



No. 11-098739- -00002-0000

Fecha: 2011-11-11 17:03:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 124

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE

☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación de una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: ALLTECH, INC.

Dirección: 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356 , US.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número Cual

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDONEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 5

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: Alvaro.Correa@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 79.143.366 TP 20.281

④

Numero de expediente

11 098.739

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada

De conformidad con el artículo 34 de la Decisión 486, me permito presentar un nuevo texto en el cual se efectuaron

modificaciones a las tablas 1 a 5, dichas modificaciones no representan ampliación de la solicitud originalmente presentada.

⑥

Comprobante de Pago No. 11-0098144

Fecha 05-10-2011

⑦

Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa.

☐ Poderes, si fuere el caso.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA

C.C. 79.143.366

T.P. 20.281

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

2000-F03

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0098144

Bogotá D.C., Octubre 05 de 2011 - 17:08:26

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	412134424	04/10/2011	79.821.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00

SON: ~~**CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**~~

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739- -00002-0000

Fecha: 2011-11-11 17:03:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 124

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 5 de 2011 - 17:08:48

**COMPOSICIONES DE LEVADURA ENTRELAZADAS CON ARCILLA Y
MÉTODOS DE UTILIZARLAS**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la
5 Solicitud Provisional de U.S. 61/144.620 presentada el 14
de enero de 2009, incorporada en la presente por
referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a composiciones que
comprenden células de levadura y/o componentes de la
célula de levadura y métodos para producirlos y
utilizarlos. En particular, la invención proporciona
nuevas levaduras que comprenden la estructura de la pared
15 alterada (por ejemplo, integrada con arcilla y/o
componente de arcilla (por ejemplo, entrelazada) en las
paredes celulares y/o las paredes celulares que
comprenden una relación de glucano:manano alterado),
métodos de producir los mismos, composiciones que
20 comprenden y/o derivan de los mismos, y métodos de uso de
los mismos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber
bacterias y toxinas). Las composiciones y métodos de la
invención se usan en una variedad de aplicaciones que
incluyen dietaria (por ejemplo, mezcla con productos
25 alimenticios para animales o alimentación de otra manera
a los animales), terapéutica, profiláctica (por ejemplo,
mezclar con materiales de relleno y/u otros materiales
que se ponen en contacto con los animales, uso durante el
procesamiento de alimentos y bebidas, y uso durante la
30 filtración de líquidos), así como en aplicaciones de
investigación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los hongos son ubicuos en el mundo, y poco visibles ya que ellos comúnmente son microscópicamente pequeños. Las micotoxinas son metabolitos secundarios secretados por los hongos. Las micotoxinas son compuestos tóxicos y/o carcinogénicos producidos por varias especies fúngicas que crecen en diversas materias primas agrícolas. Los ejemplos de micotoxinas, incluyen pero sin limitación aflatoxinas, fumonisinas, ochratoxina A, deoxinivalenol (también conocida como "DON" o "vomitoxina"), patulina, y zearalenona. Las micotoxinas a menudo se producen en los granos de cereales así como antes, durante y después de la recolección de forrajes. Algunas micotoxinas son letales, algunas causan enfermedades identificables o problemas de salud, algunas debilitan el sistema inmune sin producir síntomas específicos para la micotoxina, algunas actúan como alérgenos o irritantes, y algunas tienen efecto desconocido sobre animales o seres humanos. El mayor impacto económico de la contaminación con micotoxina se siente en los cultivos y productores de la industria avícola, así como en los productores de alimentos y alimentos para animales. Las micotoxinas pueden aparecer en la cadena alimenticia como resultado de la infección fúngica de productos vegetales, y también pueden ser ingeridos directamente por los seres humanos o introducidos por contaminación de los productos alimenticios para animales del ganado. Las micotoxinas contaminan los materiales orgánicos (por ejemplo, rellenos) así como agua, y resisten mucho a la descomposición durante la digestión de modo que permanecen en la cadena alimenticia en productos comestibles (por ejemplo, carne, huevos y productos

5 lácteos). Ninguna región del mundo escapa de la micotoxinas y su impacto negativo en la salud animal y humana. La evolución del comercio global de productos alimenticios para animales aumenta las oportunidades de que las mezclas de granos produzcan combinaciones de micotoxinas en una dieta determinada y que micotoxinas inusuales e insospechadas se presenten en una región determinada independientemente de su condición climática.

10 Las estrategias usadas para evitar la aparición de micotoxinas involucra controlar elementos que permiten la producción de micotoxinas, controlar el crecimiento de los hongos, así como practicar control de calidad de los alimentos para consumo humano y animal por medio de una metodología adecuada de muestreo, detección y
15 cuantificación. Sin embargo, la contaminación con micotoxinas es inevitable.

A fin de reducir los efectos negativos de las micotoxinas, históricamente han añadido materiales inorgánicos tales como arcillas, bentonitas, y
20 aluminosilicatos, conocidos por sus propiedades adsorbtivas, a los productos alimenticios para animales. Los aditivos de productos alimenticios para animales, en grandes cantidades, secuestran algunas micotoxinas en el tracto gastrointestinal del animal y minimizan sus
25 efectos tóxicos. Sin embargo, los aditivos impiden la absorción de muchos nutrientes beneficiosos que son importantes para los animales tales como vitaminas, minerales, y aminoácidos, de este modo disminuye la densidad de nutrientes de la dieta. Además, los aditivos
30 de productos alimenticios para animales, en particular en las heces animales, tienen un impacto ambiental extremadamente perjudicial.

Los agentes químicos tales como ácidos, bases (por ejemplo, amoníaco, soda cáustica), oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ozono), agentes reductores (por ejemplo, bisulfitos), agentes clorados y formaldehídos, se han usado para degradar las micotoxinas en los alimentos contaminados, en particular las aflatoxinas (Ver, por ejemplo, Hagler 1991; Phillips et al 1994; Lemke et al 2001). Sin embargo, estas técnicas no son eficientes, son costosas, generan una cantidad significativa de residuos químicos, y a menudo son generalmente inseguras.

Ciertas cepas de bacterias ácido lácticas, propionibacterias y bifidobacterias tienen estructuras de pared celular que se unen a las micotoxinas (Ver, 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 ineficientes.

20

SÍNTESIS DE LA INVENCION

En algunas formas de realización, la presente invención provee una célula de levadura que comprende una pared de célula de levadura que comprende arcilla o un componente de arcilla entrelazado en una pared de célula de levadura. En algunas formas de realización, la célula de levadura se cultiva en un medio de cultivo celular que comprende arcilla. En algunas formas de realización, la arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicato. En algunas formas de realización, la arcilla está seleccionada de una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita,

30

una esmectita, una caolinita, una organoarcilla y mezclas de ellos. En algunas formas de realización, la arcilla es una arcilla de aluminosilicato. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,125% a aproximadamente el 4,0%. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es del 0,125% al 4,0%. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,0%. En algunas formas de realización, la levadura está seleccionada de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluiveromyces*, *Torulaspora* y sus combinaciones. En algunas formas de realización, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

En algunas formas de realización, la presente invención provee composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla. En algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se deriva de una célula de levadura cultivada en medio de cultivo que comprende una arcilla. En algunas formas de realización, se utilizar perlas de vidrio y una batidora de perlas para preparar el extracto de pared de célula de levadura. En algunas formas de realización, se utiliza un tratamiento enzimático para preparar el extracto de pared de célula de levadura. En algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade a un alimento. En algunas formas de realización, el forraje

está seleccionado de una ración mezcla total (Total Mixed Ration, TMR), un forraje, un pellet, un concentrado, una premezcla, un coproducto, grano, grano de destilación, melazas, fibras, pienso, pasto, heno, grano, hojas,

5 comida, solubles y un suplemento. En algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade a material orgánico. En algunas formas de realización, la

10 arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade al agua. En algunas formas de realización, un líquido se filtra a través de la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla. En algunas

15 formas de realización, el líquido es un jugo, agua, cerveza o vino. En algunas formas de realización, la composición se formula para alimentar a cualquier miembro del reino animal. En algunas formas de realización, el miembro del reino animal está seleccionado de especies de aves, bovinos, porcinos, equinos, ovinos y caprinos,

20 peces, mariscos, camélidos, felinos, caninos y roedores. En algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla secuestra una o varias micotoxinas. En algunas formas de realización, la micotoxina está seleccionada de

25 Aflatoxinas, Zearalenona, Trichotecenos, Fumonisinás y Ochratoxinas. En algunas formas de realización, la micotoxina está seleccionada de acetoxiscirpenodiol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina de acetilo T-2, extendida a

30 todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, ácido altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamide, butenolide, calonectrina,

chaetoglobosina, citrinina, citreoviridina, cochliodinol, citochalasina E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, monoacetato de desoxinivalenol, 5 diacetoxiscirpenol, destruxina B, enniatinas, extendida a todas las toxinas ergot y endofitos, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas B1 y B2 y B3, Fusarenona-X, Fusarochromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, ipomeanina, islanditoxina, 10 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, 15 rubroskirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, scirpentriol, slaframina, stericoncentrated modified yeast cell wall extracttocistin, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendida a todos los tricotecenos, 20 tricoxidermina, tricotecina, tricoverrinas, tricoverroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculógeno, viopurpurina, viomelleína, viriditoxina, xantocilina, iavanicina + 1 y zearalenoles y zearalenona.

En algunas formas de realización, la presente 25 invención provee una composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla, en donde la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una cantidad 30 efectiva para secuestrar micotoxinas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una cantidad de aproximadamente

el 0,0125% a aproximadamente el 10% en peso de un producto alimenticio. En algunas formas de realización, la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una
5 cantidad de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 4,0% en peso de un producto alimenticio. La presente invención no está limitada al tipo de producto alimenticio.

En algunas formas de realización, la presente
10 invención provee un método para reducir la biodisponibilidad de las micotoxinas en un animal o humano que comprende: (a) proveer: (i.) una composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla y (ii) un
15 material consumido por animal o humano; (b) incorporar la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla en el material para producir una arcilla o material incorporado en el extracto de la pared celular de levadura enlazado con
20 componente de arcilla; y (c) dejar que el animal o humano consuma la arcilla o el material incorporado en el extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla. En algunas formas de realización, el material es un producto alimenticio. En algunas formas
25 de realización, aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 0,4% en peso de la composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade a un forraje. En algunas formas de realización, el material es
30 un relleno. En algunas formas de realización, aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 99,0% de la composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de

arcilla se añade en peso al relleno. En algunas formas de realización, el material es un líquido. En algunas formas de realización, aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 99,0% de la composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade en peso al líquido. En algunas formas de realización, el animal está seleccionado de una especie de aves, bovinos, porcinos, equinos, ovinos y caprinos, peces, mariscos, camélidos, felinos, caninos y roedores. En algunas formas de realización, la composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla secuestra uno o varios tipos de micotoxinas. En algunas formas de realización, las micotoxinas son Aflatoxinas, Zearalenona, Trichotecenos, Fumonisinias, Ochratoxinas o sus combinaciones. En algunas formas de realización, la presente invención también provee incorporar un agente adicional en la arcilla o material incorporado en el extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla, en donde el agente está seleccionado de una esterasa, epoxidasa, levadura y/o cepa bacteriana.

En algunas formas de realización, la presente invención provee un método de producción de una cantidad en escala comercial de arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla que comprende: (a) proveer: (i) cultivo inicial de levadura y (ii) medio de cultivo de células de levadura, en donde el medio de cultivo de la célula de levadura comprende los nutrientes requeridos para el crecimiento de levadura y una arcilla o componente de arcilla; (b) introducir el cultivo inicial de levadura en el medio de cultivo de la célula de levadura; (c) incubar la levadura

en un fermentador de escala industrial en condiciones configuradas para permitir el crecimiento de levadura, en donde la levadura incorpora la arcilla o el componente de arcilla en la pared celular de la levadura durante el crecimiento; (d) añadir agente antiespumante al fermentador; (e) lisar la arcilla o paredes celulares de levadura entrelazadas con el componente de arcilla; y (f) separar la arcilla o las paredes celulares de levadura entrelazadas con el componente de arcilla de los demás componentes de la levadura. En algunas formas de realización, la levadura está seleccionada de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluiveromyces*, *Torulaspora* o sus combinaciones. En algunas formas de realización, la arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicato. En algunas formas de realización, la arcilla es una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita, una esmectita, una caolinita, una organoarcilla o mezclas de ellos. En algunas formas de realización, la arcilla es una arcilla de aluminosilicato. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 0,125% a aproximadamente el 4,0%. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente 0,5% a aproximadamente el 2,0%. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular varía del 0,125% al 4,0%. En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular va del 0,5% al 2,0%. En algunas formas de realización, el fermentador de escala industrial está entre mil y cinco millones de litros. En algunas formas de realización, el agente antiespumante se añade para aliviar los efectos de la arcilla sobre el proceso de

incubación. En algunas formas de realización, el agente antiespumante es un antiespumante molecular no siliconado, antiespumante a base de aceite, antiespumante en polvo, antiespumante en base acuosa, antiespumante a base de silicona, antiespumante a base de polietilenglicol, antiespumante a base de polipropilenglicol o poliacrilatos de alquilo. En algunas formas de realización, el agente antiespumante es un antiespumante molecular no siliconado. En algunas formas de realización, el lisado comprende perlas de vidrio, un homogeneizador y/o tratamiento enzimático.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra A) una representación de una célula de levadura con arcilla y/o componentes de arcilla entrelazados en la pared celular de la levadura, y B) una descripción comparativa de (a) la pared celular de la levadura de una célula de levadura cultivada en ausencia de arcilla y (b) la pared celular de la levadura de una célula de levadura que crece/cultiva en presencia de arcilla.

La Figura 2 muestra una micrografía electrónica de barrido (A) una arcilla bentonita (Fluka); (B) células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla y un primer plano de la porción de glucano de la pared celular de la levadura; (C1) célula de levaduras cultivadas en presencia de 2% de arcilla bentonita con detalle de una formación del conglomerado de varias células de levadura en la estructura laminar de bentonita; (C2) células de levadura cultivadas en presencia de 2% de arcilla bentonita con detalle de una inclusión de la arcilla

directamente en la estructura de la pared celular de la levadura.

La Figura 3 proporciona características de los extractos de pared celular de la levadura preparados mediante microesferas de vidrio y un homogenizador celular tipo Minibead Beater de las células de levaduras: cultivadas en ausencia de arcilla (solo pared celular de la levadura "YCW"), células de levaduras cultivadas en presencia de 0,5% de arcilla (YCW + 5%), célula de levaduras cultivadas en presencia de 1% de arcilla (YCW + 1,0%), y célula de levaduras cultivadas en presencia de 2,0% de arcilla. Adicionalmente, los porcentajes de adsorción de la micotoxina zearalanona para cada una de las muestras.

La Figura 4 proporciona características de los extractos de pared celular de la levadura preparados utilizando corte de proteasa de las células de levaduras cultivadas en ausencia de arcilla (YCW sola), célula de levaduras cultivadas en presencia de 1% de arcilla (YCW + 1,0%), y células de levaduras cultivadas en presencia de 2,0% de arcilla.

La Figura 5 ilustra la anatomía de una célula de levadura.

La Figura 6 muestra la composición de dos lotes de CIYCW producido en una escala semiindustrial.

La Figura 7 muestra resultados de la eficacia de secuestro obtenidos en el proceso en escala semiindustrial de la pared celular de la levadura, con y sin arcilla de esmectita y que no ha sido extraída con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos secuestrantes para AFB1 y ZEA fueron respectivamente 0,1 y 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.

La Figura 8 muestra los resultados de la eficacia de secuestro obtenidos con la producción de pared celular de la levadura con arcilla de esmectita y que ha sido extraída con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos secuestrantes para AFB1 y ZEA fueron respectivamente 0,1 y 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.

La Figura 9 muestra los resultados de adsorción obtenidos con las diferentes paredes celulares de la levadura que provienen de tres cepas cultivadas con o sin arcilla MBB02 y que ha sido extraída o no con hidrólisis enzimática. El nivel de inclusión de los productos secuestrantes para AFB1 y ZEA fueron respectivamente 0,1 y 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.

25

DEFINICIONES

Como se usa en la presente, los términos "levadura" y "células de levadura" se refieren a microorganismos eucarióticos clasificados en el reino de los Hongos, que tienen pared celular, membrana celular y componentes intracelulares. Las levaduras no forman un grupo taxonómico o filogenético específico. En la actualidad se conocen aproximadamente 1.500 especies; se estima que

solo se ha descripto el 1% de las especies de levaduras. El término "levadura" a menudo se toma como sinónimo para *S. cerevisiae*, pero la diversidad filogenética de las levaduras se muestra por su ubicación en albas divisiones de Ascomycota y Basidiomycota. Las levaduras de gemación ("levaduras verdaderas") se clasifican en el orden Saccharomycetales. La mayor parte de las especies de levadura se reproducen asexualmente por gemación, aunque algunas se rededucen por fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, si bien algunas especies son multicelulares a través de la formación de una cadena de células en gemación conectadas conocidas como *pseudohifas*, o *hifas falsas*. El tamaño de la levadura puede variar mucho de acuerdo con la especie, normalmente miden de 3-4 μm de diámetro, aunque algunas levaduras pueden alcanzar más de 40 μm .

Como se usa en la presente, el término "pared celular de la levadura" también denominado como "YCW" se refiere a la pared celular de un organismo de levadura que rodea la membrana plásmica y los componentes intracelulares de la levadura. La pared celular de la levadura incluye la capa externa (principalmente manano) y la capa interna (principalmente glucano y quitina) de la pared celular de la levadura. Una función de la pared celular es proporcionar estructura y proteger el interior de la levadura (si centro de actividad metabólica). Las vías de señalización y reconocimiento tienen lugar en la pared celular de la levadura. La composición de la pared celular de la levadura varía de cepa a cepa y de acuerdo con las condiciones de cultivo de la levadura.

Como se usa en la presente, el término "extracto de la pared celular de la levadura" se refiere a la pared celular de la levadura de la levadura que ha sido rota o

"lisada" (por ejemplo, durante una etapa de ruptura o lisado) y separada de los componentes intracelulares solubles de la célula de levadura.

