

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739-00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYI

Eve: 378 FASENACIONALI

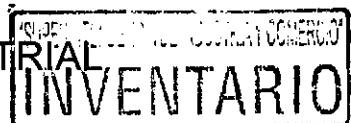
Act. 411 PRESENTACION

Folios: 192

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL



División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

11-98739

54. TÍTULO

Composiciones de levadura entrebrazadas con
Arcilla y métodos de utilizarlas

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

ALLTECH, INC.

DOMICILIO

3031 Cotnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky, US

74. APODERADO

ALVARO CORREA

22. BOGOTÁ, D.C.,

03 de Agosto / 2011

[Signature]
14-08-2011

PETITORIO

12

SO

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eva: 378 FASENACIONALI
Folios: 192

Act. 411 PRESENTACION

Tra. 11. PATENTEIYII

Fecha: 2011-08-04 16:02:38

SO

11 008738 -00000-0000

No. 11-098738-
Fecha: 2011-08-04 16:02:38
Tra. 11 PATENTE(YII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 192

1
X
X

Patente de Modelo de Utilidad

Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)	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: E-Mail:	Fax: Cual	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6 Teléfono: 6341500 Fax: 3762211 E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com		IDENTIFICACION C.C. ☒ X NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número 79.143.366 Usaquén TP 20281
(4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: YIANNIKOURIS, Alexandros, THIELEN, Ursula Anne Dirección: 3409 Derby Landing Circle Lexington, Kentucky 40513 (US), 632 Stratford Drive Lexington, Kentucky 40503, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados unidos de América		
(5) PCT (85) Solicitud Internacional No. PCT/US2010/021076 Fecha 14-01-2010 Publicación Internacional No. WO2010/083336 Fecha 22-07-2010			
(6) Título (54) COMPOSICIONES DE LEVADURA ENTRELAZADAS CON ARCILLA Y MÉTODOS DE UTILIZARLAS			
(7) Clasificación Internacional (51) A61K 36/06; C12N 1/16; A23L 1/28; A23K 1/00; A23L 2/38; C12G 1/00; C12C 1/00			
(8) Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen US	(32) Fecha 14-01-2009	(31) Número de Solicitud 61/144,620
(9) Comprobante de pago No. 11-0070223 - 11-0064167 - 11-0053508 - 11-0070225 - 11-0070210 Fecha 19-07-2011 - 01-07-2011 - 02-06-2011			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

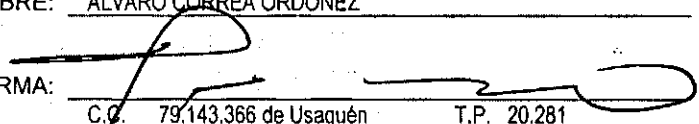
11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA: 
C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0070223

Bogotá D.C., Julio 19 de 2011 - 16:46:48

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	325068763	18/07/2011	82.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005 01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739- -00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 192

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 Computador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870264 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 19 de 2011 - 16:47:23

2011/0114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0064167

Bogotá D.C., Julio 01 de 2011 - 14:27:42

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	325065742	01/07/2011	95.266.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739- -00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 192

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

Julio 1 de 2011 - 14:42:43

2011/0095

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0053508

Bogotá D.C., Junio 02 de 2011 - 16:48:12

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	403018361	02/06/2011	62.503.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				\$10.000.00

=====

ON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739-00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38

Tra. 11 PATENTE I y II

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CR

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 192

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

Junio 2 de 2011 - 16:48:39

2011/012 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0070225

Bogotá D.C., Julio 19 de 2011 - 16:46:49

RECIBIDO DE : BAKER & CCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325068763	18/07/2011	82.512.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739- -00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 192

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

Julio 19 de 2011 - 16:47:24

2011/0127

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0070210

Bogotá D.C., Julio 19 de 2011 - 16:46:48

RECIBIDO DE : BAKER &

CKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325068763	18/07/2011	82.912.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD DE INVENION	485.000.00	485.000.00
			\$485.000.00

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-098739- -00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 192

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

Julio 19 de 2011 - 16:47:23



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: A61K 36/06; C12N 1/16; A23L 1/28; A23K 1/00; A23L 2/38; C12G 1/00; C12C 1/00

(71) Solicitante(s): **ALLTECH, INC.**

(72) Inventor(es): **YIANNIKOURIS, Alexandros, THIELEN, Ursula Anne**

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*

32)

Fecha

(33)

