE ÎN
HRANA RUMEGĂTOARELOR, EFECTE LA
NIVELUL METABOLISMULUI RUMINAL",
LUMEA SATULUI, 2017; RO 127936 B1**

(54) **FURAJ COMBINAT CU RISC REDUS DE CONTAMINARE
CU MICOTOXINE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA**



RO 135248 B1

1 Prezenta invenție se referă la un furaj combinat cu risc redus de contaminare cu
micotoxine și la un procedeu de obținere a acestuia, având aplicații în zootehnie.

3 Sunt cunoscute o serie întregă de procedee de reducere/eliminare a contaminării
cu micotoxine a furajelor, în special a cerealelor-boabe din compoziția acestora. Cerealele
5 boabe sunt contaminate cu micotoxine în special în timpul vegetației acestora. Riscul de
contaminare a cerealelor păioase (în special grâu și orz) cu micotoxine formate în timpul
7 vegetației este de obicei asociat unei boli, înroșirea (fuzarioza) spicului, care a re-apărut pe
scară largă în toate zonele în care se cultivă cereale păioase în lume. Cauzele reapariției
9 acestei boli devastatoare a cerealelor păioase sunt multiple, incluzând schimbările climatice,
extinderea tehnologiilor conservative și ecologice, creșterea ponderii exploatațiilor agricole
11 predominant cerealiere, evoluția naturală a populațiilor de *Fusarium* (Oancea 2011). Un
întreg complex de specii de *Fusarium* producătoare de micotoxine este implicat în
13 declanșarea acestei boli. Inițial s-a considerat că în Europa și America de Nord agentul
patogen principal care cauzează înroșirea spicului este *F. graminearum* (cu teleomorfa
15 *Gibberella zeae* (Schwein) Petch) (McMullen, Jones et al. 1997). În cadrul speciei *F.*
graminearum au fost descrise două grupuri, grupul 1 heterotalic și grupul 2, homotalic, grupul
17 1 fiind diferențiat în specia *F. pseudograminearum*, (Aoki and O'Donnell 1999), cu teleomorfa
Gibberella coronata (Aoki and O'Donnell 1999). Analiza filogenetică a 2100 de izolate de *F.*
19 *graminearum* din întreaga lume a dus la divizarea speciei *F. graminearum* inițiale în nouă
specii filogenetice, pe baza a șapte linii descendente inițial diferențiate. Speciile au fost
21 denumite *F. austroamericanum* (linia 1), *F. meridionale* (linia 2), *F. boothii* (linia 3), *F.*
mesoamericanum (linia 4), *F. acaciae-mearnsii* (linia 5), *F. asiaticum* (linia 6), *F. cortaderiae*
23 (linia 8) și *F. brasiliicum* (linie nediferențiată inițial). Denumirea de *F. graminearum* a fost
păstrată pentru linia 7, responsabilă de înroșirea spicului de grâu în Europa și America de
25 Nord. Ulterior au mai fost propuse două noi specii: *F. veroșii* (obținută din Japonia și Ungaria)
și *F. gerahii* (obținută din Vestul Mijlociului al Statelor Unite) (Starkey, Ward et al. 2007).
27 Separarea propusă în 11 specii diferite a speciei inițiale *F. graminearum* nu a fost însă
acceptată de toți cercetătorii implicați în studierea genului *Fusarium* (Leslie and Bowden
29 2008), astfel încât în prezent se folosesc termenii de *F. graminearum sensu stricto* (pentru
specia diferențiată în linia 7) și *sensu lato* (pentru tot grupul de specii filogenetice asociat
31 inițial).

În afara acestor specii din grupul *Fusarium graminearum sensu lato*, alte specii de
33 *Fusarium* producătoare de micotoxine, respectiv *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*,
F. langsethiae, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. arthro-sporioides*, *F. tricinctum*, *F. cerealis/F.*
35 *crookwellense*, ca și 2 specii de *Microdochium*, *M. nivalis* și *M. majus*, inițial descrise ca
F. nivale, au fost asociate cu fuzarioza spicului de grâu în întreaga lume (Xu and Nicholson
37 2009). Anumite specii pot predomina în unele gazde din categoria cerealelor păioase, în
diferite regiuni ale lumii, sau în anumite condiții climatice. În Europa s-a constatat că
39 *F. graminearum* a înlocuit *F. culmorum* ca principal patogen care cauzează înroșirea spicului
(Valverde-Bogantes, Bianchini et al. 2020). Toată această diversitate este asociată unei
41 diversități ridicate a micotoxinelor pe care fusariile fitopatogene le produc în boabele infec-
tate. Cele mai periculoase fusariotoxine includ trichotecenele deoxinivalenol (DON), nivalenol
43 (NIV), HT2/T2, și micotoxina estrogenică zearalenonă (ZEA) (Bottalico and Perrone 2002).
Metodele analitice noi au făcut posibilă analizarea simultană a multor micotoxine. Acest lucru
45 a atras atenția asupra așa-numitelor fusariotoxine emergente produse în boabele cerealelor
păioase, fusariotoxine despre care cunoștințele referitoare la toxicitate sunt limitate
47 (Fraeyman, Croubels et al. 2017), ca de exemplu enniatinele, beauvericina și moniliformina.
La nivelul EU au stabilite limite maxime de admisibilitate pentru două fusariotoxine prezente

RO 135248 B1

În boabele cerealelor păioase, DON și ZEA. Pe viitor reglementările s-ar putea extinde și la alte micotoxine, cu ar fi de exemplu HT2/T2 (Knutsen, Barregård et al. 2017). Riscul producerii fuzariozei spicului și acumulării de fusariotoxine este amplificat considerabil de precipitațiile din timpul formării bobului cerealelor păioase (De Wolf, Madden et al. 2003, Prandini, Sigolo et al. 2009).