El término "aislado" cuando se usa en relación con una pared celular de la levadura, como en "una pared celular de la levadura aislada" o "pared celular de la levadura aislada integrada con arcilla" o "pared celular de la levadura aislada que comprende la estructura de glucano:manano alterada" se refiere a una pared celular de la levadura o componente de esta que se identifica y separa de al menos de un componente con el que se asocia comúnmente en su fuente natural. En consecuencia, una pared celular de la levadura aislada es la que esta presente en una forma o configuración que es diferente de la que se halla en la naturaleza (por ejemplo, que está separada de los componentes intracelulares de la levadura). En contraste, pared celular de la levadura no aislada es una pared celular de la levadura o componente de esta que se halla en el estado en que existe en la naturaleza. En algunas formas de realización, la pared celular de la levadura aislada se usa para describir el extracto de la pared celular de la levadura.

Como se usa en la presente, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la extracción de los componentes de una muestra. Por ejemplo, las paredes celulares de la levadura o extractos de la pared celular de la levadura se purifican por la extracción de los componentes que no son la pared celular de la levadura (por ejemplo, membrana plásmica y/o componentes intracelulares de la levadura); también se purificar por la eliminación de contaminantes u otros agentes que no son pared celular de la levadura. La extracción de los componentes que no son la pared celular de la levadura

y/o contaminantes no pared celular de la levadura produce un aumento del por ciento de pared celular de la levadura o sus componentes en una muestra. En otro ejemplo, las paredes celular de la levadura que comprenden arcilla o componentes de arcilla integrados/entrelazados en la pared celular de la levadura se purifican por la extracción de los componentes que no son la pared celular de la levadura (por ejemplo, membrana plásmica y/o componentes intracelulares de la levadura), de este modo el por ciento de pared celular de la levadura que comprende arcilla o componentes de arcilla integrados/entrelazados en la pared celular de la levadura está aumentado en una.

Como se usa en la presente, la expresión "extracto de la pared celular de la levadura concentrado" se refiere al extracto de la pared celular de la levadura que se concentra por medio de uno o más procedimientos (por ejemplo, por secado (por ejemplo, durante una etapa de secado y concentración)). En otro ejemplo, un extracto de la pared celular de la levadura concentrado es una preparación de pared celular de la levadura o preparación de extracto de la pared celular de la levadura que se purifica por la extracción de los componentes que no son la pared celular de la levadura.

Como se usa en la presente, el términos "levadura modificada" y "levadura alterada" se refieren a la levadura cultivada de una manera que se 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 la levadura (por ejemplo, una pared celular de la levadura que comprende la relación de glucano:manano alterada y/o arcilla/componente de arcilla integrado/entrelazado en la

pared celular de la levadura que funciona de modo diferente de una pared celular de la levadura sin la relación de glucano:manano alterada y/o no arcilla o componente no arcilla integrado/entrelazado en la pared celular de la levadura).

Como se usa en la presente, el término "pared celular de la levadura modificada" se refiere a la pared celular de la levadura de la levadura modificada o alterada.

Como se usa en la presente, el término "extracto de la pared celular de la levadura modificada" se refiere al extracto de la pared celular de la levadura de levadura modificada o alterada.

Como se usa en la presente, el término "extracto de la pared celular concentrado de la levadura modificada" como se usa en la presente se refiere al extracto de la pared celular de la levadura concentrado derivado de una levadura modificada o alterada, por ejemplo, en la patente US N.º 6.045.834.

Como se usa en la presente, las expresiones "levadura entrelazada con arcilla", "levadura integrada con arcilla", "levadura entrelazada con los componentes de arcilla", levadura integrada con los componentes de arcilla" se refieren a levaduras crecidas o cultivadas en presencia de arcilla o componentes de arcilla que han incorporado o entrelazado arcilla o componentes de arcilla en la pared celular de la levadura. La levadura entrelazada con arcilla o componentes de arcilla es un tipo específico de levadura modificada.

Como se usa en la presente, el término "entrelazado" como en "extracto de la pared celular de la levadura entrelazada con arcilla", extracto de la pared celular de la levadura entrelazada con componentes de arcilla", o

similares se refiere a la integración de arcilla o componente de arcilla en la pared celular de la levadura. Si bien no es necesario un mecanismo para practicar la invención y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción, en algunas formas de realización, el entrelazado de arcilla o componente de arcilla en la pared celular de la levadura ocurre durante el crecimiento de la levadura (por ejemplo, después de su ciclo reproductivo asexual (gemación) (por ejemplo, a medida que la célula hija crece y se forma su red de la pared celular de la levadura, la arcilla o componente de arcilla se integra en la célula de levadura)). En un ejemplo, la elongación de las cadenas de glucano y/o quitina proporcionan los sitios de integración involucrados en la integración de la arcilla o componente de arcilla durante la gemación, lo que genera que la célula hija comprenda arcilla o componente de arcilla integrado en su pared celular. En otro ejemplo, la estructura macromolecular de la arcilla atrapa las células de levadura en su red laminar, donde la célula de levadura procede a través de gemación, integrando adicionalmente arcilla o componente de arcilla en la pared celular de la levadura. La pared celular de la levadura integrada/entrelazado con arcilla y/o componente de arcilla(s) permanece integrada/entrelazada en la pared celular de la levadura después de la extracción de la pared celular.

Como se usan en la presente, los términos "pared celular de la levadura entrelazada con arcilla", "pared celular de la levadura integrada con componentes de arcilla", "pared celular de la levadura integrada con componentes de arcilla" y "pared celular de la levadura integrada con arcilla" se refieren a la pared celular de

la levadura de levaduras crecidas o cultivadas en presencia de arcilla que ha incorporado o entrelazado arcilla o componentes de arcilla en la pared celular de la levadura.

5 Como se usa en la presente, el términos "extracto de la pared celular de la levadura entrelazada con arcilla", "extracto de la pared celular de la levadura entrelazada con componentes de arcilla", "extracto de pared celular de la levadura integrada con arcilla", y "extracto de
10 pared celular de la levadura integrada con componentes de arcilla" se refieren al extracto de la pared celular de la levadura de levadura (por ejemplo, donde la levadura de la cual se obtiene el extracto de pared celular crece o se cultiva en presencia de arcilla) que la incorporado
15 o entrelazado arcilla o componentes de arcilla en la pared celular de la levadura.

 Como se usa en la presente, el términos "extracto de pared celular concentrado de la levadura entrelazada" y "extracto de pared celular concentrado de la levadura
20 integrada" se refiere al extracto de la pared celular de la levadura concentrado de la levadura crece o se cultiva en presencia de arcilla que ha incorporado o entrelazado o arcilla o componentes de arcilla en la pared celular de la levadura.

25 Como se usa en la presente, el término "in vivo" se refiere a estudios y/o experimentos realizados en un organismo vivo, que ocurre en un organismo biológico.

 Como se usa en la presente, la expresión "in vitro" se refiere a un ambiente artificial fuera del organismo
30 vivo y a los procesos o reacciones biológicas que pueden ocurrir normalmente en un organismo pero se hacen producir en un ambiente artificial. Los ambientes in

vitro pueden comprender, pero sin limitación, tubos de ensayo y cultivos celulares.

Como se usa en la presente, la expresión "cromatografía líquida de alto rendimiento" y el término "HPLC" se refieren a una forma de cromatografía líquida para separar compuestos. Los compuestos se disuelven en solución. Los compuestos se separan por la inyección de un tapón de la misma mezcla en la columna. Los instrumentos de HPLC comprenden un reservorio de la fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. La presencia de analitos en el efluente de la columna se registra por detección cuantitativa de un cambio en el índice de refracción, absorción UV-VIS en una longitud de onda establecida, fluorescencia después de la excitación con una longitud de onda adecuada, o respuesta electroquímica.

Como se usa en la presente, la expresión "microscopía electrónica de barrido" y el término "SEM" se refiere a un tipo de microscopio electrónico que visualiza la superficie de la muestra por barrido con un haz electrónico de alta energía en un patrón de barrido de exploración. Los electrones interactúan con los átomos que constituyen la muestra produciendo señales que contienen información acerca de la topografía de la superficie, composición y otras propiedades de la muestra tales como conductividad eléctrica.

Como se usa en la presente, la expresión "agente de fijación" se refiere al agente químico que es capaz de fijar una sustancia u otra para "fijar", estabilizar o conservar de otro modo la sustancia en su forma actual para impedir que la sustancia se degrade o modifique de otro modo. A menudo, los agentes de fijación se usan en la microscopía electrónica de barrido (SEM) para preparar

la muestra. Agente de fijación primaria: como se usan en la presente, los términos "agente de fijación primaria" se refieren al primer agente de fijación usado para "fijar" una sustancia. Agente de fijación secundario: 5 como se usan en la presente, los términos "agente de fijación secundario" se refieren al segundo agente de fijación usado para "fijar" una sustancia. Agente de fijación terciario: como se usan en la presente, los términos "agente de fijación terciaria" se refieren a 10 tercer agente de fijación usado para "fijar" una sustancia.

Como se usa en la presente, el término "analito" se refiere a un átomo, una molécula, un grupo de átomos y/o moléculas, una sustancia, o constituyente químico. Un 15 analito, en y de sí mismos no se puede medir, más bien se pueden determinar los aspectos o propiedades (físicas, químicas, biológicas, etc.) del analito usando un procedimiento analítico, tal como HPLC. Por ejemplo, no se puede medir una "silla" (componente-analito) en y por 20 sí misma, pero se puede medir la altura, ancho, etc. de una silla. Asimismo, no se puede medir una micotoxina pero se puede medir la fluorescencia de la micotoxina que se relaciona con su concentración.

Como se usa en la presente, el término "señal" se 25 usa generalmente en referencia a cualquier proceso detectable que indica que una reacción ha ocurrido (por ejemplo, la unión del anticuerpo al antígeno). Las señales se pueden evaluar en forma cualitativa así como cuantitativa. Los ejemplos de tipos de "señales" 30 incluyen, pero sin limitación, señales radiactivas, señales fluorimétricas o señales colorimétricas de producto/reactivo.

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

Como se usa en la presente, el término "absorber" se refiere a los procesos por los cuales un material "toma" o "succiona" otra sustancia. Por ejemplo, "absorción" puede referirse a procesos de absorción o asimilación de
15 sustancias en las células o a través de los tejidos y órganos mediante difusión u ósmosis (por ejemplo, absorción de nutrientes por el sistema digestivo o absorción de fármacos en el torrente sanguíneo).

Como se usa en la presente, el término "adsorción" se refiere a un proceso que ocurre cuando un material es secuestrado por, y/o se acumula en la superficie de, un sólido o un líquido (secuestrante y/o adsorbente) (por
20 ejemplo, de este modo se forma una película de moléculas o átomos (el adsorbato)).

Como se usa en la presente, el término "secuestrar" y/o el término "secuestro" se refieren la asociación física (por ejemplo, por medio de acoplamiento o revestimiento) de dos o más entidades que se ponen
25 contacto entre sí (por ejemplo, de esta manera forman un complejo estable). Los ejemplos de formas de asociaciones incluyen, pero sin limitación, enlace hidrógeno, coordinación, y formación de pares iónicos. Las interacciones secuestrantes pueden involucrar una
30

cantidad variable de interacciones químicas (por ejemplo, enlaces químicos) que dependen de la estereoquímica y geometría de cada entidad (por ejemplo, que también definen la especificidad del secuestro). Cuando dos o más
5 entidades se secuestran, estas se pueden secuestrar por medio de enlaces químicos, pero también pueden asociarse por medio de cargas u otro tipo de interacciones.

Como se usa en la presente, los términos "agente de secuestro" y/o "agente secuestrante", se refieren a una
10 entidad que es capaz de inducir o involucrarse de otro modo en un secuestro y/o formar un complejo con una segunda entidad.

Como se usa en la presente, el término "sorción" se refiere tanto a adsorción como absorción.

15 Como se usa en la presente, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de una composición (por ejemplo, que comprende una célula de levadura, pared celular de la levadura o componente de pared celular de la levadura modificada de la invención) suficiente para
20 obtener el efecto beneficioso o resultados deseado. Una cantidad efectiva se puede administrar y/o combinar con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración particular.

25 Como se usa en la presente, el término "digesto" se refiere a la conversión de alimentos, productos alimenticios para animales, u otros compuestos orgánicos en forma absorbible; para ablandar, descomponer o disgregar por calor y humedad o acción química.

30 Como se usa en la presente, "sistema digestivo" se refiere a un sistema (que incluye sistema gastrointestinal) en que ocurre o puede ocurrir la digestión.

Como se usa en la presente, la expresión "productos alimenticios para animales" se refiere a materiales que son consumidos por animales y aportan energía y/o nutrientes de una dieta del animal. Los ejemplos de
 5 productos alimenticios para animales incluyen, pero sin limitación, ración mixta total (TMR), forraje, pellet, concentrados, premezclas, coproductos), granos, granos para destiladores, melazas, fibras, forrajes, pastos, heno, granos, hojas, harina, productos solubles, y
 10 suplementos.

Como se usa en la presente, el término "animal" se refiere a los del reino Animal. Esto incluye, pero sin limitación a ganado, animales de granja, animales domésticos, animales mascota, animales marinos y agua dulce, y animales salvaje.
 15

Como se usa en la presente, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de dar una sustancia, que incluye un fármaco, profármaco u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o in vivo, in vitro, o células, tejidos y órganos ex vivo). Los ejemplos de vías de administración pueden ser a través de los ojos (oftálmico), boca (oral), piel (tópica o transdérmico), nariz (nasal), pulmones (inhalante), mucosa oral (bucal),
 20 oreja, rectal, vaginal, por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, etc.) y similares.
 25

Como se usa en la presente, el término "coadministración" y el término "coadministrar" se refiere a la administración de al menos dos agentes o terapias a un sujeto y/o material (por ejemplo, producto alimenticio para animales). La coadministración de dos o más agentes o terapias pueden ser concurrentes, o un
 30

primer agente/terapia se puede administrar antes de un segundo agente/terapia.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" se refiere a una mejora y/o reversión de los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, micotoxicosis). El término "tratamiento" se refiere a medidas de tratamiento terapéutico y profiláctico o preventivo. Por ejemplo, los sujetos que pueden beneficiarse del tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen los que ya tienen la enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, micotoxicosis) así como aquellos en que se previene una enfermedad y/o trastorno (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

Como se usa en la presente, la expresión "en riesgo de la enfermedad" se refiere al 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 hereditarios), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales presentes en el ambiente, etc.).

Como se usa en la presente, el término "enfermedad", el término "infección" y el término "condición o respuesta patológica" se refieren a un estado, signos y/o síntomas que se asocian con un deterioro del estado normal de un animal vivo o de alguno de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el desempeño de las funciones normales, y puede ser una respuesta a factores ambientales (tales como malnutrición, peligros industriales o clima, que incluyen micotoxicosis), agentes infecciosos específicos (tales como gusanos,

bacterias, o virus), a defectos inherentes del organismo (tales como varias anomalías genéticas), o combinaciones de estos y otros factores.

5 Como se usa en la presente, el término "micotoxycosis" se refiere a una afección en que las micotoxinas pasan las barreras de resistencia del cuerpo humano o animal. La micotoxycosis se puede considerar una infección o una enfermedad y puede tener un efecto perjudicial en los afectados.

10 Como se usa en la presente, el término "micotoxina" se refiere un compuesto tóxico y/o carcinogénico producido por varias especies fúngicas.

15 Como se usa en la presente, la expresión "que sufre de la enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un sujeto animal o humano) que está experimentando una enfermedad particular y no se limita a ningún signo o síntoma o enfermedad particular.

20 Como se usa en la presente, el término "tóxico" se refiere cualquier efecto perjudicial, deletéreo, dañino, o negativo de otro modo sobre un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes del contacto o administración de la toxina/ tóxico.

25 Como se usa en la presente, el término "ácido" como se usa en la presente se refiere cualquier compuesto químico que puede donar protones y/o aceptar electrones. Los ácidos incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, toluen-p-sulfónico, tartárico, 30 acético, cítrico, metansulfónico, etansulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftalen-2-sulfónico, bencensulfónico, y similares. Otros ácidos, tales como oxálico, que no son farmacéuticamente aceptables de por

sí, se pueden emplear en la preparación de sales útiles como intermediarios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

5 Como se usa en la presente, el término "base" se refiere a cualquier compuesto químico que puede aceptar protones y/o donar electrones o iones hidróxido. Las bases incluyen, pero sin limitación, hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metal
10 alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio), amoníaco, y compuestos de formula NW_4^+ , donde W es alquilo C_{1-4} , y similares.

 Como se usa en la presente, el término "sal" se refiere a compuestos que pueden derivar de ácidos o bases
15 inorgánicas u orgánicas. Los ejemplos de sales incluyen, pero sin limitación, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencensulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato,
20 etansulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietansulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato,
25 picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato, y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención compuestos con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ , y NW_4^+ (donde W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares.
30 4), y similares.

 Como se usa en la presente, la expresión "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 la levadura, o componente de la celular de la levadura modificada de la invención) con un portador, inerte o activo, que hace la composición especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

Como se usa en la presente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" y la expresión "farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones que no producen sustancialmente más reacciones adversas conocidas que las reacciones beneficiosas conocidas.

Como se usa en la presente, la expresión "agente antiespumante" se refiere a un aditivo usado para evitar la formación de espuma o se añade para romper la espuma ya formada. Un "agente antiespumante" también se denomina como "antiespumante" o "desespumante" se refiere a un aditivo que reduce la tensión superficial de una solución o medio o emulsión o caldo en fermentadores debido a la aireación o agitación, de este modo inhibe o modifica la formación de una espuma. Los agentes comúnmente usados son aceites insolubles, dimetil polisiloxanos y otras siliconas, ciertos alcoholes tales como estearildecanol, octal decanol, sulfonatos, estearatos y glicoles.

Como se usa en la presente, el término "célula" se refiere una unidad autorreplicante autónoma que puede existir como una unidad de vida independiente funcional (en el caso del organismo unicelular, por ejemplo levadura), o como subunidad en un organismo multicelular (tal como en plantas y animales) que es especializada en llevar a cabo funciones particulares para la causa de un organismo como un todo. Existen dos tipos de células: células procarióticas y células eucarióticas.

Como se usa en la presente, el término "eucariota" se refiere a organismos cuyas células se organizan en estructuras complejas encerradas entre membranas. Los "eucariotas" se pueden distinguir de los "procariotas".

