

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 505**

51 Int. Cl.:

A23L 31/10	(2006.01)	C12H 1/044	(2006.01)
A23L 31/15	(2006.01)	C12H 1/056	(2006.01)
A23K 10/00	(2006.01)		
A23K 50/00	(2006.01)		
A23L 33/14	(2006.01)		
A23K 20/28	(2006.01)		
A23L 2/52	(2006.01)		
C12N 1/16	(2006.01)		
A61K 36/06	(2006.01)		
A23L 33/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2010 PCT/US2010/021076**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2010 WO10083336**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2010 E 10732102 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2387410**

54 Título: **Composiciones de levadura intercaladas con arcilla y métodos de utilización de las mismas**

30 Prioridad:

14.01.2009 US 144620 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.01.2017

73 Titular/es:

**ALLTECH, INC. (100.0%)
3031 Catnip Hill Pike
Nicholasville, KY 40356, US**

72 Inventor/es:

**YIANNIKOURIS, ALEXANDROS y
THIELEN, URSULA ANNE**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 597 505 T3

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

Composiciones de levadura intercaladas con arcilla y métodos de utilización de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden células de levadura y/o componentes de células de levadura y métodos para producir y utilizar las mismas. En particular, la divulgación proporciona una levadura novedosa que comprende una estructura de pared celular alterada (por ejemplo, arcilla integrada (por ejemplo, intercalada) en la(s) pared(es) celular(es)), métodos de producción de la misma, composiciones que comprenden y/o se derivan de la misma, y métodos de uso de la misma (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber micotoxinas). Las composiciones y los métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones incluyendo dietéticas (por ejemplo, mezclando con productos alimenticios o alimentando de otra forma a animales), terapéuticas, profilácticas (por ejemplo mezcla con fuentes de lechos y/o otros materiales que entran en contacto con animales, uso durante el procesamiento y la fabricación de alimentos y bebidas, y uso durante la filtración de líquidos) así como aplicaciones de investigación.

Antecedentes de la invención

15 Los hongos son ubicuos en todo el mundo, y pasan desapercibidos ya que lo más comúnmente son microscópicamente pequeños. Las micotoxinas son metabolitos secundarios secretados por los hongos. Las micotoxinas son compuestos tóxicos y/o carcinogénicos producidos por diversas especies fúngicas que crecen sobre diversos productos agrícolas. Los ejemplos de micotoxinas incluyen pero no se limitan a aflatoxinas, fumonisin, ocratoxina A, desoxinivalenol (también conocido como "DON" o "vomitoxina"), patulina y zearalenona. Las micotoxinas se producen a menudo en granos de cereales así como forrajes antes, durante y después de la cosecha. Algunas micotoxinas son mortales, algunas provocan enfermedades identificables o problemas de salud, algunas debilitan el sistema inmunitario sin producir síntomas específicos para esa micotoxina, algunas actúan como alérgenos o irritantes, y algunas no tienen ningún efecto conocido sobre animales o seres humanos. El mayor impacto económico de la contaminación con micotoxinas lo sufren productores de cultivos y aves de corral, así como productores de alimentos y piensos. Las micotoxinas pueden aparecer en la cadena alimentaria como resultado de infección fúngica de productos vegetales, y o bien pueden ingerirse directamente por seres humanos, o bien introducirse por contaminación de pienso(s) para ganado. Las micotoxinas contaminan materiales orgánicos (por ejemplo lechos) así como agua, y resisten en gran medida la descomposición durante la digestión de modo que permanecen en la cadena alimentaria en productos comestibles (por ejemplo carne, huevos y productos lácteos).

20 Ninguna región del mundo escapa a las micotoxinas y su impacto negativo sobre la salud animal y humana. La evolución del comercio global de piensos aumenta las posibilidades de que combinaciones de granos den como resultado combinaciones de micotoxinas en una dieta dada y que micotoxinas poco comunes y no sospechosas estén presentes en una región dada independientemente de su condición climática.

35 Las estrategias usadas para evitar la aparición de micotoxinas implican controlar los elementos que permiten la producción de micotoxinas, controlar el crecimiento de mohos, así como poner en práctica el control de calidad de alimentos y piensos por medio de una metodología adecuada de toma de muestras, detección y cuantificación. Sin embargo, la contaminación con micotoxinas es inevitable.

40 Con el fin de reducir los efectos negativos de micotoxinas, se han añadido históricamente a los piensos materiales inorgánicos tales como arcillas, bentonitas y aluminosilicatos, conocidos por sus propiedades de adsorción. Los aditivos para piensos, en grandes cantidades, secuestran algunas micotoxinas en el tracto gastrointestinal del animal y minimizan sus efectos tóxicos. Sin embargo, los aditivos dificultan la absorción de muchos nutrientes beneficiosos que son importantes para los animales tales como vitaminas, minerales y aminoácidos disminuyendo de ese modo la densidad de nutrientes de la dieta. Además, los aditivos para piensos, particularmente en heces de los animales, tienen un impacto medioambiental extremadamente perjudicial.

45 Se han usado agentes químicos tales como ácidos, bases (por ejemplo, amoníaco, sosa cáustica), oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ozono), agentes reductores (por ejemplo, bisulfitos), agentes clorados y formaldehído, para degradar micotoxinas en piensos contaminados, particularmente aflatoxinas (véase, por ejemplo, Hagler 1991; Phillips *et al* 1994; Lemke *et al* 2001). Sin embargo, estas técnicas no son eficaces, son caras, generan una cantidad significativa de residuos químicos y a menudo no son seguras en general.

50 Determinadas cepas de bacterias del ácido láctico, propionibacterias y bifidobacterias tienen estructuras de pared celular que se unen a micotoxinas (véase, por ejemplo, Ahokas *et al* 1998; El-Nemazi *et al* 1998; Yoon *et al* 1999) y limitan su biodisponibilidad en el cuerpo del animal. Sin embargo, estos procesos biológicos son generalmente lentos, producen metabolitos tóxicos y son ineficaces.

55 Bauman *et al.*, J. Basic Microbiol. 41 (2001) 1, 7-16 describen el impacto de la zeolita sobre la forma y el tamaño celulares; Karmelic *et al.*, P15, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 374, n.º 4, páginas 317-346 describen la dependencia de la concentración de bases esfingoides de la fase de crecimiento y la adición de zeolita en levadura de cerveza. El documento US6045834 describe la eliminación de micotoxinas de pienso que comprende la administración de un extracto derivado de la pared celular de levadura en combinación con arcilla.

Sumario de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1 a 16.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula de levadura que comprende una pared celular de levadura que comprende arcilla intercalada en la pared celular de levadura. La célula de levadura se cultiva en un medio de cultivo celular que comprende arcilla. En algunas realizaciones, la arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicatos. En algunas realizaciones, la arcilla se selecciona de una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita, una esmectita, una caolinita, una organoarcilla y mezclas de las mismas. En algunas realizaciones, la arcilla es un aluminosilicato arcilla. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,125% hasta el 4,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,125% hasta el 4,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,5% hasta el 2,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,5% hasta el 2,0%. En algunas realizaciones, la levadura se selecciona de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada. El extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se deriva de una célula de levadura cultivada en medio de crecimiento que comprende una arcilla. En algunas realizaciones, se utilizan perlas de vidrio y una batidora de perlas para preparar el extracto de pared celular de levadura. En algunas realizaciones, se utiliza tratamiento enzimático para preparar el extracto de pared celular de levadura. En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se añade a un pienso. En algunas realizaciones, el pienso se selecciona de una ración total mezclada (TMR), un forraje, un gránulo, un concentrado, una premezcla, un coproducto, grano, grano de destilería, melazas, fibra, alimento para animales, pasto, heno, semilla, hojas, harina, compuestos solubles y un complemento. En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se añade a material orgánico. En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se añade a agua. En algunas realizaciones, se filtra un líquido a través del extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada. En algunas realizaciones, el líquido es un zumo, agua, cerveza o vino. En algunas realizaciones, la composición se formula para alimentar a cualquier miembro del reino Animalia. En algunas realizaciones, el miembro del reino Animalia se selecciona de especies aviares, bovinas, porcinas, equinas, ovinas y caprinas, piscícolas, de marisco, camélidas, felinas, caninas y de roedor. El extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada secuestra una o más micotoxinas. En algunas realizaciones, la micotoxina se selecciona de aflatoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas y ocratoxinas. En algunas realizaciones, la micotoxina se selecciona de acetoxiscirpenodiol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, extendida a todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, ácido altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, caetoglobosina, citrinina, citreoviridina, cocliodinol, citocalasina E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, monoacetato de desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, destruxina B, eniatinas, extendidas a todas las toxinas del cornezuelo del centeno y endófitos, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas B1 y B2 y B3, fusarenona-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, ipomeanina, islanditoxina, lateritina +1, licomarasmina +1, malformina, maltorzina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, extendida a todas las ocratoxinas, oosporeína, ácido oxálico, patulina, ácido penicílico, penitrem, roridina E, rubratoxina, rubroskirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, eslaframina, esterigmatocistina, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, viopurpurina, viomeleína, viriditoxina, xantocilina, yavanicina+1 y zearalenoles, y zearalenona.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada, en las que el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada está presente en una cantidad eficaz para secuestrar micotoxinas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada está presente en una cantidad del 0,0125% al 10% en peso de un producto alimenticio. En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada está presente en una cantidad del 0,0125% al 4,0% en peso de un producto alimenticio. La presente invención no está limitada por el tipo de producto alimenticio.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para reducir la biodisponibilidad de micotoxinas para un animal o ser humano que comprende: (a) proporcionar: (i) una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada, y (ii) un material consumido por un animal o ser humano; (b) incorporar el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada en el material para producir un material con extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada incorporado; y (c) permitir que el animal o el ser humano consuman el material con extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada incorporado. En algunas realizaciones, el material es un producto alimenticio. En algunas realizaciones, se añade del 0,0125% al 0,4% en peso de la composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada a un producto alimenticio. En algunas realizaciones, es material es un lecho. En algunas realizaciones, se añade del 0,0125% al 99,0% de la composición que comprende un extracto de pared celular de levadura en peso al lecho. En

- algunas realizaciones, el material es un líquido. En algunas realizaciones, se añade del 0,0125% al 99,0% de la composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada en peso al líquido. En algunas realizaciones, el animal se selecciona de especies aviares, bovinas, porcinas, equinas, ovinas y caprinas, piscícolas, de marisco, camélidas, felinas, caninas y de roedor. La composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada secuestra uno o más tipos de micotoxinas. En algunas realizaciones, las micotoxinas son aflatoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, acratoxinas, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona además la incorporación de un agente adicional en el material con extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada incorporado, en el que el agente se selecciona de una esterasa, epoxidasa, cepa de levadura y/o bacteriana.
- La presente divulgación proporciona un método de producción de una cantidad a escala comercial de extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada que comprende: (a) proporcionar: (i) un cultivo iniciador de levadura y (ii) medios de cultivo de células de levadura, en el que los medios de cultivo de células de levadura comprenden los nutrientes requeridos para el crecimiento de levaduras y una arcilla; (b) introducir el cultivo iniciador de levadura en los medios de cultivo de células de levadura; (c) incubar la levadura en un fermentador a escala industrial en condiciones configuradas para permitir el crecimiento de levaduras, en el que las levaduras incorporan la arcilla en la pared celular de levadura durante el crecimiento; (d) añadir agente antiespumante al fermentador; (e) lisar las paredes de células de levaduras con arcilla intercalada; y (f) separar las paredes de células de levaduras con arcilla intercalada de los otros componentes de levaduras. En algunas realizaciones, la levadura se selecciona de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicatos. En algunas realizaciones, la arcilla es una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita, una esmectita, una caolinita, una organoarcilla o mezcla de las mismas. En algunas realizaciones, la arcilla es una arcilla de aluminosilicato. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es del 0,125% al 4,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es del 0,5% al 2,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es del 0,125% al 4,0%. En algunas realizaciones, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es del 0,5% al 2,0%. En algunas realizaciones, el fermentador a escala industrial es de entre mil y cinco millones de litros. En algunas realizaciones, el agente antiespumante se añade para aliviar los efectos de la arcilla sobre el proceso de incubación. En algunas realizaciones, el agente antiespumante es un antiespumante molecular distinto de silicona, antiespumante a base de aceite, antiespumante de polvo, antiespumante a base de agua, antiespumante a base de silicona, antiespumante a base de polietilenglicol, antiespumante a base de propilenglicol o poli(acrilatos de alquilo). En algunas realizaciones, el agente antiespumante es un antiespumante molecular distinto de silicona. En algunas realizaciones, el lisado comprende perlas de vidrio, una batidora de perlas y/o tratamiento enzimático.

Descripción de los dibujos

- La figura 1 muestra A) una representación de una célula de levadura con arcilla intercalada en la pared celular de levadura, y B) una descripción comparativa de (a) la pared celular de levadura de una célula de levadura cultivada en ausencia de arcilla y (b) la pared celular de levadura de una célula de levadura hecha crecer/cultivada en presencia de arcilla.
- La figura 2 muestra una micrografía electrónica de barrido de (A) una arcilla bentonita (Fluka); (B) células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla y un primer plano de la parte de glucano de la pared celular de levadura; (C1) células de levadura cultivadas en presencia del 2% de arcilla bentonita con detalle de una formación de conglomerado de varias células de levadura atrapadas en la estructura laminar de la bentonita; (C2) células de levadura cultivadas en presencia del 2% de arcilla bentonita con detalle de una inclusión de la arcilla directamente en la estructura de la pared celular de levadura.
- La figura 3 proporciona características de extractos de pared celular de levadura preparados utilizando perlas de vidrio y una batidora de miniperlas a partir de células de levadura: cultivadas en ausencia de arcilla (pared celular de levadura (*Yeast Cell Wall*, "YCW") sólo), células de levadura cultivadas en presencia del 0,5% de arcilla (YCW +5%), células de levadura cultivadas en presencia del 1% de arcilla (YCW+1,0%) y células de levadura cultivadas en presencia del 2,0% de arcilla. Adicionalmente, los porcentajes de adsorción de la micotoxina zearalenona para cada una de las muestras.
- La figura 4 proporciona características de extractos de pared celular de levadura preparados utilizando corte con proteasa a partir de células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla (YCW sólo), células de levadura cultivadas en presencia del 1% de arcilla (YCW+1,0%) y células de levadura cultivadas en presencia del 2,0% de arcilla.
- La figura 5 representa la anatomía de una célula de levadura.
- La figura 6 muestra la composición de dos lotes de CIYCW producidos a escala semiindustrial.
- La figura 7 muestra los resultados de eficacia de secuestro obtenidos con la pared celular de levadura a escala semiindustrial, con y sin arcilla esmectita y habiéndose extraído o no con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos de secuestrante para AFB1 y ZEA fueron respectivamente del 0,1 y el 0,4% en el medio de

reacción que se mantuvo a un pH constante de 4,0. El ensayo se realizó con agitación orbital durante 90 min a 37°C y la cantidad de toxina unida se evaluó usando HPLC equipada con un detector de fluorescencia.

5 La figura 8 muestra los resultados de eficacia de secuestro obtenidos con la producción de pared celular de levadura con arcilla esmectita y habiéndose extraído con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos de secuestrante para AFB1 y ZEA fueron respectivamente del 0,1 y el 0,4% en el medio de reacción que se mantuvo a un pH constante de 4,0. El ensayo se realizó con agitación orbital durante 90 min a 37°C y la cantidad de toxina unida se evaluó usando HPLC equipada con un detector de fluorescencia.

10 La figura 9 muestra los resultados de adsorción obtenidos con las diferentes paredes celulares de levadura procedentes de tres cepas hechas crecer con o sin arcilla MBB02 y habiéndose extraído o no con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos de secuestrante para AFB1 y ZEA fueron respectivamente del 0,1 y el 0,4% en el medio de reacción que se mantuvo a un pH constante de 4,0. El ensayo se realizó con agitación orbital durante 90 min a 37°C y la cantidad de toxina unida se evaluó usando HPLC equipada con un detector de fluorescencia.

Definiciones

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “levadura” y “células de levadura” se refiere a microorganismos eucariotas clasificados en el reino Hongos, que tienen una pared celular, membrana celular y componentes intracelulares. Las levaduras no forman una agrupación filogenética o taxonómica específica. Actualmente se conocen aproximadamente 1.500 especies; se estima que sólo se ha descrito el 1% de todas las especies de levadura. El término “levadura” se toma a menudo como sinónimo para *S. cerevisiae*, pero la diversidad
20 filogenética de las levaduras se muestra por su colocación en las divisiones tanto Ascomycota como Basidiomycota. Las levaduras gemantes (“levaduras verdaderas”) se clasifican en el orden Saccharomycetales. La mayoría de las especies de levaduras se reproducen asexualmente por gemación, aunque algunas se reproducen por fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies se convierten en multicelulares a través de la formación de una tira de células gemantes conectadas conocida como pseudohifa, o hifa falsa. El tamaño de las levaduras
25 puede variar enormemente dependiendo de la especie, midiendo normalmente 3-4 µm de diámetro, aunque algunas levaduras pueden alcanzar más de 40 µm.