Ochratoxinele se formează de asemenea în cerealele păioase (Elmholt and Hestbjerg 1999). Deși denumirea acestor micotoxine vine de la *Aspergillus ochraceus*, în climatul temperat specia majoră producătoare de ochratoxine este *Penicillium verrucosum* (Dhungana, Aii et al. 2019).

Riscul de contaminare a porumbului în timpul vegetației este asociat a două tipuri de fungi toxigeni. Aflatoxinele, considerate a fi cele mai periculoase micotoxine, datorită efectului lor cancerigen foarte ridicat, sunt produse de ciuperci microscopice care determină infecții inaparente ale bobului în curs de formare. O metodă elegantă de a evidenția această capacitate a aspergiliilor aflatoxigene de a parazita boabele în curs de formare este cea de evidențiere a endoinfecției boabelor de porumb cu ciuperci microscopice producătoare de aflatoxine. Metoda este simplă și presupune depunerea pe un mediu de cultură agarizat a boabelor de porumb sterilizate la suprafață și secționare aseptice. A fost elaborat un mediu selectiv pentru facilitarea identificării ciupercilor toxigene, pe care au fost puse în evidență că și în condițiile din România aspergiliile toxigene infectează inaparent boabele de porumb în curs de formare (Lupu, Oancea et al. 2001). Aflatoxinele sunt produse de 22 de specii care aparțin grupului *Aspergillus section Flavi*, 4 specii din grupul A section *Nidulantes* și 2 specii din grupul A. section *Ochraceorosei*. Cele mai importante și mai cunoscute specii producătoare de aflatoxine din secțiunea *Flavi* sunt *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* și *A. nomius* (Pickova, Ostry et al. 2021). Seceta și stresul hidric favorizează infecția endofită a bobului de porumb în curs de formare și producerea de aflatoxine (Damianidis, Ortiz et al. 2018, Williams, Henry et al. 2021).

Fumonisinele, altă categorie de micotoxine care contaminează porumbul boabe și pentru care s-au stabilit deja limite maxime admisibile, sunt produse de un fung care este general recunoscut ca fiind fitopatogen, *F. verticillioides*, anterior denumit *F. moniliforme*, cu telemorfa *Gibberella fujikuroi* (Leslie, Plattner et al. 1992). *F. verticillioides* se dezvoltă endofit la porumb și, în cazul unei umidități ridicate, produce putregaiul știuletelui (Cao, Santiago et al. 2014). Acumularea ridicată de fumonisine este favorizată de expunerea la stres hidric (Roucou, Bergez et al. 2021).

Nu numai cerealele boabe sunt contaminate cu micotoxine în timpul vegetației. Studiile recente au demonstrat că și în cazul culturilor oleoproteaginoase (ale căror șroturi sunt utilizate ca sursă plastică/de proteine în formulele nutrețurilor combinate) are loc o contaminare cu micotoxine în timpul vegetației. Micotoxine produse de specii toxigene de *Alternaria* au fost detectate în boabele de floarea-soarelui (Hickert, Bergmann et al. 2016, Lopez, Venema et al. 2016). Fusariotoxine, ca de ex. DON și NIV, au fost puse în evidență și în boabe de soia înainte de recoltare (Barros, Zanon et al. 2012, Naeem, Li et al. 2019).

Diversitatea speciilor implicate în contaminarea cu micotoxine a cerealelor-boabe în timpul vegetației, la care se adaugă efectul inductor al stresului hidric/secetei sau al excesului de precipitații în fazele de formare a boabelor de cereale, fac ca limitarea contaminării cu micotoxine a cerealelor boabe în timpul vegetației să fie dificil de realizat. Schimbările climatice care amplifică variațiile de temperatură și tiparul precipitațiilor cresc riscul de contaminare cu micotoxine. Condițiile de stocare care nu sunt optime favorizează dezvoltarea fungilor contaminanți, inclusiv prin extinderea lor spre suprafața semințelor contaminate, și producerea suplimentară de micotoxine (Neme and Mohammed 2017). Un

RO 135248 B1

1 alt aspect recent relevat, care complică evaluarea prin analize rapide, este existența formelor
de toxină conjugate, formate atunci când sunt metabolizate de plantă, care sunt denumite
3 și "micotoxine mascate" și al căror rol nu este încă cunoscut (Zhang, Nie et al. 2020).

La nivelul animalelor de fermă, în special al monogastricelor, micotoxinele determină
5 efecte patologice multiple - imunotoxicitate, afecțiuni hepatice, inflamarea sistemului digestiv
(Gao, Meng et al. 2020, Yang, Song et al. 2020). Pierderile sunt datorate atât efectelor
7 negative asupra creșterii și dezvoltării și fertilității, cât și datorită costurilor pentru tratarea
bolilor produse de micotoxine (Magnoli, Poloni et al. 2019, Yang, Song et al. 2020).
9 Acumularea micotoxinelor (inclusiv a metaboliților lor, "micotoxine mascate") în produsele
animale reprezintă o problemă de siguranță alimentară și de sănătate publică majoră
11 (Milicevic, Skrinjar et al. 2010).