País

61/144,620

14-01-2009

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 14-08-2011

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 22-07-2010

Fecha de presentación de la solicitud: 14-01-2010

N° publicación: WO2010/083336

No. de solicitud: PCT/US2010/021076

(54) Título: **COMPOSICIONES DE LEVADURA ENTRELAZADAS CON ARCILLA Y MÉTODOS DE UTILIZARLAS**


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **DISEÑO INDUSTRIAL** ☐

(1) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:			
(51) Clasificación Internacional: A61K 36/06; C12N 1/16; A23L 1/28; A23K 1/00; A23L 2/38; C12G 1/00; C12C 1/00					
(71) Solicitante(s): ALLTECH, INC.					
(72) Inventor(es): YIANNIKOURIS, Alexandros, THIELEN, Ursula Anne					
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ					
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32)	Fecha	(33) País	
	61/144,620		14-01-2009	US	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-08-2011			(87) Publicación internacional:		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT			Fecha: 22-07-2010		
Fecha de presentación de la solicitud: 14-01-2010			No. Publicación: WO2010/083336		
No. de solicitud: PCT/US2010/021076					
(54) Título: COMPOSICIONES DE LEVADURA ENTRELAZADAS CON ARCILLA Y MÉTODOS DE UTILIZARLAS					
(57) 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 a 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, filácticos (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. CONTINUA AL RESPALDO					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 36/06; C12N 1/16; A23L 1/28; A23K 1/00; A23L 2/38; C12G 1/00; C12C 1/00	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) ALLTECH, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. 61/144,620	32) Fecha 14-01-2009	(33) Pais US
		(72) Inventor(es) YIANNIKOURIS, Alexandros, THIELEN, Ursula Anne	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 14-08-2011		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 22-07-2010
	Fecha de presentación de la solicitud: 14-01-2010		N° publicación: WO2010/083336
	No. de solicitud PCT/US2010/021076		
(54) Titulo: COMPOSICIONES DE LEVADURA ENTRELAZADAS CON ARCILLA Y MÉTODOS DE UTILIZARLAS			

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.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 July 2010 (22.07.2010)



(10) International Publication Number
WO 2010/083336 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 36/06 (2006.01) A23L 2/38 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) C12G 1/00 (2006.01)
A23L 1/28 (2006.01) C12C 1/00 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/021076

(22) International Filing Date:

14 January 2010 (14.01.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/144,620 14 January 2009 (14.01.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ALL-TECH, INC. [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YIANNIKOURIS, Alexandros [FR/US]; 3409 Derby Landing Circle, Lexington, Kentucky 40513 (US). THIELEN, Ursula Anne [US/US]; 632 Stratford Drive, Lexington, Kentucky 40503 (US).

(74) Agent: SISK, Tyler J.; Casimir Jones S.C., 2275 Deming Way, Suite 310, Middleton, Wisconsin 53562 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: CLAY INTERLACED YEAST COMPOSITIONS AND METHODS OF UTILIZING THE SAME

(57) Abstract: The present invention relates to compositions comprising yeast cells and/or yeast cell components and methods for producing and utilizing the same. In particular, the invention provides novel yeast comprising altered cell wall structure (e.g., clay and/or clay component(s) integrated (e.g., interlaced) into cell wall(s) and/or cell wall(s) comprising altered glucan:mannan ratio), methods of producing the same, compositions comprising and/or derived from the same, and methods of using the same (e.g., to sequester and/or adsorb bacteria and toxins). Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including dietary (e.g., admixing with feedstuffs or otherwise feeding to animals), therapeutic, prophylactic (e.g. admixing with bedding sources and/or other materials that come into contact with animals, usage during food and beverage processing and manufacture, and usage during filtration of liquids) as well as research applications.

WO 2010/083336 A2

CLAY INTERLACED YEAST COMPOSITIONS AND METHODS OF UTILIZING THE SAME

The present application claims priority to U.S. Provisional Application 61/144,620
5 filed January 14, 2009, hereby incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions comprising yeast cells and/or yeast cell
components and methods for producing and utilizing the same. In particular, the invention
10 provides novel yeast comprising altered cell wall structure (e.g., clay and/or clay
component(s) integrated (e.g., interlaced) into cell wall(s) and/or cell wall(s) comprising
altered glucan:mannan ratio), methods of producing the same, compositions comprising
and/or derived from the same, and methods of using the same (e.g., to sequester and/or
adsorb bacteria and toxins). Compositions and methods of the invention find use in a variety
15 of applications including dietary (e.g., admixing with feedstuffs or otherwise feeding to
animals), therapeutic, prophylactic (e.g. admixing with bedding sources and/or other
materials that come into contact with animals, usage during food and beverage processing
and manufacture, and usage during filtration of liquids) as well as research applications.