Tal como se usa en el presente documento, al término “pared celular de levadura” también se le hace referencia como “YCW” y se refiere a la pared celular de un organismo de levadura que rodea a la membrana plasmática y los
30 componentes intracelulares de la levadura. La pared celular de levadura incluye tanto la capa externa (principalmente manano) y la capa interna (principalmente glucano y quitina) de la pared celular de levadura. Una función de la pared celular es proporcionar estructura y proteger la levadura interior (su centro de actividad metabólica). Tienen lugar rutas de señalización y reconocimiento en la pared celular de levadura. La composición de la pared celular de levadura varía de cepa a cepa y según las condiciones de crecimiento de la levadura.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “extracto de pared celular de levadura” se refiere a la pared celular de levadura de una levadura que se ha roto o “lisado” (por ejemplo, durante una fase de rotura y lisado) y se ha separado de los componentes intracelulares solubles de la célula de levadura.

El término “aislado” cuando se usa en relación a una pared celular de levadura, como en “una pared celular de levadura aislada” o “pared celular de levadura con arcilla integrada aislada” o “pared celular de levadura aislada que
40 comprende estructura de glucano:manano alterada” se refiere a una pared celular de levadura o componente de la misma que se ha identificado y separado de al menos un componente con el que está asociada habitualmente en su fuente natural. Por tanto, una pared celular de levadura aislada está presente en una forma o entorno que es diferente de aquél en el que se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, que está separada de los componentes intracelulares de la levadura). En cambio, la pared celular de levadura no aislada es una pared celular de levadura o componente de la misma que se encuentra en el estado en el que existe en la naturaleza. En algunas realizaciones,
45 pared celular de levadura aislada se usa para describir un extracto de pared celular de levadura.

Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de componentes de una muestra. Por ejemplo, las paredes celulares de levadura o los extractos de pared celular de levadura se purifican mediante la eliminación de componentes que no son de la pared celular de levadura (por
50 ejemplo, membrana plasmática y/o componentes intracelulares de la levadura); también se purifican mediante la eliminación de contaminantes u otros agentes que no son pared celular de levadura. La eliminación de componentes que no son de la pared celular de levadura y/o contaminantes que no son de la pared celular de levadura da como resultado un aumento en el porcentaje de pared celular de levadura o componentes de la misma en una muestra. En otro ejemplo, se purifican paredes celulares de levadura que comprende arcilla integrada/intercalada en la pared celular de levadura mediante la eliminación de componentes que no son de la pared celular de levadura (por
55 ejemplo, membrana plasmática y/o componentes intracelulares de levadura), de ese modo el porcentaje de pared celular de levadura que comprende arcilla integrada/intercalada en la pared celular aumenta en una muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término “extracto de pared celular de levadura concentrado” se refiere a un extracto de pared celular de levadura que se concentra por medio de uno o más procedimientos (por ejemplo,

mediante secado (por ejemplo, durante una fase de secado y concentración)). En otro ejemplo, un extracto de pared celular de levadura concentrado es una preparación de pared celular de levadura o preparación de extracto de pared celular de levadura que se purifica mediante la eliminación de componentes que no son de la pared celular de levadura.

5 Tal como se usa en el presente documento, los términos “levadura modificada” y “levadura alterada” se refieren a levadura cultivada de un modo que altera la composición, estructura y/o función de la levadura (por ejemplo, que altera la composición, estructura y/o función de la pared celular de levadura (por ejemplo, una pared celular de levadura que comprende una razón de glucano:manano alterada y/o arcilla integrada/intercalada en la pared celular de levadura que funciona de manera diferente de una pared celular de levadura sin razón de glucano:manano alterada y/o pared celular de levadura sin arcilla integrada/intercalada).

Tal como se usa en el presente documento, el término “pared celular de levadura modificada” se refiere a pared celular de levadura de levadura modificada o alterada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “extracto de pared celular de levadura modificada” se refiere a extracto de pared celular de levadura de levadura modificada o alterada.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “extracto de pared celular de levadura modificada concentrado” tal como se usa en el presente documento se refiere a extracto de pared celular de levadura concentrado derivado de levadura modificada o alterada, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.045.834.

20 Tal como se usa en el presente documento, los términos “levadura con arcilla intercalada”, “levadura con arcilla integrada” se refieren a levadura hecha crecer o cultivada en presencia de arcilla que ha incorporado o intercalado arcilla en la pared celular de levadura. La levadura con arcilla intercalada es un tipo específico de levadura modificada.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “intercalada” como en “extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada” se refiere a la integración de arcilla en la pared celular de levadura. Aunque no es necesario un mecanismo para poner en práctica la invención y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, la intercalación de arcilla en la pared celular de levadura se produce durante el crecimiento de la levadura (por ejemplo, después de su ciclo de reproducción asexual (gemación) (por ejemplo, a medida que una célula hija crece y forma su red de pared celular de levadura, integra arcilla en la célula de levadura)). En un ejemplo, el alargamiento de las cadenas de glucano y/o quitina proporciona sitio(s) de integración implicados en la integración de la arcilla durante la gemación, dando como resultado que la célula hija comprenda arcilla integrada en su pared celular. En otro ejemplo, la estructura de arcilla macromolecular atrapa la(s) célula(s) de levadura en su red laminar, en la que la célula de levadura avanza a través de gemación, integrando adicionalmente arcilla en la pared celular de levadura. La arcilla integrada/intercalada en la pared celular de levadura permanece integrada/intercalada en la pared celular de levadura tras la extracción de la pared celular.

35 Tal como se usan en el presente documento, los términos “pared celular de levadura con arcilla intercalada” y “pared celular de levadura con arcilla integrada” se refieren a pared celular de levadura de levadura hecha crecer o cultivada en presencia de arcilla que se ha incorporado o intercalado en la pared celular de levadura.

40 Tal como se usa en el presente documento, los términos “extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada”, “extracto de pared celular de levadura con arcilla integrada” se refieren a extracto de pared celular de levadura de una levadura (por ejemplo, en la que la levadura a partir de la cual se prepara el extracto de pared celular se hace crecer o se cultiva en presencia de arcilla) que ha incorporado o intercalado arcilla en la pared celular de levadura.

45 Tal como se usa en el presente documento, los términos “extracto de pared celular de levadura intercalada concentrado” y “extracto de pared celular de levadura integrada concentrado” se refieren a un extracto de pared celular de levadura concentrado de levadura hecha crecer o cultivada en presencia de arcilla que ha incorporado o intercalado arcilla en la pared celular de levadura.

Tal como se usa en el presente documento, el término “*in vivo*” se refiere a estudios y/o experimentos realizados dentro de un organismo vivo, produciéndose dentro de un organismo biológico.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “*in vitro*” se refiere a un entorno artificial fuera del organismo vivo y a procesos o reacciones biológicas que se producirían normalmente dentro de un organismo pero que hace que se produzcan en un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden comprender tubos de ensayo y cultivo celular.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “cromatografía de líquidos de alta resolución” y el término “HPLC” se refieren a una forma de cromatografía de líquidos para separar compuestos. Los compuestos se disuelven en disolución. Los compuestos se separan inyectando un tapón de la mezcla de muestra sobre la columna. Los instrumentos de HPLC comprenden un depósito de fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. Se registra la presencia de analitos en el efluente de la columna detectando cuantitativamente un cambio en el índice de refracción, absorción UV-VIS a una longitud de onda fijada,

fluorescencia tras excitación con una longitud de onda adecuada, o respuesta electroquímica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “microscopía electrónica de barrido” y el término “SEM” se refieren a un tipo de microscopio electrónico que toma imágenes de la superficie de la muestra mediante barrido de la misma con un haz de electrones de alta energía en un patrón de barrido en cuadrícula. Los electrones interactúan con los átomos que constituyen la muestra produciendo señales que contienen información sobre la topografía, composición y otras propiedades de la superficie de la muestra tales como conductividad eléctrica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de fijación” se refiere a un producto químico que puede fijar una sustancia a otra con el fin de “fijar”, estabilizar o conservar de otra forma la sustancia en su forma actual para impedir que la sustancia se degrade o cambie de otra forma. A menudo, se usan agentes de fijación en microscopía electrónica de barrido (SEM) para preparar la muestra. Agente de fijación primario: tal como se usa en el presente documento, el término “agente de fijación primario” se refiere al primer agente de fijación usado para “fijar” una sustancia. Agente de fijación secundario: tal como se usa en el presente documento, el término “agente de fijación secundario” se refiere al segundo agente de fijación usado para “fijar” una sustancia. Agente de fijación terciario: tal como se usa en el presente documento, el término “agente de fijación terciario” se refiere al tercer agente de fijación usado para “fijar” una sustancia.

Tal como se usa en el presente documento, el término “analito” se refiere a un átomo, una molécula, una agrupación de átomos y/o moléculas, una sustancia o constituyente químico. Un analito no puede medirse por sí mismo, en su lugar, pueden determinarse aspectos o propiedades (físicas, químicas, biológicas) del analito usando un procedimiento analítico, tal como HPLC. Por ejemplo, no puede medirse una “silla” (analito-componente) por sí misma, pero puede medirse la altura, anchura, etc. de una silla. Asimismo, no puede medirse una micotoxina pero puede medirse la fluorescencia de la micotoxina que está relacionada con su concentración.

Tal como se usa en el presente documento, el término “señal” se usa generalmente en referencia a cualquier proceso detectable que indique que se ha producido una reacción (por ejemplo, unión de anticuerpo a antígeno). Las señales pueden evaluarse cualitativamente así como cuantitativamente. Los ejemplos de tipos de “señales” incluyen señales radiactivas, señales fluorimétricas o señales de productos/reactivos colorimétricos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “biodisponibilidad” se refiere a la fracción de una molécula o componente que está disponible para un organismo o alcanza la circulación sistémica. Cuando una molécula o componente se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es del 100%. Sin embargo, cuando una molécula o componente se administra por medio de otras vías (tal como por vía oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a absorción incompleta y metabolismo de primer paso).

Tal como se usa en el presente documento, el término “absorber” se refiere al proceso mediante el cual un material “toma” o “succiona” otra sustancia. Por ejemplo, “absorción” puede referirse al proceso de absorber o asimilar sustancias dentro de células o a través de los tejidos y órganos a través de difusión u ósmosis (por ejemplo absorción de nutrientes por el sistema digestivo o absorción de fármacos en el torrente sanguíneo).

Tal como se usa en el presente documento, el término “adsorción” se refiere a un proceso que se produce cuando un material se secuestra por, y/o se acumula sobre la superficie de, un sólido o un líquido (secuestrante y/o adsorbente) (por ejemplo formando de ese modo una película de moléculas o átomos (el adsorbato)).

Tal como se usa en el presente documento, el término “secuestrar” y/o el término “secuestro” se refiere a la asociación física (por ejemplo, por medio de acoplamiento o revestimiento) de dos o más entidades que entran en contacto entre sí (por ejemplo, formando de ese modo un complejo estable). Las formas a modo de ejemplo de asociaciones incluyen enlaces de hidrógeno, coordinación y formación de pares iónicos. Las interacciones de secuestro pueden implicar un número variable de interacciones químicas (por ejemplo, enlaces químicos) dependiendo de la estereoquímica y la geometría de cada entidad (por ejemplo, definiendo adicionalmente la especificidad del secuestro). Cuando se secuestran dos o más entidades, pueden secuestrarse por medio de enlaces químicos, pero también pueden asociarse por medio de interacciones de carga o de otro tipo. Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de secuestro” y/o “agente secuestrante”, se refiere a una entidad que puede inducir o estar implicada de otra forma en un secuestro y/o la formación de un complejo con una segunda entidad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sorción” se refiere a tanto adsorción como absorción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una composición (por ejemplo, que comprende una célula de levadura, pared celular de levadura o componente de pared celular de levadura modificada de la invención) suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse y/o combinarse con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que esté limitada a una vía de administración o formulación particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “digerir” se refiere a la conversión de alimento, productos alimenticios u otros compuestos orgánicos en forma absorbible; ablandar, descomponer o romper mediante calor y humedad o acción química.

Tal como se usa en el presente documento, “sistema digestivo” se refiere a un sistema (incluyendo el sistema gastrointestinal) en el que se produce o puede producirse la digestión.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “productos alimenticios” se refiere a material(es) que se consumen por animales y contribuyen a la energía y/o nutrientes para la dieta de un animal. Los ejemplos de productos alimenticios incluyen ración total mezclada (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), premezcla(s) coproducto(s), grano(s), grano(s) de destilería, melazas, fibra(s), alimento para animales(s), pasto(s), heno, semilla(s), hojas, harina, compuesto(s) soluble(s) y complemento(s).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a los del reino Animalia. Esto incluye, pero no se limita a ganado, animales de granja, animales domésticos, animales de compañía, animales marinos y de agua dulce, y animales salvajes.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “administración” y el término “administrar” se refieren al hecho de dar una sustancia, incluyendo un fármaco, profármaco u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*).

15 Vías de administración a modo de ejemplo pueden ser a través de los ojos (oftálmica), la boca (oral), la piel (tópica o transdérmica), la nariz (nasal), los pulmones (inhalante), la mucosa oral (bucal), el oído, rectal, vaginal, mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intratumoral, por vía intraperitoneal).

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “coadministración” y el término “coadministrar” se refieren a la administración de al menos dos agente(s) o terapias a un sujeto y/o material (por ejemplo, producto alimenticio). La coadministración de dos o más agentes o terapias puede ser simultánea, o puede administrarse un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere a la mejora y/o reversión de los síntomas de una enfermedad (por ejemplo, micotoxicosis). El término “tratamiento” se refiere a tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Por ejemplo, los sujetos que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen aquellos en los que va a prevenirse una enfermedad y/o un trastorno (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “en riesgo de enfermedad” se refiere a un sujeto que está predispuesto a experimentar una enfermedad particular. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética particular a experimentar la enfermedad, tal como trastornos heredables), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones ambientales, exposición a compuestos perjudiciales presentes en el entorno, etc.).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad”, el término “infección” y el término “respuesta o estado patológico” se refieren a un estado, signos y/o síntomas que están asociados con una alteración del estado normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpen o modifican el rendimiento de las funciones normales, y pueden ser una respuesta a factores ambientales (tales como malnutrición, peligros industriales o clima, incluyendo micotoxicosis), agentes infecciosos específicos (tales como lombrices, bacterias o virus), a un defecto inherente del organismo (tal como diversas anomalías genéticas), o combinaciones de estos y otros factores.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “micotoxicosis” se refiere a un estado en el que las micotoxinas pasan las barreras de resistencia del cuerpo humano o animal. La micotoxicosis puede considerarse o bien una infección o bien una enfermedad y puede tener un efecto perjudicial sobre los aquejados.

Tal como se usa en el presente documento, el término “micotoxina” se refiere a compuesto(s) tóxico(s) y/o carcinogénico(s) producidos por diversas especies fúngicas.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “que padece una enfermedad” se refiere a un sujeto (por ejemplo, un sujeto animal o humano) que está experimentado una enfermedad particular y no se limita a ningún signo o síntoma particular, o enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tóxico” se refiere a cualquier efecto perjudicial, nocivo, dañino o negativo de otra forma sobre un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes del contacto o la administración de la toxina/agente tóxico.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto químico que pueda donar protón/protones y/o aceptar electrón/electrones. Los ácidos incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico. Otros ácidos, tales como oxálico, aunque no son por sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente

55

aceptables.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “base” se refiere a cualquier compuesto químico que pueda aceptar protón/protones y/o donar electrón/electrones o iones hidróxido. Las bases incluyen hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metal alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amoniaco, y compuestos de fórmula NW_4^+ , en la que W es alquilo C_{1-4} .