Procedeele de eliminare a produselor potențial contaminate prin sortare mecanică
13 sunt printre cele mai des uzitate. Datorită faptului că nu se intervine (semnificativ) cu nici un
fel de mijloc chimic, fizic sau biologic, caracteristicile de calitate ale produselor nu sunt afec-
15 +tate. De asemenea, procedeele pot fi automatizate, deci productivitatea este corespunzătoare
celorlalte procedee utilizate pentru producerea nutrețurilor combinate și concentrate.

17 **RO 133114 A2** se referă la un supliment nutritiv de uz veterinar pentru diminuarea
contaminării cu micotoxine a furajelor la suine și la un procedeu de obținere a acestuia.
19 Suplimentul este constituit din 53...58% adsorbant mineral de micotoxine de tip diatomită,
2...3% uleiuri esențiale bioactive cu acțiune antimicotică, 3...5% izolat proteic din soia,
21 0,7...0,9% hidroxid de calciu, 0,1...0,2% hidroxid de potasiu, 37...39% zer din lapte.

“Șrotul de camelină și șrotul de in, surse alternative în hrana rumegătoarelor, efecte
23 la nivelul metabolismului ruminal” - 02 Noiembrie 2017 “Lumea Satului”
(<https://www.lumeasatului.ro/stiri-agricultura/utilaje-agricole/4220-srotul-de-camelina-si-srotul-de-in-surse-alternative-in-hrana-rumegatoarelor-efecte-la-nivelul-metabolismului-ruminal.html>) sugerează utilizarea șrotului de camelină rezultată din obținerea uleiurilor din
25 semințe prin presare la rece, în hrana animalelor.

27 **RO 127936 B1** descrie un supliment nutrițional pentru hrana porcilor, care conține
șrot de soia, și ulei de camelină, acesta din urmă fiind utilizat pentru conținutul bogat în acizi
29 grași polinesaturați $\omega 3$ și $\omega 6$.

31 Brevetul **US 8841570 B2** descrie un sistem și o metodă nedistructivă pentru detec-
tarea aflatoxinelor, care este bazată pe fluorescența roșu-portocalie. Un plan de sortare este
33 iluminat cu o sursă de lumină UV de bandă largă. Se obține cel puțin o imagine a produselor
nesortate pe planul de sortare menționat. Se evaluează componenta roșie a fluorescenței,
35 de la 620 nm la 720 nm și se realizează o analiză a imaginii. Produsele contaminate,
determinate pe baza histogramei componentei roșii, sunt separate cu ajutorul unui dispozitiv
37 care le elimină selectiv. Dezavantajul procedurii este că nu elimină produsele care sunt
contaminate cu micotoxine de către fungii care se dezvoltă exclusiv în interiorul boabelor de
39 cereale sau semințe oleoproteaginoase.

Brevetul **US 4795651 A** prezintă un procedeu de separare a produselor agricole, și
41 în special a cerealelor contaminate cu aflatoxine în fracții care sunt, respectiv, contaminate
cu aflatoxine și în mod substanțial lipsite de aflatoxine, care cuprinde următoarele etape (a)
43 contactarea materialului alimentar contaminat cu aflatoxine cu un mediu de flotație având o
densitate de 0,9 până la aproximativ 1,2 g/cm³, separând astfel produsul agricol în două
45 fracții, aceea cu o greutate specifică mai mică decât mediul de flotație și cea cu o greutate
specifică egală sau mai mare decât cea a mediului de flotație; (b) uscarea ambelor fracții ale
47 materialului alimentar până la conținutul lor inițial de umiditate. Procedeu descris elimină
boabele/semințele contaminate de fungi toxigeni care se dezvoltă endofit și care au o
49 diferență de densitate între produsele contaminate și cele necontaminate, dar nu le elimină
pe cele care sunt contaminate la suprafață.

RO 135248 B1

Brevetul **RO 111819** asociază eliminarea produselor contaminate în profunzime în timpul vegetației prin flotație în soluții moderat alcaline cu eliminarea produselor contaminate la suprafață prin sortare după fluorescența produșilor fungici de metabolism, amplificată prin expunere la mediu moderat alcalin. 1
3

Dezavantajul procedeeelor de flotație în mediu lichid este determinat însă de consumurile energetice necesare eliminării umidității crescute în timpul procesului de flotație. În cazul proceselor de flotație în aer s-a demonstrat o eficacitate redusă în decontaminarea de aflatoxine produse de fungi aflatoxigeni endofitți (Aoun, Stafstrom et al. 2020). 5
7

O altă direcție de limitare a efectelor micotoxinelor este prin aplicarea unor adsorbenți care reduc biodisponibilitatea micotoxinelor. Brevetul **US 5149549 A** prezintă o metodă de creștere a valorii nutriționale a furajelor contaminate cu micotoxine prin adăugarea argilă de tip montmorillonit în furaj. Argila de tip montmorillonit este aplicată într-o cantitate suficientă pentru a absorbi sau adsorbi micotoxinele din tractul digestiv al animalelor. În afară de argile/aluminosilicați, un alt adsorbent specific pentru micotoxine sunt pereții de drojdie. Ambii glucani din peretele celular al drojdiilor, (1 → 3)-β-d-glucani, și (1 → 6)-[β-d-glucani, leagă micotoxinele atât prin legături de hidrogen, cât și prin interacții van der Waals (Yiannikouris, Andre et al. 2006). Cererea de brevet **JP 2009234948 A** descrie o compoziție adsorbantă de micotoxine, care include un produs rezultă prin acțiunea unor enzime litice asupra peretelui celular de drojdie care conține 60-95% în greutate glucan solubil. Brevetul **EP 1079696 B1** se referă la o compoziție pentru legarea și, prin urmare, inactivarea micotoxinelor din furaje, alcătuită dintr-un extract de perete celular de drojdie de perete și un aluminosilicat. Brevetul **US 9968116 B** protejează aplicarea unui beta zeolit adsorbent, cu eficiență ridicată de legare pentru aflatoxina B1, ochratoxina A, zearalenonă, acidul mico-fenolic, acidul ciclopiazonic, fumonisin B1, T-2 și patulină. 9
11
13
15
17
19
21
23