5 El término "procariota" se refiere a organismos que carecen de un núcleo celular u otra organela unida a membrana. El término "eucariota" se refiere a todos los organismos con células que exhiben las características típicas de los eucariotas, tales como la presencia de de
10 un núcleo verdadero unido por membrana nuclear, dentro del cual se hallan los cromosomas, la presencia de organelas unidas a membrana, y otras características observadas comúnmente en organismos eucarióticos. En consecuencia, el término incluye, pero sin limitación a
15 organismos tales como hongos, protozoos y animales.

Como se usa en la presente, el término "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo de células. Se incluyen en este término líneas continuas de células (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos de células
20 primarias, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas), y ninguna otra población celular mantenida in vitro.

Como se usa en la presente, la expresión
25 "reproducción celular" se refiere a un proceso de multiplicación celular que tiene tres etapas primarias. La primera etapa de reproducción celular involucra la replicación del ADN de la "célula progenitora". La segunda etapa es la separación del ADN duplicado en dos
30 grupos de cromosomas de igual tamaño. La tercera etapa es la división física de las células enteras, usualmente llamadas citoquinesis. La reproducción celular es más compleja en los eucariotas que en otros organismos. Las

células no eucarióticas tales como células bacterianas se reproducen por fisión binaria, un proceso que incluye la replicación del ADN, segregación de cromosomas, y citoquinesis. La reproducción de células eucarióticas involucra la mitosis o un proceso más complejo llamado meiosis. La mitosis y meiosis algunas veces se llaman los dos procesos de "división nuclear". La fisión binaria es similar a la reproducción de células eucarióticas que involucra la mitosis. Ambas llevan a la producción de dos células hija con el mismo número de cromosomas que la célula progenitora. La meiosis se usa para un proceso de reproducción celular especial de los organismos diploides. Este produce cuatro "células hija" (gametas) especiales que tienen la mitad de la cantidad de ADN de la célula normal. Una gameta masculina y una gameta femenina luego pueden combinar para producir un cigoto, una célula que nuevamente tiene la cantidad normal de cromosomas.

Como se usa en la presente, la expresión "reproducción de levadura" se refiere al ciclo de reproducción de la levadura, que tiene ciclos reproductivos asexuales y sexuales, sin embargo el modo más común de crecimiento vegetativo de la levadura es reproducción asexual por "gemación" o "fisión" con una "célula hija" que se forma de una "célula progenitora". El núcleo de la célula progenitora se divide en un núcleo hijo y migra en la célula hija. La yema continúa creciendo hasta que se separa de la "célula progenitora", formando una nueva célula. En condiciones de estrés alto las células haploides generalmente mueren, sin embargo en las mismas condiciones las células diploides experimentan esporulación, ingresan en la reproducción sexual (meiosis) y producen una variedad de esporas haploides,

que pueden continuar apareándose (conjugar), para formar de nuevo el diploide.

Como se usa en la presente, el término "gemación" se refiere a un tipo de división celular en los hongos (por ejemplo, levadura) y en protozoos en los que una de las "células hija" se desarrolla como una protuberancia más pequeña de la otra. Usualmente la posición de la célula en gemación se define por la polaridad en la "célula progenitora". En algunos protozoos la hija brotada puede hallarse dentro del citoplasma de la otra hija.

Como se usa en la presente, la expresión "célula hija" se refiere a una de las dos o más células formadas en la división de una célula progenitora.

Como se usa en la presente, la expresión "célula progenitora" y el término "célula madre" se refieren a la célula que da origen a las células hija por división celular.

Como se usa en la presente, el término "inoculación" se refiere al acto de introducir un microorganismo o suspensión de microorganismos (por ejemplo levadura, hongos, bacterias, etc.) en un medio de cultivo. La inoculación es el acto o proceso de introducir algo para que este crezca o se reproduzca.

Como se usa en la presente, el término "inóculo" y el término "preinóculo" se refieren a células usadas en una inoculación, tales como células añadidas para comenzar un cultivo.

Como se usa en la presente, la expresión "procedimiento de cultivo" se refiere a la reproducción de células vivas aplicadas a las células de levaduras donde la frase "crecimiento celular" es una abreviatura para la idea de "crecimiento de la cantidad de células por medio de la reproducción celular". Durante la

reproducción celular una célula (la "célula progenitora" o "célula madre") se divide para producir "células hija".

Como se usa en la presente, la expresión "cultivar levaduras" y el término "crecimiento de levaduras" se
5 refiere al acto de poblar y/o propagar levaduras.

Como se usa en la presente, el término "centrifugación" se refiere a la separación de las moléculas por tamaño o densidad usando fuerzas centrífugas generadas por rotor giratorio que pone un
10 objeto en rotación alrededor de un eje fijo, que aplica una fuerza perpendicular al eje. La centrífuga funciona usando el principio de sedimentación, donde la aceleración centrípeta se usa para distribuir uniformemente las sustancias de mayor y menor densidad en
15 las diferentes capas de densidad.

Como se usa en la presente, el término "concentración" se refiere la cantidad de una sustancia por espacio definido. La concentración usualmente se expresa en términos de masa por unidad de volumen. Para
20 diluir una solución, se debe añadir más solvente, o reducir la cantidad de soluto (por ejemplo, por evaporación selectiva, secado por aspersion, secado por congelación, por ejemplo, extracto de la pared celular de la levadura concentrado o extracto de la pared celular
25 concentrado de la levadura modificada). En contraste, para concentrar una solución, se debe añadir más soluto, o reducir la cantidad de solvente.

Como se usa en la presente, el término "capa" se refiere a un depósito usualmente horizontal organizado en
30 un estrato de material que forma una parte o segmento superpuesto obtenido después de la separación por centrifugación en relación con la densidad de las propiedades del material.

Como se usa en la presente, el término "recolección" se refiere al acto de recolectar o juntar materiales que se han producido (por ejemplo, juntar materiales producidos durante la producción de levaduras).

- 5 Como se usa en la presente, el término "arcilla" se refiere a arcillas minerales, sintéticas, organoarcillas y cualquiera de sus mezclas.

- Como se usa en la presente, el término "arcilla mineral" se refiere a un material natural o sintético
10 compuesto principalmente de minerales de grano fino (silicatos) que muestran plasticidad a través de un rango variable de contenido de agua (que puede ser el resultado de agua atrapada en la estructura por atracción polar) y se puede endurecer cuando se seca y/o activar. Los
15 ejemplos de silicatos incluyen, pero sin limitación, filosilicato, bentonita, zeolita, aluminosilicato, montmorilonita, esmectita, caolinita.

- Como se usa en la presente, el término "organoarcilla" y el término "arcilla modificada" se
20 refieren a un filosilicato modificado orgánicamente, derivado de una arcilla mineral natural. Por el intercambio de los cationes intercapa originales por los organocaciones (normalmente iones de alquilamonio cuaternario) o polisacáridos, se genera una superficie
25 organofílica, que consiste en restos orgánicos unidos en forma covalente. La estructura laminar permanece análoga al filosilicato original.

- Como se usa en la presente, el término "secado" se refiere a secado por aspersión, secado por congelación,
30 secado al aire, secado al vacío u otra clase de proceso que reduce o elimina el líquido de una sustancia.

 Como se usa en la presente, la expresión "secado por aspersión" 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 líquido de una sustancia. En otras palabras el material se seca por medio de aspersión o atomización en una
5 corriente de aire caliente.

Como se usa en la presente, la expresión "secado-congelado" y el término "líoofilización" y el término "criodesecación" se refieren a la extracción de un solvente de la materia en un estado congelado por
10 sublimación. Esto se logra por la congelación del material por secar por debajo de su punto eutéctico y luego proporcionar el calor latente de sublimación. El control preciso de la entrada de calor permite el secado del estado congelado sin producir la fusión de nuevo. En
15 la aplicación práctica, el proceso es acelerado y se controla precisamente en condiciones de presión reducidas.

Como se usa en la presente, la expresión "polvo de flujo libre seco" se refiere a un polvo seco que fluye
20 libre.

Como se usa en la presente, el término "molienda" se refiere a la reducción del tamaño de partícula por impacto, cizallamiento o desgaste.

Como se usa en la presente, el término "lavado" se
25 refiere a la remoción o limpieza (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo, agua destilada, buffer, o solvente) o mezcla) de impurezas o componente soluble no deseado de una preparación (por ejemplo, un extracto de la pared celular de la levadura se puede
30 lavar para eliminar componentes que no son la pared celular de la levadura de la muestra).

Como se usa en la presente, el término "enzima" se refiere a una proteína o molécula basada en proteína con

una secuencias de aminoácidos característica que se pliega para producir una estructura tridimensional específica que da a la molécula propiedades únicas y que actúa como un catalizador o un agente químico para reacciones químicas específicas, al convertir un conjunto específico de reactivos (llamados sustratos) en productos específicos.

Como se usa en la presente, el término "péptido" el término "polipéptido" y el término "proteína" se refieren a una secuencia primaria de aminoácidos que se unen por "uniones peptídicas" covalentes. En general, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, normalmente 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término "polipéptido" abarca péptidos y proteínas. Péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser sintéticos, recombinantes o naturales. Un péptido sintético se produce por medio artificiales in vitro (por ejemplo, no se produjo in vivo).

Como se usa en la presente, el término "proteasas" se refiere a alguna de diversas enzimas, que incluyen las endopeptidasas y exopeptidasas que catalizan la ruptura hidrolítica de las proteínas en los péptidos o aminoácidos.

Como se usa en la presente, el término "lisis" se refiere a la desintegración o ruptura de la membrana celular de la levadura y pared celular de la levadura que producen la liberación de los componentes intracelulares. Como se usa en la presente, la "lisis" ocurre como resultado de mecanismos físicos/ mecánicos, enzimáticos (que incluyen autólisis e hidrólisis) u osmóticos (que incluyen "shock alcohólico" e hidrólisis).

Como se usa en la presente, el término "autólisis" se refiere a la ruptura de una parte o célula entera o tejido por enzimas autoproducidas.

5 Como se usa en la presente, el término "hidrólisis", se refiere a los procesos de división de un compuesto en fragmentos con la adición de agua (por ejemplo, que se usa para degradar polímeros en unidades más simples (por ejemplo, almidón en glucosa)).

10 Como se usa en la presente, "shock alcohólico" 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 levaduras) que crecen en el medio. El
15 shock alcohólico puede llevar a la lisis de las células (por ejemplo, célula de levaduras) que crecen en el medio.

Como se usa en la presente, el término "ósmosis" se refiere a la difusión de un solvente (por ejemplo, agua) a través de una membrana semipermeable, desde una
20 solución de baja concentración de soluto (alto potencial de agua) a una solución con alta concentración de soluto (bajo potencial de agua), hasta un gradiente de concentración de soluto. Es un proceso físico en que un
25 solvente se mueve, sin aporte de energía, a través de una membrana semipermeable (permeable al solvente, pero no al soluto) separando soluciones de concentraciones diferentes. El movimiento neto de solvente es de la solución menos concentrada (hipotónica) a la más
30 concentrada (hipertónica), que tiende a reducir la diferencia en las concentraciones.

Como se usa en la presente, la expresión "estrés osmótico" y la expresión "shock osmótico" se refieren a

un cambio súbito en la concentración del soluto alrededor de una célula, lo que causa un cambio rápido en el movimiento del agua a través de su membrana celular. En las condiciones de altas concentraciones de sales, 5 sustratos o cualquier soluto del sobrenadante, el agua se extrae de las células a través de ósmosis. Esto también inhibe el transporte de sustratos y cofactores en la célula, de este modo "se produce un shock" en la célula. En forma alternativa, a bajas concentraciones de solutos, 10 el agua entra en la célula en cantidades grandes, causando que esta se hinche y estalle o experimente apoptosis.

Como se usa en la presente, el término "muestra" se usa en el sentido general que incluye un espécimen o 15 cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales (que incluyen seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos, y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, tales como 20 plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, suelo, agua, cristales y muestras industriales.

Como se usa en la presente, el término "complejo" se 25 refiere a una entidad formada por la asociación entre dos o más entidades separadas (por ejemplo, asociación entre dos o más entidades donde las entidades son iguales o diferentes (por ejemplo, especies químicas iguales o diferentes). La asociación puede ser por medio de un 30 enlace covalente o un enlace no covalente (por ejemplo, por medio de fuerza de van der Waals, electrostáticas, interacción de carga, interacción hidrofóbica, interacción dipolar, y/o enlace hidrógeno (por ejemplo,

uniones uretano, uniones amida, uniones éster, y sus combinaciones)).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención provee nuevas células de levadura que comprenden una estructura de pared celular que fue modificada (por ejemplo, arcilla y/o componentes de arcilla se entrelazan en la pared celular de la levadura y/o la relación de glucano:manano se modificó),
10 métodos de producción de ellos, composiciones que comprenden y/o se derivan de ellos y sus métodos de uso (por ejemplo, para secuestrar bacterias y micotoxinas).

En algunas formas de realización, la presente invención provee un extracto de pared de célula de
15 levadura (por ejemplo, un extracto de pared celular aislado, purificado, modificado y/o concentrado) que comprende arcilla y/o componentes de arcilla entrelazados en la pared celular (por ejemplo, debido al cultivo de la célula de levadura en presencia de una arcilla) y/o
20 extracto de la pared celular de levadura que comprende una estructura alterada de glucano:manano. En algunas formas de realización, la arcilla entrelazada en el extracto de la pared celular de levadura que comprende arcilla y/o componente de arcilla entrelazado en la pared
25 celular de la levadura y/o extracto de la pared celular de levadura que comprende una estructura alterada de glucano:manano se mezcla o se añade de otro modo a productos alimenticios, materia orgánica (por ejemplo, relleno), y/o agua secuestrando así las micotoxinas (por
30 ejemplo, en el tracto gastrointestinal del animal o durante la filtración) y reduciendo los efectos negativos de las micotoxinas. Así, en algunas formas de realización, la presente invención provee métodos que

mejoran significativamente las propiedades adsorbentes/secuestrantes del material a base de pared celular de levadura hacia las micotoxinas (por ejemplo, que significativamente adsorben y/o secuestran y/o
5 limitan la biodisponibilidad de una variedad de micotoxinas (por ejemplo, no adsorbidas y/o no secuestradas durante el uso de arcilla sola, extracto de la pared celular de levadura solo, una combinación de extracto de la pared celular de levadura al que más tarde
10 se añade arcilla sobre una base de mezcla seca; y/o un injerto químico de materiales polisacáridos sobre la parte superior de productos a base de arcilla) en el tracto digestivo de un animal).

En algunas formas de realización, la presente
15 invención provee una nueva preparación de células de levadura cultivadas en presencia de una o varias arcillas. En algunas formas de realización, las paredes celulares de levadura entrelazada con arcilla se extraen de las células de levadura entrelazada con arcilla
20 cultivadas en presencia de una o varias arcillas. En algunas formas de realización, el extracto de la pared celular de levadura entrelazada con arcilla se purifica y/o se concentra. Tal como se describe en la presente, la presente invención no está limitada a ninguna cepa de
25 células de levadura particular o a ninguna arcilla particular. En algunas formas de realización, la fuente de arcilla es una fuente de arcilla estándar de grado comercial (por ejemplo, seleccionada para inhibir in vitro, in vivo y/o ex vivo propiedades hacia las
30 micotoxinas o una fuente de arcilla seleccionada porque no exhibe in vitro, in vivo y/o ex vivo propiedades hacia las micotoxinas). Las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden utilizar para adsorber y/o

secuestrar las micotoxinas en una variedad de sujetos. De hecho, la presente invención no está limitada por el tipo de sujeto que se beneficia de las composiciones y métodos descritos en la presente. La presente invención puede

5 beneficiar a todos los animales, sin embargo, los sujetos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, especies de seres humanos, aves, bovinos, porcinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, peces, camélidos, roedores, así como peces y mariscos. En algunas formas de

10 realización, cuando se mezcla con sustancia orgánica (por ejemplo, incluyendo relleno y productos alimenticios), y/o agua y/o alimento directamente al sujeto, las composiciones de la presente invención reducen la absorción o captación de micotoxinas por el sujeto,

15 aliviando así el rendimiento reducido, salud y/o reduciendo la incidencia de enfermedades asociadas con la micotoxina y las respuestas patológicas en el sujeto.

En algunas formas de realización, la presente invención provee un método para preparar y/o generar

20 células de levadura que comprenden arcilla y/o componentes de arcilla entrelazados en la pared celular de la levadura, y/o que comprenden una estructura alterada de glucano:manano. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la presente invención provee una

25 célula de levadura generada y/o cultivada en presencia de una arcilla, en donde la pared celular de la levadura comprende una relación de glucano:manano que es mayor (por ejemplo, 2,5% mayor, 5% mayor, 10% mayor, 15%, 20% mayor, 25% mayor, 30% mayor, 40% mayor, 50% mayor o más)

30 que la relación de glucano:manano de células de levadura generadas/cultivadas en ausencia de una arcilla (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2). En algunas formas de realización, la presente invención provee un extracto de pared celular

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

De esta manera, la presente invención provee un nuevo extracto de la pared celular de levadura entrelazado con arcilla de levadura cultivada en presencia de una arcilla y métodos de generarlos. En
15 algunas formas de realización, un método de generación de células de levadura comprende el cultivo de células de levadura que incluyen, pero sin limitación, especies de *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluiveromyces* y *Torulaspora* en presencia de una o varias arcillas a fin de alterar o
20 modificar de algún otro modo la pared celular de la levadura (por ejemplo, a fin de mejorar la capacidad de la pared celular de la levadura de adsorber y/o secuestrar las micotoxinas (por ejemplo, debido a la pared celular de la levadura entrelazada con arcilla y/o
25 componentes de arcilla y/o que comprende una estructura alterada de glucano:manano)). En algunas formas de realización, la presente invención provee la mezcla de uno o varios materiales a base de arcilla que incluyen, pero sin limitación, silicatos (por ejemplo, grupo de
30 tectosilicatos (por ejemplo, zeolitas, cuarzo, feldespatos); filosilicatos (por ejemplo, caolinita, haloisita, dicktita, nacrita, quisotilo, antigorita, lizardita, talco), pirofilitas, esmectitas (por ejemplo,

montmorilonita, beidelita, nontronita; vermiculitas, micasantigorita, muscovita, illita, fengita, biotita); sepiolita, paligorskita, atapulgita) y/o un silicato de aluminio hidratado (por ejemplo, montmorilonitas, bentonita)) con un medio de cultivo de célula de levadura (por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos 1, 5 y 6). La presente invención provee que las células de levadura viables incorporen la arcilla y/o componentes de arcilla en la estructura de la pared celular de la levadura (por ejemplo, tal como se indica en las Figuras 1A y 1B y Figura 2). En algunas formas de realización, una o varias arcillas mezcladas en un medio de cultivo de células de levadura están presentes en una concentración de aproximadamente el 0,075%, 0,1%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15% o más del medio de cultivo total. En algunas formas de realización, la cantidad de una o varias arcillas mezcladas en un medio de cultivo de células de levadura no excede el 2% del contenido final de un reactor en el que se cultivan las células de levadura. En algunas formas de realización, una cantidad de arcilla añadida al medio de cultivo de células de levadura se selecciona de modo tal que no lleve al hinchamiento del medio de cultivo de células de levadura (por ejemplo, es de aproximadamente el 2,0% o menos). En algunas formas de realización, la cantidad de arcilla añadida al medio de cultivo de células de levadura se selecciona de modo que produzca un extracto de pared celular de levadura recolectado de la levadura que comprende una cantidad de arcilla que tiene una aprobación regulatoria para usar como un alimento de adición en comida animal no medicada (por ejemplo, no excede 2% en la ración total). En algunas formas de realización, se añade un agente antiespumante de grado

alimenticio o antiespumante al medio de cultivo celular, (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, antiespumantes moleculares no siliconados, antiespumantes a base de aceite (por ejemplo, aceite mineral, aceite vegetal, aceite blanco u otro aceite que es insoluble en el medio espumante) o antiespumantes a base de compuestos de silicona (por ejemplo, provistos como una emulsión a base de aceite o de agua)). En algunas formas de realización, se añaden ceras (por ejemplo, etilenbisestearamida (EBS), ceras de parafina, ceras de éster o ceras de alcohol graso) y/o sílices hidrofóbicos para mejorar la emulsificación y la dispersión en el medio espumante.