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “sal” se refiere a compuestos que pueden derivarse de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos. Los ejemplos de sales incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención combinados con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en el que W es un grupo alquilo C_{1-4}).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo (por ejemplo, una composición que comprende una célula de levadura viable, pared celular de levadura o componente de pared celular de levadura modificada de la invención) con un portador, inerte o activo, lo que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso de diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” y el término “farmacológicamente aceptable” se refieren a composiciones que no producen sustancialmente más reacciones adversas conocidas que reacciones beneficiosas conocidas.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente desespumante” se refiere a un aditivo para impedir la formación de espuma o se añade para romper la espuma ya formada. Un “agente desespumante” también se denomina “desespumante” o “antiespumante” y se refiere a un aditivo que reduce la tensión superficial de una disolución o medio o emulsión o caldo en fermentadores debido a aireación o agitación, inhibiendo o modificando así la formación de una espuma. Agentes comúnmente usados son aceites insolubles, dimetilpolisiloxanos y otras siliconas, determinados alcoholes tales como estearildecanol, octaldecanol, sulfonatos, estearatos y glicoles.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula” se refiere a una unidad autorreplicante autónoma que puede existir como unidad de vida independiente funcional (como en el caso de un organismo unicelular, por ejemplo levadura), o como subunidad en un organismo multicelular (tal como en plantas y animales) que está especializada en llevar a cabo funciones particulares para el organismo como un todo. Hay dos tipos distintos de células: células procariotas y células eucariotas.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “eucariota” se refiere a organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas encerradas dentro de membranas. Los “eucariotas” pueden distinguirse de los “procariotas”. El término “procariota” se refiere a organismos que carecen de un núcleo celular u otros orgánulos rodeados por una membrana. El término “eucariota” se refiere a todos los organismos con células que presentan las características típicas de eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero rodeado por una membrana nuclear, dentro de la cual se encuentran los cromosomas, la presencia de orgánulos rodeados por una membrana, y otras características comúnmente observadas en organismos eucariotas. Por tanto, el término incluye organismos
40 tales como hongos, protozoos y animales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivo celular” se refiere a cualquier cultivo *in vitro* de células. Se incluyen dentro de este término líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas), y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “reproducción celular” se refiere a un proceso de multiplicación celular que tiene tres fases primarias. La primera fase de la reproducción celular implica la replicación del ADN de la célula parental. La segunda fase es la separación del ADN duplicado en dos grupos de cromosomas de igual tamaño. La tercera fase es la división física de células completas, habitualmente denominada citocinesis. La reproducción celular es más completa en eucariotas que en otros organismos. Las células no eucariotas tales como
50 células bacterianas se reproducen por fisión binaria, un procedimiento que incluye replicación del ADN, segregación de cromosomas y citocinesis. La reproducción de células eucariotas implica o bien mitosis o bien un proceso más complejo denominado meiosis. La mitosis y meiosis se denominan algunas veces los dos procesos de “división nuclear”. La fisión binaria es similar a la reproducción de células eucariotas que implica mitosis. Ambas conducen a la producción de dos células hijas con el mismo número de cromosomas que la célula parental. La meiosis se usa
55 para un proceso de reproducción celular especial de organismos diploides. Produce cuatro “células hijas” especiales (gametos) que tienen la mitad de la cantidad celular normal de ADN. Entonces pueden combinarse un gameto macho y un gameto hembra para producir un cigoto, una célula que de nuevo tiene la cantidad normal de cromosomas.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “reproducción de levaduras” se refiere al ciclo de reproducción de una levadura, que tiene ciclos reproductores asexual y sexual, sin embargo el modo más común de crecimiento vegetativo en levaduras es reproducción asexual mediante “gemación” o “fisión” con una “célula hija” que se forma sobre la “célula parental”. El núcleo de la célula parental se divide en un núcleo hijo y migra a la célula hija. La yema continúa creciendo hasta que se separa de la “célula parental”, formando una nueva célula. En condiciones de alto estrés, las células haploides generalmente morirán, sin embargo en las mismas condiciones las células diploides pueden experimentar esporulación, entrando en reproducción sexual (meiosis) y produciendo una variedad de esporas haploides, que pueden acoplarse (conjugarse), formando de nuevo el diploide.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “gemación” se refiere a un tipo de división celular en hongos (por ejemplo levaduras) y en protozoos en el que una de las “células hijas” se desarrolla como una protrusión más pequeña que la otra. Habitualmente la posición de la célula en gemación se define mediante polaridad en la “célula parental”. En algunos protozoos la hija gemada puede encontrarse dentro del citoplasma de la otra hija.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “célula hija” se refiere a una de las dos o más células formadas en la de una célula parental.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula parental” y el término “célula madre” se refieren a la célula que da lugar a células hijas mediante división celular.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “inoculación” se refiere al acto de introducir un microorganismo o suspensión de microorganismos (por ejemplo levadura, hongos, bacterias) en un medio de cultivo. La inoculación es el acto o proceso de introducir algo en donde crecerá o se reproducirá.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “inóculo” y el término “preinóculo” se refieren a células usadas en una inoculación, tal como células añadidas para iniciar un cultivo.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “procedimiento de crecimiento” se refiere a la reproducción de células vivas aplicada a células de levadura en donde la frase “crecimiento celular” es una abreviatura para la idea de “crecimiento del número de células por medio de reproducción celular”. Durante la reproducción celular una célula (la “célula parental” o “célula madre”) se divide para producir “células hijas”.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “cultivar una levadura” y el término “hacer crecer una levadura” se refieren al acto de poblar y/o propagar una levadura.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “centrifugación” se refiere a la separación de moléculas por tamaño o densidad usando fuerzas centrífugas generadas por un rotor giratorio que pone un objeto en rotación alrededor de un eje fijado, aplicando una fuerza perpendicular al eje. La centrifuga funciona usando el principio de sedimentación, en donde se usa la aceleración centrípeta para distribuir uniformemente sustancias de densidad mayor y menor para dar diferentes capas de densidad.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término “concentración” se refiere a la cantidad de una sustancia por espacio definido. La concentración se expresa habitualmente en cuanto a masa por unidad de volumen. Para diluir una disolución, debe añadirse más disolvente, o reducirse la cantidad de soluto (por ejemplo, mediante evaporación selectiva, secado por pulverización, secado por congelación, por ejemplo, extracto de pared celular de levadura concentrado o extracto de pared celular de levadura modificada concentrado). En cambio, para concentrar una disolución, debe añadirse más soluto, o reducirse la cantidad de disolvente.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término “capa” se refiere a un depósito habitualmente horizontal organizado en estrato de un material que forma una parte o segmento superior obtenido tras la separación mediante centrifugación en relación con las propiedades de densidad del material. Tal como se usa en el presente documento, el término “cosecha” se refiere al hecho de recoger o agrupar los materiales que se han producido (por ejemplo agrupando los materiales producidos durante la producción de levaduras).
- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término “arcilla” se refiere a minerales de arcilla, arcilla sintética, organoarcillas y cualquier mezcla de los mismos.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término “mineral de arcilla” se refiere a un material sintético o que se produce de manera natural compuesto principalmente por minerales de grano fino (silicatos) que muestran plasticidad a través de un intervalo variable de contenido en agua (que puede ser el resultado del agua atrapada en la estructura por atracción polar) y pueden endurecerse cuando se secan y/o calcinan. Los ejemplos de silicatos incluyen filosilicato, bentonita, zeolita, aluminosilicato, montmorillonita, esmectita, caolinita.
- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término “organoarcilla” y el término “arcilla modificada” se refieren a un filosilicato modificado de manera orgánica, derivado de un mineral de arcilla que se produce de manera natural. Intercambiando los cationes intercalados originales por organocaciones (normalmente iones de alquilamonio cuaternario) o polisacáridos, se genera una superficie organófila, que consiste en restos orgánicos covalentemente unidos. La estructura laminar sigue siendo análoga al filosilicato original.
- 55

Tal como se usa en el presente documento, el término “secado” se refiere a secado por pulverización, secado por congelación, secado al aire, secado a vacío o cualquier otra clase de proceso que reduzca o elimine líquido en una sustancia.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “secado por pulverización” se refiere a un método comúnmente usado de secado de una sustancia que contiene líquido usando gas caliente para evaporar el líquido para reducir o eliminar el líquido en la sustancia. En otras palabras, el material se seca por medio de pulverización o atomización en una corriente de aire seco calentado.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “secado por congelación” y el término “lío-filización” y el término “criodesecación” se refieren a la eliminación de un disolvente de la materia en un estado congelado mediante sublimación. Esto se logra congelando el material que va a secarse por debajo de su punto eutéctico y luego proporcionando el calor latente de sublimación. El control preciso de la entrada de calor permite secar a partir del estado congelado sin que el producto vuelva a fundirse. En aplicación práctica, el proceso se acelera y se controla de manera precisa en condiciones de presión reducida.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “polvo de flujo libre seco” se refiere a un polvo seco de flujo libre.

Tal como se usa en el presente documento, el término “trituration” se refiere a reducir el tamaño de partícula por impacto, cizalladura o atrición.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “lavado” se refiere a la eliminación o limpieza (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo agua destilada, tampón o disolvente) o mezcla) de impurezas o un componente no deseado soluble de una preparación (por ejemplo, un extracto de pared celular de levadura puede lavarse para eliminar componentes que no son de la pared celular de levadura de la muestra).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “enzima” se refiere a una proteína o molécula a base de proteína con una secuencia de aminoácidos característica que se pliega para producir una estructura tridimensional específica que proporciona a la molécula propiedades únicas y que actúa como catalizador o agente químico para reacciones químicas específicas, convirtiendo un conjunto específico de reactantes (denominados sustratos) en productos específicos.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “péptido”, el término “polipéptido” y el término “proteína” se refieren a una secuencia de aminoácidos primaria que pueden estar unidos por “enlaces peptídicos” covalentes. Generalmente, un péptido consiste en unos cuantos aminoácidos, normalmente desde 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término “polipéptido” engloba péptidos y proteínas. Los péptidos, los polipéptidos o las proteínas pueden ser sintéticos, recombinantes o producirse de manera natural. Un péptido sintético se produce por medios artificiales *in vitro* (por ejemplo, no se producía *in vivo*).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “proteasas” se refiere a cualquiera de diversas enzimas, incluyendo las endopeptidasas y exopeptidasas que catalizan la descomposición hidrolítica de proteínas para dar péptidos o aminoácidos.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “lisis” se refiere a la desintegración o rotura de la membrana de la célula de levadura y la pared celular de levadura dando como resultado la liberación de los componentes intracelulares. Tal como se usa en el presente documento, la “lisis” se produce como resultado de mecanismos físicos/mecánicos (incluyendo autólisis e hidrólisis) u osmóticos (incluyendo “choque con alcohol” e hidrólisis).

Tal como se usa en el presente documento, el término “autólisis” se refiere a la descomposición de una parte o la totalidad de la célula o tejido por enzimas autoproducidas. Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrólisis” se refiere al proceso de dividir un compuesto en fragmentos con la adición de agua (por ejemplo, que se usa para descomponer polímeros en unidades más sencillas (por ejemplo almidón en glucosa)).

45 Tal como se usa en el presente documento, “choque con alcohol” se refiere a un estrés osmótico generado por la adición de un alcohol (por ejemplo etanol) al medio de crecimiento para crear una diferencia entre la presión osmótica del medio y la presión osmótica dentro de las células (por ejemplo, células de levadura) que se hacen crecer en el medio. El choque con alcohol puede conducir a la lisis de las células (por ejemplo, células de levadura) hechas crecer en el medio.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “ósmosis” se refiere a la difusión de un disolvente (por ejemplo, agua) a través de una membrana semipermeable, de una disolución de baja concentración de soluto (alto potencial de agua) a una disolución con alta concentración de soluto (bajo potencial de agua), hacia arriba de un gradiente de concentración de soluto. Es un proceso físico en el que el disolvente se mueve, sin introducción de energía, a través de una membrana semipermeable (permeable al disolvente, pero no al soluto) que separa dos disoluciones de concentraciones diferentes. El movimiento neto de disolvente es desde la disolución menos concentrada (hipotónica) hasta la más concentrada (hipertónica), lo que tiende a reducir la diferencia en las

55

concentraciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “estrés osmótico” y el término “choque osmótico” se refieren a un cambio súbito en la concentración de soluto alrededor de una célula, provocando un rápido cambio en el movimiento de agua a través de su membrana celular. En condiciones de altas concentraciones de o bien sales, sustratos o bien cualquier soluto en el sobrenadante, se extrae agua de las células a través de osmosis. Esto también inhibe el transporte de sustratos y cofactores al interior de la célula provocando por tanto un “choque” de la célula. Alternativamente, a bajas concentraciones de solutos, entra agua en la célula en grandes cantidades, provocando que se hinche y que o bien estalle o bien experimente apoptosis.

Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” se usa en un sentido amplio incluyendo un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse de animales (incluyendo seres humanos) y engloban fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos de la sangre, tales como plasma, suero. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua, cristales y muestras industriales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “complejo” se refiere a una entidad formada por la asociación entre dos o más entidades separadas (por ejemplo, asociación entre dos o más entidades en la que las entidades son iguales o diferentes (por ejemplo, especie química igual o diferente). La asociación puede ser por medio de un enlace covalente o un enlace no covalente (por ejemplo, por medio de fuerzas de van der Waals, electrostáticas, de interacción de carga, de interacción hidrófoba, de interacción de dipolos y/o de enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces uretano, enlaces amida, enlaces éster, y combinación de los mismos)).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona células de levadura novedosas que comprenden a estructura de pared celular que se ha modificado (por ejemplo, se intercala arcilla en la pared celular de levadura), métodos de producción de las mismas, composiciones que comprenden y/o se derivan de las mismas, y métodos de uso de las mismas (por ejemplo, para secuestrar micotoxinas).

La presente divulgación proporciona un extracto de pared celular de levadura (por ejemplo, un extracto de pared celular aislado, purificado, modificado y/o concentrado) que comprende arcilla intercalada en la pared celular (por ejemplo, debido al cultivo de la célula de levadura en presencia de una arcilla). En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada que comprende arcilla intercalada en la pared celular de levadura se mezcla con o se añade de otro modo a productos alimenticios, materia orgánica (por ejemplo, lecho), y/o agua secuestrando así micotoxinas (por ejemplo, mientras se encuentra en el tracto gastrointestinal del animal o durante la filtración), y anulando o reduciendo los efectos negativos de las micotoxinas. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos que mejoran significativamente las propiedades de adsorción/secuestro de material basado en pared celular de levadura frente a micotoxinas (por ejemplo, que adsorben y/o secuestran y/o limitan significativamente la biodisponibilidad de una variedad de micotoxinas (por ejemplo, adsorbidas y/o no secuestradas arcilla sola, extracto de pared celular de levadura solo, una combinación de extracto de pared celular de levadura al que se le añade posteriormente arcilla en una base de combinación en seco; y/o un injerto químico de materiales de polisacárido encima de productos a base de arcilla) en el tracto digestivo de un animal).

La presente divulgación proporciona una preparación novedosa de células de levadura que se hacen crecer en presencia de una o más arcillas. En algunas realizaciones, se extraen paredes celulares de levadura con arcilla intercalada de las células de levadura con arcilla intercalada que se hacen crecer en presencia de una o más arcillas. En algunas realizaciones, el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se purifica y/o concentra. En algunas realizaciones, la fuente de arcilla es una fuente de arcilla de calidad comercial convencional (por ejemplo, seleccionada para mostrar propiedades *in vitro*, *in vivo*, y/o *ex vivo* frente a micotoxinas, o una fuente de arcilla seleccionada porque no muestra propiedades *in vitro*, *in vivo*, y/o *ex vivo* frente a micotoxinas). Pueden usarse composiciones y métodos de la presente invención para adsorber y/o secuestrar micotoxinas en una variedad de sujetos. La presente invención puede beneficiar a todos los animales, sin embargo, los sujetos a modo de ejemplo incluyen seres humanos, especies aviares, bovinas, porcinas, equinas, ovinas, caprinas, caninas, felinas, piscícolas, camélidas, roedores así como sujetos de peces y marisco. En algunas realizaciones, cuando se mezclan con materia orgánica (por ejemplo, incluyendo lecho y productos alimenticios), y/o agua, y/o se alimentan directamente a un sujeto, las composiciones de la presente divulgación disminuyen la adsorción o captación de micotoxinas por el sujeto, aliviando así una reducción del rendimiento, la salud y/o reduciendo la incidencia de enfermedades asociadas con micotoxina y respuestas patológicas en el sujeto.

La presente divulgación proporciona un método para preparar y/o generar células de levadura que comprenden arcilla intercalada en la pared celular de levadura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula de levadura generada y/o cultivada en presencia de una arcilla en la que la pared celular de levadura comprende una razón de glucano:manano que es mayor que (por ejemplo, el 2,5% mayor, el 5% mayor, el 10% mayor, el 15%, el 20% mayor, el 25% mayor, el 30% mayor, el 40% mayor, el 50% mayor o más) la razón de glucano:manano de células de levadura generadas/cultivadas en ausencia de una arcilla (véase, por ejemplo, el ejemplo 2). La presente divulgación proporciona un extracto de pared celular de levadura obtenido (por ejemplo,

aislado, purificado y/o concentrado) a partir de una célula de levadura viable generada y/o cultivada en presencia de una arcilla en la que la pared celular de levadura comprende una razón de glucano:manano que es mayor (por ejemplo, el 2,5% mayor, el 5% mayor, el 10% mayor, el 15%, el 20% mayor, el 25% mayor, el 30% mayor, el 40% mayor, el 50% mayor o más) que la razón de glucano:manano de células de levadura generadas/cultivadas en ausencia de una arcilla (véase, por ejemplo, el ejemplo 2).