Cererea de brevet **US 10806164 B2** protejează un adsorbant de micotoxine pe baza unui derivat de betaină foarte specific pentru tricotecenele A și B, și în special pentru vomitoxină (sau deoxinivalenol) și toxina T-2, care este legat de suprafața unui aluminosilicat prin intermediul unui compus organic amfoteric cu o grupare carboxil. Fiind un compus donor de metil, betaina susține detoxifierea micotoxinelor la nivelul ficatului și a fost folosită pentru a preveni micototoxicozele la animalele de fermă (**RU 2 391975**), Betaina a fost asociată și unei compoziții care include perete celular de drojdie și aluminosilicați (cererea de brevet **WO 2019076820 A1**). 25
27
29
31

Betaina susține metabolizarea micotoxinelor în ficat, dar principala problemă pe care o generează micotoxinele este răspunsul inflamator de la nivelul intestinului (Gao, Meng et al. 2020). Adsorbenții folosiți ca aditiv furajer au însă tendința de a lega și o serie de vitamine și de aminoacizi esențiali, reducându-le semnificativ disponibilitatea în sistemul digestiv (Kihal, Rodriguez-Prado et al. 2020). Utilizarea adsorbenților ar trebui să fie realizată în funcție de nivelul efectiv al contaminării cu micotoxine. Metodele uzuale de analiză pentru micotoxine necesită o procedură de prelevare laborioasă pentru a fi relevante, deoarece contaminarea cu micotoxine este punctiformă (Whitaker 2003, Miraglia, De Santis et al. 2005, Kibugu, Mdachi et al. 2021). 33
35
37
39
41

Această contaminare punctiformă determină un alt risc al produselor vrac, care, în cazul manipulărilor care implică fluidizare, pot determina separarea aditivilor adsorbenți de micotoxine, datorită densităților lor diferite de cea a restului de ingrediente furajere. 43

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de furaj combinat cu risc redus de contaminare cu micotoxine, în care să fie utilizată o nouă combinație de adsorbenți de micotoxine, care să aibă o capacitate redusă de legare vitamine și ridicată de legare micotoxine. 45
47

RO 135248 B1

1 Este un alt obiect al acestei invenții realizarea unui compoziții de furaj combinat cu
risc redus de contaminare cu micotoxine, în care să se realizeze combinarea adsorbentilor
3 de micotoxine cu o sursă de acizi grași polinesaturați de tip omega-3, știut fiind rolul
antiinflamator al acestora la nivelul enterocitelor din tubul digestiv al animalelor de fermă
5 (Sundaram, Giromini et al. 2020).

Este un alt obiect al acestei invenții realizarea unui procedeu prin care să se combine
7 optim procedeele de separare prin sortatoare optice cu procedeele de adăugare a
adsorbentilor selectivi pentru micotoxine. Procedeu implică adaptarea unei
9 metode rapide, care să permită estimarea conținutului de micotoxine pentru a realiza o
dozare exactă a adsorbentilor pentru micotoxine.

11 Furajul combinat conform invenției este sub formă de peleți și este constituit din
59,7...58,9 kg făină de cereale, 23,5...34,2 kg vegetale oleoproteaginoase, din care 6...9 kg
13 șrot de camelină, 6,1...6,5 kg fân tocat de lucernă și 11...19,1kg șrot de soia, 0,06...0,125 kg
aditiv de legare a micotoxinelor care este alcătuit din 25...30% pereți celulari de drojdie cu
15 un conținut de cel puțin 40% β -glucani și 70...75% diatomită care are cel puțin 86% SiO_2 ,
dimensiuni ale frustulelor între 5...14 μm și o suprafață specifică de minimum 30 m^2g^{-1} ,
17 3,8...4,4 kg ulei de camelină suplimentat cu 3000 UI retinol, 1250 UI colecalciferol și 24 mg
acetat de tocoferil pe fiecare litru de ulei, 1,29...1,475 kg aminoacizi și colină, 0,75...1,7 kg
19 săruri minerale și 0,2 kg premix vitamino-mineral.

Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

21 - preluarea din silozul de cereale a boabelor de cereale și foto-sortarea acestora
pentru eliminarea boabelor care prezintă modificări ale suprafeței asociate cu infecția cu
23 fungi toxigeni;

- adăugarea peste 59,7-68,9 kg cereale boabe a 23,5-34,2 kg de oleoproteaginoase
25 vegetale, dintre care 6-9 kg de șroturi de camelină, provenite dintr-o presă mecanică de ulei,
restul fiind fân de lucernă tocat și șroturi de soia;

27 - măcinarea amestecului de cereale și oleoproteaginoase și analiza făinii prin
spectrometrie moleculară Raman la 585 nm și respectiv FT-NIR între 1100 și 2600 nm,
29 pentru evaluarea conținutului de acid α -linolenic 18:3n-3 și, respectiv, de aflatoxine formate
de fungii infectanți endo-fiti;

31 - adăugarea de aditiv legare micotoxine, în funcție de semnalul în spectrul Raman,
la 956 cm^{-1} , 0,060 kg pentru o intensitate de 8000 unități Raman și 0,125 kg, la o intensitate
33 de 9300 unități Raman;

