



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 750**

51 Int. Cl.:

A23L 1/015 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/06 (2006.01)

A23K 1/175 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07824430 .8**

96 Fecha de presentación : **01.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2094107**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Composición reductora de micotoxina.**

30 Prioridad: **01.11.2006 GB 0621792**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

73 Titular/es: **ALPHA-ALCHEMY LIMITED**
3 Morleys Place High Street
Sawston Cambridgeshire CB22 3TG, GB
David Parfitt

72 Inventor/es: **Mann, Stephen Philip y**
Parfitt, David

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la reducción del contenido de micotoxina de un producto alimenticio.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las micotoxinas son toxinas producidas por hongos que se sabe que afectan de forma adversa a la nutrición y salud de seres humanos y animales. La producción de micotoxinas es el resultado del proceso biológico natural de los hongos, y ha ocurrido durante miles de años. Sin embargo, la producción de micotoxinas ha estado influida por el cambio climático y por cambios en la práctica agrícola.

10

Las micotoxinas son producidas por una amplia variedad de hongos, incluyendo *Aspergillus* (Aflatoxina y Ocratoxina), *Fusarium* (Zearalenona, Desoxinivalenol, Fumonisina) y *Penicillium* (toxina PR y Roquefortina). Estas toxinas tienen un efecto farmacológico considerable, incluso a concentraciones muy bajas (partes por billón), mientras que la toxicidad se puede potenciar adicionalmente por el metabolismo *in vivo*, particularmente por el hígado. La destoxificación de la mayoría de las toxinas se produce en el hígado, mientras que también se puede lograr la destoxificación del tubo digestivo (GIT), en ciertas condiciones, mediante microorganismos.

15

Se ha identificado un gran número de micotoxinas. Actualmente, existen cinco grupos principales de interés agrícola particular: las Aflatoxinas, los tricotenos (por ejemplo Desoxinivalenol), el grupo de las Zearalenonas, las Fumonisininas y las toxinas endofíticas.

20

Las *Aflatoxinas* pueden provocar reducción del crecimiento, inmunidad suprimida, eficiencia reducida del alimento, y aumento de la mortalidad en el ganado, entre otros síntomas. En cerdos, se puede observar eficiencia reducida del alimento, aumento de la mortalidad, y menores tasas de crecimiento. En aves de corral, se presentan síntomas similares y una disminución de la capacidad para metabolizar grasa, proteína y almidón.

25

La *Zearalenona* en el ganado vacuno y cerdos imita al estrógeno y produce una reducción considerable en el comportamiento reproductivo, crecimiento reducido, producción reducida de leche y eficiencia reducida del alimento. En aves de corral, se observa aumento de la mortalidad.

30

El *Desoxinivalenol* (DON), un ejemplo de un tricoteno, provoca graves síntomas en ganado vacuno, cerdos y aves de corral, incluyendo efectos gástricos tales como vómito, tasas reducidas de crecimiento, producción reducida de huevos, diarreas y eficiencia reducida del alimento.

30

La *Fumonisinina* produce efectos negativos vía una reducción de la circulación sanguínea y gasto cardíaco, por lo menos en parte al actuar como agonista de receptores de esfingosina. De esta manera, reducen el crecimiento y provocan edema pulmonar en cerdos y aves de corral. Esta reducción de la circulación afecta a todos los órganos principales, incluyendo el hígado, y puede exacerbar y potenciar los efectos de otras toxinas que también pueden estar presentes.

35

La *Ocratoxina* puede ser carcinógena en el hombre, y produce inmunosupresión en animales de granja.

El *Lolitre B* (*Acremonium lolii* en raigrás) es un ejemplo de una toxina endofítica que produce una forma de temblor de los pastos que se confunde a menudo con hipomagnesemia.

40

La *Esporidesmina* (*Pithomyces spp.* en raigrás) es una toxina endofítica que provoca eccema facial y daño hepático en ovejas.

La *Ergovalina* (*Acremonium coenophialum*) es una toxina endofítica encontrada en la festuca alta, que reduce la liberación de prolactina y reduce el caudal sanguíneo.

45

En interés de la salud tanto de seres humanos como de animales, es necesario que se reduzcan las micotoxinas, o preferentemente se eliminan todas juntas, de la cadena alimentaria.

50

Las técnicas actuales usadas para reducir el contenido de micotoxina en un producto alimenticio implican el uso de agentes de unión a micotoxina, tales como arcilla bentonítica, a la que se unen las toxinas y por lo tanto se pueden eliminar con la arcilla. Sin embargo, la unión y eliminación de micotoxinas son sólo parcialmente exitosas. Algunas micotoxinas siguen siendo tóxicas incluso cuando se unen a un agente de unión, mientras que algunas toxinas no se unen eficazmente a concentraciones *in vivo* normales. Mayores niveles de contaminación también son un problema, puesto que los niveles recomendados actuales de ligantes pueden no ser suficientes para eliminar todas las toxinas presentes.

Una técnica alternativa es añadir enzimas alimentarias, o microorganismos, que rompen las

micotoxinas, para reducir la toxicidad. Sin embargo, a menudo esto no es eficaz reduciendo suficientemente el contenido de micotoxina, lo que puede ser debido a un equilibrio dinámico en el tubo digestivo, que evita la excreción de las toxinas.

5 El documento US 2006/188549 describe composiciones capaces de reducir los incidentes de la toxicosis por festuca, provocada por festuca infectada por endófito (ergovalina), en mamíferos. La composición debe contener un vasodilatador, y puede contener otros ingredientes.

Por lo tanto, todavía se necesita una técnica eficaz para reducir la toxicidad de las micotoxinas.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La presente invención se basa en la observación sorprendente de que una composición que contiene una enzima, un agente de unión a micotoxina, y un microorganismo capaz de captar una micotoxina, es inesperadamente eficaz reduciendo la toxicidad de las micotoxinas.

Según un primer aspecto de la invención, una composición comprende una enzima, un agente de unión a micotoxina, y una levadura de *Sacharomyces* capaz de captar una micotoxina.

15 Según un segundo aspecto de la invención, un método para reducir la toxicidad de una micotoxina en un producto alimenticio comprende la etapa de poner en contacto el producto alimenticio con una composición tal como se define anteriormente.

Según un tercer aspecto de la invención, un producto alimenticio comprende una composición tal como se define anteriormente.

20 Según un cuarto aspecto de la invención, una composición tal como se define anteriormente es útil en terapia, en particular en el tratamiento de una enfermedad provocada por una micotoxina.