Los experimentos realizados durante el desarrollo de las formas de realización de la invención identificaron una cantidad de factores importantes para el crecimiento de células de levadura en presencia de una o varias arcillas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, 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 a menos del 3% (por ejemplo, para evitar llegar al estado sólido o semisólido (por ejemplo, debido a la absorción del agua y la capacidad de retención del material arcilloso)). Así, la absorción de agua del silicato de aluminio hidratado hinchable en agua es un factor limitante que impacta sobre la relación de material de soporte de arcilla al agua en la formulación de un medio de cultivo de la presente invención. En algunas formas de realización, el medio de cultivo y las botellas usadas se esterilizan y la inoculación con microorganismos se efectúa de acuerdo con procedimientos estándares. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se prepara un

preinóculo con levadura seca activa en una botella de agua desionizada estéril y se incuba a aproximadamente 25-30 °C (por ejemplo, 28 °C) durante un período establecido (por ejemplo, 20 min). En algunas formas de
5 realización, la inoculación del preinóculo se realiza de forma aséptica (por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 30 °C). En algunas formas de realización, el pH y los niveles de glucosa se controlan y se mantienen. En algunas formas de realización, la agitación
10 del cultivo se aumenta de forma incremental (por ejemplo, de 100 a 500 rpm) durante el crecimiento. En algunas formas de realización, una o varias arcillas se añaden asépticamente al cultivo durante el crecimiento (por ejemplo, cuando se consumen menos de la mitad,
15 aproximadamente la mitad o más de la mitad de los nutrientes del cultivo).

En algunas formas de realización, cuando la cantidad de arcilla mezclada en el medio de cultivo de células de levadura aumenta (por ejemplo, en una cantidad
20 dependiente del tipo de arcilla o arcillas usada), las propiedades de hinchamiento de la arcilla material inhibe el crecimiento de las células de levadura.

En algunas formas de realización, el crecimiento de medio de cultivo de células de levadura mezclado con
25 levadura en arcilla provee condiciones que estresan la levadura de cultivo. A pesar de que la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción particular y no es necesaria una comprensión del mecanismo de acción para poner en práctica la presente invención, en algunas
30 formas de realización, el estrés aplicado a la levadura por el medio de cultivo celular mezclado con arcilla causa que la levadura produzca más glucano, dando como resultado mayores proporciones de glucano:manano.

En algunas formas de realización, la presente invención provee que las células de levadura cultivadas en presencia de una o varias arcillas no solo entrelaza la arcilla y/o un componente de arcilla en la pared celular de la levadura, sino que también desarrolla una composición de pared celular alterada (por ejemplo, caracterizada por relaciones alteradas de glucano:manano, contenido proteico total y/o cantidades remanentes). Por ejemplo, la presente invención provee células de levadura que comprenden una relación de glucano:manano que es mayor (por ejemplo, 2,5% mayor, 5% mayor, 10% mayor, 15%, 20% mayor, 25% mayor, 30% mayor, 40% mayor, 50% mayor o más) que la relación de glucano:manano de las células de levadura cultivadas en ausencia de arcilla (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2). La presente invención también provee células de levadura y extractos de pared de células de levadura que comprenden un contenido proteico total mejorado (por ejemplo, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% o más de contenido proteico mejorado) en comparación con el contenido proteico total de células de levadura y/o extractos de pared celular de levadura generados en ausencia de una arcilla (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2).

En algunas formas de realización, la presente invención provee extractos de pared celular de levadura que comprende arcilla y/o componentes de arcilla entrelazados en la pared celular de la levadura y/o que comprenden una relación alterada de glucano:manano de la estructura, que provee superiores propiedades de secuestro de micotoxina que las composiciones convencionales. La presente invención no está limitada por ningún método particular de generación de un extracto de pared celular de levadura de levadura cultivada en presencia de una o varias arcillas. De hecho, se pueden

utilizar una variedad de procedimientos para generar el extracto de pared de célula de levaduras que incluyen, pero sin limitación, el uso de perlas de vidrio y un homogeneizador, tratamiento enzimático (por ejemplo, de proteasa (por ejemplo, papaína)), lisis mecánica, autólisis e hidrólisis y otros métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Peppler, H. J. 1979. Production of yeasts and yeast products. Página 157 en: Microbial Technology & Microbial Processes, Vol. 1 (2d Ed.), Academic Press). Después de la lisis y la extracción, la arcilla y/o el componente de arcilla entrelazado/integrado en la pared celular de levadura se lava para eliminar los componentes intracelulares y purificar y concentrar el extracto. El extracto resultante se puede secar por medio de cualquiera de los métodos comunes en el arte incluyendo, pero sin limitación, liofilización y/o secado por pulverización (por ejemplo, para formar un polvo higroscópico insoluble en agua).

Conforme a ello, la invención provee, en algunas formas de realización, extracto de la pared celular de levadura que comprende arcilla y/o componente de arcilla entrelazado directamente en la pared celular de la levadura. En algunas formas de realización, una composición que comprende un extracto de pared celular de levadura de la invención que comprende arcilla y/o componentes de arcilla integrados directamente en la pared celular de la levadura comprende menos de aproximadamente el 0,5% de arcilla, 0,5-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70% o más de arcilla y/o componente de arcilla como parte de un extracto de pared celular de levadura (sobre una base de % en p/p). En algunas formas de

realización, el aumento de la cantidad de arcilla en un medio de cultivo incrementa la cantidad de arcilla y/o el contenido de componente de arcilla de un extracto de pared de célula de levadura.

- 5 En algunas formas de realización, la arcilla que se añade a un medio de cultivo de células de levadura que no se incorpora en una célula de levadura se recolecta y utiliza en un posterior procedimiento de cultivo de células de levadura (por ejemplo, se recicla el material
- 10 de arcilla no incorporado). Por ejemplo, el reciclado de material arcilloso se facilita por las propiedades de sedimentación de la arcilla en comparación con la levadura. De hecho, los experimentos realizados durante el desarrollo de las formas de realización de la
- 15 invención produjeron dos capas recuperables, (i) una capa inferior que contiene material arcilloso solo (al 99%); y (ii) una capa superior que contiene una fracción arcillosa incorporada en la levadura. Así, a pesar de que el mecanismo no es necesario para poner en práctica la
- 20 presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción particular, en algunas formas de realización, la presente invención provee una inclusión directa de partículas de arcilla en y/o sobre la pared celular de la levadura (por ejemplo,
- 25 que sobrevive a los procesos de preparación de extracto de la pared celular de levadura (por ejemplo, por medio de entrelazado directo de arcilla o componente de arcilla en las quenonas poliméricas de glucano de la pared celular de la levadura)). En otras formas de realización,
- 30 una fracción de arcilla atrapa una célula de levadura durante el cultivo y después de florecer, junto con células hija, las células de levadura están enjauladas en una macroestructura que comprende arcilla antes de lisar

la levadura y sus componentes intracelulares se eliminan por lavado. En algunas formas de realización, las glucanoquenonas crecen en la estructura laminar de la arcilla.

5 En algunas formas de realización, una célula de levadura o componente de pared celular de levadura (por ejemplo, un extracto de pared celular de levadura generado y aislado tal como se describe en la presente (por ejemplo, que comprende arcilla o componente de
10 arcilla entrelazados en la pared celular de la levadura y/o que comprende un glucano alterado y/o estructura de manano)) se combina con uno o varios otros agentes que incluyen, pero sin limitación, una enzima (por ejemplo, esterasa, epoxidasa), una bacteria, una levadura o un
15 componente de levadura, arcilla, etc. (por ejemplo, antes de mezclar con alimentos, incorporar en alimentos pelletizados y/o alimentar a animales)).

 En algunas formas de realización, la presente invención utiliza células de levadura que comprenden una
20 estructura alterada de pared celular de levadura (por ejemplo, arcilla y/o componente de arcilla entrelazado en la pared celular de la levaduras y/o paredes celulares que comprenden estructura alterada de glucano y/o manano), composiciones que los comprenden y/o
25 composiciones derivadas de ellos, que se utilizan con uno o varios métodos y/o materiales descritos en la presente para usar en composiciones y/o métodos para la reducción, remoción y/o eliminación de micotoxinas (por ejemplo, métodos físicos, de mezcla, químicos, microbiológicos
30 descritos en la presente (por ejemplo, para adsorber y/o secuestrar bacterias y toxinas)). Por ejemplo, en algunas formas de realización, una célula de levadura o componente de pared celular de levadura (por ejemplo, un

extracto de pared celular de levadura producido como se describe en la presente (por ejemplo, que comprende arcilla o componentes de arcilla entrelazados en la pared celular de la levadura y/o que comprende una estructura alterada de glucano y/o manano)) se utiliza con uno o
 5 varios métodos físicos, de mezcla, químicos, microbiológicos descritos en la presente para secuestrar micotoxinas.

La presente invención no está limitada por el tipo
 10 de micotoxina secuestrada. De hecho, las composiciones de la presente invención (por ejemplo, extractos de pared celular de levadura entrelazados con arcilla) se pueden utilizar para adsorber y/o secuestrar una variedad de micotoxinas que incluyen, pero sin limitación,
 15 acetoxiscirpenodiol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina de acetilo T-2, extendida a todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, ácido altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1,
 20 beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolide, calonectrina, chaetoglobosina, citrinina, citreoviridina, cochliodinol, citochalasin E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desacetilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, monoacetato de desoxinivalenol,
 25 diacetoxiscirpenol, destruxina B, enniatinas, extendida a todas las toxinas ergot y endofitos, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisinas B1 y B2 y B3, Fusarenona-X, Fusarochromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, ipomeanina, islanditoxina,
 30 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, E,G,H, scirpentriol, slaframina,
 stericoncentrated modified yeast cell wall
 5 extracttoccistin, toxina T-1, toxina T-2,
 triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos,
 tricoxermina, tricoxetina, tricoxerrinas, tricoxerroles,
 triptoquivaleno, verrucarina, verruculógeno,
 viopurpurina, viomeleína, viriditoxina, xantocilina,
 10 iavanicina + 1, zearalenoles, zearalanonas, zearalenona y
 subfamilias y/o derivados de ellos. En algunas formas de
 realización, se utilizan composiciones y métodos de la
 invención para adsorber y/o secuestrar aflatoxinas,
 zearalenona, ochratoxinas, tricoxeteno, fumonisina,
 15 patulina y/o ergot relacionado con endofito y posibles
 conjugados y metabolitos de las micotoxinas antes
 mencionadas. Los experimentos realizados durante el
 desarrollo de la invención demuestran los beneficios del
 uso de la presente invención en comparación con métodos
 20 históricos o convencionales. Por ejemplo, tal como se
 describe en la presente, una desventaja de usar una
 composición que comprende sólo (1) una arcilla, (2) una
 composición que comprende sólo un extracto de pared de
 célula de levadura, así como (3) una composición que
 25 comprende un extracto de pared celular de levadura al que
 se añadió una arcilla, es que tales composiciones y
 métodos de uso de ellos son medios menos efectivos que la
 presente invención para reducir los efectos negativos de
 micotoxinas y tienen menos desventajas. Sin embargo, los
 30 extractos de pared celular de levadura entrelazados con
 arcilla de la presente invención (por ejemplo, que
 comprende arcilla y/o componente de arcilla entrelazado
 en la pared celular de la levadura, y/o que comprende una

estructura alterada de glucano y/o manano) desarrollan una capacidad inesperada para secuestrar una variedad de micotoxinas y también desarrollan una capacidad sorprendentemente mejorada para 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 añadió arcilla, ver los Ejemplos 2-3). De esta manera, la presente invención provee composiciones y métodos de desarrollan propiedades esperadas y superiores de secuestro y/o adsorción con respecto a una variedad de micotoxinas no halladas en composiciones y métodos convencionales. De esta manera, la presente invención provee materiales a base de pared celular de levadura entrelazada con arcilla y métodos de preparación y uso de ellos para proporcionar un método eficaz para secuestrar micotoxinas en el tracto digestivo de animales y humanos (por ejemplo, por medio de adsorción de micotoxinas presentes en productos alimenticios, otra materia orgánica y/o agua) mientras también provee menor adsorción o ninguna adsorción de nutrientes beneficios y menor cantidad o ningún efecto negativo en el medio ambiente.

En algunas formas de realización, una forma física preferida de la invención es un polvo de flujo libre seco apropiado para la inclusión directa en productos alimenticios, otra materia orgánica (por ejemplo, relleno) o como un suplemento directo a un animal.

Las composiciones de la invención se pueden añadir a cualquier materia orgánica (por ejemplo, relleno, producto alimenticio para animales, producto alimenticio

para humanos) y/o agua (por ejemplo, agua usada para el consumo animal y/o humano, agua medioambiental (por ejemplo, estanques, lagos, reservorios, estanques de peces, etc.)) para eliminar las micotoxinas de la materia. Cuando se incorpora directamente en productos alimenticios animales, se añade una composición de la invención en cantidades que van de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 0,4% en peso de alimento. Cuando se incorpora en otra materia orgánica (por ejemplo, relleno animal), se añade una composición de la invención en cantidades que van de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 99,9%. Cuando se incorpora en un líquido (por ejemplo, agua (por ejemplo, para filtración)), se añade una composición de la invención en cantidades de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 100%. En algunas formas de realización, se añade una composición de la invención a productos alimenticios en cantidades de aproximadamente el 0,025% a aproximadamente el 0,2% en peso de producto alimenticio. De modo alternativo, las composiciones de la invención se dan como alimento directamente a los animales como un suplemento (por ejemplo, en una cantidad que va de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 20 gramos por animal por día). Un experto en el arte apreciará de inmediato que la cantidad para alimentar varía según la especie animal, el tamaño, el tipo de producto alimenticio al que se añade una composición de la invención, material de relleno, fuente de agua, etc.

Las composiciones de la invención se pueden dar como alimento a cualquier animal y humano. Cuando se mezcla con productos alimenticios o se usa como un suplemento alimentario, las composiciones de la invención reducen la biodisponibilidad de micotoxina, la absorción o la

captación de micotoxinas por el animal, mejoran en rendimiento y/o salud y reducen la incidencia de enfermedades. En algunas formas de realización, cuando se añaden composiciones de la invención al material orgánico con el que animales y humanos entran en contacto (por ejemplo relleno), las composiciones de la invención reducen la biodisponibilidad de micotoxina (por ejemplo, reducen la absorción y/o la captación de micotoxinas por el animal) mejorando así el rendimiento y la salud y reducen la incidencia de enfermedades. En algunas formas de realización, se añaden composiciones de la invención al agua que se pretende usar en animales o humanos (por ejemplo, para consumo u otra finalidad), reduciendo la biodisponibilidad de micotoxina (por ejemplo, reduciendo la absorción y/o la captación de micotoxinas por un sujeto animal o humano) y mejorando el rendimiento y la salud y reduciendo la incidencia de la enfermedad (por ejemplo, las composiciones de la invención reducen la biodisponibilidad, la absorción o la captación de micotoxinas. En algunas formas de realización, una composición de la invención se añade al agua usada para el consumo humano (por ejemplo, agua usada para preparación de jugos, vino, botellas de agua, café, té, leche u otro tipo de líquido consumido). En algunas formas de realización, se añade una composición de la invención a agua medioambiental (por ejemplo, estanques, lagos, reservorios, ríos, corrientes, canales de irrigación, tanques usados para peces domésticos u otro tipo de especies acuáticas, etc.). Así, en algunas formas de realización, una composición de la invención (por ejemplo, extracto de la pared celular de levadura que comprende arcilla o componente de arcilla integrado en la pared celular) se usa en la filtración de líquidos (por

ejemplo, líquidos consumibles (por ejemplo, agua usada para producción de bebidas, bebestibles)). Por ejemplo, en algunas formas de realización, se utiliza una composición de la invención como tal o en un filtro, en
 5 donde un líquido (por ejemplo, líquido de consumo (por ejemplo, jugo de naranja, jugo de manzana, jugo de ciruela, jugo de pomelo, jugo de arándano u otro tipo de jugo, cerveza, vino, líquido destilado, etc.)) se procesa a través de un filtro que comprende una composición de la
 10 invención, en donde la composición elimina uno o varios tipos de micotoxinas del líquido.