- suplimentarea uleiului de camelină cu 3000 UI retinol, 1250 UI de colecalciferol și
35 24 mg acetat de tocoferil pe fiecare litru de ulei și adăugarea de ulei de camelină,
proporțional cu conținutul de aflatoxine estimat prin spectroscopie Raman, între 3,8 și 4,4 kg,
37 până la un semnal de 45,6-52,8% absorbție FT-NIR în intervalul spectral 5540-5350 cm^{-1} ,
respectiv 30,4-35,2% absorbție, în intervalul spectral 8650-8250 cm^{-1} , corespunzător unui
39 nivel de 0,6-0,72% acid α -linoleic 18:3n-3 în furajul concentrat;

- adăugarea de 1,29-1,475 amestec de aminoacizi și colină 0,75-1,7 kg de săruri
41 minerale, 0,2 kg de premixuri vitamino-minerale, până la 100 kg de furaj concentrat;

- omogenizarea amestecului, urmată de comprimarea furajului concentrat într-o presă
43 de peleți, răcirea și ambalarea peletilor.

Aditivul de legare micotoxine este alcătuit din 25-30 g de pereți celulari de drojdie,
45 cu un conținut de cel puțin 40% β -glucani, și de 70-75% diatomită, care are cel puțin 86%
 SiO_2 , dimensiuni ale frustulelor între 5-14 μm și o suprafață specifică de minimum 30 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

RO 135248 B1

Invenția prezintă următoarele avantaje:	1
- compoziția de furaj propusă prezintă un risc redus de contaminare cu micotoxine, datorită combinației tehnicii de separare prin fotosortare mecanică a boabelor a cerealelor infectate la suprafață cu fugi toxigeni, și care prezintă modificări de culoare, cu tehnica adăugării de adsorbenți pentru micotoxinele formate de fungii toxigeni care infectează interior boabelor de cereale;	3
- compoziția propusă reduce inflamația la nivelul intestinului, datorită asigurării unui aport adecvat, direct proporțional cu nivelul de aflatoxine, al acidului α -linoleic 18:3n-3, cunoscută pentru efectul său antiinflamator, și datorită stimulării microorganismelor prebiotice intestinale, datorită aportului de fibre prebiotice, celuloză și xilani din făina de lucernă și manani din pereții celulari de drojdie;	7
- asigură adaptarea concentrației de aditiv adsorbent de micotoxine la nivelul de aflatoxine din cereale, datorită determinării aflatoxinelor printr-o metodă non-invazivă;	9
- menține un nivel al vitaminelor liposolubile care este proporțional cu cel al adsorbentului și care compensează eventuala legare a acestor vitamine de aditivul adsorbent;	11
- înlătură riscul de separare a aditivilor cu densitate mică, cum este de exemplu diatomită, datorită compactării și peletizării.	13
În continuare se exemplifică realizarea invenției prin exemple care o ilustrează fără a o limita.	15
Exemplul 1	17
Se preiau circa 22 kg de boabe de porumb dintr-un siloz, care se urcă în rezervorul de alimentare a unui sortator de culoare (de exemplu: Fotosorter B2, Aky Technology, Turcia). Se separă boabele de porumb care au culoarea modificată datorită dezvoltării la suprafață a fungilor (potențial toxigeni). Se procedează la fel cu 40 kg de boabe de grâu. Se adaugă 20 kg de boabe de porumb, 39,7 kg de boabe de grâu într-un amestecător. Peste aceste 59,7 kg cereale se aduc 34,2 kg de oleoproteaginoase vegetale, dintre care 9 kg de șroturi de camelină, provenite dintr-o presă mecanică de ulei, 6,1 kg de fân de lucernă tocat și 19,1 kg șroturi de soia.	19
Amestecul de cereale și oleoproteaginoase se macină pe o moară cu ciocănele. Făina rezultată se analizează făinii prin spectrometrie moleculară Raman (de exemplu: cu un echipament Raman 585 Stellarnet, Tampa, FL, USA) și respectiv FT-NIR (de exemplu: cu SpectraStar XT, Unity Scientific, Milford, MA 01757 USA), între 1100 și 2600 nm pentru evaluarea conținutului de acid α -linolenic 18:3n-3 și, respectiv, de aflatoxine formate de fungii infectanți endo-fiți. Conținutul de aflatoxine se determină prin măsurarea intensității la 956 cm^{-1} . Conținutul de acid α -linolenic 18:3n-3 se determină prin determinarea absorbției în intervalele spectral $5540\text{-}5350\text{ cm}^{-1}$ și $8650\text{-}8250\text{ cm}^{-1}$.	21
În funcție de semnalul în spectrul Raman, la 956 cm^{-1} se adaugă aditiv de legare micotoxine, 0,060 kg pentru o intensitate de 8000 unități Raman. Aditivul de legare micotoxine este alcătuit din 25 g de pereți celulari de drojdie, cu un conținut de cel puțin 40 β -glucani, și de 75% diatomită, care are cel puțin 86% SiO_2 , dimensiuni ale frustulelor între 5-14 μm și o suprafață specifică de minimum $30\text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.	23
Uleiul provenit de la presa de <i>Camelina sativa</i> se suplimentează cu ajutorul unei micropipete automate (0-200 μl , Gilson, Middleton, WI, SUA), 3000 UI retinol, 1250 UI de colecalciferol și 24 mg acetat de tocoferil pe fiecare litru de ulei. Se adaugă de ulei de camelină, proporțional cu conținutul de aflatoxine estimat prin spectroscopie Raman, între 3,8, până la un semnal de 45,6 absorbție FT-NIR în intervalul spectral $5540\text{-}5350\text{ cm}^{-1}$, respectiv 30,4% absorbție în intervalul spectral $8650\text{-}8250\text{ cm}^{-1}$, corespunzător unui nivel de 0,6% acid α -linoleic 18:3n-3 în furajul concentrat.	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 135248 B1