Según un quinto aspecto de la invención, se usa una composición, tal como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad provocada por una micotoxina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La invención se describe haciendo referencia a las siguientes figuras, en las que:

La Figura 1 es una gráfica que indica el porcentaje de unión de diversas micotoxinas y agentes de unión a micotoxina;

30 La Figura 2 ilustra el efecto de la captación de DON por *Saccharomyces cerevisiae*, que entonces es modificada por la levadura, seguido de la liberación y unión a bentonita de la toxina modificada;

La Figura 3 ilustra el efecto de la captación de Zearalenona por *Saccharomyces cerevisiae*;

La Figura 4 ilustra la reducción de fumonisina usando *Saccharomyces cerevisiae*;

35 La Figura 5 muestra el incremento en la producción de leche en un rebaño lechero, contaminado con Desoxinivalenol y Zearalenona, después de la aplicación de una composición según la invención; y

La Figura 6 muestra el incremento en la producción de leche observado en un rebaño lechero, contaminado con Vomitoxina, después de la aplicación de una composición según la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La invención se basa en el hallazgo de que la combinación de una enzima, un agente de unión a micotoxina, y un microorganismo que es capaz de captar una micotoxina, es sorprendentemente eficaz reduciendo la toxicidad de micotoxinas presentes en un producto alimenticio.

45 Se ha observado que, cuando se usa una enzima sola, existe un equilibrio dinámico que evita que las toxinas sean defecadas. Por lo tanto, el secuestro por un microorganismo y la unión por un agente de unión actúan como una ayuda a la degradación final de la toxina por las enzimas y, opcionalmente, microorganismos en la composición.

50 Como se usa aquí, al término "enzima" se le ha de dar su significado habitual en la técnica, es decir, un catalizador biológico. Para evitar dudas, una enzima es una proteína. La enzima está preferentemente purificada por lo menos parcialmente, es decir, se proporciona como un extracto celular, aislado o preparación purificada. La enzima está presente en la composición además de cualesquiera enzimas presentes en el microorganismo, es decir, las enzimas, el microorganismo y el agente de unión a

micotoxina están presentes como tres componentes distintos de la composición. El objetivo de la enzima en la composición de la invención es modificar una o más micotoxinas, para reducir la toxicidad de la toxina. Preferentemente, la enzima rompe la toxina, parcial o completamente, eliminando de ese modo la toxicidad de la toxina.

Por lo tanto, dicha una o más enzimas de la composición rompen preferentemente la toxina. La enzima puede inducir además una modificación de una toxina, de forma que se incrementa la unión al agente de unión, a la espera de una degradación posterior. Sin desear estar atados por la teoría, se cree que la epoxidación y/o deshidrogenación de la toxina, en particular, mejora la unión. Un incremento en la unión de la toxina al agente de unión se puede detectar mediante un ensayo de unión a la toxina, como se detalla en el Ejemplo B, experimento 4. Se pueden usar otras enzimas, que no actúan necesariamente de forma directa sobre una micotoxina, para producir radicales que modifican la toxina. Esto se puede lograr con o sin la unión de la toxina a la enzima. Un ejemplo de una enzima adecuada de este tipo es la lignina peroxidasa. En esta realización, cuando se usan radicales, la enzima se puede sustituir por un catalizador biomimético (tal como el grupo prostético hemo), un catalizador organometálico o un catalizador metálico.

Una enzima, o combinación de enzimas, con la capacidad para reducir la toxicidad de una micotoxina está dentro del alcance de la invención. Las enzimas preferidas incluyen una esterasa, lipasa, proteasa, oxidasa, aminoácido oxidasa, lactonohidrolasa, peroxidasa, lactoperoxidasa, manganeso peroxidasa, epoxidasa, polisacarasa y deshidrogenasa. Se puede usar cualquier combinación de enzimas preferidas, y el experto en la materia sabrá que la combinación específica de enzimas requeridas puede depender de la toxina o toxinas a tratar. Las enzimas particularmente preferidas incluyen celulasas, epoxidasas, deshidrogenasas, hemicelulasas (también conocidas como xilanasas) y lipasas, preferentemente una triacilglicerol lipasa (número E.C. 3.1.1.3), tal como Lipase AE 02 (obtenible de *Candida rugosa* y comercialmente disponible de Mann Associates; Cambridge, UK) o "Lipase OF" (comercialmente disponible de Meito Sangyo, Japón). La combinación incluye preferentemente una lipasa. Una combinación preferida de enzimas es la combinación de una celulasa, una hemicelulasa (xilanasas) y una lipasa. Más abajo, en la Tabla 2 se muestra una combinación preferida de enzimas adecuada para uso en la invención.

El segundo componente de la composición según la invención es un agente de unión a micotoxina. Se puede incluir uno o más agentes de unión. Preferentemente, se incluyen 2, 3, 4 o más agentes de unión diferentes. El término "unión" se refiere tanto a un enlace químico iónico o covalente como a una adsorción física más débil que implica interacciones de van der Waals y/o enlace de hidrógeno. En una realización preferida, el agente de unión tiene una superficie cargada. La carga puede ser positiva o negativa. La unión se refiere a la asociación no transitoria de una micotoxina al agente de unión. En una realización preferida, la unión tiene una afinidad mínima entre la micotoxina y el agente de unión, de manera que 10 mg de agente de unión se unirá al 50% de una concentración 200 µg/l (es decir, fisiológica) de toxina. La unión se puede determinar usando el método proporcionado en el Ejemplo B, experimento 4. Los agentes de unión a micotoxina son conocidos en la técnica; los ejemplos de agentes de unión adecuados son zeolitas, montmorillonita, arcillas bentoníticas, tierra de diatomeas, carbones activados, materiales vegetales fibrosos tales como salvado de trigo y fibra de alfalfa, extracto de pared celular de levaduras, y polisacáridos. Cualquier agente que se pueda unir a una micotoxina o a un producto de la ruptura de micotoxina está dentro del alcance de la invención. Los agentes de unión a micotoxina preferidos incluyen una arcilla bentonítica, preferentemente bentonita sódica o más preferentemente bentonita cálcica, y un polisacárido, preferentemente glucomanano, más preferentemente un glucomanano esterificado. El glucomanano se obtiene preferentemente como un extracto de la pared celular de levaduras, como se reconoce en la técnica. Los adsorbentes de micotoxina que contienen glucomanano están comercialmente disponibles, por ejemplo Mycosorb®, obtenible de Alltech UK, Stamford, UK.