Tal como se describe en los Ejemplos 1-4, el cultivo de levadura en presencia de arcilla provee un aumento drástico en la adsorción de la pared celular de la
 15 levadura de micotoxinas (por ejemplo, del 6,917% cuando la levadura no se cultiva con arcilla y alcanza el 73,553% y el 79,337% cuando 1,0 y 2,0% de arcilla están incluidos, respectivamente, en el medio sin extracción específica del glucano de la pared celular de levadura
 20 interna (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2)). Más aún, la relación de glucano:manano aumenta de 1,066 a 1,366 con la adición de arcilla. A pesar de una reducción de manano, la concentración de las proteínas de la pared celular aumentó. Además, la fracción remanente (por
 25 ejemplo, que representa las pérdidas de glucanos, manano, proteínas, arcilla, N-acetilglucosamina y/o quitina presentes en la pared celular de la levadura durante el proceso de extracción) aumentó en presencia y el área superficial de la arcilla. A pesar de que no es necesario
 30 un mecanismo para poner en práctica la invención y la invención no está limitada a ningún mecanismo de acción particular, en algunas formas de realización, el aumento se debe a la mejora de la fracción de quitina incluida en

mecanismos de compensación de la levadura debida a cambios de ambiente y condiciones de crecimiento. Más aún, las composiciones de la presente invención (que comprenden extracto de la pared celular de levadura de células de levadura alteradas (por ejemplo, células de levadura que comprenden arcilla y/o componente de arcilla entrelazado en la pared celular de la levaduras y/o paredes celulares que comprenden estructura alterada de glucano y/o manano)) dio una capacidad significativa e inesperada para adsorber y/o secuestrar micotoxinas (por ejemplo, zearalenona (por ejemplo, que despliega una eficacia del 79,33% en comparación con sólo una eficacia del 44,7% para una composición convencional que comprende una combinación de extracto de la pared celular de levadura a la que más tarde una arcilla sobre una base de mezcla seca, ver los Ejemplos 1-4)).

Se investigó el uso de un método alternativo para extraer una pared celular de levadura entrelazada con arcilla de células de levadura entrelazadas con arcilla usando un corte de proteasa (ver el Ejemplo 3). La extracción específica de la capa interna (glucano) de la pared celular de levadura entrelazada con arcilla generó un aumento de las propiedades secuestrantes y adsorbentes de la pared celular de levadura entrelazada con arcilla para las micotoxinas (por ejemplo, zearalenona). Más aún, el cultivo de las células de levadura en un medio de cultivo celular que comprende arcilla al 1,0% y 2,0% mejoró significativamente la actividad secuestrante y de adsorción de la pared celular de levadura entrelazada con arcilla con micotoxinas (por ejemplo, zearalenona). Por ejemplo, una composición convencional que comprende una combinación de extracto de la pared celular de levadura al que se añade más tarde una arcilla sobre una base de

mezcla seca para una eficacia del 44,7% para secuestrar las micotoxinas, en comparación con una eficacia del 85,89% para secuestrar micotoxinas obtenidas con una composición de la presente invención y un aumento de la adsorción de aflatoxina B1 del 2,65 hasta el 53,70% (ver, 5 por ejemplo, el Ejemplo 3).

En algunas formas de realización, la presente invención provee métodos para producir células de levadura que comprenden una pared celular de levadura 10 entrelazada con arcilla. En algunas formas de realización, las células de levadura que comprenden una pared celular de levadura entrelazada con arcilla se producen en una variedad de escalas (por ejemplo, escala de ensayo, escala de lotes, escala piloto, escala de 15 preproducción, escala de producción, escala comercial, escala industrial). En algunas formas de realización, la levadura se cultiva en un fermentador. Un fermentador puede ser de cualquier tamaño (por ejemplo, 5 litros...10 litros... 25 litros... 50 litros... 100...500 litros...1K litro...5K 20 litros...10K litros...50K litros...100K litros...500K litros...1 millón de litros, etc.) para producir la escala de levadura deseada para usar con la presente invención (por ejemplo, escala de ensayo, escala piloto, escala industrial, etc.). En algunas formas de realización, el 25 medio para cultivar la levadura puede ser de cualquier composición apropiada para cultivar levadura de acuerdo con la presente invención. Los nutrientes apropiados son fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, magnesio, azufre, potasio y elementos de traza. En algunas formas de 30 realización, se añaden nutrientes al cultivo en concentraciones (% p/p del compuesto fuente) dentro de los rangos (porcentajes en peso): fuente de carbono 0,01 - 20% (por ejemplo 0,05 - 10%), fuente de nitrógeno 0,001

- 10% (por ejemplo 0,001 - 3%), fuente de fósforo 0,001 - 5% (por ejemplo 0,01 - 0,5%), fuente de magnesio 0,001 - 0,2% (por ejemplo 0,001 - 0,2%), fuente de azufre 0,01 - 0,25% (por ejemplo 0,01 - 0,25%), fuente de potasio 0,001 - 05% (por ejemplo 0,01 - 0,25%), fuente de nitrógeno orgánico 0,001 - 5% (por ejemplo 0,01 - 5%) y elementos de traza se añaden en exceso. En algunas formas de realización, el medio de cultivo de levadura comprende agua, fuente de carbono (por ejemplo, azúcar, glucosa, dextrosa, caña de azúcar, melazas, etc.), fuente de nitrógeno apropiada (por ejemplo, amonio, urea, etc.), fuente de aminoácido (por ejemplo, peptona, etc.), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, hipocloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, sulfato de zinc, etc.) y fuente de arcilla o componente de arcilla (por ejemplo zeolita, bentonita, aluminosilicato, montmorilonita, esmectita, caolinita, organoarcilla, mezclas de ellos, etc.). En algunas formas de realización, los componentes del medio de cultivo de levadura pueden estar presentes en cualquier cantidad apropiada para el cultivo de células de levadura (ver, por ejemplo, el Ejemplo 5). En algunas formas de realización, la presencia de arcilla en medios de cultivo de levadura presenta complicaciones no anticipadas para protocolos de cultivo de levadura estándar. En algunas formas de realización, la presencia de arcilla en medio de cultivo da como resultado cantidades de espuma inusualmente grandes en el fermentador. En algunas formas de realización, la presente invención provee agentes antiespumantes en el medio de cultivo celular (por ejemplo, antiespumantes moleculares no siliconados, antiespumantes a base de aceite (por ejemplo, aceite mineral, aceite vegetal, aceite blanco, etc.),

antiespumantes en polvo (por ejemplo, sílice), antiespumantes a base de agua, antiespumante a base de siliconas, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, poliacrilatos de alquilo, etc.). En
5 algunas formas de realización, los agentes antiespumantes se requieren para aumentar la escala de la presente invención. En algunas formas de realización, el uso de un agente antiespumante se asocia con una capacidad mejorada para aumentar la producción de una composición de la
10 invención.

PARTE EXPERIMENTAL

Se proveen los siguientes ejemplos a efectos de demostrar e ilustrar en mayor grado determinadas formas
15 de realización preferidas y aspectos de la presente invención, y dichos ejemplos no han de interpretarse como un límite de los alcances de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

20 *Cultivo de levadura.* Se utilizó el siguiente protocolo para cada fermentador Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, EE.UU.) para cultivar la levadura *Sacchromyces cerevisiae* (levadura seca activa, ADY (active dry yeast) de Fermin,
25 Alltech Inc., Lote #689, Recuento de levadura: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad: 92.6%). Se preparó el inóculo de levadura mediante la transferencia de 28 g de ADY Fermin fresco a una botella precalentada de 250 ml de agua estéril desionizada. Seguidamente, se incubó la
30 solución a 30°C (en un baño de agua) durante 20 min y se sometió al vórtice varias veces. El medio del BioFlow estaba compuesto de 66 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 4 g de dextrosa, 4 g de base de nitrógeno para

levadura y 1750 mL de agua desionizada. Se produjo un lote de control para lo cual se utilizó se cultivó levadura sola, lo que requirió 250 mL adicionales de agua desionizada añadida al volumen del reactor. Se produjeron
5 tres lotes que contenían levadura y bentonita K10 (Fluka) mediante la adición de 8, 16, y 32 g al reactor. Se calentó el medio del reactor Bioflow a 30°C, y se inyectó aire con un caudal de 1L/min durante diez minutos antes de la inoculación. Se ajustó la agitación a 300 rpm y se
10 supervisó el medio y se lo mantuvo a un pH mínimo 5,0 durante la totalidad del cultivo. Se añadió un agente antiespumante (Antifoam AES, 1:10, en la medida de lo necesario). A continuación se inyectó DAP (Ammonium phosphate dibasic, fosfato de amonio dibásico) de manera
15 aséptica (4 g en 10 mL a pH 4.0). La levadura previamente suspendida fue añadida en el fermentador. Se verificó el nivel de glucosa durante el cultivo mediante tiras diabéticas (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y se añadió glucosa
20 complementaria cuando el nivel de la glucosa cayó por debajo de 0,8 mg/mL. Se incrementó la agitación progresivamente a 500 rpm a lo largo de 2 horas de la incubación, así como también el caudal de aire (hasta 4 L/min a lo largo de tres horas). Cuando la mitad del
25 sustrato de glucosa complementaria se hubo consumido, se añadió bentonita adicional (8, 16, 32 g en 250 ml de agua desionizada) al reactor de manera de obtener una concentración final de 0,5%; 1,0%; y 2,0%, respectivamente, de arcilla en el medio final.

30 Se cosecharon cultivos de levadura cuando se hubo utilizado la totalidad del azúcar. Se recolectó el contenido del BioFlow en botellas estériles, y se centrifugó a 4.000 g durante 20 minutos. Se retiró el

material sobrenadante y se lavaron las pellas con NaCl al 0,125 % en H₂O. Se separaron las pellas en dos fracciones mediante la formación distinta de dos capas después de la centrifugación: (i) una capa que contenía arcilla; e (ii) una capa que contenía levadura y arcilla. Seguidamente se lavaron las levaduras tres veces con una solución de NaCl al 0,125% NaCl.

Método de la extracción de las paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla. Para la aislación de las fracciones de paredes de célula de levadura con respecto a la levadura producida como se describe en lo que precede, se utilizaron dos métodos separados.

En un primer método, se utilizó un "micrométodo" en el que se emplean perlas de vidrio y un homogeneizador (minibead beater) (Bead-Beater, Model #1107900, Biospec Products, Inc., Hamilton Beach/Proctor-Silex, Inc., Southern Pines, North Carolina, EE.UU.). Las pellas fueron resuspendidas con dos volúmenes de Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, con PMSF (phenylmethylsulfonofluoride, sulfonofluoruro de fenilmetilo), y golpeadas con perlas de vidrio (suspensión de levadura: perlas 50:50) en un volumen total de 5 mL durante 30 segundos con un intervalo de reposo de un minuto, todo este tiempo sobre hielo. Se repitió el golpeteo diez veces o hasta que el 95% de las células estaban desintegradas. Se recolectaron las perlas y se las lavó. Se reunieron las fracciones y se las centrifugó a 4.000 g durante 20 min. Las pellas fueron seguidamente reunidas, secadas por congelación y molidas.

En un segundo método, las pellas de levadura fueron suspendidas con agua desionizada estéril hasta una concentración de 13 a 15 % de material seco. La suspensión de levaduras fue sometida a agitación a 60°C.

Se ajustó el pH mediante la utilización de NaOH al 10 % hasta pH = 8,0, antes de añadirse enzima a razón de 0,3 mL/L. La temperatura y las condiciones de agitación se mantuvieron a lo largo de ocho horas. Se supervisó el pH y se lo ajustó cada 15 minutos (para lo cual se utilizó se utilizó el NaOH al 10%) durante las primeros dos horas, y a continuación se supervisó el pH y se lo ajustó cada hora durante las siguientes seis horas. Se transfirió la suspensión a botellas de centrifugación estériles, y se centrifugó a 4.000 g durante 20 minutos. El material sobrenadante fue descartado y se lavaron las pellas con tres volúmenes de agua estéril fría, y seguidamente se centrifugó nuevamente a 4.000 g durante 20 minutos. Se repitió el paso de lavado dos meses antes de congelar las pellas, secarlas por congelación y molerlas.

EJEMPLO 2

Caracterización de los extractos de paredes de célula de levadura mediante perlas de vidrio y un homogeneizador a partir de células de levadura cultivadas en ausencia y presencia de arcilla

Se desintegraron células de levadura después de la resuspensión de las células de levadura en tampón Tris-HCl, pH 7,4, con PMSF para lo cual se utilizó un micro método con un homogeneizador de perlas y perlas de vidrio, como anteriormente descrito (véase el Ejemplo 1). Seguidamente se analizaron los lisatos de las paredes de célula a efecto de caracterizar las paredes de célula de levadura en cuanto a su capacidad de adsorber las micotoxinas (expresada en forma de un porcentaje de eficacia comparado con la totalidad de micotoxinas presentes) bajo condiciones de pH fisiológicas para cada micotoxina individual considerada. La actividad de

adsorción/ligación global fue evaluada cinéticamente. Las muestras de ensayo comprendieron un mínimo de 5 niveles hasta 10 niveles de concentración de micotoxina ensayada con las diferentes preparaciones de paredes de célula de levadura utilizadas con una concentración entre 0,25 y 4g/L dispersadas en un medio acuoso con un valor de pH = 4 fijo representativo de las condiciones digestivas del pH en el tracto de los animales. Se calculó una evaluación de la adsorción mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía con Líquido de Elevada Performance) acoplado a detectores fluormétricos y de conjuntos de diodos (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y de micotoxina adsorbida/secuestrada).

Los datos se han representado en la Figura 3. Los extractos de paredes de célula de levadura obtenidos de las células de levadura cultivadas en la presencia de arcilla (células de levadura entrelazadas con arcilla), presentan una capacidad significativa, no prevista, de secuestrar y adsorber zearalenona (por ejemplo, por el hecho de presentar una eficacia del 79,33% para las paredes de célula de levadura extraída de ser una de levadura cultivadas en la presencia de 2% de arcilla en comparación con una eficacia de solamente 6,91% de las paredes de célula de levadura extraídas de células de levadura cultivadas en la ausencia de arcilla. El coeficiente de eficacia del 79,33 para las composiciones de paredes de célula de levadura extraídos de células de levadura cultivadas en la presencia de 2% de arcilla fue también significativamente más elevado que los coeficientes de eficacia anteriormente documentados de solamente el 44,7% para una composición convencional que comprende una combinación de extracto de paredes de

célula de levadura al cual se añade posteriormente una arcilla sobre una base de mezcla seca. El nivel de la inclusión de los secuestrantes producto para AFB1 y ZEA fue respectivamente de 0,1 y 0,4% en el medio de la
5 reacción que se mantuvo con un pH = 4,0 constante. Se llevó a cabo el ensayo bajo agitación orbital durante 90 minutos a 37°C y se evaluó la cantidad de toxina ligada mediante HPLC equipada con un detector de fluorescencia.

Adicionalmente, la levadura cultivada en la
10 presencia de arcilla presentó una alteración significativa en los componentes/estructura de las paredes de célula. Por ejemplo, a medida que se aumenta la cantidad de arcilla, aumenta la relación manano:glucano (por ejemplo, a medida que la arcilla
15 aumenta de 0, 0,5%, 1,0% a 2,0%, la relación manano:glucano aumenta de 1,01 a 1,2, 1,35 y 1,45, respectivamente. La cantidad total de proteína también aumentó al aumentar la cantidad de arcilla añadida al medio de cultivo de las células.

20 **EJEMPLO 3**

Caracterización de los extractos de paredes de célula de levadura aislados mediante la utilización de corte de proteínas a partir de células de levadura cultivadas en ausencia y presencia de arcilla

25 Se trataron células de levadura con una proteasa como se describe en el Ejemplo 1. Seguidamente se analizaron los lisatos de las paredes de célula a efectos de caracterizar las paredes de célula de las levaduras y su capacidad de adsorber las micotoxinas (expresada como
30 un porcentaje de eficacia en comparación con la totalidad de micotoxinas presentes) bajo condiciones de pH fisiológicas para cada micotoxina individual considerada. Se evaluó la capacidad global de adsorción cinéticamente.

Las muestras de ensayo comprendían un mínimo de 5 niveles hasta las 10 niveles de concentraciones de micotoxinas ensayadas con las diferentes preparaciones de paredes de célula de levadura utilizados con una concentración entre 0,25 y 4 g/L dispersas en un medio acuoso con un valor de pH = 4,0 fijo) representativo de las condiciones digestivos del pH en el tracto de los animales. Se calculó la evaluación de la adsorción mediante un HPLC (High Performance Liquid Chromatography) acoplado a detectores fluorométricos y de conjuntos de diodos (por ejemplo, para detectar cantidades de micotoxina y micotoxina adsorbida/secuestrada).

Los datos se muestran en la Figura 4. Los extractos de paredes de célula de levadura entrelazadas con arcilla, obtenidos a partir de células de levadura cultivadas en la presencia de arcilla, presentaron una capacidad significativa, no prevista, de secuestrar y/o adsorber zearalenona y aflatoxina B1. Por ejemplo, los extractos de paredes de célula de levadura obtenidas de levadura cultivada en la presencia de arcilla al 2,0% presentaron una eficacia del 85,89% para la zearalenona, mientras que los extractos de paredes de célula de levadura obtenidas de levadura cultivada en la ausencia de arcilla, presentan un coeficiente de eficacia de adsorción de solamente el 69%. Los extractos de paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla, obtenidos de levadura cultivada en la presencia de arcilla al 2,0%, presentaron una eficacia del 53,7% para la aflatoxina B1, mientras que los extractos de paredes de célula de levadura obtenidos de levadura cultivada en la ausencia de arcilla, presentan un índice de eficacia de adsorción de solamente el 2,65%. Adicionalmente, la levadura entrelazada con arcilla cultivada en la presencia de

arcilla presentó una alteración significativa en los componentes/estructura de las paredes de célula. El nivel de inclusión de los secuestrantes producto para AFB1 y ZEA fueron respectivamente de 0,1 y 0,4 % en el medios de reacción que fue mantenido con un pH = 4,0 constante. El ensayo se llevó a cabo bajo agitación orbital durante 90 minutos a 37°C y se evaluó la cantidad de toxina ligada mediante HPLC equipado con un detector de fluorescencia.

Se utilizó el método del Ejemplo 1 con fuentes alternativas de levadura a efectos de evaluar la influencia de una arcilla esmectita (American Colloid Company, Arlington Height, IL, Estados Unidos) añadida en una concentración de 1,0 % en el medio de cultivo sobre la composición del material de paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla. Se investigaron tres tipos de levadura pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae*, ADY Fermin (08-032/460-89), una levadura de hornear de Levapan (Lote # 7169281, Levapan S.A., Bogota, Columbia) y una levadura seca activa de DCL (lote #1390, DCL Yeast Ltd., Alloa, Gran Bretaña).