1 Se adaugă 1,475 amestec de aminoacizi și colină (0,7 kg clorură de colină, 60%;
0,3 kg DL metionină, 0,3 kg lizină, 0,175 kg L-treonină), 1,7 kg de săruri minerale (0,65 kg
3 de carbonat de calciu, 0,75 kg de fosfat monocalcic, 0,15 kg clorură de sodiu, 0,15 kg de
5 bicarbonat de sodiu) și 0,2 kg de premixuri vitamino-minerale, până la 100 kg de furaj
concentrat.

Premixurile vitamino-minerale conțin pe fiecare gram: 3 mg menadionă; 3 mg tiamină;
7 8 mg riboflavină; 55 mg niacină; 13 mg pantotenat de calciu; 5 mg piridoxină, 2 mg folat;
16 μg ciancobalamină; 200 μg biotină; 16 mg sulfat de cupru 40 mg sulfat de fier; 1,25 mg
9 iodură de potasiu; 0,3 mg selenate de sodiu; 120 mg de sulfat de mangan; 100 mg sulfat de
zinc, 2,5 mg ulei de parafină și restul până la 1 g făină integrală de cereale.

11 Premixul vitaminic și de oligo-minerale, amestecul de aminoacizi și colină și ames-
tecul de săruri minerale se dozează cu ajutorul unui dozator cu șnec calibrat. Se omo-
13 genizează amestecul și apoi se peletizează amestecul (de exemplu: cu o presă 33-50, Kahl,
Reinbek, Germania). Peleții se răcesc și se ambalează.

15 Furajul rezultat este destinat cu precădere monogastricelor, în special pui de găină
și porci.

17 Exemplul 2

Se procedează ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe. Se iau circa 50 de kg grâu
19 și se fotosortează, din care se adaugă peste 20 kg boabe de porumb 48,9 kg de grâu. Peste
aceste 68,9 kg cereale se aduc 23,5 kg de oleoproteaginoase vegetale, dintre care 6 kg de
21 șroturi de camelină, provenite dintr-o presă mecanică de ulei, 6,5 kg de fân de lucernă tocat
și 11 kg șroturi de soia. În funcție de semnalul în spectrul Raman, la 956 cm⁻¹ se adaugă
23 aditiv de legare micotoxine, 0,125 kg pentru o intensitate de 9300 unități Raman. Se
suplimentează cu 4,4 kg de ulei de camelină, până la un semnal de 52,8% absorbție FT-NIR
25 în intervalul spectral 5540-5350 cm⁻¹, respectiv de 35,2% absorbție, în intervalul spectral
8650-8250 cm⁻¹, corespunzător unui nivel de 0,72% acid α-linoleic 18:3n-3 în furajul
27 concentrat. Se adaugă 1,29 amestec de aminoacizi și colină (0,6 kg clorură de colină, 60%;
0,27 kg DL metionină, 0,27 kg lizină, 0,15 kg L-treonină), 0,75 kg de săruri minerale (0,35
29 kg de carbonat de calciu, 0,1 kg de fosfat monocalcic, 0,15 kg clorură de sodiu, 0,15 kg de
bicarbonat de sodiu) și 0,2 kg de premixuri vitamino-minerale, până la 100 kg de furaj
31 concentrat.

Furajul rezultat este destinat cu precădere monogastricelor, în special găini ouătoare
33 și porci grași.

35 Bibliografie

37 Aoki T. and K. O'Donnell (1999). "*Morphological and molecular characterization of*
Fusarium pseudograminearum sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of
39 *F. graminearum*". *Mycologia*, 91(4): 597-609.

Aoki T. and K. O'Donnell (1999), "*Morphological characterization of Gibberella*
41 *coroncola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*".
Mycoscience 40(6): 443-453.

43 Aoun M., W. Stafstrom, P. Priest, J. Fuchs, G. L. Windham, W. P. Williams and R. J.
Nelson (2020), "*Low-cost grain sorting technologies to reduce mycotoxin contamination in*
45 *maize and groundnut*", *Food Control* 118: 107363.

47 Barros G., M. S. A. Zanon A. Abod, M. S. Oviedo, M. L. Ramirez, M. M. Reynoso, A.
Torres and S. Chulze (2012). "*Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and*
chemotype determination of a field population of the Fusarium graminearum complex
49 *associated with soybean in Argentina*". *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry*
Analysis Control Exposure & Risk Assessment 29(2): 293-303.