Preferentemente, el agente de unión tiene por lo menos una superficie iónica, es decir, cargada, que permitirá que se produzca el enlace iónico (fuerte) entre la toxina y el agente de unión. La carga puede ser positiva o negativa. Los ejemplos de agentes de unión iónicos son bentonitas tales como bentonita sódica y bentonita cálcica.

El tercer componente de la composición según la invención es un microorganismo. Como se usa aquí, el término "microorganismo" se refiere a bacterias y levaduras. El experto en la materia reconocerá que el microorganismo preferentemente no es dañino para la salud del ser humano o animal que ingerirá el producto alimenticio al que se aplicará la composición, es decir, el microorganismo es preferentemente no patógeno. El objetivo del microorganismo es captar micotoxinas. Según la invención, se puede usar cualquier microorganismo que pueda captar micotoxinas. Una vez captada, el microorganismo secuestra la toxina, la cual no puede ser captada entonces por el animal hospedante. Las enzimas endógenas del microorganismo pueden romper entonces las toxinas, aunque esto no es un requisito absoluto. Preferentemente, el microorganismo es una levadura, más preferentemente un *Saccharomyces*, o más preferible *Saccharomyces cerevisiae*.

El microorganismo tiene la función de captar físicamente la toxina para secuestrarla dentro de la

célula bacteriana o de levadura. En el caso de una toxina por lo menos (DON), la toxina es modificada en la célula y se liberan análogos, que entonces son capaces de unirse a los ligantes en los cuales puede tener lugar una degradación enzimática posterior. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el microorganismo lleva a cabo adicionalmente una segunda función: la de expresar una o más enzimas capaces de romper una micotoxina.

En la composición de la invención, se pueden incluir uno o más microorganismos diferentes. En una realización, se incluyen por lo menos dos microorganismos; el primer microorganismo es principalmente responsable de la captación de la micotoxina, y el segundo es principalmente responsable de la expresión de la enzima que degrada a la micotoxina. Para evitar dudas, en las realizaciones en las que un microorganismo expresa una o más enzimas capaces de romper una micotoxina, la composición debe contener todavía el componente enzimático como un componente de la composición separado.

Tabla 1 - Composición de ejemplo según la invención.

Nombre	Fuente/Compañía	Especificación	kg	% en peso aprox.
Oligosacárido de manano FerMos (Agente de unión)	JACKLYN IND	FerMos, bolsas de 25 kg	7,445	35%
Terra-Green 24/48 LVM (Agente de unión)	OIL DRI	Terra-Green, 24/48 LVM, bolsas de 50 lbs.	6,68742	30%
Bentonita sódica (Agente de unión)	Eastern Mineral	Bentonita sódica Granular	2,06116	10%
Diabond Granular (Agente de unión)	Eastern Mineral	200 bolsas de Diabond granular, bolsas de 50 lbs.	2,06116	10%
Molasses secas	Bartlett Milling	Molasses secas, bolsas de 50 lbs.	1,03058	5%
Levadura <i>S. cerevisiae</i>	JACKLYN IND	Levadura a granel 10B/g, caja de 20 kg	1	5%
Vitamina A, A-30	RC BWATER	Vitamina A, A-30, bolsa de 50 lbs.	0,51529	2%
Vitamina E, E-20	RC WATER	Vitamina E, E-20, bolsa de 50 lbs.	0,51529	2%
Premezcla de enzimas IV (Véase la Tabla 2)	Micron	Enzimas Mycotex SW	0,03405	<1% (0,16%)
Aceite mineral ligero	AKEY drum	Aceite mineral ligero, 387 lbs.	0,22809	1%
	TOTAL		21,53204	100,00%

Tabla 2 - Formulación enzimática adecuada para uso en la composición de la invención.

Nombre	Fuente	Especificación	kg	% en peso
Cellulase 300 TR	BIOCAT	Cellulase 300 TR, 75.000/g	0,49000	32,67%
Hemicelulase 1500	BIOCAT	Hemicelulase 1500	0,49000	32,67%
Lipase OF	Meito Sangyo	400.000 U/g	0,49000	32,67%
Agente de fluidez	DUNLEARY	Hubersorb 600, bolsa de 30 lbs.	0,03000	2,00%
	TOTAL		1,50000	100,00%

Además de estos componentes esenciales, si es necesario, se pueden incluir componentes adicionales en una composición de la invención. Los ejemplos de componentes adicionales adecuados

son suplementos alimentarios tales como vitaminas y minerales, aceite mineral, un agente de flujo tal como un polvo de silicato de calcio fino, precipitado (por ejemplo Hubersorb), y una fuente de azúcar, tal como molasas secas. En la Tabla 1 se proporciona un ejemplo de una formulación según la invención.

Los tres componentes esenciales se preparan preferentemente como una mezcla, opcionalmente con un agente de flujo (como en la Tabla 2), y se combinan subsiguientemente con los componentes adicionales cuando se necesita para la aplicación a un producto alimenticio.

Se puede usar cualquier cantidad de cada uno de los tres componentes esenciales de la composición que logre el resultado deseado de reducir los niveles de micotoxina. Preferentemente, se aplica entre 0,1 kg y 50 kg de la composición a cada tonelada de pienso, más preferentemente entre 0,2 kg y 10 kg por tonelada, por ejemplo, 0,5, 1, 1,2, 1,5, 2,5, 5, 7,5 kg o más por tonelada. Los niveles adecuados serán manifiestos para el experto en la materia.

En una forma de realización preferida, la composición se aplica al pienso de forma que el microorganismo está presente en aproximadamente 1×10^9 células por tonelada de pienso o más. Más preferentemente, el microorganismo está presente en 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , o 5×10^9 células por tonelada de pienso o más. Aún más preferentemente, se aplican 1×10^{10} células por tonelada de pienso, más preferentemente se aplican 1×10^{11} células por tonelada de pienso, por ejemplo más de 2×10^{11} células por tonelada de pienso, más preferentemente más de 1×10^{12} , 2×10^{12} células por tonelada de pienso o más. El experto en la materia sabrá que la cantidad precisa de composición que se requiere por tonelada de pienso dependerá del pienso a tratar, de las toxinas presentes y del receptor final del pienso. Por ejemplo, un animal que consume una pequeña cantidad de pienso por día requerirá generalmente una mayor concentración de microorganismo aplicada al pienso que un animal que consume una gran cantidad de pienso por día. Para el ganado vacuno, un ejemplo de una cantidad adecuada es $2,2 \times 10^{11}$ células por tonelada de pienso, mientras que para cerdos y aves de corral una cantidad preferida es $1,1 \times 10^{12}$ células por tonelada de pienso.