20 BACKGROUND OF THE INVENTION

Fungi are ubiquitous worldwide, and inconspicuous as they are most commonly
microscopically small. Mycotoxins are secondary metabolites secreted by fungi.
Mycotoxins are toxic and/or carcinogenic compounds produced by various fungal species
that grow on various agricultural commodities. Examples of mycotoxins, include but are not
25 limited to aflatoxins, fumonisins, ochratoxin A, deoxynivalenol (a.k.a. "DON" or
"vomitoxin"), patulin, and zearalenone. Mycotoxins are often produced in cereal grains as
well as forages before, during and after harvest. Some mycotoxins are lethal, some cause
identifiable diseases or health problems, some weaken the immune system without producing
symptoms specific to that mycotoxin, some act as allergens or irritants, and some have no
30 known effect on animals or humans. The greatest economic impact of mycotoxin
contamination is felt by crop and poultry producers, as well as food and feed producers.
Mycotoxins can appear in the food chain as a result of fungal infection of plant products, and
can either be eaten directly by humans, or introduced by contaminating livestock feedstuff(s).
Mycotoxins contaminate organic materials (e.g. bedding) as well as water, and greatly resist

decomposition during digestion so they remain in the food chain in edible products (e.g. meat, eggs and dairy products). No region of the world escapes mycotoxins and their negative impact on animal and human health. The evolution of global trading of feedstuffs increases the chances that blends of grains will result in combinations of mycotoxins in a given diet and that unusual and unsuspected mycotoxins will be present in a given region regardless of its climate condition.

Strategies used to avoid mycotoxin occurrence involve controlling elements that permit mycotoxin production, controlling mold growth, as well as practicing quality control of food and feeds via adequate sampling, detection and quantification methodology.

However, mycotoxin contamination is unavoidable.

In order to reduce the negative effects of mycotoxins, inorganic materials such as clays, bentonites, and aluminosilicates, known for their adsorptive properties, have historically been added to feedstuffs. Feedstuff-additives, in large quantities, sequester some mycotoxins in the gastrointestinal tract of the animal and minimize their toxic effects.

However, additives hinder the absorption of many beneficial nutrients that are important to animals such as vitamins, minerals, and amino acids thereby decreasing the nutrient density of the diet. Moreover, feedstuff additives, particularly in animal feces, have an extremely detrimental environmental impact.

Chemical agents such as acids, bases (e.g., ammonia, caustic soda), oxidants (e.g., hydrogen peroxide, ozone), reducing agents (e.g., bisulphites), chlorinated agents and formaldehyde, have been used to degrade mycotoxins in contaminated feeds, particularly aflatoxins (See, e.g., Hagler 1991; Phillips et al 1994; Lemke et al 2001). However, these techniques are not efficient, are expensive, generate a significant amount of chemical waste, and are often generally unsafe.

Certain strains of lactic acid bacteria, propionibacteria and bifidobacteria have cell wall structures that bind mycotoxins (See, e.g., Ahokas et al 1998; El-Nemazi et al 1998; Yoon et al 1999) and limit their bioavailability in the animal body. However, these biological processes are generally slow, produce toxic metabolites, and are inefficient.

SUMMARY OF THE INVENTION

In some embodiments, the present invention provides a yeast cell comprising a yeast cell wall comprising clay or a clay component interlaced into the yeast cell wall. In some embodiments, the yeast cell is cultivated in a cell culture medium comprising clay. In some

embodiments, the clay is a mineral clay or synthetic clay belonging to the silicate group. In some embodiments, the clay is selected from a zeolite, a bentonite, an aluminosilicate, a montmorillonite, a smectite, a kaolinite, an organoclay and mixtures thereof. In some embodiments, the clay is an aluminosilicate clay. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.125% to about 4.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from 0.125% to 4.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.5% to about 2.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from 0.5% to 2.0%. In some embodiments, the yeast is selected from *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* and combinations thereof. In some embodiments, the yeast is *Saccharomyces cerevisiae*.

In some embodiments, the present invention provides composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is derived from a yeast cell cultivated in growth medium comprising a clay. In some embodiments, glass beads and a bead beater are utilized to prepare the yeast cell wall extract. In some embodiments, enzymatic treatment is utilized to prepare the yeast cell wall extract. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to a feedstuff. In some embodiments, the feedstuff is selected from a Total Mixed Ration (TMR), a forage, a pellet, a concentrate, a premix, a coproduct, grain, distiller grain, molasses, fiber, fodder, grass, hay, kernel, leaves, meal, solubles, and a supplement. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to organic material. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to water. In some embodiments, a liquid is filtered through the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract. In some embodiments, the liquid is a juice, water, beer or wine. In some embodiments, the composition is formulated for feeding to any member of Kingdom Animalia. In some embodiments, the member of Kingdom Animalia is selected from avian, bovine, porcine, equine, ovine, and caprine, piscines, shellfish, camelids, feline, canine, and rodent species. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract sequester one or more mycotoxins. In some embodiments, the mycotoxin is selected from Aflatoxins, Zearalenone, Trichothecenes, Fumonisin, and Ochratoxins. In some embodiments, the mycotoxin is selected from acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, extended to all aflatoxins, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacein +1,

beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasin E, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, enniatins, extended to all ergot toxins and endophytes, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins B1 and B2 and B3, Fusarenon-X, Fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, ipomeanine, islanditoxin, lateritin +1, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, extended to all ochratoxins, oosporein, oxalic acid, patulin, penicillic acid, penitrem, roridin E, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, slaframine, stericoncentrated modified yeast cell wall extracttocystin, T-1 toxin, T-2 toxin, triacetoxyscirpendiol extended to all trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucarin, verruculogen, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, xanthocillin, yavanicin+1, and zearalenols, and zearalenone.