RO 135248 B1

- Bottalico A. and G. Perrone (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Mycotoxins in plant disease*, Springer: 611-624. 1
- Cao, A., R. Santiago, A. J. Ramos, X. C. Souto, O. Aguin, R. A. Malvar and A. Butron (2014). "*Critical environmental and genotypic factors for Fusarium verticillioides infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain*". *International Journal of Food Microbiology*, 177: 63-71. 3
- Damianidis, D., B. Ortiz, G. Windham, K. Bowen, G. Hoogenboom, B. Scully, A. Hagan, T. Knappenberger, P. Woli and W. Williams (2018). "*Evaluating a generic drought index as a predictive tool for aflatoxin contamination of corn: From plot to regional level*". *Crop protection*, 113:64-74. 5
- De Wolf, E., L. Madden and P. Lipps (2003). "*Risk assessment models for wheat Fusarium head blight epidemics based on within-season weather data*". *Phytopathology* 93(4): 428-435. 7
- Dhungana, B., S. Aii, E. Byamukama, P. Krishnan, J. X. Wu and M. Caffè-Tremil (2019). "*Effects of temperature, water activity, and fungal isolate on ochratoxin A accumulation in oat grain inoculated with Penicillium verrucosum and development of a methodology to screen oat cultivars for ochratoxin A accumulation*". *Cereal Chemistry*, 96(5): 950-957. 9
- Elmholt, S. and H. Hestbjerg (1999). "*Field ecology of the ochratoxin A-producing Penicillium verrucosum: survival and resource colonisation in soil*". *Mycopathologia* 147(2): 67-81. 11
- Fraeyman, S., S. Croubels, M. Devreese and G. Antonissen (2017). "*Emerging fusarium and alternaria mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics*". *Toxins* 9(7): 228. 13
- Gao, Y. A., L. Meng, H. M. Liu, J. Q. Wang and N. Zheng (2020). "*The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins*". *Toxins* 12(10): 42. 15
- Hickert, S., M. Bergmann, S. Ersen, B. Cramer and H. U. Humpf (2016). "*Survey of Alternaria toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach*". *Mycotoxin Research*, 32(1): 7-18. 17
- Knutsen, H.-K., L. Barregård, M. Bignami, B. Bruschweiler, S. Ceccatelli, B. Cottrill, M. Dinovi, L. Edler, B. Grasl-Kraupp, O. Hogstrand, L. Hoogenboom, C. S. Nebbia, I. Oswald, A. Petersen, M. Rose, A.-C. Roudot, T. Schwerdtle, C. Vleminckx, G. Vollmer, H. Wallace, C. Dall'Asta, A. Gutieb, M. Metzler, I. Oswald, D. Parent-Massin, M. Binaglia, H. Steinkeilner and J. Alexander (2017). "*Appropriateness to set a group health based guidance value for T2 and HT2 toxin and its modified forms*". *EFSA Journal* 15(1): e04655. 19
- Leslie, J. and R. Bowden (2008). "*Fusarium graminearum: when species concepts collide*". *Cereal Research Communications* 36(Supplement-6): 609-615. 21
- Leslie, J. F., R. D. Plattner, A. E. Desjardins and C. J. Klittich (1992). "*Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of Gibberella fujikuroi (Fusarium section Liseola)*". *Phytopathology* 82(3): 341-345. 23
- Lopez, P., D. Venema, T. de Rijk, A. de Kok, J. M. Scholten, H. G. J. Mol and M. de Nijs (2016). "*Occurrence of Alternaria toxins in food products in The Netherlands*". *Food Control* 60: 196-204. 25
- Lupu, C, F. Oancea and V. Severin (2001). "*Comparative study on fungal charge of maize kernels*". *Analele ICDPP* 31: 59-64. 27
- Magnoli, A. P., V. L. Poloni and L. Cavaglieri (2019). "*Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry*". *Current Opinion in Food Science* 29: 99-108. 29

RO 135248 B1

- 1 McMullen, M., R. Jones and D. Gallenberg (1997). "*Scab of wheat and barley: a re-*
2 *emerging disease of devastating impact*". *Plant disease* 81(12): 1340-1348.
- 3 Milicevic, D. R., M. Skrinjar and T. Baltic (2010). "*Real and Perceived Risks for*
4 *Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control*". *Toxins*,
5 2(4): 572-592.
- 6 Naeem, M., H. J. Li, L Yan, M. A. Raza, G. S. Gong, H. B. Chen, C. P. Yang, M.
7 Zhang, J. Shang, T. G. Liu, W. Q. Chen, M. F. Abbas, G. Irshad, M. I. Khaskheli, W. Y. Yang
8 and X. L. Chang (2019). "*Characterization and Pathogenicity of Fusarium Species*
9 *Associated with Soybean Pods in Maize/Soybean Strip Intercropping*". *Pathogens* 8(4): 17.
- 10 Neme, K. and A. Mohammed (2017). "*Mycotoxin occurrence in grains and the role*
11 *of postharvest management as a mitigation strategies. A review*". *Food Control* 78: 412-425.
- 12 Oancea, F. (2011). "Conservation agriculture system based bioactive vegetative
13 mulch consists of green crop". *Scrisul Romanesc, Craiova*: 67-87.
- 14 Pickova, D., V. Ostry and F. Malir (2021). "*A Recent Overview of Producers and*
15 *Important Dietary Sources of Aflatoxins*". *Toxins* 13(3): 15.
- 16 Prandini, A., S. Sigolo, L. Filippi, P. Battilani and G. Piva (2009). "*Review of predictive*
17 *models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat*". *Food and*
18 *Chemical Toxicology* 47(5): 927-931.
- 19 Roucou, A., C. Bergez, B. Meleard and B. Orlando (2021). "*A Fumonisin Prevention*
20 *Tool for Targeting and Ranking Agroclimatic Conditions Favoring Exposure in French Maize-*
21 *Growing Areas*". *Toxins* 13(3): 214.
- 22 Starkey, D. E., T. J. Ward, T. Aoki, L R. Gale, H. C. Kistler, D. M. Geiser, H. Sugă,
23 B. Toth, J. Varga and K. O'Donnell (2007). "*Global molecular surveillance reveals novel*
24 *Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity*". *Fungal Genetics and*
25 *Biology*, 44(11): 1191-1204.
- 26 Sundaram, T. S., C. Giromini, R. Rebucci and A. Baldi (2020). "Omega-3
27 Polyunsaturated Fatty Acids Counteract Inflammatory and Oxidative Damage of Non-
28 Transformed Porcine Enterocytes". *Animals* 10(6): 11.
- 29 Valverde-Bogantes, E., A. Bianchini, J. R. Herr, D. J. Rose, S. N. Wegulo and H. E.
30 Hallen-Adams (2020). "*Recent population changes of Fusarium head blight pathogens:*
31 *drivers and implications*". *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(3): 315-329.
- 32 Williams, J., W. Henry, J. Smith, N. Buehring and D. Boykin (2021). "*Aflatoxin*
33 *accumulation in corn influenced by cultural practices in the US Mid-South*", *Crop Science*,
34 61(1): 729-738.
- 35 Xu, X. and P. Nicholson (2009). "*Community ecology of fungal pathogens causing*
36 *wheat head blight*". *Annual review of phytobiology* 47: 83-103.
- 37 Yang, C, G. Song and W. Lim (2020). "*Effects of mycotoxin-contaminated feed on*
38 *farm animals*". *Journal of hazardous materials*, 389: 122087.
- 39 Yiannikouris, A., G. Andre, L. Poughon, J. Frangois, C.-G. Dussap, G. Jeminet, G.
40 Bertin and J.-P. Jouany (2006). "*Chemical and conformational study of the interactions*
41 *involved in mycotoxin complexation with p-D-glucans*". *Biomacromolecules* 7(4): 1147-1155.
- 42 Zhang, Z., D. Nie, K. Fan, J. Yang, W. Guo, J. Meng, Z. Zhao and Z. Han (2020). "*A*
43 *systematic review of plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and*
44 *metabolism*". *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(9): 1523-1537.
- 45