Por tanto, la presente divulgación proporciona un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada novedoso a partir de levadura cultivada en presencia de una arcilla, y métodos de generación del mismo. En algunas realizaciones, un método de generación de células de levadura comprende cultivar células de levadura incluyendo especies de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota* en presencia de una o más arcillas con el fin de alterar o modificar de otro modo la pared celular de levadura (por ejemplo, con el fin de potenciar la capacidad de la pared celular de levadura para adsorber y/o secuestrar micotoxinas (por ejemplo, debido a la pared celular de levadura con arcilla intercalada). La presente divulgación proporciona la combinación de uno o más materiales a base de arcilla incluyendo silicatos (por ejemplo, grupo de tectosilicatos (por ejemplo, zeolitas, cuarzo, feldspatos); filosilicatos (por ejemplo, caolinita, halloysita, dickita, nacrita, crisotilo, antigorita, lizardita, talco), pirofilitas, esmectitas (por ejemplo, montmorillonita, beidellita, nontronita; vermiculitas, micasantigorita, moscovita, illita, fengita, biotita); sepiolita, paligorskita, atapulgita), y/o un silicato de aluminio hidratado (por ejemplo, montmorillonitas, bentonita)) con un medio de cultivo de células de levadura (por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos 1, 5 y 6). Las células de levadura viables incorporan la arcilla en la estructura de pared celular de levadura (por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 1A y 1B y la figura 2). En algunas realizaciones, la una o más arcillas combinadas en un medio de cultivo de células de levadura están presentes a una concentración del 0,075%, el 0,1%, el 0,125%, el 0,25%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 12%, el 15% o más del medio de crecimiento total. En algunas realizaciones, la cantidad de una o más arcillas combinadas en un medio de cultivo de células de levadura no supera el 2% del contenido final de un reactor en el que se hacen crecer las células de levadura. En algunas realizaciones, se elige una cantidad de arcilla añadida a medio de cultivo de células de levadura que no conduce al hinchamiento del medio de cultivo de células de levadura (por ejemplo, es del 2,0% o menos). En algunas realizaciones, se elige la cantidad de arcilla añadida a medio de cultivo de células de levadura que produce un extracto de pared celular de levadura recogido de la levadura que comprende una cantidad de arcilla que tiene aprobación reguladora para su uso como aditivo para piensos en piensos para animales no medicados (por ejemplo, no supera el 2% en la ración total). En algunas realizaciones, se añade un agente antiespumante o desespumante de calidad alimenticia al medio de cultivo celular (por ejemplo, incluyendo desespumantes moleculares distintos de silicona, desespumantes a base de aceite (por ejemplo, aceite mineral, aceite vegetal, aceite blanco u otro aceite que es insoluble en el medio de espumación) o desespumantes a base de compuesto de silicona (por ejemplo, suministrados como emulsión a base de aceite o agua)). En algunas realizaciones, se añaden ceras (por ejemplo, etilen-bis-estearamida (EBS), ceras parafínicas, ceras de éster o ceras de alcohol graso) y/o sílice hidrófoba para mejorar la emulsificación y propagación en el medio de espumación.

Experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la invención identificaron varios factores como importantes para el crecimiento de células de levadura en presencia de una o más arcillas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se prefiere mantener la relación (p/v) (por ejemplo, correspondiente a gramos/centímetro cúbico (g/cc)) entre el material de soporte de arcilla y el agua al o por debajo del 3% (por ejemplo, para evitar que se alcance un estado sólido o semisólido (por ejemplo, debido a la adsorción y capacidad de retención de agua del material de arcilla)). Por tanto, la sorción de agua del silicato de aluminio hidratado hinchable en agua es un factor limitante que tiene un impacto sobre la razón de material de soporte de arcilla con respecto a agua en la formulación de un medio de cultivo de la presente invención. En algunas realizaciones, se esterilizan los frascos y medios de cultivo usados, y se realiza la inoculación con microorganismos según procedimientos convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se prepara un inóculo previo con levadura seca activa en un frasco de agua desionizada estéril y se incuba a aproximadamente 25-30°C (por ejemplo, 28°C) durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, 20 min). En algunas realizaciones, la inoculación del inóculo previo se realiza de manera aséptica (por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 30°C). En algunas realizaciones, se monitorizan y mantienen los niveles de pH y glucosa. En algunas realizaciones, se aumenta la agitación del cultivo de manera progresiva (por ejemplo, desde 100 hasta 500 rpm) durante el crecimiento. En algunas realizaciones, se añaden una o más arcillas de manera aséptica al cultivo durante el crecimiento (por ejemplo, cuando se consume menos de la mitad, aproximadamente la mitad, o más de la mitad de los nutrientes del cultivo).

En algunas realizaciones, a medida que aumenta la cantidad de arcilla combinada en el medio de cultivo de células de levadura (por ejemplo, en una cantidad que depende del tipo de arcilla o arcillas usado) las propiedades de hinchamiento del material de arcilla inhiben el crecimiento de células de levadura.

En algunas realizaciones, hacer crecer levadura en medio de cultivo de células de levadura combinado con arcilla proporciona condiciones que provocan estrés a la levadura en crecimiento. Aunque no se necesita entender el mecanismo de acción para poner en práctica la presente invención, en algunas realizaciones, el estrés aplicado a la levadura por el medio de cultivo celular combinado con arcilla provoca que la levadura produzca más glucano, dando como resultado un aumento de las razones de glucano: manano.

La presente divulgación proporciona que células de levadura cultivadas en presencia de una o más arcillas no sólo intercalan con la arcilla en la pared celular de levadura, sino que también presentan una composición de pared

- celular alterada (por ejemplo, caracterizada por alteración de razones de glucano:manano, contenido en proteína total y/o cantidades restantes). Por ejemplo, la presente divulgación proporciona células de levadura que comprenden una razón de glucano:manano que es mayor (por ejemplo, el 2,5% mayor, el 5% mayor, el 10% mayor, el 15%, el 20% mayor, el 25% mayor, el 30% mayor, el 40% mayor, el 50% mayor o más) que la razón de glucano:manano de las células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla (véase, por ejemplo, el ejemplo 2). La presente divulgación también proporciona células de levadura y extractos de pared celular de levadura que comprenden un contenido en proteína total potenciado (por ejemplo, contenido en proteína potenciado al 100%, al 200%, al 300%, al 400%, al 500% o más) en comparación con el contenido en proteína total de células de levadura y/o extractos de pared celular de levadura generados en ausencia de una arcilla (véase, por ejemplo, el ejemplo 2).
- En algunas realizaciones, la presente divulgación invención proporciona extractos de pared celular de levadura que comprenden arcilla intercalada en la pared celular de levadura y que comprenden una razón de glucano:manano alterada de la estructura, que proporciona propiedades de secuestro de micotoxinas superiores a las composiciones convencionales. Puede usarse una variedad de procedimientos para generar extractos de pared celular de levadura incluyendo el uso de perlas de vidrio y una batidora de perlas, tratamiento enzimático (por ejemplo, con proteasa (por ejemplo, papaína)), lisis mecánica, autólisis e hidrólisis, y otros métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Peppier, H. J. 1979. Production of yeasts and yeast products. Página 157 en: Microbial Technology & Microbial Processes, vol. 1 (2ª ed.), Academic Press). Tras la lisis y extracción, se lava la pared celular de levadura con arcilla intercalada/integrada para eliminar componentes intracelulares y para purificar y concentrar el extracto. El extracto resultante puede secarse mediante cualquiera de varios métodos comunes en la técnica incluyendo liofilización y/o secado por pulverización (por ejemplo, para formar un polvo higroscópico insoluble en agua).
- Por consiguiente, la divulgación proporciona, en algunas realizaciones, extracto de pared celular de levadura que comprende arcilla intercalada directamente en la pared celular de levadura. En algunas realizaciones, una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura de la divulgación que comprende arcilla integrada directamente en la pared celular de levadura comprende menos del 0,5% de arcilla, el 0,5-1%, el 1-2%, el 2-5%, el 5-10%, el 10-15%, el 15-20%, el 20-30%, el 30-40%, el 40-50%, el 50-60%, el 60-70%, el 70% o más de arcilla como parte de un extracto de pared celular de levadura (en base de % p/p). En algunas realizaciones, aumentar la cantidad de arcilla en un medio de cultivo aumenta la cantidad de contenido en arcilla de un extracto de pared celular de levadura.
- En algunas realizaciones, la arcilla que se añade a medio de crecimiento de células de levadura que no se incorpora en una célula de levadura se recoge y se usa en un procedimiento posterior de crecimiento de células de levadura (por ejemplo, el material de arcilla no incorporado se recicla). Por ejemplo, el reciclaje de material de arcilla se ve facilitado por las propiedades de sedimentación de la arcilla en comparación con la levadura. De hecho, experimentos realizados durante el desarrollo de realizaciones de la invención han producido dos fases recuperables, (i) una fase inferior que contiene únicamente material de arcilla (al 99%); y (ii) una fase superior que contiene una fracción de arcilla incorporada en levadura. Por tanto, aunque no se necesita un mecanismo para poner en práctica la presente invención, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una inclusión directa de partículas de arcilla en y/o sobre la pared celular de levadura (por ejemplo, que sobrevive a procedimientos de preparación de extracto de pared celular de levadura (por ejemplo, mediante intercalación directa de arcilla en las cadenas poliméricas de glucano de la pared celular de levadura)). En otras realizaciones, una fracción de arcilla atrapa una célula de levadura durante el cultivo y tras la gemación, junto con células hijas, las células de levadura quedan encerradas en una macroestructura que comprende arcilla antes de que la levadura se someta a lisis y se retiren sus componentes intracelulares mediante lavado. En algunas realizaciones, las cadenas de glucano crecen entre la estructura laminar de la arcilla.
- En algunas realizaciones, se combina una célula de levadura o un componente de pared celular de levadura (por ejemplo, un extracto de pared celular de levadura generado y aislado tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende arcilla intercalada en la pared celular de levadura y que comprende una estructura de glucano y/o manano alterada)) con uno o más de otros agentes incluyendo una enzima (por ejemplo, esterase, epoxidasa), una bacteria, una levadura o un componente de levadura, arcilla (por ejemplo, antes del mezclado con piensos, la incorporación en piensos comprimidos y/o la alimentación a animales)).
- En algunas realizaciones, la presente invención usa células de levadura que comprenden una estructura de pared celular de levadura alterada (por ejemplo, arcilla intercalada en las paredes celulares de levadura y paredes celulares que comprenden una estructura de glucano y/o manano alterada), composiciones que comprende las mismas y/o composiciones derivadas de las mismas, que se usan con uno o más métodos y/o materiales descritos en el presente documento para su uso en composiciones y/o métodos para la reducción, retirada y/o eliminación de micotoxinas (por ejemplo, métodos físicos, de mezclado, químicos, microbiológicos descritos en el presente documento (por ejemplo, para adsorber y/o secuestrar micotoxinas)). Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa una célula de levadura o un componente de pared celular de levadura (por ejemplo, un extracto de pared celular de levadura producido tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende arcilla intercalada en la pared celular de levadura y que comprende una estructura de glucano y/o manano alterada)) con uno o más métodos físicos, de mezclado, químicos o microbiológicos descritos en el presente documento para secuestrar micotoxinas.

Pueden usarse composiciones de la presente invención (por ejemplo, extractos de pared celular de levadura con arcilla intercalada) para adsorber y/o secuestrar una variedad de micotoxinas incluyendo acetoxiscirpenodiol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina acetil T-2, extendida a todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, ácido altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonecetrina, caetoglobosina, citrinitina, citreoviridina, cocliodiol, citocalasina E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonecetrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, monoacetato de desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, destruxina B, eniatinas, extendidas a todas las toxinas del cornezuelo del centeno y endofitos, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas B1 y B2 y B3, fusarenona-X, fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, ipomeanina, islanditoxina, lateritina +1, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, extendida a todas las ocratoxinas, oosporeína, ácido oxálico, patulina, ácido penicílico, penitrem, roridina E, rubratoxina, rubroskirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, escirpentriol, eslaframina, esterigmatocistina, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculogeno, viopurpurina, viomeleína, viriditoxina, xantocilina, yavanicina+1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona y subfamilias y/o derivados de las mismas. En algunas realizaciones, se usan composiciones y métodos de la invención para adsorber y/o secuestrar aflatoxinas, zearalenona, ocratoxinas, tricoteceno, fumonisina, patulina y/o endofito relacionado con cornezuelo y posibles conjugados y metabolitos de las micotoxinas mencionadas anteriormente. Experimentos realizados durante el desarrollo de la invención demuestran el/los beneficio(s) de usar la presente invención en comparación con métodos históricos o convencionales. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, un inconveniente de usar una composición que comprende sólo (1) una arcilla, (2) una composición que comprende sólo un extracto de pared celular de levadura, así como (3) una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura al que se le ha añadido una arcilla, es que tales composiciones y métodos de usar las mismas son medios menos eficaces que la presente invención para reducir los efectos negativos de micotoxinas y tienen más inconvenientes. Sin embargo, extractos de pared celular de levadura con arcilla intercalada de la presente invención (por ejemplo, que comprenden arcilla intercalada en la pared celular de levadura, y que comprende una estructura de glucano y/o manano alterada) presentan la inesperada capacidad de secuestrar una variedad de micotoxinas, y también presentan una capacidad sorprendentemente potenciada de adsorber micotoxinas en comparación con composiciones convencionales (por ejemplo, una composición que comprende sólo arcilla(s), una composición que comprende sólo un extracto de pared celular de levadura, así como una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura al que se le ha(n) añadido arcilla(s), véanse los ejemplos 2-3). Por tanto, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos que presentan propiedades de secuestro y/o adsorción inesperadas y superiores con respecto a una variedad de micotoxinas no encontradas en composiciones y métodos convencionales. Por tanto, la presente invención proporciona usos de materiales a base de pared celular de levadura con arcilla intercalada para proporcionar un método eficaz para secuestrar micotoxinas en el tracto digestivo de animales y seres humanos (por ejemplo, mediante adsorción de micotoxinas presentes en productos alimenticios, otra materia orgánica y/o agua) al tiempo que también proporcionan menos o ninguna adsorción de nutrientes beneficiosos y menos o ningún efecto negativo sobre el entorno.

En algunas realizaciones, una forma física preferida de la divulgación es un polvo seco que fluye libremente adecuado para su inclusión directa en productos alimenticios, otra materia orgánica (por ejemplo, lecho) o como suplemento directo para un animal.

Las composiciones de la divulgación pueden añadirse a cualquier materia orgánica (por ejemplo, lecho, producto alimenticio para animales, producto alimenticio para seres humanos) y/o agua (por ejemplo, agua usada para consumo por animales y/o seres humanos, agua del entorno (por ejemplo, estanques, lagos, depósitos, acuarios)) para eliminar micotoxinas de la materia. Cuando se incorpora directamente en productos alimenticios para animales, una composición de la divulgación se añade en cantidades que oscilan entre el 0,0125% y el 0,4% en peso de pienso. Cuando se incorpora en otra materia orgánica (por ejemplo, lecho para animales), una composición de la divulgación se añade en cantidades que oscilan entre el 0,0125% y el 99,9%. Cuando se incorpora en un líquido (por ejemplo, agua (por ejemplo, para filtración)), una composición de la divulgación se añade en cantidades que oscilan entre el 0,0125% y el 100%. En algunas realizaciones, una composición de la divulgación se añade a productos alimenticios en cantidades de desde el 0,025% hasta el 0,2% en peso de producto alimenticio. Alternativamente, las composiciones de la divulgación se alimentan directamente a animales como suplemento (por ejemplo, en una cantidad que oscila entre 2,5 y 20 gramos por animal al día). Un experto habitual en la técnica aprecia fácilmente que la cantidad que va a alimentarse varía dependiendo de la especie del animal, el tamaño, el tipo de producto alimenticio al que se le añade una composición de la invención, el material de lecho, fuente de agua, etc.

Pueden alimentarse composiciones de la divulgación a cualquier animal y a seres humanos. Cuando se mezclan con productos alimenticios o se usan como suplemento de pienso, las composiciones de la divulgación disminuyen la biodisponibilidad de micotoxinas, la absorción o captación de micotoxinas por el animal, mejoran el rendimiento y/o la salud y reducen la incidencia de enfermedad. En algunas realizaciones, cuando se añaden composiciones de la divulgación a material orgánico con el que entran en contacto animales y seres humanos (por ejemplo lecho), las composiciones de la divulgación disminuyen la biodisponibilidad de micotoxinas (por ejemplo, disminuyen la adsorción y/o captación de micotoxinas por el animal) mejorando así el rendimiento y la salud y reduciendo la

incidencia de enfermedad. En algunas realizaciones, se añaden composiciones de la divulgación a agua que está prevista para su uso por animales o seres humanos (por ejemplo, para consumo u otros fines), disminuyendo así la biodisponibilidad de micotoxinas (por ejemplo, disminución de la absorción y/o captación de micotoxinas por un animal o sujeto humano) y mejorando el rendimiento y la salud y reduciendo la incidencia de enfermedad (por ejemplo, las composiciones de la divulgación disminuyen la biodisponibilidad, absorción o captación de micotoxinas). En algunas realizaciones, una composición de la divulgación se añade a agua usada para consumo por seres humanos (por ejemplo, agua usada para la elaboración de zumo, vino, botellas de agua, café, té, leche u otro tipo de líquido consumido). En algunas realizaciones, una composición de la divulgación se añade a agua del entorno (por ejemplo, estanques, lagos, depósitos, ríos, arroyos, canales de irrigación, acuarios usados para alojar peces u otro tipo de especies acuáticas). Por tanto, en algunas realizaciones, una composición de la divulgación (por ejemplo, extracto de pared celular de levadura que comprende arcilla integrada en la pared celular) se usa en la filtración de líquidos (por ejemplo, líquidos consumibles (por ejemplo, agua usada en la producción de bebidas, bebidas)). Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de la divulgación se usa como, o en, un filtro, en el que un líquido (por ejemplo, líquido consumible (por ejemplo, zumo de naranja, zumo de manzana, zumo de ciruela, zumo de pomelo, zumo de arándano, u otro tipo de zumo, cerveza, vino, líquido destilado)) se procesa a través de un filtro que comprende una composición de la divulgación, en el que la composición retira uno o más tipos de micotoxinas del líquido.