15 In some embodiments, the present invention provides a compositions comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract, wherein the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount effective to sequester mycotoxins. For example, in some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount of about 0.0125% to about 10% by weight of a feedstuff. In some embodiments, the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount of about 0.0125% to about 4.0% by weight of a feedstuff. The present invention is not limited by the type of feedstuff.

In some embodiments, the present invention provides a method for reducing bioavailability of mycotoxins to an animal or human comprising: (a) providing: (i.) a composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract, and (ii) a material consumed by animal or human; (b) incorporating the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract into the material to produce a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material; and (c) allowing the animal or human to consume the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material. In some embodiments, the material is a feedstuff. In some embodiments, about 0.0125% to about 0.4% by weight of the composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to a feedstuff. In some embodiments, the material is bedding. In some embodiments, the about 0.0125% to about 99.0% of the composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added by weight to

the bedding. In some embodiments, material is a liquid. In some embodiments, about 0.0125% to about 99.0% of the composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added by weight to the liquid. In some embodiments, the animal is selected from of avian, bovine, porcine, equine, ovine, and caprine, piscines, shellfish, camelids, feline, canine, and rodent species. In some embodiments, the composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract sequesters one or more types of mycotoxins. In some embodiments, the mycotoxins are Aflatoxins, Zearalenone, Trichothecenes, Fumonisin, Ochratoxins, or combinations thereof. In some embodiments, the present invention further provides incorporating an additional agent into the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material, wherein the agent is selected from an esterase, epoxidase, yeast and/or bacterial strain.

In some embodiments, the present invention provides a method of producing a commercial-scale quantity of clay or clay component interlaced yeast cell wall extract comprising: (a) providing: (i) yeast starter culture and (ii) yeast cell culture media, wherein the yeast cell culture media comprises the required nutrients for yeast growth and a clay or clay component; (b) introducing the yeast starter culture into the yeast cell culture media; (c) incubating the yeast in an industrial-scale fermenter under conditions configured to allow yeast growth, wherein the yeast incorporate the clay or clay component into the yeast cell wall during growth; (d) adding anti-foaming agent to the fermenter; (e) lysing the clay or clay component interlaced yeast cells walls; and (f) separating the clay or clay component interlaced yeast cells walls from the other yeast components. In some embodiments, the yeast is selected from *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* or combinations thereof. In some embodiments, the clay is a mineral clay or synthetic clay belonging to the silicate group. In some embodiments, the clay is a zeolite, a bentonite, an aluminosilicate, a montmorillonite, a smectite, a kaolinite, an organoclay or mixture thereof. In some embodiments, the clay is an aluminosilicate clay. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.125% to about 4.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.5% to about 2.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from 0.125% to 4.0%. In some embodiments, the amount of clay in the cell culture medium is from 0.5% to 2.0%. In some embodiments, the industrial-scale fermenter is between one thousand and five million liters. In some embodiments, the anti-foaming agent is added to alleviate effects of the clay on the incubation process. In some embodiments, the anti-foaming agent is a nonsilicone molecular defoamer, oil-based defoamer, powder defoamer, water-based

defoamer, silicone based defoamer, polyethylene glycol-based defoamer, polypropylene glycol-based defoamer, or alkyl polyacrylates. In some embodiments, the anti-foaming agent is a nonsilicone molecular defoamer. In some embodiments, the lysing comprises glass beads, a bead beater and/or enzymatic treatment.

5

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows A) a depiction of a yeast cell with clay and/or clay components interlaced into the yeast cell wall, and B) a comparative description of (a) the yeast cell wall of a yeast cell cultivated in the absence of clay and (b) the yeast cell wall of a yeast cell grown/cultivated in the presence of clay.

10

Figure 2 shows a scanning electron micrograph of (A) a bentonite clay (Fluka); (B) yeast cells cultivated in the absence of clay and a close-up of the glucan portion of the yeast cell wall; (C1) yeast cells cultivated in the presence of 2% bentonite clay with detail of a conglomerate formation of several yeast cells trapped in the lamellar structure of bentonite; (C2) yeast cells cultivated in the presence of 2% bentonite clay with detail of an inclusion of the clay directly in the yeast cell wall structure.