En la composición, el microorganismo está presente en cualquier cantidad adecuada que permita que se produzca la destoxificación cuando se aplica a un producto alimenticio. Preferentemente, el microorganismo está presente a aproximadamente 1×10^9 células o más por kilogramo de la composición, más preferentemente 1×10^{10} células por kilogramo de composición o más, por ejemplo 1×10^{11} o 1×10^{12} células por kilogramo, o más. El experto en la materia apreciará que la cantidad de microorganismo en la composición afectará a la cantidad de composición requerida para lograr el efecto deseado, en particular las células por tonelada de pienso citadas anteriormente. En la composición del ejemplo de la Tabla 1, la levadura se incluye en una cantidad de aproximadamente 5% (en peso). Un kg de la composición definida por la Tabla 1 contiene aproximadamente 5×10^{11} células de levadura. Por lo tanto, la aplicación de 0,5 kg de esta composición a una tonelada de pienso proporcionará aproximadamente $2,5 \times 10^{11}$ células por tonelada de pienso, mientras que la aplicación de 2,5 kg de esta composición a una tonelada de pienso proporcionará aproximadamente $1,25 \times 10^{12}$ células por tonelada de pienso.

Dicha una o más enzimas está presente en la composición en una cantidad eficaz. Se prefiere menos de 5% en peso de enzima, más preferentemente menos de 1%, más preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso, aún más preferentemente entre 0,15% y 0,25% en peso. La composición de la Tabla 1 contiene una mezcla enzimática que suma en total 0,16% en peso, incluyendo el agente de flujo.

El ligante está presente en la proporción más grande, a un nivel eficaz. Preferentemente, por lo menos 50% en peso de la composición debería ser un agente de unión, más preferentemente 60 a 90%. La composición de la Tabla 1 contiene una mezcla de agentes de unión que suma en total aproximadamente 85%.

Para evitar dudas, un intervalo adecuado para cada uno de los ingredientes esenciales en la composición de la invención es: microorganismo - 0,1% a 10% en peso, preferentemente 2% a 8%, es decir, 5%; enzima - se prefiere menos 5% en peso de enzima, más preferentemente menos de 1%, más preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso, aún más preferentemente entre 0,15% y 0,25% en peso; ligante - preferentemente por lo menos 50% en peso de la composición es un agente de unión, más preferentemente 60 a 90%. El resto (si lo hay) puede estar formado por los agentes adicionales citados anteriormente, si es necesario.

La composición de la invención puede estar en cualquier formulación adecuada, por ejemplo un sólido tal como un polvo o gránulo, un gel o un líquido. Preferentemente, la formulación es un sólido, más preferentemente un polvo.

La composición de la invención es eficaz reduciendo los niveles de micotoxina. Preferentemente, la composición se usa para reducir micotoxinas en un producto alimenticio. Como se usa aquí, a la expresión "producto alimenticio" se le debe dar su significado habitual en la técnica, refiriéndose a cualquier material que es comido por un ser humano o un animal para la nutrición. Los productos alimenticios comprenden hidratos de carbono, grasas y/o proteínas, entre otros componentes. El producto alimenticio puede ser de origen animal o vegetal. El alimento humano y los piensos para animales están

dentro del alcance de la expresión. En una realización preferida, el producto alimenticio es un pienso para animales de origen vegetal, habitualmente conocido como forraje, más preferentemente un producto alimenticio de cereal. La expresión “producto alimenticio” incluye materiales que se deben procesar antes del consumo seguro por un ser humano o animal. Un ejemplo preferido de tal material son los “granos de destilería”. Estos granos, también conocidos como “granos secos de destilería”, son un subproducto del cereal del proceso de la destilación. Los granos de destilería son conocidos en la técnica. De forma breve, se producen en destilerías secando la mezcla de granos molidos, y se usan habitualmente como forraje para ganado, especialmente rumiantes. Por lo tanto, la destoxificación de los granos de destilería, mediante reducción del contenido de micotoxinas, está dentro del alcance de la invención.

La composición se puede añadir al producto alimenticio de cualquier manera que sea eficaz reduciendo el contenido de micotoxina. Se requiere el contacto entre la composición y el producto alimenticio. El método preferido es tratar el producto alimenticio antes de la ingestión, para eliminar, preferentemente de forma completa, la toxicidad. Esto es la “destoxificación” del producto alimenticio antes del consumo. Un método alternativo es tratar el pienso inmediatamente antes de la ingestión, o simultáneamente con la ingestión, y confiar en la invención para completar la destoxificación durante la digestión. Esta destoxificación postingestión es particularmente adecuada para uso en animales, preferentemente rumiantes tales como ganado vacuno y ovejas.

Un método para reducir la toxicidad de una micotoxina o micotoxinas en un producto alimenticio comprende la etapa de poner en contacto el producto alimenticio con una composición tal como se define aquí. La micotoxina puede ser cualquier micotoxina. Las micotoxinas preferidas incluyen Zearalenona, un tricoteno tal como Desoxinivalenol, Aflatoxina, Fumonisina, Roquefortina, Ochratoxina o una toxina endofítica, tal como esporidesmina, ergovalina o Lolitrem B.

Según la invención, se puede destoxificar un producto alimenticio de cualquier animal humano o no humano, preferentemente mamífero no humano. Preferentemente, el producto alimenticio es para un animal de granja, tal como ganado vacuno, caballos, cerdos, o aves de corral.

Sin desear estar atados por la teoría, se piensa que la destoxificación se logra de muchas maneras, que actúan sinérgicamente. El componente enzimático rompe las toxinas y/o mejora la unión de la toxina al agente de unión a micotoxina. El agente de unión evita que las micotoxinas sean absorbidas por animal, y permite su excreción. El microorganismo capta y secuestra las toxinas, y también puede romper las toxinas. Se piensa que cualquier toxina que es liberada por el microorganismo se une más fuertemente al agente de unión, en el que puede producirse la degradación posterior (por las enzimas). Por lo tanto, se piensa que las acciones del microorganismo y/o de la enzima potencian la unión de la toxina al agente de unión. Por lo tanto, estos tres componentes trabajan en una sinergia compleja ventajosa, que no se podía predecir.