Tal como se describe en los ejemplos 1-4, el cultivo de levadura en presencia de arcilla proporciona un drástico aumento en la adsorción de la pared celular de levadura de micotoxinas (por ejemplo, desde el 6,917% cuando la levadura no se cultiva con arcilla, y alcanzando el 73,553% y el 79,337% cuando se incluye el 1,0 y el 2,0% de arcilla, respectivamente, en el medio sin la extracción específica del glucano de la capa interna de pared celular de levadura (véase, por ejemplo, el ejemplo 2)). Además, la razón de glucano:manano aumenta desde 1,066 hasta 1,366 con la adición de arcilla. A pesar de una disminución de manano, la concentración de las proteínas de la pared celular aumentó. Además, la fracción restante (por ejemplo, que representa pérdidas de glucanos, manano, proteínas, arcilla, N-acetilglucosamina y/o quitina presentes en la pared celular de levadura durante el procedimiento de extracción) aumentó en presencia y en el área superficial de la arcilla. Aunque no se necesita un mecanismo para poner en práctica la invención y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, el aumento se debe a la potenciación de la fracción de quitina implicada en mecanismos de compensación de la levadura debido a cambios del entorno y las condiciones de crecimiento. Además, las composiciones de la presente divulgación (que comprenden extracto de pared celular de levadura de células de levadura alteradas (por ejemplo, células de levadura que comprenden arcilla intercalada en las paredes celulares de levadura y paredes celulares que comprenden una estructura de glucano y/o manano alterada)) proporcionaron una capacidad significativa e inesperada de adsorber y/o secuestrar micotoxinas (por ejemplo, zearalenona (por ejemplo, presentando una eficacia del 79,33% en comparación con una eficacia de tan sólo el 44,7% para una composición convencional que comprende una combinación de extracto de pared celular de levadura a la que se le añade una arcilla posteriormente en una base de combinación seca, véanse los ejemplos 1-4)).

Se investigó el uso de un método alternativo para extraer pared celular de levadura con arcilla intercalada de células de levadura con arcilla intercalada usando una fracción de proteasa (véase el ejemplo 3). La extracción específica de la capa interna (glucano) de pared celular de levadura con intercalada arcilla generó un aumento de las propiedades de secuestro y adsorción de la pared celular de levadura con arcilla intercalada para micotoxinas (por ejemplo, zearalenona). Además, cultivar células de levadura en un medio de cultivo celular que comprende arcilla al 1,0% y al 2,0% potenció significativamente la actividad de secuestro y adsorción de la pared celular de levadura con arcilla intercalada con micotoxinas (por ejemplo zearalenona). Por ejemplo, una composición convencional que comprende una combinación de extracto de pared celular de levadura a la que se le añade arcilla posteriormente en una base de combinación seca representó una tasa de eficacia del 44,7% para secuestrar micotoxinas, en comparación con una tasa de eficacia del 85,89% para secuestrar micotoxinas obtenida con una composición de la presente invención y un aumento de la adsorción de aflatoxina B1 de desde el 2,65 hasta el 53,70% (véase, por ejemplo, el ejemplo 3).

La presente divulgación proporciona métodos para producir células de levadura que comprenden una pared celular de levadura con arcilla intercalada. En algunas realizaciones, se producen células de levadura que comprenden una pared celular de levadura con arcilla intercalada a una variedad de escalas (por ejemplo escala de prueba, escala de lote, escala piloto, escala de preproducción, escala de producción, escala de comercial, escala de industrial). En algunas realizaciones, se hace crecer levadura en un fermentador. Un fermentador puede ser de cualquier tamaño adecuado (por ejemplo 5 litros...10 litros... 25 litros... 50 litros... 100...500 litros... 1000 litros...5000 litros...10000 litros...50000 litros...100000 litros...500000 litros...1 millón de litros) para producir la escala deseada de levadura para su uso con la presente invención (por ejemplo escala de prueba, escala piloto, escala industrial). En algunas realizaciones, los medios para hacer crecer levadura pueden ser de cualquier composición adecuada para hacer crecer levadura según la presente invención. Nutrientes adecuados son fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre, potasio y oligoelementos. En algunas realizaciones, se añaden nutrientes al cultivo en concentraciones (% p/p del compuesto fuente) dentro de los intervalos (porcentajes en peso): fuente de carbono al 0,01 - 20% (por ejemplo al 0,05 - 10%), fuente de nitrógeno al 0,001 - 10% (por ejemplo al 0,001 - 3%), fuente de fósforo al 0,001 - 5% (por ejemplo al 0,01 - 0,5%), fuente de magnesio al 0,001 - 0,2% (por ejemplo al 0,001 - 0,2%), fuente de azufre al 0,01 - 0,25% (por ejemplo al 0,01 - 0,25%), fuente de potasio al 0,001 - 05% (por ejemplo al 0,01

- 0,25%), fuente de nitrógeno orgánico al 0,001 - 5% (por ejemplo al 0,01 - 5%), y se añaden oligoelementos en exceso. En algunas realizaciones, los medios de cultivo de levadura comprenden agua, fuente de carbono (por ejemplo azúcar, glucosa, dextrosa, caña de azúcar, melaza), fuente de nitrógeno adecuada (por ejemplo amoníaco, urea), fuente de aminoácidos (por ejemplo peptona), sales (por ejemplo cloruro de sodio, hipoclorito de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, sulfato de zinc, etc.), y fuente de arcilla (por ejemplo zeolita, bentonita, aluminosilicato, montmorillonita, esmectita, caolinita, organoarcilla, mezclas de las mismas). En algunas realizaciones, los componentes de medios de cultivo de levadura pueden estar presentes en cualquier cantidad adecuada para el crecimiento de células de levadura (véase por ejemplo el ejemplo 5). En algunas realizaciones, la presencia de arcilla en medios de cultivo de levadura presenta complicaciones no previstas con respecto a protocolos de crecimiento de levadura convencionales. En algunas realizaciones, la presencia de arcilla en medios de cultivo da como resultado cantidades inusualmente grandes de espumación en el fermentador. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona agentes antiespumantes en el medio de cultivo celular (por ejemplo desespumantes moleculares distintos de silicona, desespumantes a base de aceite (por ejemplo aceite mineral, aceite vegetal, aceite blanco), desespumantes en polvo (por ejemplo sílice), desespumantes a base de agua, desespumantes a base de silicona, copolímeros de polietilenglicol-polipropilenglicol, poli(acrilatos de alquilo)). En algunas realizaciones, se requieren agentes antiespumantes para aumentar la escala de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el uso de un agente antiespumante está asociado con una capacidad potenciada de aumentar a escala la producción de una composición de la divulgación.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Cultivo de levadura. Se usó el siguiente protocolo para cada fermentador Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, Nueva Jersey, EE.UU.) para hacer crecer la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (levadura seca activa (ADY) de Fermin, Alltech Inc., n.º de lote 689, recuento de levadura: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad: 92,6%). Se preparó el inóculo de levadura transfiriendo 28 g de ADY de Fermin reciente a un frasco previamente calentado de 250 ml de agua desionizada estéril. Después, se incubó la disolución a 30°C (en un baño de agua) durante 20 min y se agitó con remolinos varias veces. Los medios de BioFlow estaban compuestos por 66 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 4 g de dextrosa, 4 g de base de nitrógeno de levadura y 1750 ml de agua desionizada. Se produjo un lote de control haciendo crecer levadura sola, lo que requirió 250 ml adicionales de agua desionizada en el volumen de reactor. Se produjeron tres lotes que contenían levadura y bentonita K10 (Fluka) añadiendo 8, 16 y 32 g al reactor. Se calentaron los medios del reactor Bioflow hasta 30°C y se inyectó aire a una velocidad de flujo de 1 l/min durante 10 min antes de la inoculación. Se fijó la agitación a 300 rpm y se monitorizaron los medios y se mantuvieron a un mínimo de pH 5,0 durante todo el crecimiento. Se añadió un agente antiespumante (antiespumante AES, 1:10, según fuera necesario). Después se inyectó fosfato de amonio dibásico (DAP) de manera aséptica (4 g en 10 ml a pH 4,0). Se añadió la levadura previamente resuspendida al fermentador. Se sometió a prueba el nivel de glucosa durante el crecimiento con tiras para diabéticos (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y se añadió glucosa de suplemento cuando el nivel de glucosa disminuyó por debajo de 0,8 mg/ml. Se aumentó progresivamente la agitación hasta 500 rpm a lo largo de 2 h de incubación así como el flujo de aire (hasta 4 l/min a lo largo de 3 h). Cuando se consumió la mitad del sustrato de glucosa de suplemento, se añadió bentonita adicional (8, 16, 32 g en 250 ml de agua desionizada) al reactor para una concentración final del 0,5%; el 1,0% y el 2,0%, respectivamente, de arcilla en los medios finales.

Se recogieron los cultivos de levadura cuando se había usado todo el azúcar. Se recogió el contenido de BioFlow en frascos estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con NaCl al 0,125% en H₂O. Se separó el sedimento en 2 fracciones mediante la formación diferenciada de 2 fases tras la centrifugación: (i) una fase que contenía arcilla y (ii) una fase que contenía levadura y arcilla. Después se lavó la levadura tres veces con disolución de NaCl al 0,125%.

Método de extracción de pared celular de levadura con arcilla intercalada. Se usaron dos métodos separados para el aislamiento de fracciones de pared celular de levadura a partir de levadura producidas tal como se describió anteriormente

En un primer método, se usó un "micro-método" empelando perlas de vidrio y una batidora de miniperlas (Bead-Beater, modelo n.º 1107900, Biospec Products, Inc., Hamilton Beach/Proctor-Silex, Inc., Southern Pines, Carolina del Norte, EE.UU.). Se resuspendió el sedimento con dos volúmenes de Tris-Cl 10 mM, pH 7,4 con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se batió con perlas de vidrio (50:50, suspensión de levadura:perlas) en un volumen total de 5 ml durante 30 s con descanso con un intervalo de 1 min, en todo momento en hielo. Se repitió el batido 10 veces o hasta que se rompió el 95% de las células. Volvieron a recogerse las perlas y se lavaron. Se combinaron las fracciones y se centrifugaron a 4000 g durante 20 min. Después se recogieron los sedimentos, se liofilizaron y se trituraron.

En un segundo método, se resuspendió el sedimento de levadura con agua desionizada estéril hasta una concentración del 13 al 15% de materia seca. Se agitó la suspensión de levadura a 60°C. Se ajustó el pH usando NaOH al 10% hasta 8,0 antes de añadir enzima a 0,3 ml/l. Se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación a lo largo de 8 h. Se monitorizó el pH y se ajustó cada 15 min (usando NaOH al 10%) durante las dos primeras horas, y después se monitorizó el pH y se ajustó cada hora durante las siguientes seis horas. Se transfirió la suspensión a frascos de centrifuga estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con tres volúmenes de agua estéril fría, y después se centrifugó de nuevo a 4000 g durante 20 min. Se repitió la etapa de lavado dos veces antes de congelar, liofilizar y triturar el sedimento.

EJEMPLO 2

- 10 Caracterización de extractos de pared celular de levadura aislados usando perlas de vidrio y una batidora de miniperlas a partir de células de levadura cultivadas en ausencia y presencia de arcilla

Se rompieron células de levadura tras la resuspensión de las células en tampón Tris-HCl, pH 7,4 con PMSF usando un micro-método usando una batidora de perlas y perlas de vidrio tal como se describe (véase el ejemplo 1). Después se analizaron lisados de pared celular de levadura con el fin de caracterizar las paredes celulares de levadura y su capacidad para adsorber micotoxinas (expresada como porcentaje de la eficacia en comparación con las micotoxinas totales presentes) en condiciones de pH fisiológico para cada micotoxina individual considerada. Se evaluó cinéticamente la actividad de adsorción/unión global. Las muestras de prueba comprendían un mínimo de 5 niveles hasta 10 niveles de concentraciones de micotoxinas sometidas a prueba con las diferentes preparaciones de pared celular de levadura usadas a una concentración de entre 0,25 y 4 g/l dispersadas en un medio acuoso con un valor fijado de pH 4 representativo de las condiciones digestivas de pH en el tracto del animal. Se calculó la evaluación de la adsorción usando cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con detectores fluorimétricos y de red de diodos (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina adsorbida/secuestrada).

Se muestran los datos en la figura 3. Los extractos de pared celular de levadura obtenidos de células de levadura cultivadas en presencia de arcilla (células de levadura con arcilla intercalada) presentan una capacidad significativa, inesperada, de secuestrar y adsorber zearalenona (por ejemplo, presentando una eficacia del 79,33% para paredes celulares de levadura extraídas de células de levadura cultivadas en presencia de arcilla al 2% en comparación con una eficacia de tan sólo el 6,91% de paredes celulares de levadura extraídas de células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla). La tasa de eficacia del 79,33% para composiciones de pared celular de levadura extraídas de células de levadura cultivadas en presencia de arcilla al 2% también fue significativamente superior a las tasas de eficacia anteriormente documentadas de tan sólo el 44,7% para una composición convencional que comprendía una combinación de extracto de pared celular de levadura a la que se le añadió posteriormente una arcilla en una base de combinación seca. El nivel de inclusión de los productos secuestrantes para AFB1 y ZEA fue respectivamente del 0,1 y el 0,4% en el medio de reacción que se mantuvo a un pH constante de 4,0. El ensayo se realizó con agitación orbital durante 90 min a 37°C y la cantidad de toxina unida se evaluó usando HPLC equipada con un detector fluorescente.

Adicionalmente, levadura crecida/cultivada en presencia de arcilla presentó una alteración significativa en el componente/la estructura de la pared celular. Por ejemplo, a medida que aumentó la cantidad de arcilla, la razón de manano:glucano aumenta (por ejemplo, a medida que la arcilla aumenta desde nada, el 0,5%, del 1,0% al 2,0%, la razón de manano:glucano aumenta desde 1,01 hasta 1,2, 1,35 y 1,45, respectivamente). La cantidad total de proteína también aumentó con cantidades crecientes de arcilla añadidas al medio de cultivo celular.

EJEMPLO 3

Caracterización de extractos de pared celular de levadura aislados usando corte con proteasa de células de levadura crecidas/cultivadas en ausencia y presencia de arcilla

45 Se trataron células de levadura con una proteasa tal como se describió en el ejemplo 1. Después se analizaron lisados de pared celular de levadura con el fin de caracterizar las paredes celulares de levadura y su capacidad para adsorber micotoxinas (expresada como porcentaje de eficacia en comparación con las micotoxinas totales presentes) en condiciones de pH fisiológico para cada micotoxina individual considerada. Se evaluó cinéticamente la actividad de adsorción global. Las muestras de prueba comprendían un mínimo de 5 niveles hasta 10 niveles de concentraciones de micotoxinas sometidas a prueba con las diferentes preparaciones de pared celular de levadura usadas a una concentración entre 0,25 y 4g/l dispersadas en un medio acuoso con un valor fijo de pH 4 representativo de las condiciones digestivas de pH en el tracto del animal. Se calculó la evaluación de la adsorción usando una cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con detectores fluorimétricos y red de diodos (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina adsorbida/secuestrada).

55 Se muestran los datos en la figura 4. Los extractos de pared celular de levadura con arcilla intercalada obtenidos de células de levadura cultivadas en presencia de arcilla presentaron una capacidad significativa, inesperada, de secuestrar y/o adsorber zearalenona y aflatoxina B1. Por ejemplo, los extractos de pared celular de levadura obtenidos de levadura que se hizo crecer en presencia de arcilla al 2,0% presentaron una eficacia del 85,89% para

zearalenona mientras que los extractos de pared celular de levadura de levadura cultivados en ausencia de arcilla sólo presentaron una tasa de eficacia de adsorción del 69%. Los extractos de pared celular de levadura con arcilla intercalada obtenidos de levadura que se hizo crecer en presencia de arcilla al 2,0% presentaron una eficacia del 53,7% para aflatoxina B1 mientras que los extractos de pared celular de levadura de levadura cultivada en ausencia de arcilla sólo presentaron una tasa de eficacia de adsorción del 2,65%. Adicionalmente, la levadura con arcilla intercalada crecida/cultivada en presencia de arcilla presentó una alteración significativa en el componente/la estructura de la pared celular. El nivel de inclusión de los productos secuestrantes para AFB1 y ZEA fue respectivamente del 0,1 y el 0,4% en el medio de reacción que se mantuvo a un pH constante de 4,0. El ensayo se realizó con agitación orbital durante 90 min a 37°C y la cantidad de toxina unida se evaluó usando HPLC equipada con un detector fluorescente.

Se usó el método del ejemplo 1 con fuentes de levadura alternativas para evaluar la influencia de una arcilla esmectita (American Colloid Company, Arlington Height, IL, EE.UU.) añadida al 1,0% en los medios de crecimiento sobre la composición del material de pared celular de levadura con arcilla intercalada. Se investigaron tres tipos de levadura que pertenecían a *Saccharomyces cerevisiae*, ADY de Fermin (08-032/460-89), una levadura de panadería de Levapan (n.º de lote 7169281, Levapan S.A., Bogotá, Colombia) y una levadura seca activa de DCL (n.º de lote 1390, DCL Yeast Ltd., Alloa, Gran Bretaña).