15

Figure 3 provides characteristics of yeast cell wall extracts prepared utilizing glass beads and a minibead beater from yeast cells: cultivated in the absence of clay (Yeast Cell Wall "YCW" only), yeast cells cultivated in the presence of 0.5% clay (YCW +5%), yeast cells cultivated in the presence of 1% clay (YCW+1.0%), and yeast cells cultivated in the presence of 2.0% clay. Additionally, the percentages of adsorption of the mycotoxin zearalanone for each of the samples.

20

Figure 4 provides characteristics of yeast cell wall extracts prepared utilizing protease cutting from yeast cells cultivated in the absence of clay (YCW only), yeast cells cultivated in the presence of 1% clay (YCW+1.0%), and yeast cells cultivated in the presence of 2.0% clay.

25

Figure 5 depicts the anatomy of a yeast cell.

Figure 6 shows the composition of two batches of CIYCW produced at a semi-industrial scale.

30

Figure 7 shows sequestration efficacy results obtained with the yeast cell wall semi-industrial scale, with and without smectite clay and having been or not extracted with enzyme hydrolysis. The level of inclusion of the sequestrants product for AFB1 and ZEA were respectively of 0.1 and 0.4% in the reaction medium that was maintained at a constant pH of

4.0. The assay was performed under orbital agitation during 90 min at 37°C and the amount of bound toxin evaluated using HPLC equipped with a fluorescent detector.

Figure 8 shows sequestering efficacy results obtained with the yeast cell wall production with smectite clay and having been extracted with enzyme hydrolysis. The level of inclusion of the sequestrants product for AFB1 and ZEA were respectively of 0.1 and 0.4% in the reaction medium that was maintained at a constant pH of 4.0. The assay was performed under orbital agitation during 90 min at 37°C and the amount of bound toxin evaluated using HPLC equipped with a fluorescent detector.

Figure 9 shows adsorption results obtained with the different yeast cell wall coming from three strains grown with or without clay MBB02 and having been or not extracted with enzyme hydrolysis. The level of inclusion of the sequestrants product for AFB1 and ZEA were respectively of 0.1 and 0.4% in the reaction medium that was maintained at a constant pH of 4.0. The assay was performed under orbital agitation during 90 min at 37°C and the amount of bound toxin evaluated using HPLC equipped with a fluorescent detector.

DEFINITIONS

As used herein, the term "yeast" and "yeast cells" refers to eukaryotic microorganisms classified in the kingdom Fungi, having a cell wall, cell membrane and intracellular components. Yeasts do not form a specific taxonomic or phylogenetic grouping. Currently about 1,500 species are known; it is estimated that only 1% of all yeast species have been described. The term "yeast" is often taken as a synonym for *S. cerevisiae*, but the phylogenetic diversity of yeasts is shown by their placement in both divisions Ascomycota and Basidiomycota. The budding yeasts ("true yeasts") are classified in the order Saccharomycetales. Most species of yeast reproduce asexually by budding, although some reproduce by binary fission. Yeasts are unicellular, although some species become multicellular through the formation of a string of connected budding cells known as *pseudohyphae*, or *false hyphae*. Yeast size can vary greatly depending on the species, typically measuring 3–4 µm in diameter, although some yeast can reach over 40 µm.

As used herein, the term "yeast cell wall" also referred to as "YCW" refers to the cell wall of a yeast organism that surrounds the plasmic membrane and the intracellular components of the yeast. Yeast cell wall includes both the outer layer (mainly mannan) and the inner layer (mainly glucan and chitin) of the yeast cell wall. A function of the cell wall is to provide structure and protect the yeast interior (its metabolic activity center). Signaling and

recognition pathways take place in the yeast cell wall. The composition of yeast cell wall varies from strain to strain and according to growth conditions of yeast.

As used herein, the term "yeast cell wall extract" refers to the yeast cell wall of yeast that has been ruptured or "lysed" (e.g., during a rupture and lysing stage) and separated from the soluble intracellular components of the yeast cell.

The term "isolated" when used in relation to a yeast cell wall, as in "an isolated yeast cell wall" or "isolated clay integrated yeast cell wall" or "isolated yeast cell wall comprising altered glucan:mannan structure" refers to a yeast cell wall or component thereof that is identified and separated from at least one component with which it is ordinarily associated in its natural source. Thus, an isolated yeast cell wall is such present in a form or setting that is different from that in which it is found in nature (e.g., that is separate from intracellular components of yeast). In contrast, non-isolated yeast cell wall is a yeast cell wall or component thereof found in the state they exist in nature. In some embodiments, isolated yeast cell wall is used to describe yeast cell wall extract.