1. Furaj combinat cu risc redus de contaminare cu micotoxine, **caracterizat prin aceea că**, este sub formă de peleți și este constituit din 59,7...58,9 kg făină de cereale, 23,5...34,2 kg vegetale oleoproteaginoase, din care 6...9 kg șrot de camelină, 6,1...6,5 kg fân tocat de lucernă și 11...19,1 kg șrot de soia, 0,06...0,125 kg aditiv de legare a micotoxinelor care este alcătuit din 25...30% pereți celulari de drojdie cu un conținut de cel puțin 40% β -glucani și 70...75% diatomită care are cel puțin 86% SiO_2 , dimensiuni ale frustulelor între 5...14 μm și o suprafață specifică de minimum $30 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, 3,8...4,4 kg ulei de camelină suplimentat cu 3000 UI retinol, 1250 UI colecalciferol și 24 mg acetat de tocoferil pe fiecare litru de ulei, 1,29...1,475 kg aminoacizi și colină, 0,75...1,7 kg săruri minerale și 0,2 kg premix vitamino-mineral. 3 5 7 9 11
2. Procedeu de obținere a furajului combinat cu risc redus de contaminare cu micotoxine este, **caracterizat prin aceea că**, se foto-sortează 59,7...68,9 kg boabe de cereale; se adăugă 23,5...34,2 kg oleoproteaginoase vegetale dintre care 6...9 kg de șroturi de camelina, 6,1...6,5 kg fân de lucernă tocat și 11...19,1 kg șrot de soia; se macină amestecul de cereale și oleoproteaginoase, se analizează făina obținută prin spectrometrie moleculară Raman la 585 nm și respectiv FT-NIR între 1100 și 2600 nm; se adăugă aditiv de legare micotoxine alcătuit din 25...30% de pereți celulari de drojdie cu un conținut de cel puțin 40% β -glucani, și 70-75% diatomită, care are cel puțin 86% SiO_2 , dimensiuni ale frustulelor între 5-14 μm și o suprafață specifică de minimum $30\text{m}^2\text{g}^{-1}$, în cantitate de 0,060 kg pentru o intensitate de 8000 unități Raman și 0,125 kg aditiv legare micotoxine pentru o intensitate de 9300 unități Raman, în funcție de semnalul în spectrul Raman, la 956 cm^{-1} ; se suplimentează uleiul de camelină cu 3000 UI retinol, 1250 UI de colecalciferol și 24 mg acetat de tocoferil pe fiecare litru de ulei și se adăugă proporțional cu conținutul de aflatoxine estimat prin spectroscopie Raman, între 3,8 și 4,4 kg, până la un semnal de 45,6-52,8% absorbție FT-NIR în intervalul spectral $5540\text{-}5350 \text{ cm}^{-1}$, respectiv 30,4-35,2% absorbție, în intervalul spectral $8650\text{-}8250 \text{ cm}^{-1}$, corespunzător unui nivel de 0,6-0,72% acid α -linoleic 18:3n-3 în furajul concentrat; se adaugă 1,29-1,475 kg amestec de aminoacizi și colină, 0,75-1,7 kg de săruri minerale și 0,2 kg de premixuri vitamino-minerale, până la 100 kg de furaj concentrat; se omogenizează amestecul, se comprimă furajul concentrat într-o presă de peleți, se răcește și se ambalează peleții. 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31
3. Procedeu de obținere a furajului combinat cu risc redus de contaminare cu micotoxine conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**, aditivul de legare micotoxine este alcătuit din 25-30 g de pereți celulari de drojdie, cu un conținut de cel puțin 40% β -glucani, și de 70-75% diatomită, care are cel puțin 86% SiO_2 , dimensiuni ale frustulelor între 5-14 μm și o suprafață specifică de minimum $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. 33 35 37