Se observó variación entre la pared celular de levadura con arcilla intercalada con niveles del 19,9, el 17,0 y el 10,3% de glucano; el 10,6, el 10,4 y el 8,4% de manano; y el 1,5, el 1,4, el 0,9% de quitina (N-acetil-glucosamina) presentes en la pared celular de levadura (y expresados con referencia a las células totales) para ADY de Fermin, Levapan, DCL CIYCW antes de la hidrólisis.

La eficacia de secuestro del material producido también mostró diferencias según el tipo de célula de levadura seleccionado (véase la figura 9). Las variaciones observadas en cuanto a la eficacia también estuvieron relacionadas con el tipo de micotoxina considerada.

EJEMPLO 4

Obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de extractos de pared celular de levadura de células de levadura crecidas/cultivadas en ausencia y presencia de arcilla

Se realizaron experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la invención con el fin de caracterizar y observar varias muestras de levadura (véase, por ejemplo, la figura 2). Se prepararon las muestras mediante la filtración de una disolución rehidratada de levadura en glutaraldehído al 2,5% (GTA) en disolución de NaCl al 0,85%. Después se filtró la disolución a través de un filtro Nucleopore de nailon de 13 mm de diam., 0,1 µm de tamaño de poro previamente humedecido con NaCl al 0,85%. Después se transfirió el filtro a una placa Petri y se cubrió con gotas de agente de fijación GTA/cacodilato (Cac) a temperatura ambiente durante 90 min. Después se aclararon los filtros con NaCac 0,1 M pH 7,2. Se logró la fijación secundaria colocando los filtros en un tubo durante 60 min con 100 µl de tetraóxido de osmio al 2% en NaCac 0,1 M pH 7,2. Después se aclararon las muestras con NaCac 0,1 M pH 7,2 y 3 veces con agua desionizada. Se logró la deshidratación de las muestra mediante series de etanol (del 25% al 100%). Después, se liofilizaron las muestras, se montaron en un soporte preparado con una cinta de carbono con fines de conductividad, y se recubrieron con aleación de Au/P. Se realizaron las observaciones a 3,0 keV con un instrumento S-4300 FESEM (Hitachi, Japón). Para eliminar cualquier interacción no específica entre la levadura y la arcilla, se aplicó una corriente de gas nitrógeno a alta presión sobre cada muestra montada antes de recubrir con Au/P.

EJEMPLO 5

Aumento a escala semiindustrial de la producción de pared celular de levadura cultivada con arcilla

Cultivo de levadura a escala aumentada. Se usó un fermentador de 150 l (ML-4100, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, Nueva Jersey, EE.UU.) para hacer crecer la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (levadura seca activa (ADY) de Fermin, Alltech Inc., n.º de lote 609, recuento de levadura: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad: 92,6%). Se preparó el inóculo de levadura transfiriendo 0,84 kg de ADY de Fermin reciente a una garrafa de 19 l previamente sometida a tratamiento en autoclave (121°C durante 40 min) con tubos, cubierta con BioShield que contenía 7,5 l de agua y que se había mantenido tras el tratamiento en autoclave a 30°C en una incubadora durante la noche. Se prepararon dos garrafas para alimentación de 19 l, cubiertas con BioShield, añadiendo 9 l de agua, 6 kg de dextrosa y una barra de agitación. Tras mezclar y disolver la fuente de carbono, se sometieron a tratamiento en autoclave los medios de alimentación (121°C durante 40 min). Se preparó una disolución de nitrógeno usando un frasco tapado estéril de 1 l que contenía 250 ml de agua desionizada, 120 g de fosfato de diamonio ajustado a pH 4,0-4,1 con HCl concentrado. Se prepararon dos frascos tapados estériles de 1 l de nitrógeno para alimentación añadiendo 700 ml de agua desionizada, 192 g de fosfato de diamonio ajustado a pH 4,0-4,1 con HCl concentrado. Se preparó una disolución de base en una garrafa de 19 l con tubos, cubierta con BioShield y que contenía 13,5 l de agua, 1,5 l de KOH. Después se conectaron los tubos a una bomba peristáltica. Se preparó una disolución de agente antiespumante (antiespumante AES, 1:10) en una garrafa de 19 l con tubos, cubierta con BioShield y que contenía 12 l de agua, 3 l de agente antiespumante (antiespumante AES, 3 kg) y se mezcló. Después se conectaron los tubos

a una bomba peristáltica. Los medios del fermentador de 150 l estaban compuestos por 1,98 kg de ámbar, 0,3 kg de peptona, 0,12 kg de dextrosa, 0,12 kg de base de nitrógeno de levadura, 0,516 g de arcilla esmectita (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, EE.UU.) y 60 l de agua que se llevaron hasta 121°C, 15 psi durante 1 h con agitación. Se enfrió el medio hasta 30°C y se mantuvo esta temperatura a lo largo de toda la propagación.

5 Se realizó la propagación en el fermentador de 150 l mantenido a 30°C con agitación leve (al 70% de polvo) e inyección de aire (a 5 psi) antes de la inoculación y durante toda la fermentación. El inóculo que contenía 0,84 kg de ADY en 7,5 l de agua se agitó durante 20-30 min antes de la inoculación en el fermentador de 150 l. Se añadió un frasco de nitrógeno para alimentación a cada garrafa para alimentación con mezclado. Se bombeó la disolución de nitrógeno en el fermentador de 150 l y se dejó mezclar durante un mínimo de 10 min antes de la inoculación. Se conectó la garrafa de antiespumante y se bombeó agente antiespumante a través de los tubos al fermentador de 10 150 l según fuera necesario. Se ajustó una sonda de espuma dentro del fermentador para monitorizar la espumación y para permitir suplementar correctamente con el agente antiespumante. Se conectó la disolución de base y se bombeó a través de los tubos en el fermentador de 150 l según fuera necesario. Se monitorizó la evolución del pH de los medios del fermentador de 150 l y se mantuvo a un mínimo de pH 5,0 durante todo el crecimiento. Se realizó la inoculación conectando la garrafa de inóculo al orificio y bombeando el contenido al interior del fermentador de 15 150 l. Se realizó el mezclado del inóculo en el fermentador durante 20-30 min antes de la primera toma de muestras. Se monitorizó la espuma a lo largo de toda la propagación, ajustando el aire y aumentando la agitación cada hora. Se monitorizó el pH de manera interna y externa y se ajustó según fuera necesario para mantener un pH de 5,0 o superior. Se sometió a prueba el nivel de glucosa durante el crecimiento con tiras para diabéticos (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y se añadió glucosa de suplemento cuando el nivel de glucosa disminuyó por debajo de 0,8 mg/ml bombeando lentamente en la disolución para alimentación o acelerando gradualmente a lo largo del tiempo. Si el nivel de azúcar aumentó por encima de 0,8 mg/ml, se ralentizó la velocidad de alimentación o se apagó si fue necesario.

20 Se recogieron los cultivos de levadura cuando se había usado todo el azúcar. Se recogió el contenido del fermentador de 150 l en frascos estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y se midió el porcentaje de materia seca de la levadura lavada. Después se transfirió el material de vuelta al fermentador de 150 l y se añadió agua para llevar la suspensión desde el 9-11% hasta una concentración del 13-15% de materia seca. Se mantuvo la agitación en todo momento.

30 Extracción de pared celular de levadura con arcilla intercalada mediante hidrólisis enzimática. Se agitó la suspensión de levadura con el 13-15% de materia seca a 60°C. Se ajustó el pH usando NaOH al 10% hasta 8,0 antes de añadir enzima a 0,3 ml/l. Se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación a lo largo de 8 h. Se monitorizó el pH y se ajustó cada 15 min (usando NaOH al 10%) durante las dos primeras horas, y después se monitorizó el pH y se ajustó cada hora durante las siguientes seis horas. Se transfirió la suspensión a frascos de centrifuga estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con tres volúmenes de agua 35 estéril fría, y después se centrifugó de nuevo a 4000 g durante 20 min. Se repitió la etapa de lavado dos veces antes de congelar, liofilizar y triturar el sedimento. El aumento de la temperatura durante la fase de secado por pulverización dio como resultado un rendimiento ligeramente superior y menos acumulación de producto en la secadora por pulverización.

40 Puede realizarse un seguimiento de la inclusión del material de arcilla mediante el cambio en la concentración en ceniza de la muestra alcanzando valores de aproximadamente el 20% para la pared celular de levadura con arcilla intercalada en comparación con una concentración del 5% en un extracto de pared celular de levadura que no contiene ningún material de arcilla (véase la figura 6). También se encontró una diferencia significativa en cuanto a la composición entre la línea celular de levadura con ADY de Fermin producida anteriormente en los fermentadores Bioflow en comparación con el fermentador de 150 l con una disminución de la composición de glucano y manano 45 en la producción a gran escala pero también un aumento del contenido en quitina de la pared celular de levadura (del 1,5% al 3%), lo que explica las respuestas por parte de la pared celular de levadura al agente de alteración e implica la ruta de señalización de la pared celular.

50 Se evaluaron productos de CIYCW a escala semiindustrial para determinar la eficacia de secuestro de micotoxinas (véase, por ejemplo la figura 7), y los resultados confirman el aumento de las capacidades de adsorción de micotoxinas de CIYCW.

EJEMPLO 6

Producción de pared celular de levadura con arcilla intercalada usando una fuente industrial de azúcar

55 Cultivo de levadura. Se hicieron crecer *Saccharomyces cerevisiae* (levadura seca activa (ADY) de Fermin, Alltech Inc., recuento de levadura: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad: 92,6%) en un fermentador Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, Nueva Jersey, EE.UU.). Se preparó el inóculo de levadura transfiriendo 29 g de ADY de Fermin reciente a un frasco previamente calentado de 87 ml de agua desionizada estéril. Después, se incubó la disolución a 30°C (en un baño de agua) durante 20 min y se agitó con remolinos varias veces. Los medios de BioFlow estaban compuestos por 0,048 g de hipoclorito de calcio, 0,24 g de sulfato de magnesio, 0,168 g de sulfato de zinc, 0,24 g de cloruro de magnesio, 2,4 g de mosto de caña de azúcar (2,5 ml de alimento preparado),

7,5 de arcilla esmectita (al 0,5% en los medios finales, (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, EE.UU.) y 1440 ml de agua desionizada. El mosto de caña de azúcar es una disolución de melaza al 30% de azúcares reductores totales (TRS) diluida con agua. La preparación del mosto se realizó con 669 g de melaza (al 62,8% de TRS) y 731 ml de agua desionizada. Se preparó una fuente de nitrógeno con 54,5 g de urea en 163,5 ml de agua desionizada.

Se calentaron los medios del reactor Bioflow a 30°C y se inyectó aire a una velocidad de flujo de 1 l/min durante 10 min antes de la inoculación. Se fijó la agitación a 300 rpm y se monitorizaron los medios y se mantuvieron a un mínimo de pH 5,0 durante todo el crecimiento usando ácido fosfórico al 85%. Se añadió un agente antiespumante (antiespumante AES, 1:10, según fuera necesario). Se añadió la levadura anteriormente resuspendida al fermentador. Se sometió a prueba el nivel de glucosa durante el crecimiento con tiras para diabéticos (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y se añadió alimento de suplemento (del mosto de caña de azúcar) cuando el nivel de glucosa disminuyó por debajo de 0,8 mg/ml. Se aumentó progresivamente la agitación hasta 500 rpm a lo largo de 2 h de incubación así como el flujo de aire (hasta 4 l/min a lo largo de 3 h). La concentración final de arcilla en el reactor fue del 0,5% en los medios finales.

La cantidad de melaza que debía añadirse al fermentador dependía de la eficacia de la levadura en usar el azúcar y estaba comprendida entre 400 y 600 g. El exceso de alimentación de melaza dio lugar a problemas de producción dando como resultado la incapacidad de generar biomasa de levadura mediante fermentación. Se recogieron los cultivos de levadura cuando no se observó crecimiento adicional. Se recogió el contenido del reactor BioFlow en frascos estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con NaCl al 0,125% en H₂O. No se encontró ninguna fracción separada cuando se usó melaza para realizar la propagación de la levadura. Después se lavaron las levaduras tres veces con disolución de NaCl al 0,125%.

Método de extracción de pared celular de levadura con arcilla intercalada. Se resuspendió el sedimento de levadura con agua desionizada estéril hasta una concentración del 13 al 15% de materia seca. Se agitó la suspensión de levadura a 60°C. Se ajustó el pH usando NaOH al 10% hasta 8,0 antes de añadir enzima a 0,3 ml/l. Se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación a lo largo de 8 h. Se monitorizó el pH y se ajustó cada 15 min (usando NaOH al 10%) durante las dos primeras horas, y después se monitorizó el pH y se ajustó cada hora durante las siguientes seis horas. Se transfirió la suspensión a frascos de centrifuga estériles y se centrifugó a 4000 g durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con tres volúmenes de agua estéril fría, y después se centrifugó de nuevo a 4000 g durante 20 min. Se repitió la etapa de lavado dos veces antes de congelar, liofilizar y triturar el sedimento.

La eficacia de secuestro del material producido también mostró diferencias según la fuente de carbono usada para propagar la levadura (véase la figura 8). Las variaciones observadas en cuanto a la eficacia también estuvieron relacionadas con el tipo de micotoxina considerada. La composición del material también fue diferente de la composición del material anteriormente producido con dextrosa como única fuente de carbono. Se encontraron niveles del 13,4% de glucano; el 17,8% de manano; y el 2,7% de quitina (N-acetil-glucosamina) presentes en la pared celular de levadura (y expresados con referencia a la célula total).

EJEMPLO 7

Eficacia *in vivo* frente a *Fusarium mycotoxicoses*

Se pesaron individualmente pavipollos híbridos de un día de edad (Hybrid Turkeys, Kitchener, ON, Canadá), se marcaron y se distribuyeron aleatoriamente en grupos en la Arkell Poultry Research Station de la Universidad de Guelph. Se asignaron los pollos aleatoriamente a cada una de las 5 dietas. Inicialmente se mantuvieron los pollos a 32°C, y se redujo gradualmente la temperatura en 3°C por semana hasta alcanzar una temperatura de 21°C al final de la semana 4. Se mantuvo esta temperatura durante la duración del experimento. Se alimentó a los pavipollos con dietas de inicio a base de maíz, trigo y harina de soja (0-3 semanas) y de crecimiento (4-6 semanas) formuladas con granos de control, control + pared celular de levadura con arcilla intercalada al 0,2%, granos contaminados y granos contaminados + pared celular de levadura con arcilla intercalada al 0,2%. La dieta de control se formuló para cumplir o superar los requisitos mínimos de nutrientes de pavos según el NRC (1994). Se prepararon dietas contaminadas con micotoxinas sustituyendo el 25 y el 10% y el 26 y el 5% del maíz y el trigo de control por maíz y trigo contaminados, contaminados de manera natural con micotoxinas de *Fusarium* durante las fases de inicio y de crecimiento, respectivamente. Se calcularon los niveles de sustitución de granos de control con los granos contaminados con el fin de lograr una exposición a micotoxinas de aproximadamente 4 mg de DON/kg de dieta durante las fases de inicio y de crecimiento. Se prepararon dietas suplementadas con adsorbente de glucomanano polimérico sustituyendo maíz de control en las dietas con el 0,2% de pared celular de levadura con arcilla intercalada (CIYCW). Se proporcionaron pienso y agua a voluntad. Se tomaron muestras de pienso representativas al comienzo de cada fase para análisis inmediatos y de micotoxinas. Se determinaron los contenidos en la dieta de proteína, materia seca y ceniza según la Association of Official Analytical Chemists (1980). En la tabla 1 se presentan las formulaciones de dietas y los contenidos en nutrientes. Los procedimientos experimentales se aprobaron por el comité para el cuidado de animales de la Universidad de Guelph siguiendo las directrices del Canadian Council on Animal Care.

ES 2 597 505 T3

Tabla 1. Composición de dietas experimentales (%).