As used herein, the term "purified" or "to purify" refers to the removal of components from a sample. For example, yeast cell walls or yeast cell wall extracts are purified by removal of non-yeast cell wall components (e.g., plasmic membrane and/or yeast intracellular components); they are also purified by the removal of contaminants or other agents that are not yeast cell wall. The removal of non-yeast cell wall components and/or non-yeast cell wall contaminants results in an increase in the percent of yeast cell wall or components thereof in a sample. In another example, yeast cell walls comprising clay or clay components integrated/interlaced into the yeast cell wall are purified by the removal of non-yeast cell wall components (e.g., plasmic membrane and/or yeast intracellular components), thereby the percent of yeast cell wall comprising clay or clay components integrated/interlaced into the cell wall is increased in a sample.

As used herein, the term "concentrated yeast cell wall extract" refers to yeast cell wall extract that is concentrated via one or more procedures (e.g., by drying (e.g., during a drying and concentrating stage)). In another example, a concentrated yeast cell wall extract is a yeast cell wall preparation or yeast cell wall extract preparation that is purified by removal of non-yeast cell wall components.

As used herein, the terms "modified yeast" and "altered yeast" refer to yeast cultivated in a way that alters the composition, structure and/or function of the yeast (e.g., that alters the composition, structure and/or function of the yeast cell wall (e.g., a yeast cell wall comprising an altered glucan:mannan ratio and/or clay/clay component

integrated/interlaced into the yeast cell wall that functions differently than a yeast cell wall without altered glucan:mannan ratio and/or non-clay or non-clay component integrated/interlaced yeast cell wall).

As used herein, the term "modified yeast cell wall" refers to yeast cell wall of
5 modified or altered yeast.

As used herein, the term "modified yeast cell wall extract" refers to yeast cell wall extract of modified or altered yeast.

As used herein, the term "concentrated modified yeast cell wall extract" as used herein refers to concentrated yeast cell wall extract derived from modified or altered yeast,
10 for example, in US Pat. No. 6,045,834.

As used herein, the terms "clay interlaced yeast," "clay integrated yeast," "clay component interlaced yeast," "clay component integrated yeast" refer to yeast grown or cultivated in the presence of clay or clay components that has incorporated or interlaced clay or clay components into the yeast cell wall. Clay or clay component interlaced yeast and is a
15 specific type of modified yeast.

As used herein, the term "interlaced" as in "clay interlaced yeast cell wall extract," "clay component interlaced yeast cell wall extract," or the like refers to the integration of clay or clay component into yeast cell wall. Although a mechanism is not necessary to practice the invention and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some
20 embodiments, interlacing of clay or clay component into yeast cell wall occurs during yeast growth (e.g., after its asexual reproductive cycle (budding) (e.g., as a daughter cell grows and forms its yeast cell wall network, clay or clay component integrates into the yeast cell)). In one example, elongation of the chains of glucan and/or chitin provide integration site(s) involved in the integration of the clay or clay component during budding, resulting in the
25 daughter cell comprising clay or clay component integrated into its cell wall. In another example, the macromolecular clay structure traps yeast cell(s) in its lamellar network, wherein the yeast cell proceeds through budding, further integrating clay or clay component into the yeast cell wall. Yeast cell wall integrated/interlaced clay and/or clay component(s) remain integrated/interlaced in yeast cell wall post cell wall extraction.

30 As used herein, the terms "clay interlaced yeast cell wall," "clay component integrated yeast cell wall," "clay component interlaced yeast cell wall," and "clay integrated yeast cell wall" refer to yeast cell wall of yeast grown or cultivated in the presence of clay that has incorporated or interlaced clay or clay components into the yeast cell wall.

As used herein, the terms "clay interlaced yeast cell wall extract," "clay component interlaced yeast cell wall extract," "clay integrated yeast cell wall extract," and "clay component integrated yeast cell wall extract" refer to yeast cell wall extract of yeast (e.g., wherein the yeast from which the cell wall extract is made are grown or cultivated in the presence of clay) that has incorporated or interlaced clay or clay components into the yeast cell wall.

As used herein, the terms "concentrated interlaced yeast cell wall extract" and "concentrated integrated yeast cell wall extract" refer to concentrated yeast cell wall extract of yeast grown or cultivated in the presence of clay that has incorporated or interlaced clay or clay components into the yeast cell wall.

As used herein, the term "in vivo" refers to studies and/or experiments conducted within a living organism, occurring within a biological organism.

As used herein, the term "in vitro" refers to an artificial environment outside the living organism and to biological processes or reactions that would normally occur within an organism but are made to occur in an artificial environment. In vitro environments can comprise of, but are not limited to, test tubes and cell culture.

As used herein, the term "high-performance liquid chromatography" and the term "HPLC" refer to a form of liquid chromatography to separate compounds. The compounds are dissolved in solution. Compounds are separated by injecting a plug of the sample mixture onto the column. HPLC instruments comprise a reservoir of mobile phase, a pump, an injector, a separation column, and a detector. The presence of analytes in the column effluent is recorded by quantitatively detecting a change in refractive index, UV-VIS absorption at a set wavelength, fluorescence after excitation with a suitable wavelength, or electrochemical response.