Por lo tanto, la toxina se puede eliminar del producto alimenticio mediante ruptura enzimática, mediante la unión al agente de unión, y/o mediante secuestro en el microorganismo, eliminándola así del producto alimenticio; si la destoxificación se produce en un animal, la eliminación se realiza finalmente a partir del tubo digestivo en el material fecal. Estos secuestros tienen los efectos adicionales de evitar la absorción en el animal y facilitar la acción de las enzimas de la invención en el tubo digestivo.

El experto en la materia sabrá que la salud de los animales y seres humanos se puede ver afectada adversamente por la presencia de una micotoxina en un producto alimenticio. Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden usar en terapia, para tratar una enfermedad provocada por una micotoxina.

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo A - Degradación experimental de toxinas e identificación de catalizadores

Se examinó la modificación de diversas toxinas mediante enzimas identificando la actividad de un número de una selección de enzimas frente a diversas toxinas. El cambio en la toxina se midió mediante un anticuerpo monoclonal en un ensayo de Elisa. Puesto que el anticuerpo monoclonal retiene, en muchos casos, la capacidad para reaccionar de forma cruzada con los fragmentos producidos por la catálisis enzimática, esto proporciona una herramienta de identificación definitiva pero no una medida cuantitativa de la actividad de las enzimas.

Las enzimas adecuadas que se pueden usar como parte de la invención se muestran en la Tabla 3, y los ejemplos de su acción se muestran en las Tablas 4-6.

Tabla 3 - Ejemplos de las enzimas adecuadas para uso en la composición de la invención

ENZIMA	NÚMERO EC	ACCIÓN
Esterasa	3.1.1.x	Hidrólisis de éster
Lipasa	3.1.1.3	Hidrólisis de éster
Proteasa	3.4.x.x	Hidrólisis de péptidos
Oxidasa	1.4.3	Oxidaciones
Aminoácido oxidasa	1.4.3.2 & 3	Oxidación del NH ₂ de aminoácidos
Lactonohidrolasa	3.1.1.25	Hidrólisis de lactonas
Peroxidasa	1.11.1.7	Reacciones de peroxidación
Lactoperoxidasa	1.11.1.7	Reacciones de peroxidación
Manganeso peroxidasa	1.11.1.13	Producción de Mn ⁺⁺⁺
Epoxidasa	3.3.2.3	Hidrólisis de peróxidos
Polisacarasa	3.2.1	Hidrólisis de reticulaciones de azúcares
Dehidrogenasas	1.1	Oxidación por eliminación de hidrógeno

Experimento 1: Modificación de Fumonisina mediante lipasa

Se incubó Lipase AE 02 (Mann Associates, Cambridge, UK) con Fumonisina 200 µg/litro, y se midió después de una hora a 37°C. La fumonisina que queda se midió mediante el ensayo ELISA. En cada caso, también se usaron controles enzimáticos hervidos. Se puede observar que hubo una reducción considerable en la Fumonisina que reacciona con el anticuerpo, indicando la degradación de la toxina.

Tabla 4

	pH 6,4	pH 4,5	Sin tampón
Std Norm	0,06	0,045	0,028
Experimental	0,039	0,046	0,01
% de degradación	30	0	50
Std Hervido	0,049	0,054	0,046
Experimental	0,039	0,046	0,014
% de degradación	22	15	70

Experimento 2: Modificación de Fumonisina por lipasa y amina oxidasa

La Fumonisina se examinó adicionalmente incubándola como en la Tabla 3, pero con una aminooxidasa, para eliminar los grupos amina. La lipasa 2 logró nuevamente la degradación, mientras que la oxidasa también degradó la toxina. No hubo ninguna sinergia aparente al usar ambas enzimas. Esto demuestra que una combinación de enzimas, sola, no es eficaz mejorando la degradación de la micotoxina.

Tabla 5

	Blanco	Lipase AE 02	Oxidasa	Lipase AE 02 + Oxidasa
<i>Resultados</i>	0,38	0,45	0,41	0,46
% max abs Ave	20,89	24,91	22,6	23,23
ppm	0,26	0,18	0,2	0,19
% de degradación		31,90%	22,10%	26,00%

Experimento 3 - Modificación enzimática de Zearalenona

Se examinó la degradación enzimática de Zearalenona usando una variedad de preparaciones. De estas preparaciones, algunas lograron la degradación, pero la composición según la invención (como se define en la Tabla 1) produjo un efecto sinérgico. La repetición del experimento, seguido del análisis mediante HPLC, mostró que la formulación fue capaz de reducir los niveles de toxina a cero.

Tabla 6

Enzima	Formulación definida en la Tabla 1	Celulasa de la Tabla 2	Xilanas de la Tabla 2	Nitrilasa (Control)	Lipase AE 02
Experimental	0,0010	0,014	0,022	0,024	0,006
Control	0,019	0,015	0,026	0,017	0,012
% de reducción en la concentración aparente de toxina	47	7	17	0	12

Ejemplo B - Unión experimental de toxinas e identificación de las propiedades de los ligantes**Experimento 4**

Se mezcló toxina a niveles fisiológicos de aproximadamente 200 µg/l con una cantidad constante (50 mg) de ligante, se agitó durante 30 minutos, se centrifugó, y la toxina que queda en disolución se midió usando un kit de ensayo de micotoxina RIDASCREEN® FAST (disponible de R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Alemania). Los resultados se determinan con referencia a una curva de unión patrón para la toxina y el ligante.

Los resultados se muestran en la Figura 1, que muestra el porcentaje de unión a una concentración de rumen típica (fisiológica). Las capacidades de unión de diversos componentes se demuestran a una concentración fisiológica de toxina. A partir de la variabilidad en los resultados, se puede observar que una mezcla de ligantes es preferible a una entidad individual. (Volclay = Bentonita sódica; Teragreen = Bentonita cálcica, FerMOS = complejo de unión polisacárido).

Ejemplo C - Secuestro de toxina y degradación enzimática subsiguiente de la toxina

En los siguientes experimentos (5, 6, 7) se cargaron cultivos de levadura activa (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC R404) con la toxina apropiada a 200 µg/l, y la desaparición desde el sobrenadante fue seguida por ensayos de ELISA.

Las Figuras 2, 3, y 4 ilustran los efectos del microorganismo y sus enzimas microbianas endógenas sobre las micotoxinas DON, Zearalenona y Fumonisin. En cada caso, la levadura captó la toxina, reduciendo rápidamente la toxicidad del cultivo. La toxina se metabolizó y liberó entonces, en una forma alterada, en la que es capaz de unirse al agente de unión, para la degradación subsiguiente. Estos ejemplos ilustran la sinergia de la composición según la invención.