Se observó una variación entre las paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla con niveles de 19,9, 17,0 y 10,3% de glucano; 10,6, 10,4, y 8,4% de manano; y 1,5, 1,4, 0,9% de quitina (N-acetil-glucosamina) presente en las paredes de célula de levadura (y expresado con referencia a la célula total) para ADY Fermin, Levapan, DCL CIYCW antes de la hidrólisis.

La eficacia del secuestro de material producido también presentó diferencias de acuerdo con el tipo de célula de levadura seleccionado (Véase la Figura 9). Las variaciones observadas en términos de eficacia también estaban relacionadas con el tipo de micotoxina considerado.

EJEMPLO 4

Formación de imágenes de microscopía electrónica de extractos de paredes de célula de levadura obtenidas a partir de células de levadura cultivadas en la ausencia y presencia de arcilla

Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de formas de realización de la invención a efectos de caracterizar y observar varias muestras de levadura (Véase, por ejemplo, la Figura 2). Se prepararon las muestras mediante la filtración de una solución rehidratada de levadura en GTA (glutaraldehído) al 2,5 % en una solución de NaCl al 0,85 %. Seguidamente se filtró la solución a través de un nucleoporo de nylon de 13 mm de diam., tamaño de los poros 0,1 μ m prehumedecido con NaCl al 0,85 %. Seguidamente se transfirió el filtro a un plato de Petri y se recubrió con gotas de agente de fijación GTA/cacodilato (Cac) a la temperatura ambiente durante 90 min. A continuación se enjuagaron los filtros con Na Cac 0,1 M pH 7,2. Se efectuó la fijación secundaria mediante la colocación de los filtros en un tubo durante 60 minutos con 100 μ L de tetróxido de osmio al 2 % en 0,1 M Na Cac pH 7,2. Seguidamente se enjuagaron las muestras con Na Cac 0,1 M pH 7.2 y 3 veces con agua desionizada. Se llevó a cabo la deshidratación de la muestra mediante series de etanol (de 25% a 100%). Seguidamente se secaron las muestras por congelación, se las montó sobre un elemento preparado con cintas de carbono para fines de conductividad, y se recubrió con una aleación de Au/P. Se efectuaron las observaciones a 3,0 keV en un S-4300 FESEM (Hitachi, Japón). A efectos de remover cualquier interacción no específica entre levadura y arcilla, se aplicó una corriente gaseosa

altamente presurizada de nitrógeno sobre cada muestra montada antes de recubrir con Au/P.

EJEMPLO 5

5 Escalamiento semiindustrial de la producción de paredes de célula de levadura cultivadas con arcilla

Cultivo escalado de levadura. Se utilizó un frecuentador de 150 L (ML-4100, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, EE.UU.) para cultivar la levadura *Sacchromyces cerevisiae* (ASY (active dry yeast, levadura seca activa) de Fermin, Alltech Inc., Lote #609, recuento de levaduras: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad 92,6%). Se preparó el inóculo de levadura transfiriendo 0,84 kg de ADY Fermin fresco a un carboy anteriormente sometido a autoclave (a 121°C durante 40 min) de 19 L provisto de tubería, recubierto con un BioShield que contenía 7,5 L de agua y que había sido mantenido después de autoclave a 30°C en una incubadora durante la noche. Se prepararon dos carboy de alimento de 19 L, recubiertos con un BioShield, mediante la adición de 9 L de agua, 6 kg de dextrosa y una barra de agitación. Después de mezclado y disolución de la fuente de carbono, el medio alimento fue sometido a autoclave (121 °C durante 40 min). Se preparó una solución de nitrógeno con una botella tapada 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 botellas tapadas estériles de 1 L de nitrógeno de alimento mediante la adición de 700 mL de agua desionizada, 192 g de fosfato de diamonio ajustado a pH 4,0-4,1 con HCl concentrado. Se preparó una solución de base en un carboy de 19 L, recubierto con un BioShield y que contenía 13,5

L de agua, 1,5 L de KOH. Seguidamente se conectó la tubería a una bomba peristáltica. Se preparó una solución de agente antiespumante (Antifoam AES, 1:10) en un carboy de 19 L con tubería, recubierto con un BioShield y que
5 contenía 12 L de agua, 3 L de agente antiespumante (Antifoam AES, 3 kg), y se mezcló. Seguidamente se conectó la tubería a una bomba peristáltica. El medio del fermentador de 150 litros estado compuesto de 1,98 kg de ámbar, 0,3 kg of peptona, 0,12 kg of dextrosa, 0,12 kg de
10 base de nitrógeno de levadura, 0,516 g de arcilla esmectita (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, USA) y 60 L de agua fue llevada a 121°C, 15 psi durante una hora bajo agitación. Se enfrió el medio a 30°C, y se mantuvo esta temperatura durante la
15 propagación.

Se llevó a cabo la propagación en el frecuentador de 150 L mantenido a 30 °C bajo agitación moderada (70% de la potencia) e inyección de aire (a 5 psi) antes de la
inoculación y durante la totalidad de la fermentación. El
20 inóculo que contenía 0,84 kg de ADY en 7.5 L de agua fue sometido a agitación durante 20-30 min antes de la inoculación en el frecuentador de 150 L. Se añadió una botella de nitrógeno de alimento a cada carboy de alimento bajo mezclado. La solución de nitrógeno fue
25 bombeada en el fermentador de 150 L y se las dejó mezclarse durante un mínimo de 10 minutos antes de la inoculación. Se fijó el Carboy antiespuma, y se bombeó el agente antiespumante a través de la tubería dentro del fermentador 150 L, en función de necesidad. Se colocó una
30 sonda de espuma dentro del fermentador a efectos de supervisar la formación de espuma y para permitir el completado correcto con el agente antiespuma. Se fijó la solución de base y se la bombeó a través de la tubería en

el fermentador de 150 L de acuerdo con necesidad. Se supervisó la evolución del pH del medio del fermentador de 150 L, y se lo mantuvo en un mínimo de pH 5,0 durante la totalidad del cultivo. Se llevó a cabo la inoculación
5 fijando el Carboy del inóculo al portillo y bombeando el contenido en el fermentador de 150 L. El mezclado del inóculo dentro del fermentador fue llevado a cabo 20 a 30 minutos antes de la primera toma de muestras. Se supervisó la espuma a lo largo de la propagación,
10 ajustándose el aire y la agitación cada hora. Se supervisó el pH internamente y externamente y se ajustó en la medida de lo necesario para mantener el pH a un valor 5,0 o superior. Se ensayó el nivel de glucosa durante el cultivo mediante tiras diabéticas (OneTouch,
15 UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y se añadió glucosa complementaria cuando el nivel de las glucosa caía por debajo de 0,8 mg/mL mediante bombeo lento en la solución de alimento o acelerándose gradualmente a lo largo del tiempo. Si el nivel del
20 azúcar subía arriba de 0,8 mg/mL, se desaceleró la velocidad de alimentación o se lo detuvo por completo en caso de necesidad.

Se cosecharon cultivos de levaduras cuando se hubo utilizado todo el azúcar. El contenido del fermentador de
25 150 L fue reunido en botellas estériles y centrifugado a 4.000 durante 20 min. Se retiró el material sobrenadante, y se midió el porcentaje de material seco de la levadura lavada. Seguidamente se transfirió la levadura lavada de regreso al fermentador de 150 L y se añadió agua a
30 efectos de llevar la suspensión de una concentración de 9 - 11 % a una concentración de 13-15% de material seco. La agitación se mantuvo en todo momento.

Extracción de paredes de célula de levadura entrelazada mediante hidrólisis de enzima. La suspensión de levadura de material seco de 13-15% fue sometida a agitación a 60°C. Se ajustó el pH mediante NaOH al 10 % hasta pH = 8,0, antes de añadir enzima a 0,3 mL/L. Las condiciones de temperatura y de agitación se mantuvieron a lo largo de ocho horas. Se supervisó el pH y se lo ajustó cada 15 minutos (mediante el NaOH al 10%) durante las primeras dos horas, y seguidamente se supervisó el pH y se lo ajustó cada hora durante las siguientes seis horas. Se transfirió la suspensión a botellas centrífugas estériles y se centrifugó a 4.000 g durante 20 minutos. Se descartó el material sobrenadante y se lavaron las pellas con tres volúmenes de agua estéril fría, y seguidamente se centrifugó nuevamente a 4.000 g durante 20 min. Se repitió el paso de lavado dos veces antes de congelar las pellas, y se secó por congelación y se molió. El incremento de la temperatura durante la fase de secado por spray tuvo como resultado un rendimiento ligeramente superior y una menor acumulación de producto en el secador de spray.

La inclusión del material arcilla puede ser seguida por un cambio en la concentración de ceniza en la muestra que llega a valores de aproximadamente 20 % para las paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla a diferencia de una concentración del cinco por ciento en extractos de paredes de célula de levadura que no contiene ningún material arcilla (Véase la Figura 6). También se observó una diferencia significativa en términos de composición entre las líneas de células de levadura ADY Fermin producida anteriormente en los fermentadores Bioflow a diferencia del fermentador de 150 L, con una disminución de la composición de glucano y

manano en la producción en gran escala, pero también un incremento del contenido de quitina en las paredes de célula de levadura (de 1,5% a 3%) lo que explica la respuesta de las paredes de célula de la levadura frente a agentes perturbadores en los que interviene la trayectoria de señalización de las paredes de célula.

Se evalúan los productos CIYCW en escala semiindustrial a efectos de determinar la eficacia en el secuestro de las micotoxinas (Véase, por ejemplo la Figura 7), y los resultados confirman el incremento de la capacidad de adsorción de micotoxina por el CIYCW.

EJEMPLO 6

Producción de paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla mediante la utilización de una fuente industrial de azúcar

Cultivo de levadura. Una cantidad de *Sacchromyces cerevisiae* (levadura seca activa (ADY) de Fermin, Alltech Inc., recuento de levaduras: $2,38 \times 10^{10}$ células/gramo, viabilidad: 92.6%) fue cultivada en un fermentador Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, EE.UU.). Se preparó el inóculo de levadura transfiriendo 29 g de ADY Fermin fresco a una botella recalentada de 87 ml de agua desionizada estéril. Seguidamente se incubó la solución a 30°C (en un baño de agua) durante 20 min y se sometió a vórtice varias veces. El medio de BioFlow está compuesto de 0,048 g de hipocloruro de calcio, 0,24 g de sulfato de magnesio, 0,169 g de sulfato de cinc, 0,24 g de cloruro de magnesio, 2,4 g (2,5 ml de alimento preparado) mosto de caña de azúcar, 7,5 arcilla esmectita (0,5 % en el medio final, (American Colloid Company, Arlighton Height, IL,

USA)) y 1.440 mL de agua desionizada. El mosto de caña de azúcar consiste en una solución al 30 % de TRS (total reducing sugars, azúcares reductores totales) de molazas diluidas con agua. La preparación del mosto fue efectuada
5 con 669 g de molazas (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 calentó el medio del reactor Bioflow a una temperatura de 30°C, y se inyectó aire con un caudal de
10 1L/min durante diez minutos antes de la inoculación. Se ajustó la agitación a 300 rpm y se supervisó el medio y se mantuvo un pH mínimo de 5,0 durante la totalidad del cultivo, para lo cual se utilizó ácido fosfórico, 85%. Se añadió agente anti espuma (Antifoam AES, 1:10, en la
15 medida de lo necesario). La levadura, previamente resuspendida, fue añadida al fermentador. Se ensayó el nivel de glucosa durante el cultivo con tiras diabéticas (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, EE.UU.) y alimento adicional (del mosto de
20 caña de azúcar) cuando el nivel de la glucosa caía por debajo de 0,8 mg/mL. Se incrementó la agitación regresivamente a 500 rpm a lo largo de dos horas de incubación así como el caudal del aire (a hasta 4 L/min a lo largo de tres horas). La concentración final de
25 arcilla en el reactor era de 0,5 % en el medio final.

La cantidad de molazas a ser añadidas en el fermentador dependía de la eficiencia de la levadura para utilizar el azúcar, y se hallaba comprendida entre 400 y 600 g. La sobrealimentación con molazas encontró
30 problemas productivos con los resultados de la incapacidad de generar cualquier biomasa de levadura por medio de la fermentación. Se cosecharon los cultivos de levadura cuando ya no se observó un cultivo ulterior. El

contenido del BioFlow fue recogido en botellas estériles y centrifugado a 4.000 g durante 20 minutos. Se retiró el material sobrenadante, y se lavaron las pellas con NaCl al 0,125 % NaCl en H₂O. No se halló ninguna fracción
 5 separada cuando se utilizaron molazas para llevar a cabo la propagación de la levadura. Seguidamente se lavaron las levaduras tres veces con solución de NaCl al 0,125.

Método de extracción de paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla Se resuspendieron levaduras con
 10 agua desionizada estéril hasta una concentración de 13 a 15 % de material seco. La suspensión de levaduras fue sometida a agitación a 60°C. Se ajustó el pH mediante NaOH al 10 % a pH = 8,0 antes de añadir enzima a razón de 0,3 mL/L. Las condiciones de temperatura y de agitación
 15 se mantuvieron a lo largo de ocho horas. Se supervisó el pH y se lo ajustó cada 15 minutos (para lo cual se utilizó el NaOH al 10%) durante las primeras dos horas, y seguidamente se supervisó el pH y se lo ajustó cada hora durante las seis horas siguientes. La suspensión fue
 20 transferida a botellas de centrifugadora estériles y centrifugada a 4.000 g durante 20 minutos. Se descartó el material sobrenadante y se lavaron las pellas con tres volúmenes de agua estéril fría, y seguidamente se centrifugó nuevamente a 4.000 g durante 20 min. Se
 25 repitió el paso del lavado dos veces antes de congelar las pellas, secárselas por congelación y molérselas.

La eficacia de secuestro del material producido también presentó diferencias de acuerdo con la fuente de carbono utilizado para propagar la levadura (Véase la
 30 Figura 8). Las variaciones observadas en términos de eficacia también estaban relacionadas con el tipo de micotoxina considerada. La composición del material era también diferente de la composición del material

producido con dextrosa como única fuente de carbono. Se encontraron niveles de 13,4 % de glucano, 17,8% de manano; y 2.7% de quitina (N-acetil-glucosamina) presentes en las paredes de célula de la levadura (y expresados con referencia a la célula total).

EJEMPLO 7

Eficacia In vivo contra micotoxicosis de *Fusarium*

Unos polluelos de pavo híbrido BNO de un día de edad (Hybrid Turkeys, Kitchener, ON, Canadá) fueron pesados individualmente, se les ataron las alas, y se los distribuyó aleatoriamente en grupos en la estación de investigación Arkell Poultry Research Station de la Universidad de Guelph. A los pollos se les asignó aleatoriamente una de cada cinco dietas. Los pollos fuera inicialmente mantenidos a 32°C, y se redujo la temperatura gradualmente en 3°C por semana de manera de llegar a una temperatura de 21°C al final de la semana 4. Se mantuvo esta temperatura durante una duración del experimento. A los polluelos de pavo se los alimentó con una dieta inicial basada en harina de maíz, trigo y soja (semanas 0-3), y dietas de desarrollo (semanas 4-6) formuladas con granos de control, paredes de célula de levadura de control + entrelazado con 0,2% de arcilla, granos contaminados, y granos contaminados + paredes de célula de levadura entrelazadas con 0,2 % de arcilla. La dieta de control fue formulada de manera de satisfacer o superar los requerimientos nutrientes mínimos para pavos de acuerdo con la norma NRC (1994). Se prepararon dietas contaminadas con micotoxinas mediante el reemplazo del 25 y 10% y 26 y 5% del maíz y trigo de control por maíz y trigo contaminado naturalmente con micotoxinas de *Fusarium* durante las fases inicial y de crecimiento,

respectivamente. Los niveles de reemplazo de los granos de control por los granos contaminados fueron calculados de manera de obtener una exposición a la micotoxina de aproximadamente 4 mg de DON/kg de dieta de durante las

5 fases inicial y de crecimiento. Se prepararon dietas complementadas con adsorbente polimérico glucomanano, para lo cual se sustituyó el maíz de control en las dietas con 0,2 % de paredes de célula de levaduras entrelazadas con 0.2 % de arcilla (CIYCW). Se provee

10 alimento y agua ad libitum. Se tomaron muestras representativas de alimento al inicio de cada fase para los análisis proximal y de micotoxina. Los contenidos dietarios de proteína, material seco y cenizas fueron determinados de acuerdo con la Association of Official

15 Analytical Chemists (1980). En la Tabla 1, se muestra las formulaciones de las dietas y los contenidos nutrientes. Los procedimientos del experimento fueron aprobados por la University of Guelph Animal Care Committee en base a las directivas del Canadian Council on Animal Care.

20

Tabla 1. Composiciones de dietas experimentales (%)

Ingredientes	Dieta inicial (semanas 0 a 3)			
	Control	Control + CIYCW	Contaminada	Contaminada + 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 monocálcico	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
Vitamina y mineral, premezclados (1)	1,00	1,00	1,00	1,00
Anticoccidio (2)	0,10	0,10	0,10	0,10
CIYWC		0,20		0,20
<u>Valores calculados</u>				
ME, kcal/kg			2.800	
Proteína bruta			26,50	
Lisina			1,60	
Metionina			0,62	
Calcio			1,20	
Fósforo disponible			0,60	
<u>Valores analizados</u>				
Proteína bruta	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 desarrollo (semanas 4 a 6)			
	Control	Control + CIYCW	Contaminada	Contaminada + 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 monocálcico	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
Vitamina y mineral, premezclados (1)	1,00	1,00	1,00	1,00
Anticoccidio (2)	0,10	0,10	0,10	0,10
CIYWC		0,20		0,20
<u>Valores calculados</u>				
ME, kcal/kg			3.050	
Proteína bruta			23	
Lisina			1,36	

Metionina			0,5	
Calcio			1,1	
Fósforo disponible			0,52	
<u>Valores</u> <u>analizados</u>	23,31	24,29	24,27	27,70
Proteína bruta	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 provista por kg de dieta: vitamina A (todo-trans-retinil palmitato), 8.800 UI; colecalciferol, 3.300 UI; vitamina E (todo rac- α -tocoferil acetato); 40 UI; menadiona, 3,3 mg; tiamina, 4,0 mg; riboflavina, 8,0 mg; ácido pantoténico, 15,0 mg; niacina, 50 mg; pirodoxina, 3,3 mg; colina, 600 mg; ácido fólico, 1,0 mg; biotina, 220 μ g; vitamina B₁₂, 12 μ g; etoxiquina, 120 mg; manganeso 70 mg; cinc, 70 mg; hierro, 60 mg; cobre, 10 mg; yodo, 1,0 g; selenio, 0,3 mg.