As used herein, the term "scanning electron microscopy" and the term "SEM" refer to a type of electron microscope that images the sample surface by scanning it with a high-energy beam of electrons in a raster scan pattern. The electrons interact with the atoms that make up the sample producing signals that contain information about the sample's surface topography, composition and other properties such as electrical conductivity.

As used herein, the term "fixation agent" refers to a chemical that is capable of fixing one substance to another in order to "fix", stabilize, or otherwise preserve the substance in its current form to prevent the substance from degrading or otherwise changing. Often, fixation agents are used in scanning electron microscopy (SEM) to prepare the sample. Primary fixation agent: as used herein, the terms "primary fixation agent" refers to the first fixation

agent used to “fix” a substance. Secondary fixation agent: as used herein, the terms “secondary fixation agent” refers to the second fixation agent used to “fix” a substance. Tertiary fixation agent: as used herein, the terms “tertiary fixation agent” refers to the third fixation agent used to “fix” a substance.

5 As used herein, the term “analyte” refers to an atom, a molecule, a grouping of atoms and/or molecules, a substance, or chemical constituent. An analyte, in and of itself cannot be measured, rather, aspects or properties (physical, chemical, biological, etc.) of the analyte can be determined using an analytical procedure, such as HPLC. For example, one cannot measure a “chair” (analyte-component) in and of itself, but, the height, width, etc. of a chair
10 can be measured. Likewise, one cannot measure a mycotoxin but can measure the mycotoxin fluorescence that is related to its concentration.

As used herein, the term “signal” is used generally in reference to any detectable process that indicates that a reaction has occurred (for example, binding of antibody to antigen). Signals can be assessed qualitatively as well as quantitatively. Examples of types
15 of “signals” include, but are not limited to, radioactive signals, fluorimetric signals or colorimetric product/reagent signals.

As used herein, the term “bioavailability” refers to the fraction of a molecule or component that is available to an organism or reaches the systemic circulation. When a molecule or component is administered intravenously, its bioavailability is 100%. However,
20 when a molecule or component is administered via other routes (such as orally), its bioavailability decreases (due to incomplete absorption and first-pass metabolism).

As used herein, the term “absorb” refers to the process by which a material “takes in” or “sucks up” another substance. For example, “absorption” may refer to the process of absorbing or assimilating substances into cells or across the tissues and organs through
25 diffusion or osmosis (e.g. absorption of nutrients by the digestive system or absorption of drugs into the blood stream).

As used herein, the term “adsorption” refers to a process that occurs when a material is sequestered by, and/or accumulates on the surface of, a solid or a liquid (sequestrant and/or adsorbent) (e.g. thereby forming a film of molecules or atoms (the adsorbate)).

30 As used herein, the term “sequester” and/or the term “sequestration” refers to physical association (e.g., via docking or encasement) of two or more entities that come into contact with one another (e.g., thereby forming a stable complex). Exemplary forms of associations include, but are not limited to, hydrogen bonding, coordination, and ion pair formation. Sequestration interactions may involve a variable number of chemical interactions (e.g.,

chemical bonds) depending on the stereochemistry and geometry of each entity (e.g., further defining the specificity of the sequestration). When two or more entities are sequestered they may be sequestered by way of chemical bonds, but may also be associated via charge or other type of interactions.

5 As used herein, the term "sequestration agent" and/or "sequestering agent", refers to an entity that is capable of inducing or otherwise being involved with a sequestration and/or forming a complex with a second entity.

As used herein, the term "sorption" refers to both adsorption and absorption.

10 As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a composition (e.g., comprising a yeast cell, yeast cell wall or modified yeast cell wall component of the invention) sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered and/or combined with another material in one or more administrations, applications or dosages and is not intended to be limited to a particular formulation or administration route.

15 As used herein, the term "digest" refers to the conversion of food, feedstuffs, or other organic compounds into absorbable form; to soften, decompose, or break down by heat and moisture or chemical action.

As used herein, "digestive system" refers to a system (including gastrointestinal system) in which digestion can or does occur.

20 As used herein, the term "feedstuffs" refers to material(s) that are consumed by animals and contribute energy and/or nutrients to an animal's diet. Examples of feedstuffs include, but are not limited to, Total Mixed Ration (TMR), forage(s), pellet(s), concentrate(s), premix(es) coproduct(s), grain(s), distiller grain(s), molasses, fiber(s), fodder(s), grass(es), hay, kernel(s), leaves, meal, soluble(s), and supplement(s).

25 As used herein, the term "animal" refers to those of kingdom Animalia. This includes, but is not limited to livestock, farm animals, domestic animals, pet animals, marine and freshwater animals, and wild animals.