Experimento 5: Captación y degradación de DON mediante enzimas de levadura

La levadura (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC R404) capta rápidamente DON de la disolución, evitando su captación en el animal. La levadura metaboliza el DON y libera productos de ruptura (metabolitos) que son capaces de unirse a dos ligantes bentoníticos diferentes. Entonces se puede producir una degradación posterior en los ligantes. Véase la Figura 2.

Experimento 6: Degradación de Zearalenona mediante enzimas de levadura

La captación rápida por levadura (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC R404) es demostrada con la toxina Zearalenona. La modificación enzimática se produce en la célula, y entonces se produce un pico de metabolitos, al igual que con DON, antes de que se degrade subsiguientemente. Véase la Figura 3.

Experimento 7: Degradación de Fumonisin mediante enzimas de levadura

La levadura (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC R404) puede eliminar fumonisin del tubo digestivo mediante secuestro, como se muestra en la Figura 4. Nuevamente, se produce pronto un pico de metabolitos antes de la degradación posterior a lo largo del tiempo.

Ejemplo D - DON (Desoxinivalenol y Zearalenona) en un rebaño lechero

Tratamiento de un pequeño rebaño que recibe pienso contaminado. Antes del tratamiento, el rebaño de 49 cabezas mostró un pelaje áspero, abortos, diarreas, apetitos irregulares, una producción irregular y menor de leche, alimentación en estiércol y comportamiento estresado en los animales. La Figura 5 muestra que a medida que se añadió la formulación deseada (como se define en la Tabla 1), a una tasa de 0,5 kilos/ 1.000 kilos de pienso durante dos días, y 0,25 kilos/1.000 kilos de pienso después, la producción de leche aumentó. La producción de leche se muestra en libras.

Ejemplo E - Desoxinivalenol (DON) en un rebaño lechero

Se alimentó pienso que contiene maíz forrajero, que se sabe que estaba contaminado con Vomitoxina (DON), y cuya concentración se determinó que era 16,6 ppm, a un rebaño lechero de 160 cabezas que se usó en un experimento de un mes. Las enzimas y los ligantes (como parte de la formulación definida en la Tabla 1) se alimentaron a 0,5 kilos por 1.000 kilos de ración mixta total. En la Figura 6 se muestra la producción de leche, ajustada para 150 DIM.

Ejemplo F - Desoxinivalenol porcino

En un grupo de cerdos en los que el comportamiento reproductivo y de crecimiento fue pobre y la tasa de natalidad fue menor de 50%, el número de nacidos vivos fue 5 cerdos por camada. Los días de engorde de los lechones destetados fueron alrededor de 200 días, y los animales fueron muy variables. Se identificó una exposición a toxina. El análisis del pienso mostró 4,1 y 4,8 ppm de DON. Todas las crías de cerdo se alimentaron inmediatamente con un pienso que contiene 2,5 kg/tonelada de la formulación (como se define en la Tabla 1).

Después de 21 días de la primera cubrición, la concepción volvió a la normalidad en aproximadamente 90%, y los cerdos nacidos vivos volvieron a ser más de 10. La ingesta de pienso de los cerdos en el engorde de los lechones volvió a la normalidad. Subsiguientemente, la variación de los cerdos en el engorde los lechones volvió también a ser normal.

Los verracos también se beneficiaron. Expuestos a DON, su volumen de semen y la concentración de esperma disminuyó en 50% en 7 días. Con el tratamiento, volvieron a ser normales también en aproximadamente 7 días.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una enzima, un agente de unión a micotoxina y una levadura de *saccharomyces* capaz de captar una micotoxina.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que los agentes activos consisten en la enzima, agente de unión a micotoxina y levadura de *saccharomyces* capaz de captar una micotoxina.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enzima es una esterasa, lipasa, proteasa, oxidasa, aminoácido oxidasa, lactonohidrolasa, peroxidasa, lactoperoxidasa, manganeso peroxidasa, epoxidasa, polisacarasa o deshidrogenasa.
- 10 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el ligante comprende un polisacárido, tal como glucomanano, o una bentonita.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un microorganismo que expresa por lo menos una enzima tal como se define mediante la reivindicación 3.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para aplicación a un producto alimenticio.
- 15 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el ligante de la toxina está cargado.
8. Método para reducir la toxicidad de una micotoxina en un producto alimenticio, que comprende la etapa de poner en contacto el producto alimenticio con una composición tal como se define en cualquier reivindicación anterior.
- 20 9. Método según la reivindicación 8, en el que la micotoxina a modificar es un tricoteno, preferentemente desoxinivalenol, o es Zearalenona, Aflatoxina, Fumonisina, Roquefortina, o una Ochratoxina o una toxina endofítica.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el endófito es Lolitrem B, esporidesmina o ergovalina.
- 25 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el producto alimenticio se pone en contacto con la composición antes del consumo por un animal, o en el que el producto alimenticio se pone en contacto con la composición simultáneamente con el consumo por un animal.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la enzima potencia la unión de la toxina al ligante de la toxina.
- 30 13. Producto alimenticio que comprende una composición tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en terapia.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por una micotoxina.