Ingredientes	Dieta de inicio (0-3 semanas)			
	Control	Control + CIYCW	Contaminado	Contaminado + CIYCW
Maíz	36,00	35,80	11,02	10,82
Maíz contaminado			24,98	24,98
Trigo	10,00	10,00		
Trigo contaminado	0,00	0,00	10,00	10,00
Harina de soja	45,00	45,00	45,00	45,00
Fosfato de monocalcio	2,30	2,30	2,30	2,30
Carbonato de calcio	1,84	1,84	1,84	1,84
Grasa/sebo	3,00	3,00	3,00	3,00
Sal	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-metionina	0,22	0,22	0,22	0,22
HCl-lisina	0,15	0,15	0,15	0,15
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Compuesto anticoccidiano ²	0,10	0,10	0,10	0,10
CIYCW		0,20		0,20
<u>Valores calculados</u>				
ME, kcal/kg			2800	
Proteína en bruto			26,50	
Lisina			1,60	
Metionina			0,62	
Calcio			1,20	
Fósforo disponible			0,60	
<u>Valores analizados</u>				
Proteína en bruto	26,41	24,97	27,75	26,70
DM	88,70	89,03	88,99	89,14
Ceniza	8,10	6,97	7,12	7,00

Ingredientes	Dieta de crecimiento (4-6 semanas)			
	Control	Control + CIYCW	Contaminado	Contaminado + CIYCW
Maíz	42,68	42,48	16,86	16,66
Maíz contaminado			25,82	25,82
Trigo	5,00	5,00		
Trigo contaminado			5,00	5,00
Harina de soja	42,00	42,00	42,00	42,00
Fosfato de monocalcio	2,20	2,20	2,20	2,20
Carbonato de calcio	1,40	1,40	1,40	1,40
Grasa/sebo	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-metionina	0,16	0,16	0,16	0,16
HCl-lisina	0,06	0,06	0,06	0,06
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Compuesto anticoccidiano ²	0,10	0,10	0,10	0,10
CIYCW		0,20		0,20
<u>Valores calculados</u>				
ME, kcal/kg			3050	
Proteína en bruto			23	
Lisina			1,36	
Metionina			0,5	
Calcio			1,1	
Fósforo disponible			0,52	
<u>Valores analizados</u>				
Proteína en bruto	23,31	24,29	24,27	27,70
DM	89,30	88,99	88,54	88,38
Ceniza	6,33	6,39	6,73	6,75

¹ Mezcla de vitaminas-minerales proporcionada por kilogramo de dieta: vitamina A (todo-trans-palmitato de retinilo, 8.800 UI; colecalciferol, 3.300 UI, vitamina E (todo-rac-acetato de α -tocoferilo), 40 UI; menadiona, 3,3 mg; tiamina,

4,0 mg; riboflavina, 8,0 mg; ácido pantoténico, 15,0 mg; niacina, 50 mg; piridoxina, 3,3 mg; colina, 600 mg; ácido fólico, 1,0 mg; biotina, 220 µg; vitamina B₁₂, 12 µg; etoxiquina, 120 mg; manganeso, 70 mg; zinc, 70 mg; hierro, 60 mg; cobre, 10 mg; yodo, 1,0 mg; selenio, 0,3 mg.

² Monesina sódica, al 10%

5 En la tabla 2 se facilitan las concentraciones en la dieta de DON, 15-acetil-DON, ZEN, fumonisina y ocratoxina A. Otras micotoxinas estaban por debajo de los límites de detección del método que son de 0,12 mg/kg para nivalenol, 0,05 mg/kg para 3-acetil-DON, 0,07 mg/kg para neosolaniol, 0,06 para diacetoxiscirpenol y toxina T-2 y 0,04 mg/kg para toxina HT-2, y 0,001 mg/kg para aflatoxinas. Los límites de detección para DON, 15-acetil-DON, ZEN, fumonisina y ocratoxina A fueron de 0,06, 0,05, 0,025, 0,05 y 0,0003 mg/kg, respectivamente.

10 Tabla 2. Concentraciones de micotoxinas (µg/g) en dietas experimentales.

Dieta	Micotoxina ¹				
	Desoxinivalenol	15-acetil-desoxinivalenol	Zearalenona	Fumonisina	Ocratoxina A
Inicio (0-3 semanas)					
Control	0,44	0,055	<0,025	BDL ²	0,46
Control + CIYCW	0,53	0,087	<0,025	BDL	0,79
Contaminada	3,3	0,17	0,35	56	BDL
Contaminada + CIYCW	4,1	0,17	0,47	BDL	BDL
Crecimiento (4-6 semanas)					
Control	0,44	0,12	BDL	BDL	0,62
Control + CIYCW	0,37	0,12	BDL	BDL	0,71
Contaminada	3,7	0,29	0,34	61	1,0
Contaminada + CIYCW	3,2	0,28	0,27	63	0,35

¹ También se midieron otras micotoxinas, incluyendo diacetoxiscirpenol, toxina T-2, nivalenol, 3-acetil-DON, neosolaniol, toxina HT-2 y aflatoxinas en las dietas experimentales, pero no se detectaron.

² Por debajo del límite de detección

15 La alimentación de granos contaminados no afectó significativamente al aumento de peso corporal, consumo de pienso y eficacia de uso de pienso al final de la fase de inicio (tabla 3). La alimentación de dieta contaminada aumentó significativamente el aumento de peso corporal y mejoró la eficacia del pienso en comparación con el control al final de la fase de crecimiento. No hubo ningún efecto de la dieta sobre la captación de pienso durante la fase de crecimiento (tabla 3). Al final de la fase de crecimiento, el suplemento de pared celular de levadura con arcilla intercalada a las dietas contaminadas aumentó el aumento de peso corporal, el consumo de pienso y mejoró la eficacia de uso de pienso en comparación con el control. El aumento de peso corporal y la eficacia del pienso a lo largo del periodo experimental de 6 semanas fueron significativamente superiores en las aves a las que se les alimentaron dietas contaminadas y dietas contaminadas suplementadas con pared celular de levadura con arcilla intercalada.

20 Tabla 3. Efecto de micotoxinas de *Fusarium* sobre el rendimiento de pavos¹

Dieta	0-3 semanas	4-6 semanas	0-6 semanas
Aumento de peso corporal (g/ave)			
Cont. ²	474,50	1420,81	1895,32
Cont. + CIYCW ³	591,45	1461,74	1963,19
MICO ⁴	511,93	1572,97	2084,90
MICO + CIYCW	502,00	1627,63	2129,64
EEM	15,35	29,48	37,59
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS ⁵	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	0,0023	0,002
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,0002	0,0004
MICO frente a MICO + CIYCW	NS	NS	NS
Ingesta de pienso (g/ave/día)			
Cont.	32,44	117,85	75,14
Cont. + CIYCW	33,54	116,87	75,20

MICO	33,75	119,86	76,81
MICO + CIYCW	33,87	124,4	79,13
EEM	0,91	2,21	1,40
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,05	NS
MICO frente a MICO + CIYCW	NS	NS	NS
Eficacia del pienso (aumento de peso corporal/ingesta de pienso)			
Cont.	0,69	0,57	0,60
Cont. + CIYCW	0,71	0,59	0,62
MICO	0,71	0,61	0,63
MICO + CIYCW	0,71	0,62	0,64
EEM	0,01	0,008	0,008
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	0,0027	0,004
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,0007	0,001
MICO frente a MICO + CIYCW	NS	NS	NS

¹ Los valores son las medias de mínimos cuadrados; n = 4 jaulas para aumento de peso corporal, ingesta de pienso y eficacia del pienso (7-8 aves/jaula/fase).

² Control

³ Nuevo adsorbente de micotoxinas de glucomanano polimérico

5 ⁴ Dieta contaminada

⁵ Antiguo adsorbente de micotoxinas de glucomanano polimérico ⁶ P > 0,05

10 La alimentación de granos contaminados aumentó (P<0,05) los recuentos de eosinófilos a la semana 6 (tabla 4). El suplemento de las dietas contaminadas con pared celular de levadura con arcilla intercalada previno esto. El suplemento de pared celular de levadura con arcilla intercalada en la dieta de control aumentó significativamente el hematocrito en comparación con el control sin suplemento. Hubo una reducción significativa en la concentración de glucosa y las actividades de γ -glutamilo transferasa en las aves a las que se les alimentó dieta contaminada en la semana 3 en comparación con el control (tabla 5). El suplemento de pared celular de levadura con arcilla intercalada previno esto. El suplemento de pared celular de levadura con arcilla intercalada en las dietas contaminadas aumentó significativamente las concentraciones de ácido úrico en comparación con el control en las semanas 3 y 6. Hubo una
15 disminución significativa en la actividad de lactato deshidrogenasa en la semana 3 en las aves a las que se les alimentó la dieta contaminada + pared celular de levadura con arcilla intercalada en comparación con el control.

Tabla 4. Efecto de micotoxinas de *Fusarium* en la dieta sobre la hematología¹

Dieta	3 semanas	6 semanas
Hemoglobina (g/l)		
Cont. ²	93,50	105,88
Cont. + CIYCW ³	98,12	107,88
MICO ⁴	93,50	109,75
MICO + CIYCW	95,87	106,38
EEM	2,27	180
Cont. frente a Cont. + nuevo GMA	NS ⁵	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + nuevo GMA	NS	NS
Cont. frente a MICO + antiguo GMA	NS	NS
Hematocrito (l/l)		
Cont.	0,30	0,31
Cont. + nuevo GMA	0,32	0,31
MICO	0,30	0,32
MICO + nuevo GMA	0,30	0,32
MICO + antiguo GMA	0,31	0,31

ES 2 597 505 T3

EEM	0,005	0,007
Cont. frente a Cont. + nuevo GMA	0,05	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + nuevo GMA	NS	NS
		MCHC (g/l)
Cont.	302,80	335,38
Cont. + nuevo GMA	300,88	345,25
MICO	303,13	336,13
MICO + nuevo GMA	310,88	331,63
MICO + antiguo GMA	301,00	335,63
EEM	5,44	5,52
Cont. frente a Cont. + nuevo GMA	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + nuevo GMA	NS	NS
Cont. frente a MICO + antiguo GMA	NS	NS
		WBC ($10^9/l$)
Cont.	15,37	16,75
Cont. + CIYCW	18,71	16,75
MICO	17,96	16,07
MICO + CIYCW	18,93	19,96
EEM	1,93	2,26
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Heterófilos ($10^9/l$)
Cont.	6,20	9,37
Cont. + CIYCW	8,36	9,19
MICO	7,98	8,71
MICO + CIYCW	7,86	10,36
EEM	0,93	1,26
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Linfocitos ($10^9/l$)
Cont.	7,37	5,54
Cont. + CIYCW	8,00	5,61
MICO	8,60	5,48
MICO + CIYCW	8,92	8,54
EEM	1,22	1,29
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Monocitos ($10^9/l$)
Cont.	0,71	0,52
Cont. + CIYCW	1,30	0,65
MICO	0,56	0,75
MICO + CIYCW	0,93	0,25
EEM	0,29	0,22
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Eosinófilos ($10^9/l$)
Cont.	0,27	0,15
Cont. + CIYCW	0,38	0,34
MICO	0,34	0,38

ES 2 597 505 T3

MICO + CIYCW	0,33	0,06
EEM	0,11	0,079
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	0,04
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Basófilos (10 ⁹ /l)
Cont.	0,79	0,61
Cont. + CIYCW	0,65	0,89
MICO	0,47	0,74
MICO + CIYCW	0,87	0,71
EEM	0,19	0,18
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS

¹ Los valores son las medias de mínimos cuadrados; para cada dieta y fase n = 4 jaulas y 2 aves por jaula,

² Control ³ Pared celular de levadura con arcilla intercalada, ⁴ Dieta contaminada, ⁵ P > 0,05

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de *Fusarium* en la dieta sobre la bioquímica plasmática¹

Dieta	3 semanas	6 semanas
		Calcio (mmol/l)
Cont. ²	3,05	2,94
Cont. + CIYCW ³	(ilegible)	(ilegible)
MICO ⁴	3,05	3,03
MICO + CIYCW	3,13	3,14
EEM	0,04	0,04
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS ⁵	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,002
		Fósforo (mmol/l)
Cont.	2,57	2,46
Cont. + CIYCW	2,59	2,44
MICO	2,67	2,47
MICO + CIYCW	2,64	2,64
EEM	0,08	0,06
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,05
		Proteína total (g/l)
Cont.	29,12	31,25
Cont. + CIYCW	30,12	31,12
MICO	29,62	32,62
MICO + CIYCW	29,75	34,25
EEM	0,52	0,68
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,003
		Albúmina (g/l)
Cont.	8,37	8,37
Cont. + CIYCW	(ilegible)	(ilegible)
MICO	8,25	8,50
MICO + CIYCW	8,75	9,00
EEM	0,29	0,25
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS

ES 2 597 505 T3

Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Globulina (g/l)
Cont.	20,75	22,87
Cont. + CIYCW	22,00	22,50
MICO	21,37	24,12
MICO + CIYCW	21,00	25,25
EEM	0,55	0,57
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,006
		Razón de albúmina:globulina
Cont.	0,40	0,36
Cont. + CIYCW	0,37	0,38
MICO	0,38	0,35
MICO + CIYCW	0,42	0,35
EEM	0,01	0,01
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Glucosa (mmol/l)
Cont.	18,35	17,85
Cont. + CIYCW	18,33	(ilegible)
MICO	17,31	(ilegible)
MICO + CIYCW	17,63	17,23
EEM	0,37	0,34
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	0,05	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Colesterol (mmol/l)
Cont.	4,12	4,17
Cont. + CIYCW	3,99	4,23
MICO	4,10	4,04
MICO + CIYCW	40,3	3,73
EEM	0,12	0,13
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,02
		Bilirrubina total (umol/l)
Cont.	5,37	2,37
Cont. + CIYCW	5,87	2,37
MICO	4,87	2,12
MICO + CIYCW	5,12	2,62
EEM	0,70	0,38
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
		Amilasa (U/l)
Cont.	1,75	1,75
Cont. + CIYCW	2,00	1,50
MICO	0,75	1,87
MICO + CIYCW	0,87	1,00
Cont.	(ilegible)	(ilegible)
EEM	0,33	0,18

ES 2 597 505 T3

Cont. frente a cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	0,04	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	0,008
Aspartato aminotransferasa (U/l)		
Cont.	211,38	212,63
Cont. + CIYCW	226,25	207,75
MICO	226,75	211,63
MICO + CIYCW	205,00	203,75
EEM	8,15	6,42
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
Creatina cinasa (U/l)		
Cont.	1352,63	1047,13
Cont. + CIYCW	1309,38	907,63
MICO	1649,25	953,38
MICO + CIYCW	1147,00	1086,63
EEM	173,46	145,41
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
Lactato deshidrogenasa (U/l)		
Cont. + CIYCW	821,63	764,88
MICO	872,50	913,25
MICO + CIYCW	(ilegible)	(ilegible)
(ilegible)	(ilegible)	(ilegible)
(ilegible)	(ilegible)	(ilegible)
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
Lipasa (U/l)		
Cont.	5,37	2,87
Cont. + CIYCW	4,37	4,50
MICO	4,75	3,62
MICO + CIYCW	5,87	4,25
EEM	0,94	0,72
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS
Ácido úrico (U/l)		
Cont.	247,75	167,13
Cont. + CIYCW	221,50	144,38
MICO	292,50	164,75
MICO + CIYCW	334,50	279,00
EEM	28,23	24,77
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	0,03	0,003
<hr/>		
MICO	646,63	469,25
MICO + CIYCW	566,13	497,63
EEM	30,24	20,84
Cont. frente a Cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	0,04
Cont. frente a MICO + CIYCW	0,02	NS

	Glutamato deshidrogenasa (U/l)	
Cont.	4,62	2,87
Cont. + CIYCW	3,25	2,62
MICO	4,25	2,37
MICO + CIYCW	3,50	2,50
EEM	0,70	0,36
Cont. frente a cont. + CIYCW	NS	NS
Cont. frente a MICO	NS	NS
Cont. frente a MICO + CIYCW	NS	NS

¹ Los valores son las medias de mínimos cuadrados; para cada dieta y fase n = 4 jaulas y 2 aves por jaula,

² Control, ³ Pared celular de levadura con arcilla intercalada, ⁴ Dieta contaminada, ⁵ P > 0,05

5 La alimentación de granos contaminados disminuyó significativamente las actividades de lactato deshidrogenasa en la semana 6 en comparación con el control (tabla 5). El suplemento de pared celular de levadura con arcilla intercalada previno esto. Hubo un aumento significativo en las concentraciones de calcio y fósforo en las aves a las que se les alimentó dieta contaminada y con pared celular de levadura con arcilla intercalada en comparación con el control en la semana 6. La misma dieta en la semana 6 también disminuyó significativamente las actividades de γ -glutamilo transferasa en comparación con el control. Se observó un aumento significativo en las concentraciones de proteína total y globulina, y una disminución en los niveles de colesterol en las aves a las que se les alimentó dieta contaminada cuando se suplementó con pared celular de levadura con arcilla intercalada.

15 La alimentación de granos contaminados de manera natural con micotoxinas de *Fusarium* a pavos dio como resultado una respuesta hormética con respecto al aumento de peso corporal y la eficacia del pienso. Las micotoxinas de *Fusarium* portadas en el pienso dieron como resultado algunos efectos sobre parámetros sanguíneos en comparación con los controles incluyendo aumento de recuentos de eosinófilos y disminución de actividades de lactato deshidrogenasa en la semana 6 y disminución de las concentraciones de glucosa y la actividad de gamma-glutamilo transferasa en la semana 3. La alimentación de pared celular de levadura con arcilla intercalada previno todos estos efectos. La alimentación de pared celular de levadura con arcilla intercalada dio como resultado aumentos numéricos (P>0,05) en el crecimiento en comparación con la alimentación de granos contaminados sin suplemento.