(2) Monensin sodio, 10 %

Las concentraciones dietarias de DON, 15-acetil-DON, ZEN, fumonisina y ochratoxina A se indican en la Tabla 2. Otras micotoxinas se hallaban por debajo de los límites de detección del método que eran de 0,12 mg/kg para el nivalenol, 0,05 mg/kg para el 3-acetil-DON, 0,07 mg/kg para el neosolaniol, 0,06 para el diacetoxiscirpenol y toxina T-2 y de 0,04 mg/kg para la toxina HT, y de 0,001 mg/kg para las aflatoxinas. Los límites de detección para DON, 15-acetil-DON, ZEN, fumonisina y ochratoxina A eran

de 0,06, 0,05, 0,025, 0,05 y 0,0003 mg/kg, respectivamente.

Tabla 2.- Concentraciones de micotoxina (µg/g) en dietas experimentales

Dieta	Micotoxina (1)				
	Deoxinivelenol	15-acetil-deoxinivalenol	Zearalenona	Fumonisina	Ochratoxina A
Inicial (semanas 0-3)					
Control	0,44	0,055	<0,025	BDL (2)	0,46
Control + CIYCW	0,53	0,087	<0,025	BDL	0,79
Contaminado	3,3	0,17	0,35	56	BDL
Cotaminado + CIYCW	4,1	0,17	0,47	BDL	BDL
De desarrollo (semanas 4-6)					
Control	0,44	0,12	BDL	BDL	0,62
Control + CIYCW	0,37	0,12	BDL	BDL	0,71
Contaminado	3,7	0,29	0,34	61	1,0
Contaminado + CIYCW	3,2	0,28	0,27	63	0,35

5 (1) En las dietas experimentales también se midieron otras micotoxinas, que incluyeron deacetoxicirpenol, toxina T-2, nivalenol, 3-acetil-DON, neosolaniol, toxina HT-2, y aflatoxinas, pero no se detectaron.

10 (2) BDL, below detection limit, por debajo del límite de detección.

La alimentación con granos contaminados no influyó de manera significativa sobre la ganancia de peso corporal, consumo de alimentos y eficiencia de la

utilización del alimento al final de la fase inicial (Tabla 3). La alimentación con dieta contaminada incrementó de manera significativa la ganancia de peso corporal y mejoró la eficiencia alimenticia en comparación con el control al final de la fase de desarrollo. No hubo un efecto de la dieta sobre la ingesta de alimentos durante la fase de desarrollo (Tabla 3). Al final de la fase de desarrollo, el añadido de pared de célula de levadura entrelazada con arcilla en las dietas contaminadas incrementó la ganancia de peso corporal, consumo de alimentos y mejoró la eficiencia de la utilización del alimento en comparación con el control. La ganancia de peso corporal y la eficiencia del alimento a lo largo de un período experimental de seis semanas fueron significativamente más elevadas en las aves alimentadas con dietas contaminadas y con dietas contaminadas complementadas con paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla.

20 Tabla 3. Efecto de las micotoxinas dietarios de *Fusarium* sobre del desempeño en los pavos (1)

Dieta	Semanas 0-3	Semanas 4-6	Semanas 0-6
	Aumento (ganancia) de peso corporal (g/ave)		
Control	474,50	1.420,81	1.895,32
Control + CIYCW	501,45	1.461,74	1.963,19
Contaminado	511,93	1.527,97	2.084,90
Contaminado + CIYCW	502,00	1.627,63	2,129,64

SEM		15,35	29,48	37,59
Control vs Control + CIYCW		NS (2)	NS	NS
Control vs Contaminado		NS	0,0023	0,002
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	0,0002	0,0004
Contaminado vs Contaminado + CIYCW		NS	NS	NS
Ingesta de alimento(g/ave/día)				
Control		32,44	117,85	75,14
Control + CIYCW		33,54	116,87	75,20
Contaminado		33,75	119,86	76,81
Contaminado + CIYCW		33,87	124,40	79,13
SEM		0,91	2,21	1,40
Control vs Control+ CIYCW		NS	NS	NS
Control vs Contaminado		NS	NS	NS
Control vs Contaminado +		NS	0,05	NS

CIYCW			
Contaminado vs Contaminado + CIYCW	NS	NS	NS
Eficiencia del alimento (aumento de peso corporal/ingesta de alimento)			
Control	0,69	0,57	0,60
Control + CIYCW	0,71	0,59	0,62
Contaminado	0,71	0,61	0,63
Contaminado + CIYCW	0,71	0,62	0,64
SEM	0,01	0,008	0,008
Control vs Control + CIYCW	NS	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	0,0027	0,004
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	0,0007	0,001
Contaminado vs Contaminado + CIYCW	NS	NS	NS

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos, m = 4 corrales por aumento de peso corporal; ingesta de

alimento y eficiencia del alimento (7-8
aves/corral/fase)

(2) P > 0,05

La alimentación con granos contaminados incrementó
5 (P<0,05) los recuentos de eosinófilos en la semana 6
(Tabla 4). Los suplementos de dietas contaminadas con
paredes de célula de levadura contaminada a la dieta de
control, incrementó de manera significativa los
hematocritos en comparación con el método no
10 complementado. Hubo una reducción significativa en la
concentración de glucosa y en las actividades de la γ -
glutamyl transferasa en las aves alimentadas con dieta
contaminada a la semana 3 en comparación con el control
(Tabla 5). El complemento con pared de célula de levadura
15 entrelazada con arcilla en las dietas contaminadas
incrementó de manera significativa las concentraciones de
ácido úrico en comparación con el control en las semanas
3 y 6. Hubo una reducción significativa en la actividad
de la lactato dehidrogenasa en la semana 3 en las aves
20 alimentadas con dieta contaminada + paredes de célula de
levadura entrelazada con arcilla, en comparación con el
control.

25 Tabla 4. Efecto de las micotoxinas dietarios de *Fusarium*
sobre la hematología (1)

Dieta	Semana 3	Semana 6
Hemoglobina (g/L)		
Control	93,50	105,88
Control + CIYCW	98,12	107,88

Contaminado	93,50	109,75
Contaminado + CIYCW	95,87	106,38
SEM	2,27	1,80
Control vs Control+ CIYCW	NS (2)	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Hematocrito (L/L)		
Control	0,30	0,31
Control + CIYCW	0,32	0,31
Contaminado	0,30	0,32
Contaminado + CIYCW	0,30	0,32
SEM	0,005	0,007
Control vs Control + CIYCW	0,05	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS

MCHC (g/L)		
Control	302,80	335,38
Control + CIYCW	300,88	345,25
Contaminado	303,13	336,13
Contaminado + CIYCW	310,88	331,63
SEM	5,44	5,52
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs. Contaminado + CIYCW	NS	NS

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales (pens) y dos aves por corral.

- 5 Tabla 4. Efecto de las micotoxinas dietarios de *Fusarium* sobre la hematología (1) (continuación)

Dieta	Semana 3	Semana 6
	WBC ($10^9/L$)	
Control	15,37	16,75
Control +	18,71	16,75

CIYCW		
Contaminado	17,96	16,07
Contaminado + CIYCW	18,93	19,96
SEM	1,93	2,26
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Heterófilos ($10^9/L$)		
Control	6,20	9,37
Control + CIYCW	8,36	9,19
Contaminado	7,98	8,71
Contaminado + CIYCW	7,86	10,36
SEM	0,93	1,26
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado +	NS	NS

CIYCW		
Linfocitos ($10^9/L$)		
Control	7,37	5,54
Control + CIYCW	8,00	5,61
Contaminado	8,60	5,48
Contaminado + CIYCW	8,92	8,54
SEM	1,22	1,29
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales (pens) y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

5

Tabla 4. Efecto de las micotoxinas dietarios de *Fusarium* sobre la hematología (1) (Continuación).

Dieta	Semana 3	Semana 6
Monocitos ($10^9 /L$)		

Control		0,71	0,52
Control + CIYCW)		1,30	0,65
Contaminado		0,56	0,75
Contaminado + CIYCW		0,93	0,25
SEM		0,29	0,22
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs Contaminado		MS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	NS
Eosinófilos (10^9 /L)			
Control		0,27	0,15
Control + CIYCW		0,38	0,34
Contaminado		0,34	0,38
Contaminado + CIYCW		0,33	0,06
SEM		0,11	0,079
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs		NS	0,04

Contaminado		
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Basófilos (10^9 /L)		
Control	0,79	0,61
Control + CIYCW	0,65	0,89
Contaminado	0,47	0,74
Contaminado + CIYCW	0,87	0,71
SEM	0,19	0,18
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase $n = 4$ corrales (pens) y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$.

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de Fusarium sobre la química del plasma (1)

Dieta	Semana 3	Semana 6
Calcio (mmol/L)		
Control	3,05	2,94
Control + CIYCW	3,15	2,97
Contaminado	3,05	3.03
Contaminado + CIYCW	3,13	3,14
SEM	0,04	0,04
Control vs Control + CIYCW	NS (2)	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado +CIYCW	NS	0.002
Fósforo (mmol/L)		
Control	2,57	2,46
Control + CIYCW	2,59	2,44
Contaminado	2,67	2,47
Contaminado + CIYCW	2,64	2,64

SEM		0,08	0,06
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs Contaminado		NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	0,05
Proteína total (g/L)			
Control		29,12	31,25
Control + CIYCW		30,12	31,12
Contaminado		29,62	32,62
Contaminado + CIYCW		29,75	34,25
SEM		0,52	0,68
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs Contaminado		NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	0,003

1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

Dieta	Semana 3	Semana 6
Albúmina (g/L)		
Control	8,37	8,37
Control + CIYCW	8,12	8,62
Contaminado	8,25	8,50
Contaminado + CIYCW	8,75	9,00
SEM	0,29	0,25
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado +CIYCW	NS	NS
Globulina (g/L)		
Control	20,75	22,87
Control + CIYCW	22,00	22,50
Contaminado	21,37	24,12
Contaminado + CIYCW	21,00	25,25
SEM	0,55	0,57

Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	0,006
Relación: Albúmina/globulina		
Control	0,40	0,36
Control + CIYCW	0,37	0,38
Contaminado	0,38	0,35
Contaminado + CIYCW	0,42	0,35
SEM	0,01	0,01
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS

1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de Fusarium sobre la química del plasma (1) (Continuación).

Dieta	Semana 3	Semana 6
Glucosa (mmol/L)		
Control	18,35	17,82
Control + CIYCW	18,13	17,45
Contaminado	17,31	17,52
Contaminado + CIYCW	17,63	17,23
SEM	0,37	0,34
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	0,05	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Colesterol (mmol/L)		
Control	4,12	4,17
Control + CIYCW	3,99	4,23
Contaminado	4,10	4,04
Contaminado + CIYCW	4,03	3,73

SEM		0,12	0,13
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs Contaminado		NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	NS
bilirrubina total (mmol/L)			
Control		5,37	2,37
Control + CIYCW		5,87	2,37
Contaminado		4,87	2,12
Contaminado + CIYCW		5,12	2,62
SEM		0,70	0,38
Control vs Control + CIYCW		NS	NS
Control vs Contaminado		NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW		NS	ND

1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de Fusarium sobre la química del plasma (1) (Continuación).

Dieta	Semana 3	Semana 6
γ -glutamilttransferasa (U/L)		
Control	1,75	1,75
Control + CIYCW	2,00	1,50
Contaminado	0,75	1,87
Contaminado + CIYCW	0,87	1,00
SEM	0,33	0,18
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	0,04	NS
Control vs Contaminado+CIYCW	NS	0,008
Aspartato aminotransferasa (U/L)		
Control	211,38	212,63
Control + CIYCW	226,25	207,75
Contaminado	226,75	211,63
Contaminado + CIYCW	205,00	203,75
SEM	8,15	6,42
Control vs	NS	NS

Control + CIYCW		
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Creatina quinasa (U/L)		
Control	1.352,63	1.047,13
Control + CIYCW	1.309,38	907,63
Contaminado	1.649,25	953,38
Contaminado + CIYCW	1.147,00	1.086,63
SEM	173.46	145,41
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS

1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase n = 4 corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de Fusarium sobre la química del plasma (1) (Continuación).

Dieta	Semana 3	Semana 6
Amilasa (U/L)		
Control	809,63	877,38
Control + CIYCW	821,63	764,88
Contaminado	872,50	913,25
Contaminado + CIYCW	891,38	902,88
SEM	57,27	54,54
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	NS
Control vs Contaminado + CIYCW	NS	NS
Lipasa (U/L)		
Control	5,37	2,87
Control + CIYCW	4,37	4,50
Contaminado	4,75	3,62
Contaminado + CIYCW	5,87	4,25
SEM	0,94	0,72

Control	vs	NS	NS
Control + CIYCW			
Control	vs	NS	NS
Contaminado			
Control	vs	NS	NS
Contaminado + CIYCW			
Ácido Úrico (U/L)			
Control		247,75	167,13
Control + CIYCW		221,50	144,38
Contaminado		292,50	164,75
Contaminando + CIYCW		334,50	279,00
SEM		28,23	24,77
Control	vs	NS	NS
Control + CIYCW			
Control	vs	NS	NS
Contaminado			
Control	vs	0,03	0,003
Contaminado + CIYCW			

1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase $n = 4$ corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

Tabla 5. Efecto de micotoxinas de Fusarium sobre la
5 química del plasma (1) (Continuación).

Dieta	Semana 3	Semana 6
Lactato-deshidrogenasa (U/L)		
Control	664,88	531,00
Control + CIYCW	661,75	542,13
Contaminado	646,63	469,25
Contaminado + CIYCW	566,13	497,63
SEM	30,24	20,84
Control vs Control + CIYCW	NS	NS
Control vs Contaminado	NS	0,04
Control vs Contaminado + CIYCW	0,02	NS
Glutamato dehidrogenasa (U/L)		
Control	4,62	2,87
Control + CIYCW	3,25	2,62
Contaminado	4,25	2,37
Contaminado + CIYCW	3,50	2,50

SEM		0,70	0,36
Control	vs	NS	NS
Control + CIYCW			
Control	vs	NS	NS
Contaminado			
Control	vs	NS	NS
Contaminado +			
CIYCW			

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos; para cada dieta y fase $n = 4$ corrales y dos aves por corral.

(2) $P > 0,05$

- 5 La alimentación con granos contaminados disminuyó de manera significativa las actividades del lactato deshidrogenasa en la más semanas 6 en comparación con el control (Tabla 5). Los complementos de paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla impidieron esto. Hubo
- 10 un incremento significativo en las concentraciones de calcio y fósforo en las aves alimentadas con dieta contaminada y pared de célula de levadura entrelazada con arcilla en comparación con el control a la semana 6. La misma dieta en la semana 6 también disminuyó de manera
- 15 significativa las actividades de la γ -glutamyl transferasa en comparación con el control; Se observó un incremento significativo en las concentraciones de proteína total y globulina, y una disminución en los niveles de colesterol enlazadas alimentadas con dieta
- 20 contaminada cuando se suplementó con paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla.

La alimentación de pavos con granos naturalmente contaminados con micotoxinas de *Fusarium* tuvo como resultado una respuesta hermética con respecto al aumento de peso corporal y eficiencia del alimento. Las micotoxinas de *Fusarium* transportados con el alimento tuvieron algunos efectos sobre los parámetros de la sangre en comparación con los controles, lo que incluye menores actividades de lactato deshidrogenasa en la semana 6 y menores concentraciones de glucosa y una menor actividad de gamma-glutamyl transferasa en la semana 3. La alimentación con pared de célula de levadura entrelazada con arcilla impidió la totalidad de estos efectos. La alimentación con pared de célula de levadura entrelazada con arcilla tuvo como resultado incrementos numéricos ($P>0,05$) en el crecimiento en comparación con la alimentación con granos contaminados no complementados.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la precedente memoria descriptiva se incorporan en las presente a título de referencia. Diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y métodos descritos de la inversión serán evidentes a las personas con pericia en la especialidad, sin apartarse de los alcances y espíritu de la invención. Si bien se ha descrito la invención en conexión con formas de realización específicas preferidas, debe entenderse que la invención reivindicada no ha de quedar indebidamente limitada a tales formas de realización específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para implementar la invención que son obvias para las personas con pericia en los campos relevantes, están destinadas a recaer dentro de los alcances de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de levadura que comprende una pared de
5 célula de levadura que comprende arcilla o un componente
de arcilla entrelazado en dicha pared de célula de
levadura.

2. La célula de levadura de acuerdo con la
10 reivindicación 1, en donde dicha célula de levadura se
cultiva en un medio de cultivo celular que comprende
arcilla.

3. La célula de levadura de acuerdo con la
15 reivindicación 2, en donde dicha arcilla es una arcilla
mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de
silicato.

4. La célula de levadura de acuerdo con la
20 reivindicación 3, en donde dicha arcilla está
seleccionada del grupo que consiste en una zeolita, una
bentonita, un aluminosilicato, una montmorilonita, una
esmeclita, una caolinita, una organoarcilla y mezclas de
ellos.

25

5. La célula de levadura de acuerdo con la
reivindicación 4, en donde la arcilla es una arcilla de
aluminosilicato.

30 6. La célula de levadura de acuerdo con la
reivindicación 2, en donde la cantidad de arcilla en el
medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,125%
al 4,0%.

7. La célula de levadura de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,5% al 2,0%.

8. La célula de levadura de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha levadura está seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluiveromyces*, *Torulaspora* y sus combinaciones.

9. La célula de levadura de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Una composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se deriva de una célula de levadura cultivada en medio de cultivo que comprende una arcilla.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde se utilizar perlas de vidrio y una batidora de perlas para preparar dicha extracto de pared de célula de levadura.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde se utiliza un tratamiento enzimático para preparar dicha extracto de pared de célula de levadura.

14. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade a un forraje.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el alimento está seleccionado del grupo que consiste en una ración mezcla total (Total Mixed Ration, TMR), un forraje, un pellet, un concentrado, una premezcla, un coproducto, grano, grano de destilación, melazas, fibras, pienso, pasto, heno, grano, hojas, comida, sustancias solubles y un suplemento.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade al material orgánico.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade al agua.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde un líquido se filtra a través de dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho líquido es un jugo, agua, cerveza o vino.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, formulada para la alimentación de cualquier miembro del reino animal.

5 21. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, en donde dicho miembro está seleccionado del grupo que consiste en especies de aves, bovinos, porcinos, equinos, ovinos y caprinos, peces, mariscos, camélidos, felinos, caninos y roedores.

10

22. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla secuestra a una o varias micotoxinas.

15

23. La composición de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha micotoxina está seleccionada del grupo que consiste en Aflatoxinas, Zearalenona, Trichotecenes, Fumonisinias y Ochratoxinas.

20

24. La composición de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicha micotoxina está seleccionada del grupo que consiste en acetoxiscirpenodiol, acetildesoxinivalenol, acetilnivalenol, acetilneosolaniol, toxina de acetilo T-2, extendida a
25 todas las aflatoxinas, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, aflatrem, ácido altenuico, alternariol, austdiol, austamida, austocistina, avenaceína +1, beauvericina +2, bentenolida, brevianamida, butenolida, calonectrina, chaetoglobosina, citrinina, citreoviridina, cocliodinol,
30 citocalasina E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, diacetato de desoxinivalenol, monoacetato de desoxinivalenol,

diacetoxiscirpenol, destruxin B, enniatinas, extendidas a todas las ergot toxinas y endofitos, fructigenina +1, fumagilina, fumonisinas, fumonisins B1 y B2 y B3, Fusarenona-X, Fusarocromanona, ácido fusárico, fusarina, gliotoxina, toxina HT-2, ipomeanina, islanditoxina, lateritina +1, licomarasmina +1, malformina, maltorizina, moniliiformina, 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, scirpentriol, slaframina, stericoncentrated modified yeast cell wall extracttocistin, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricoxermina, tricoxetina, tricoxerrinas, tricoxerroles, triptoquivaleno, verrucarina, verruculógeno, viopurpurina, viomelleína, viriditoxina, xantocilina, iavanicina+1 y zearalenoles y zearalenona.

20

25. Un alimento animal que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una cantidad efectiva para secuestrar micotoxinas.

25

26. El alimento animal de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 10% en peso del alimento.

30

27. El alimento animal de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 4,0% en peso del alimento.

28. Un método para reducir la biodisponibilidad de micotoxinas en un animal o humano, que comprende:

- 10 a) proveer
 - i.) una composición que comprende una arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla; y
 - ii) un material consumido por un animal o
- 15 humano;
- b) incorporar dicha arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla en dicho material para producir una arcilla o material incorporado en el extracto de la pared
- 20 celular de levadura enlazado con componente de arcilla; y
- c) permitir que dicho animal o ser humano consuma dicha arcilla o material incorporado en el extracto de la pared celular de levadura enlazado con
- 25 componente de arcilla.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde dicho material es un alimento.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el 0,4% de dicha composición que comprende una arcilla o

extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla se añade en peso a dicho alimento.

31. El método de acuerdo con la reivindicación 28,
5 en donde dicho material es relleno.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31,
en donde aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el
99,0% de dicha composición que comprende una arcilla o
10 extracto de la pared celular de levadura enlazado con
componente de arcilla se añade en peso a dicho relleno.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 28,
en donde dicho material es un líquido.
15

34. El método de acuerdo con la reivindicación 33,
en donde aproximadamente el 0,0125% a aproximadamente el
99,0% de dicha composición que comprende una arcilla o
extracto de la pared celular de levadura enlazado con
20 componente de arcilla se añade en peso a dicho líquido.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 28,
en donde dicho animal está seleccionado del grupo que
consiste en especies de aves, bovinos, porcinos, equinos,
25 ovinos y caprinos, peces, mariscos, camélidos, felinos,
caninos y roedores.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 28,
en donde dicha composición que comprende una arcilla o
30 extracto de la pared celular de levadura enlazado con
componente de arcilla secuestra uno o varios tipos de
micotoxinas.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en donde dichas micotoxinas están seleccionadas del grupo que consiste en Aflatoxinas, Zearalenona, Trichotecenos, Fumonisinias, Ochratoxinas y sus combinaciones.

5

38. El método de acuerdo con la reivindicación 28, que también comprende incorporar un agente adicional en dicha arcilla o material incorporado en el extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla, en donde dicho agente está seleccionado del grupo que consiste en una esterasa, epoxidasa, llevadura y cepa bacteriana.

39. Un método de producción de una cantidad en escala comercial de arcilla o extracto de la pared celular de levadura enlazado con componente de arcilla que comprende:

- a) proveer:
 - i) cultivo inicial de levadura; y
 - ii) medio de cultivo de células de levadura, en donde dicho medio de cultivo de células de levadura comprende los nutrientes requeridos para el crecimiento de levadura y una arcilla o componente de arcilla;
- b) introducir dicho cultivo inicial de levadura en dicho medio de cultivo de células de levadura;
- c) incubar dicha levadura en un fermentador de escala industrial en condiciones configuradas para permitir el crecimiento de levadura, en donde dicha levadura incorpora dicha arcilla o componente de arcilla en la pared celular de la levadura durante el crecimiento;

- d) adición de un agente antiespumante a dicho fermentador;
 - e) lisar la arcilla o paredes celulares de levadura entrelazadas con el componente de arcilla;
 - 5 y
 - f) separar dichas paredes celulares de levadura entrelazadas con el componente de arcilla de los demás componentes de levadura.
- 10 40. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicha levadura está seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluiveromyces*, *Torulaspora* y sus combinaciones.
- 15 41. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicha arcilla es una arcilla mineral o arcilla sintética que pertenece al grupo de silicato.
- 20 42. El método de acuerdo con la reivindicación 40, en donde dicha arcilla está seleccionada del grupo que consiste en una zeolita, una bentonita, un aluminosilicato, una montmorillonita, una esmectita, una caolinita, una organoarcilla y mezclas de ellos.
- 25 43. El método de acuerdo con la reivindicación 42, en donde la arcilla es una arcilla de aluminosilicato.
- 30 44. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,125% al 4,0%.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la cantidad de arcilla en el medio de cultivo celular es de aproximadamente el 0,5% al 2,0%.

5 46. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicho fermentador en escala industrial está entre mil y cinco millones de litros.

10 47. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicho agente antiespumante se añade para aliviar efectos de dicha arcilla sobre el proceso de incubación.

15 48. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicho agente antiespumante está seleccionado del grupo que consiste en un antiespumante molecular no siliconado, antiespumante a base de aceite, antiespumante en polvo, antiespumante en base acuosa, antiespumante a base de silicona, antiespumante a base de polietilenglicol, antiespumante a base de polipropilenglicol y poliacrilatos de alquilo.

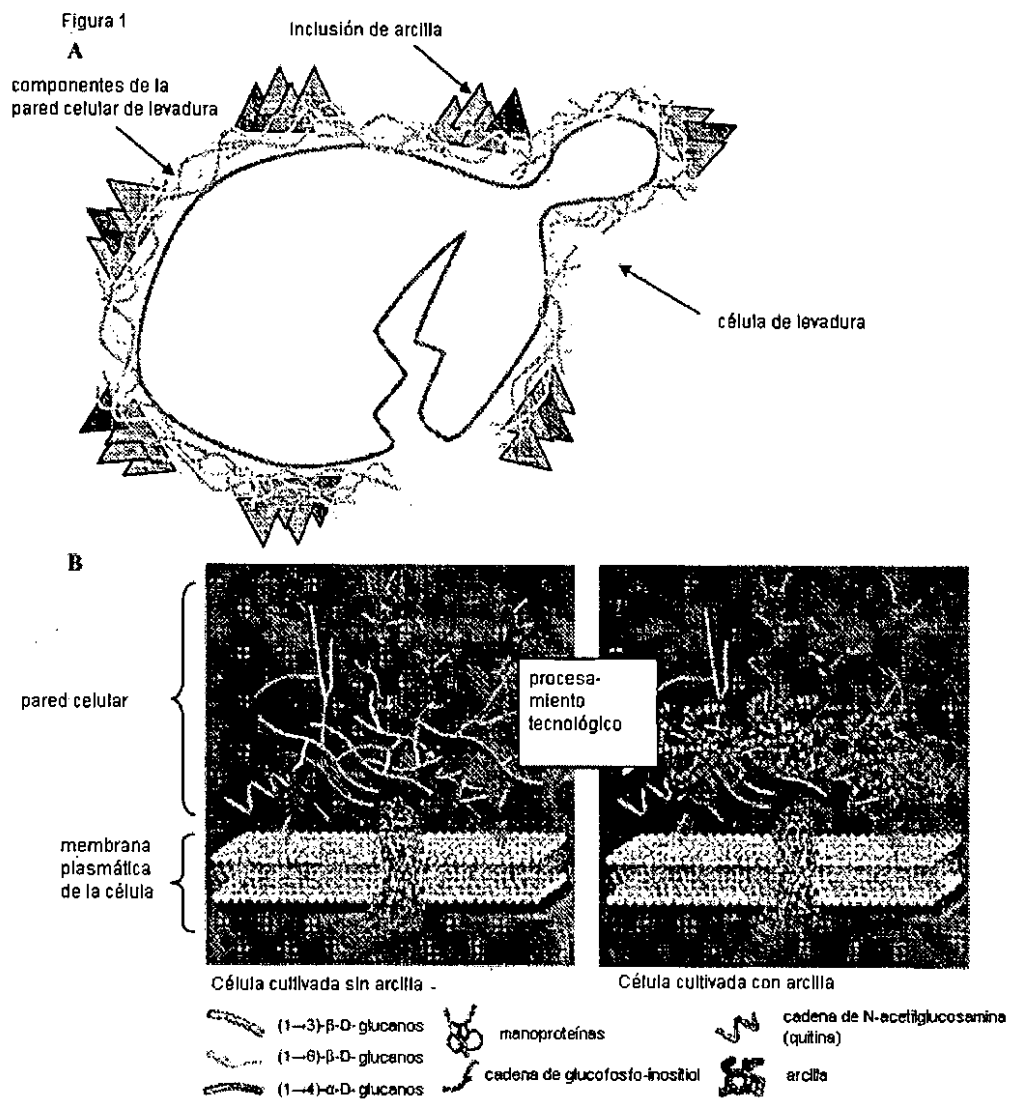
20 49. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicho agente antiespumante comprende un antiespumante molecular no siliconado.

25 50. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en donde dicho lisado comprende perlas de vidrio, un homogeneizador y/o tratamiento enzimático.

RESUMEN

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden células de levadura y/o componentes de células de levadura y métodos para producirlos y utilizarlos. En particular, la invención provee nueva levadura que comprende una estructura de pared celular alterada (por ejemplo, arcilla y/o componentes de arcilla integrados (por ejemplo, entrelazados) en las paredes celulares y/o paredes celulares que comprenden una relación alterada de glucano:manano), sus métodos de producción, composiciones que comprenden y/o están derivadas de ellos y métodos de uso de ellos (por ejemplo, para secuestrar y/o adsorber bacterias y toxinas). Las composiciones y métodos de la invención se usan en una variedad de aplicaciones que incluyen fuentes dietarias (por ejemplo, mezcla con productos alimenticios u otro tipo de alimentación a animales), terapéuticos, profilácticos (por ejemplo, mezcla con fuentes de relleno y/u otros materiales que se ponen en contacto con animales, uso durante el procesamiento de alimentos y bebestibles y fabricación y uso durante la filtración de líquidos), así como aplicaciones de búsqueda.

1/9



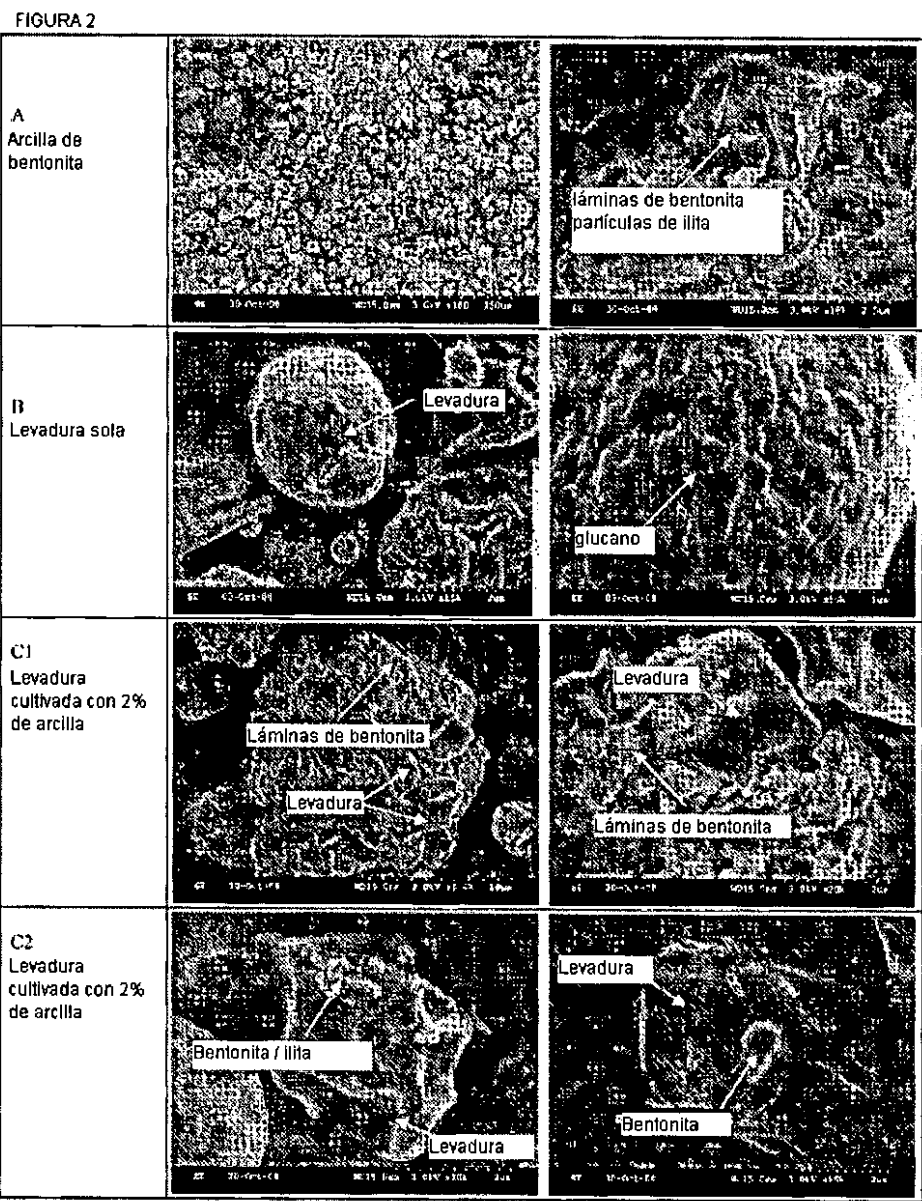


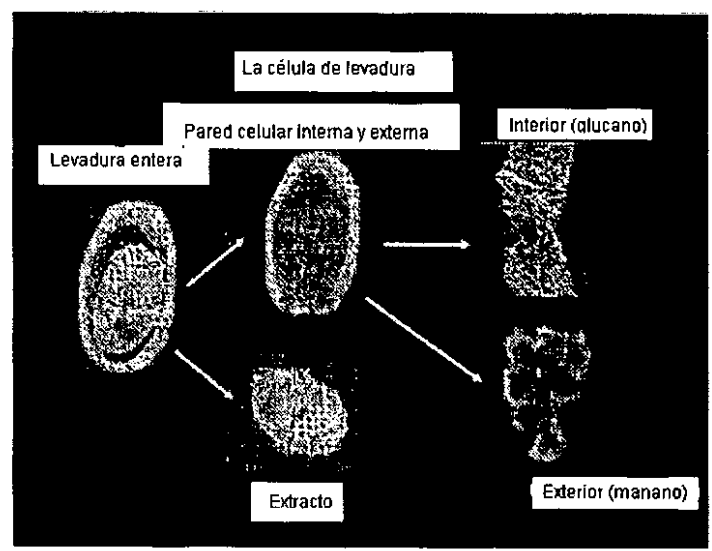
FIGURA 3

Muestra	Glucano %	Manano (%)	Rela- ción G/M	Proteína (%)	Remanen- te (%)	Adsorción ZEARALONONA (%)
PCL sola	45,52 ± 0,54	41,29 ± 0,62	1,01	12,38	0,81	6,91 ± 2,19
PCL + 0,5%	42,68 ± 0,49	35,70 ± 0,20	1,20	14,34	7,28	45,64 ± 5,30
PLC + 1,0%	42,69 ± 0,39	31,67 ± 0,37	1,35	15,83	9,81	73,55 ± 2,98
PCL + 2,0%	38,24 ± 0,28	26,34 ± 0,17	1,45	19,98	15,53	79,33 ± 2,24

FIGURA 4

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

FIGURA 5



6/9

FIGURA 6

Exp/lote N.º	08-036	09-002
Id. del material	0,5% de esmectita CIYCW secada por pulverización	0,5% de esmectita CIYCW secada por pulverización
% 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 total de la placa (cfu/g)	9,35 x 10 ⁴	
	1,79 (5 h)	0,14 (0 h)
	4,07 (9 h)	0,60 (3 h)
% de alcohol	4,72 (11 h)	1,64 (6 h)
	-	2,90 (9 h)
	-	4,82
% de glucosa	27,5	28,2
% de manosa	19,4	16,1

FIGURA 7

Levadura	Arcilla (1%, esmectita)	Hidrólisis enzimática	Adsorción (%)	
			AFBI	ZEA
ADY (PCL sola)	-	+	6,9 ± 4,5	39,3 ± 2,4
ADY (N.º 08-036)	+	+	85,3 ± 5,3	57,9 ± 1,1
(N.º 09- 002)			99,8 ± 0,02	55,1 ± 1,1

FIGURA 8

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

FIGURA 9

Levadura	Arcilla (0,5%, esmectita)	Hidrólisis enzimática	Adsorción (%)	
			AFBI	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