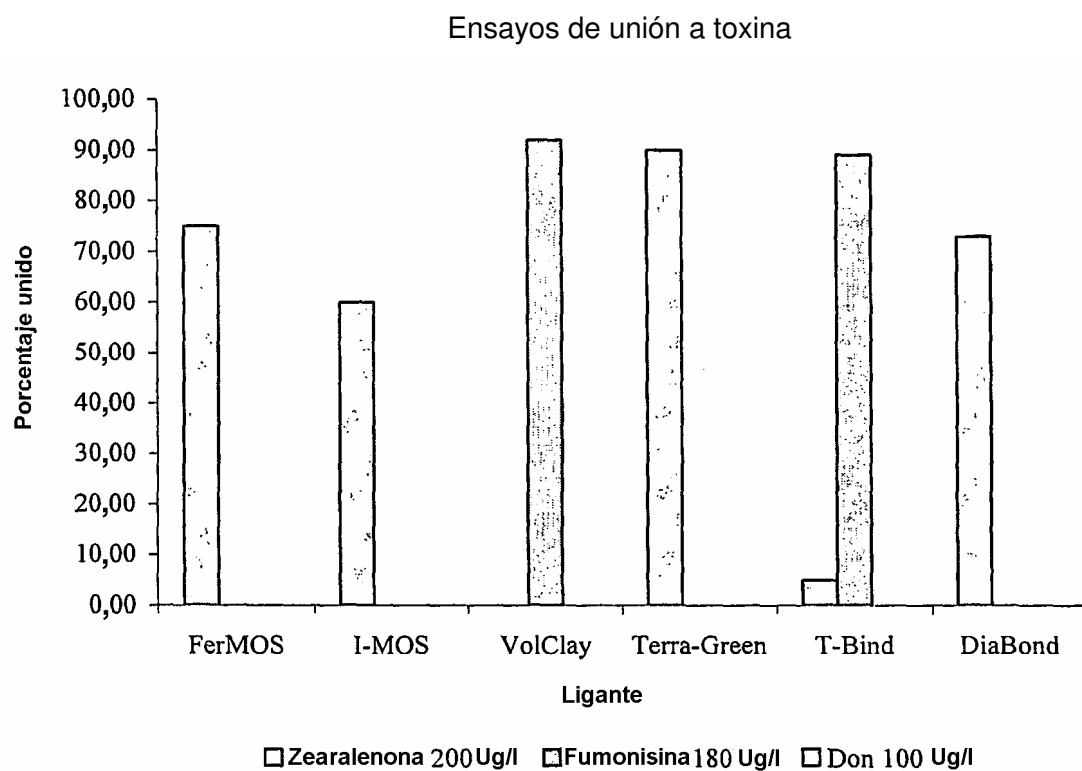


Figura 1

Levadura y metabolismo de DON

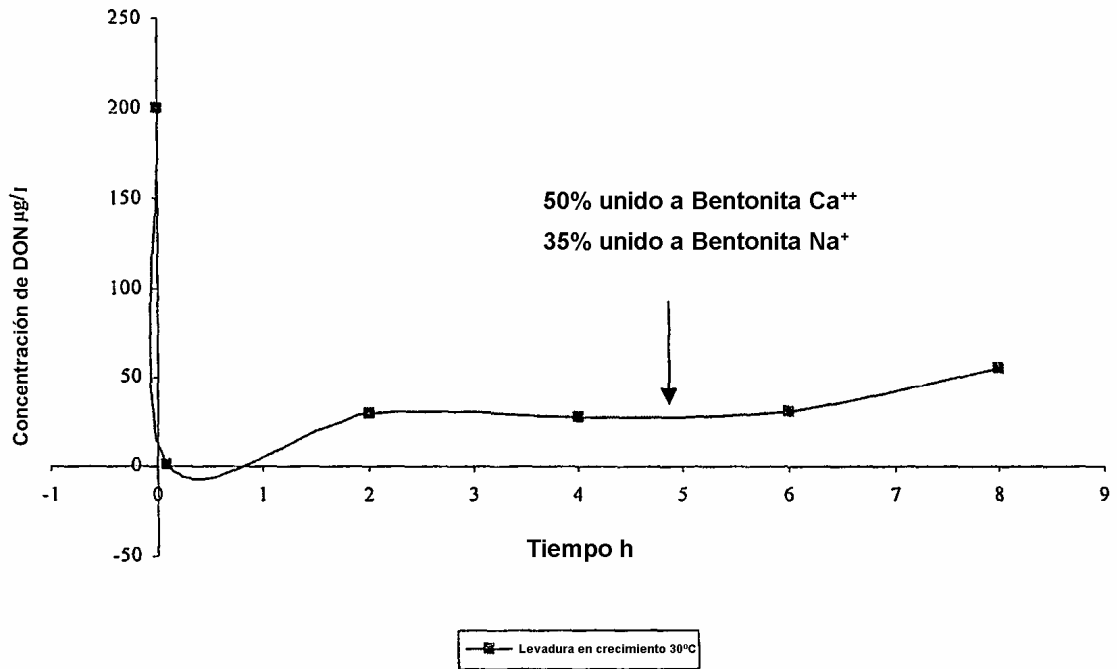


Figura 2

Enzimas de levadura y Zearalenona

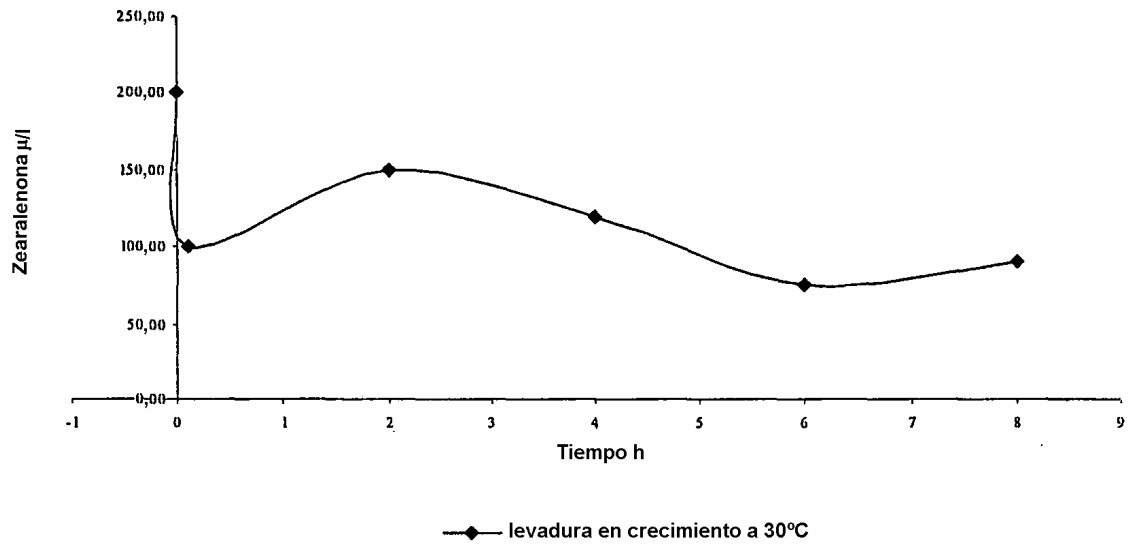


Figura 3