20

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada, en la que el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se deriva de una célula de levadura cultivada en medio de crecimiento que comprende arcilla, para su uso en la disminución de la absorción y/o captación de uno o más tipos de micotoxinas por un sujeto a través del tracto digestivo e impidiendo de ese modo enfermedades asociadas a micotoxinas y respuestas patológicas asociadas a micotoxinas en el sujeto.
2. Uso de una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada, en el que el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se deriva de una célula de levadura cultivada en medio de crecimiento que comprende arcilla, en una materia orgánica, producto alimenticio o agua para eliminar o secuestrar uno o más tipos de micotoxinas.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o uso según la reivindicación 2, en donde la arcilla se selecciona de una arcilla mineral, arcilla sintética que pertenece al grupo de silicatos, una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita, una esmectita, una caolinita, una organoarcilla o una mezcla de las mismas.
4. Composición para su uso según las reivindicaciones 1 ó 3 o uso según las reivindicaciones 2 y 3, en donde el extracto de pared celular de levadura es de una levadura del género *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulasporea* o una combinación de las mismas.
5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 4 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el uno o más tipos de micotoxinas se seleccionan del grupo que consiste en aflatoxinas, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxinas, y combinaciones de las mismas.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 5 o uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada se prepara cultivando células de levadura en un medio de cultivo celular que comprende arcilla, en donde la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,125% hasta el 4,0%, incubando la levadura en condiciones para permitir el crecimiento de la levadura y la incorporación de arcilla en las paredes celulares de levadura durante el crecimiento, lisando las células de levadura con arcilla intercalada y separando las paredes celulares de levadura con arcilla intercalada de componentes intracelulares solubles de la célula de levadura.
7. Composición para su uso según la reivindicación 6, o uso según la reivindicación 6, en donde la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de desde el 0,5% hasta el 2,0%.
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 7 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde dicha composición es para su consumo por un miembro del reino Animalia.
9. Composición para su uso según la reivindicación 8 o uso según la reivindicación 8 que contiene del 0,0125% al 99,0% en peso, del 0,0125% al 10% en peso, o del 0,0125% al 4,0% en peso de dicha composición que comprende un extracto de pared celular de levadura con arcilla intercalada.
10. Uso de la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 en un producto alimenticio formulado para eliminar o secuestrar uno o más tipos de micotoxinas.
11. Uso de la composición según la reivindicación 10, en el que el producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en una ración total mezclada (TMR), un forraje, un gránulo, un concentrado, una premezcla, un coproducto, grano, grano de destilería, melazas, fibra, alimento para animales, pasto, heno, semilla, hojas, harina, compuestos solubles y un complemento.
12. Célula de levadura que comprende una pared celular de levadura que comprende arcilla intercalada en dicha pared celular de levadura para su uso en la disminución de la absorción y/o captación de uno o más tipos de micotoxinas por un sujeto a través del tracto digestivo e impidiendo de ese modo enfermedades asociadas a micotoxinas y respuestas patológicas asociadas a micotoxinas en el sujeto.
13. Uso de una célula de levadura que comprende una pared celular de levadura que comprende arcilla intercalada en dicha pared celular de levadura en un producto alimenticio para eliminar o secuestrar uno o más tipos de micotoxinas.
14. Célula de levadura para su uso según la reivindicación 12 o uso según la reivindicación 13, en donde la célula de levadura se cultiva en un medio de cultivo celular que comprende arcilla.
15. Célula de levadura para su uso según las reivindicaciones 12 ó 14 o uso según las reivindicaciones 13 y 14, en donde la arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicatos.

16. Célula de levadura para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 14 a 15 o uso según las reivindicaciones 13 a 15, en donde dicha célula de levadura es para su consumo por un miembro del reino Animalia.

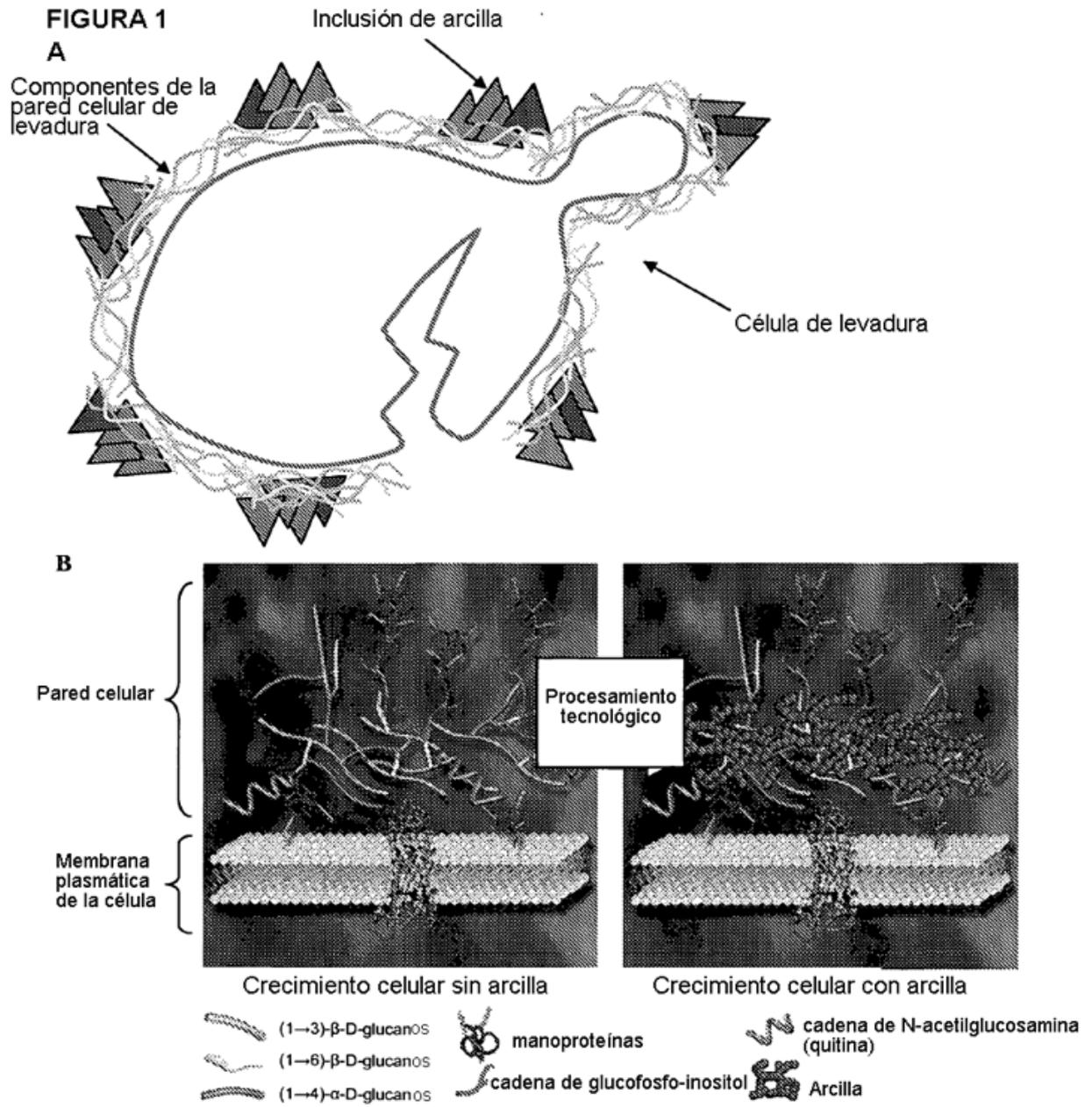


FIGURA 2

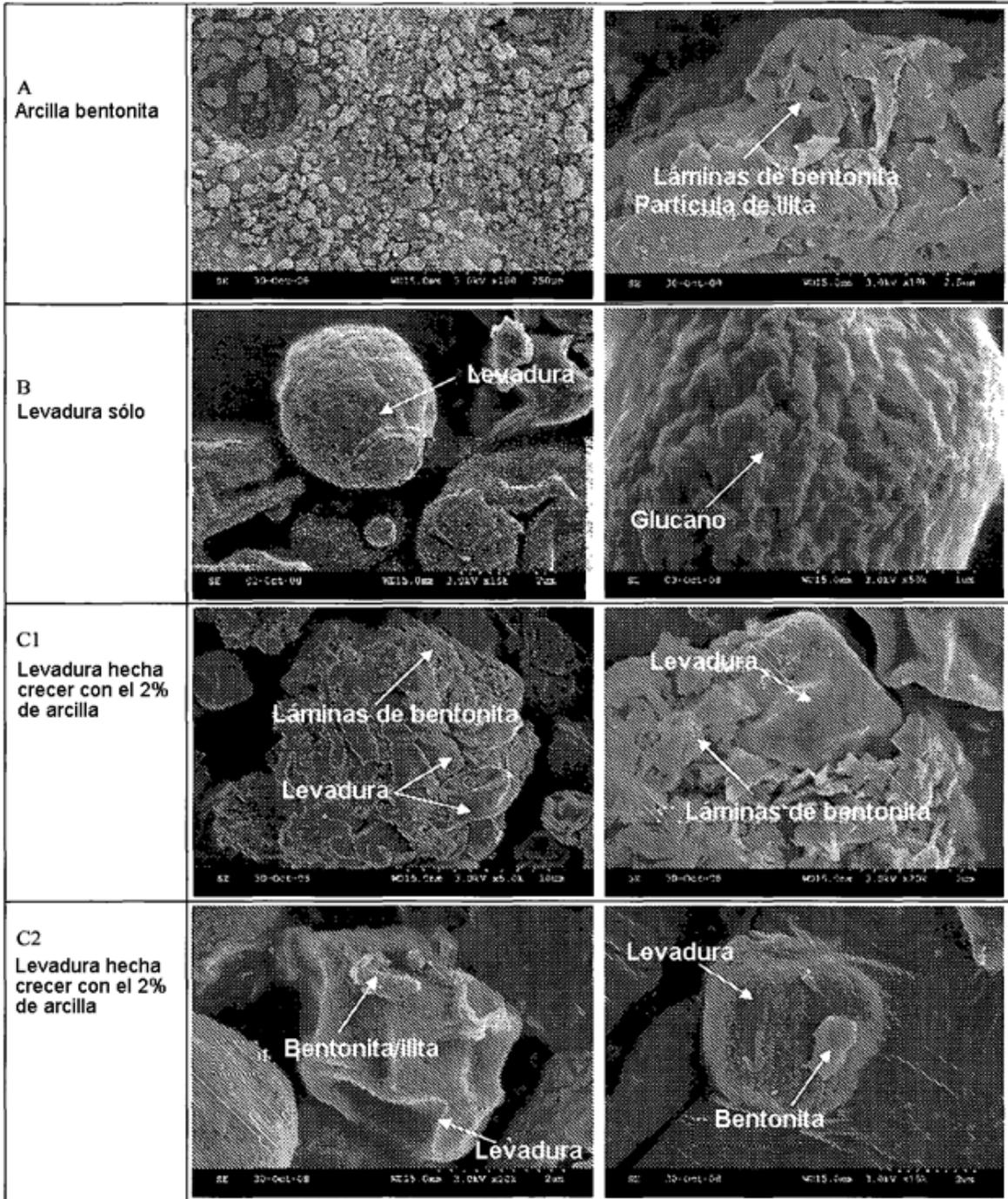


FIGURA 3

Muestra	Glucano (%)	Manano (%)	Razón G/M	Proteína (%)	Remanente (%)	Adsorción de ZEARALENONA (%)
YCW sólo	45,52 ± 0,54	41,29 ± 0,62	1,01	12,38	0,81	6,91 ± 2,19
YCW + 0,5%	42,68 ± 0,49	35,70 ± 0,20	1,20	14,34	7,28	45,64 ± 5,30
YCW + 1,0%	42,69 ± 0,39	31,67 ± 0,37	1,35	15,83	9,81	73,55 ± 2,98
YCW + 2,0%	38,24 ± 0,28	26,34 ± 0,17	1,45	19,89	15,53	79,33 ± 2,24

FIGURA 4

Muestra	Glucano (%)	Manano (%)	Razón G/M	Adsorción de ZEARALENONA (%)	Adsorción de AFLATOXINA B1 (%)	Contenido en ceniza (%)
YCW sólo	32,457 ± 0,19	25,92 ± 0,28	1,25	69,34 ± 0,58	2,65 ± 0,55	2,76
YCW + 1,0%	39,93 ± 0,26	22,29 ± 0,23	1,79	80,33 ± 0,28	40,73 ± 3,30	7,58
YCW + 2,0%	36,14 ± 0,20	20,97 ± 0,12	1,72	85,89 ± 1,02	53,70 ± 1,97	10,33

FIGURA 5

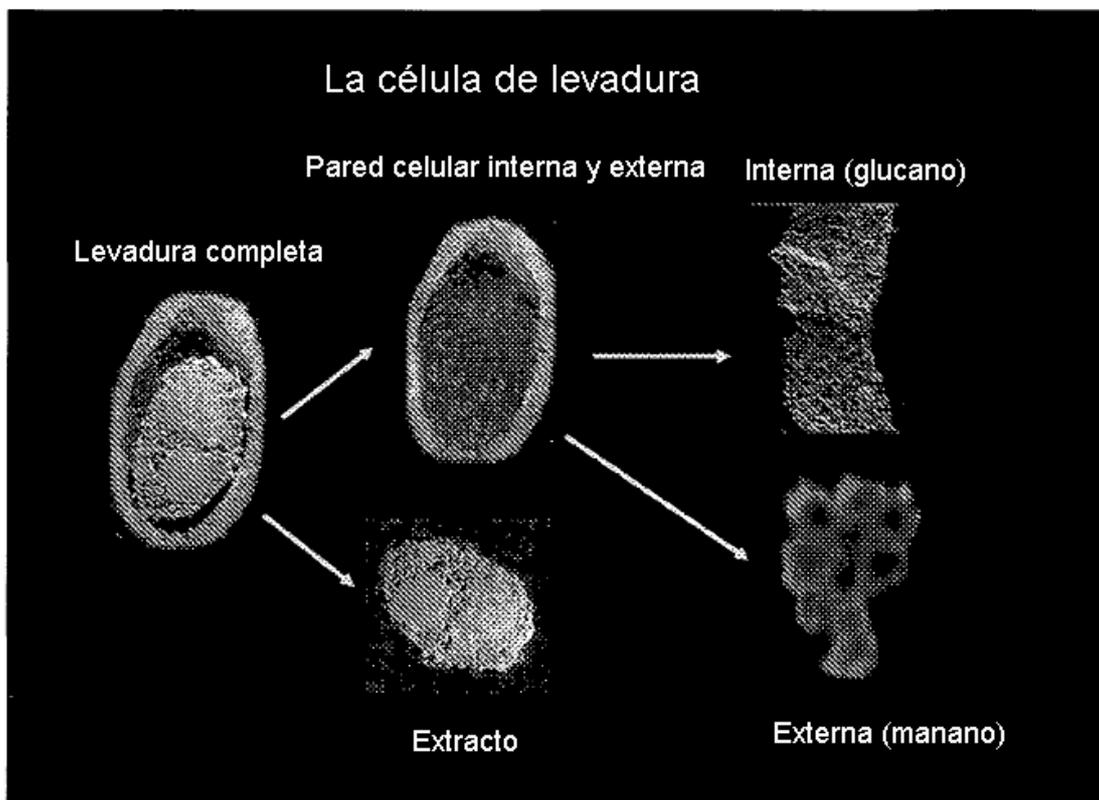


FIGURA 6

Exp./lote n.º	08-036	09-002
ID de material	CIYCW secada por pulverización con el 0,5% de esmectita	CIYCW secada por pulverización con el 0,5% de esmectita
% de ceniza	21,59	20,26%
% de C	37,82	37,43
% de H	5,3	5,1745
% de N	3,75	5,15
% de proteína	23,46	32,14
Recuento en placa total (ufc/g)	9,35 × 10 ⁴	-
	1,79 (5hrs)	0,14 (0hr)
	4,07 (9hrs)	0,60 (3hrs)
% de alcohol	4,72 (11hrs)	1,64 (6hrs)
	-	2,90 (9hrs)
	-	4,82
% de glucosa	27,5	28,2
% de manosa	19,4	16,1

FIGURA 7

Levadura	Arcilla (el 1%, esmectita)	Hidrólisis enzimática	Adsorción (%)	
			AFB1	ZEA
ADY (YCW sólo)	-	+	6,9 ± 4,5	39,3 ± 2,4
ADY (#08-036)	+	+	85,3 ± 5,3	57,9 ± 1,1
(#09-002)			99,8 ± 0,02	55,1 ± 1,1

FIGURA 8

Levadura	Arcilla (el 0,5%, esmectita)	Hidrólisis enzimática	Adsorción (%)	
			AFB1	ZEA
ADY	+	+	75,4 ± 13,2	69,2 ± 1,2

FIGURA 9

Levadura	Arcilla (el 1%, MBB02)	Hidrólisis enzimática	Adsorción (%)	
			AFB1	ZEA
Levapan	+	+	93.8 ± 6.9	56.7 ± 0.7
Levapan	-	-	6.7 ± 2.7	40.3 ± 0.7
DCL	+	+	89.3 ± 4.5	51.3 ± 1.6
DCL	-	-	4.7 ± 5.4	48.6 ± 1.4
ADY	+	+	91.6 ± 5.0	68.7 ± 0.4
ADY	-	+	6.1 ± 2.8	58.7 ± 0.9
ADY	-	-	5.8 ± 3.7	39.5 ± 0.9