Degradación de Fumonisina por las enzimas de levadura

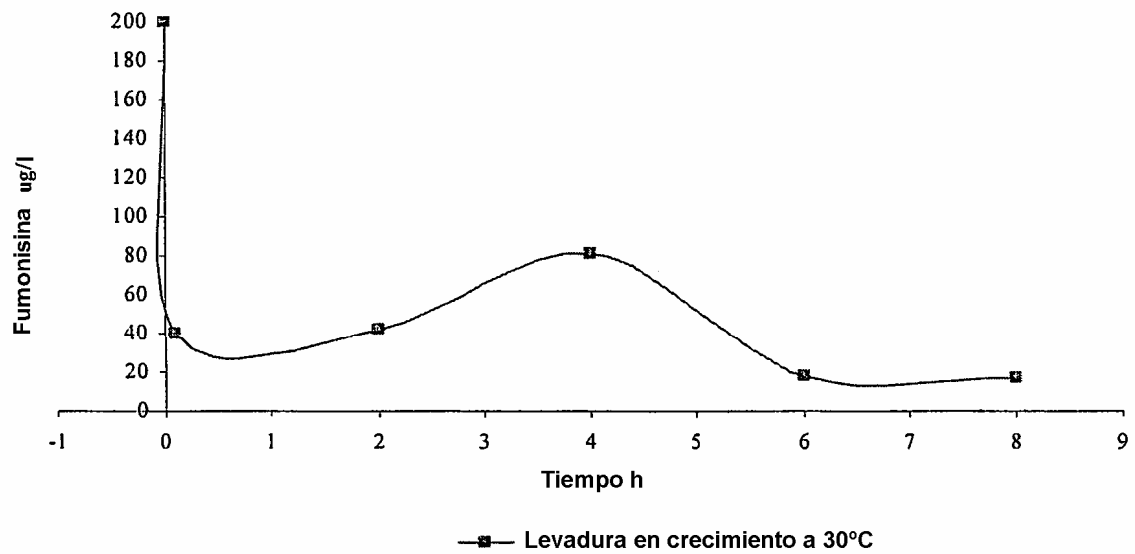


Figura 4

Producción de leche

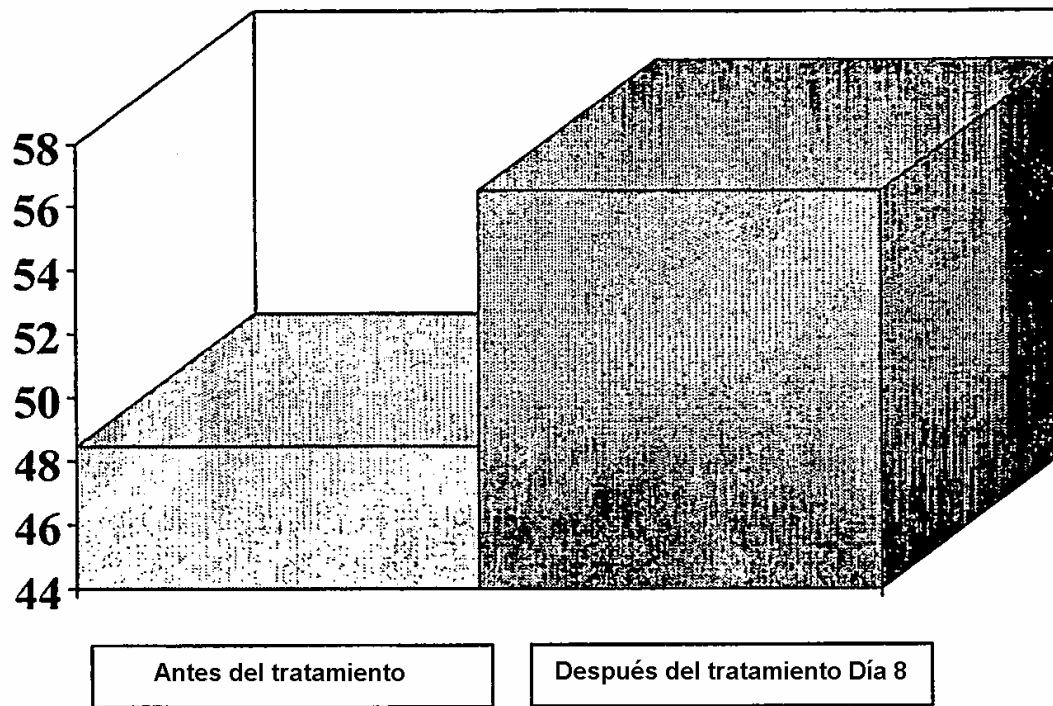


Figura 5

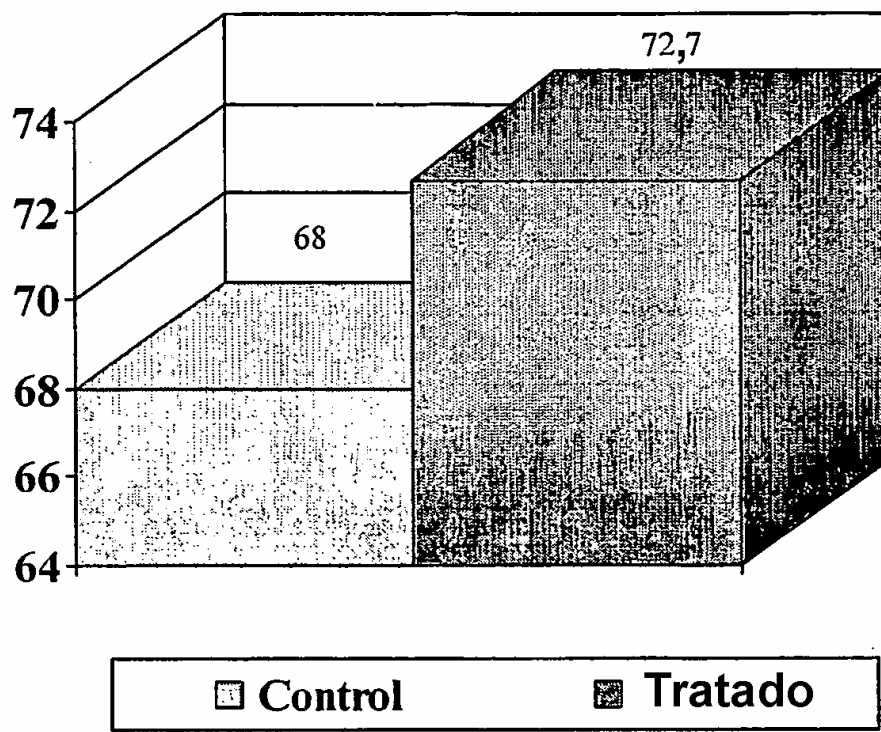


Figura 6