30 As used herein, the terms "administration" and the term "administering" refer to the act of giving a substance, including a drug, prodrug, or other agent, or therapeutic treatment to a subject (e.g., a subject or in vivo, in vitro, or ex vivo cells, tissues, and organs). Exemplary routes of administration can be through the eyes (ophthalmic), mouth (oral), skin (topical or transdermal), nose (nasal), lungs (inhalant), oral mucosa (buccal), ear, rectal, vaginal, by injection (e.g., intravenously, subcutaneously, intratumorally, intraperitoneally, etc.) and the like.

As used herein, the term "co-administration" and the term "co-administering" refer to the administration of at least two agent(s) or therapies to a subject and/or material (e.g., feedstuff). Co-administration of two or more agents or therapies can be concurrent, or a first agent/therapy can be administered prior to a second agent/therapy.

5 As used herein, the term "treatment" refers to the improvement and/or reversal of the symptoms of disease (e.g., mycotoxicosis). The term "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. For example, subjects that may benefit from treatment with compositions and methods of the present invention include those already with a disease and/or disorder (e.g., mycotoxicosis) as well as those in which a disease and/or
10 disorder is to be prevented (e.g., using a prophylactic treatment of the present invention).

As used herein, the term "at risk for disease" refers to a subject that is predisposed to experiencing a particular disease. This predisposition may be genetic (e.g., a particular genetic tendency to experience the disease, such as heritable disorders), or due to other factors (e.g., age, weight, environmental conditions, exposures to detrimental compounds
15 present in the environment, etc.).

As used herein, the term "disease", the term "infection" and the term "pathological condition or response" refer to a state, signs, and/or symptoms that are associated with an impairment of the normal state of a living animal or of any of its organs or tissues that interrupts or modifies the performance of normal functions, and may be a response to
20 environmental factors (such as malnutrition, industrial hazards, or climate, including mycotoxicosis), specific infective agents (such as worms, bacteria, or viruses), to inherent defect of the organism (such as various genetic anomalies), or combinations of these and other factors.

As used herein, the term "mycotoxicosis" refers to a condition in which mycotoxins
25 pass the resistance barriers of the human or animal body. Mycotoxicosis can be considered either an infection or a disease and may have a deleterious effect on those afflicted.

As used herein, the term "mycotoxin" refers to toxic and/or carcinogenic compound(s) produced by various fungal species.

As used herein, the term "suffering from disease" refers to a subject (e.g., an animal or
30 human subject) that is experiencing a particular disease and is not limited to any particular signs or symptoms, or disease.

As used herein, the term "toxic" refers to any detrimental, deleterious, harmful, or otherwise negative effect(s) on a subject, a cell, or a tissue as compared to the same cell or tissue prior to the contact or administration of the toxin/ toxicant.

As used herein, the term "acid" as used herein refers to any chemical compound that can donate proton(s) and/or accept electron(s). Acids include, but are not limited to, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, nitric, perchloric, fumaric, maleic, phosphoric, glycolic, lactic, salicylic, succinic, toluene-p-sulfonic, tartaric, acetic, citric, methanesulfonic, ethanesulfonic, formic, benzoic, malonic, sulfonic, naphthalene-2-sulfonic, benzenesulfonic acid, and the like. Other acids, such as oxalic, while not in themselves pharmaceutically acceptable, may be employed in the preparation of salts useful as intermediates in obtaining the compounds of the invention and their pharmaceutically acceptable acid addition salts.

As used herein, the term "base" refers to any chemical compound that can accept proton(s) and/or donate electron(s) or hydroxide ions. Bases include, but are not limited to, alkali metal (e.g., sodium) hydroxides, alkaline earth metal (e.g., magnesium) hydroxides, ammonia, and compounds of formula NW_4^+ , wherein W is C_{1-4} alkyl, and the like.

As used herein, the term "salt" refers to compounds that may be derived from inorganic or organic acids and bases. Examples of salts include, but are not limited to, acetate, adipate, alginate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate, bisulfate, butyrate, citrate, camphorate, camphorsulfonate, cyclopentanepropionate, digluconate, dodecylsulfate, ethanesulfonate, fumarate, flucoheptanoate, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, chloride, bromide, iodide, 2-hydroxyethanesulfonate, lactate, maleate, methanesulfonate, 2-naphthalenesulfonate, nicotinate, oxalate, palmoate, pectinate, persulfate, phenylpropionate, picrate, pivalate, propionate, succinate, tartrate, thiocyanate, tosylate, undecanoate, and the like. Other examples of salts include anions of the compounds of the present invention compounded with a suitable cation such as Na^+ , NH_4^+ , and NW_4^+ (wherein W is a C_{1-4} alkyl group), and the like.

As used herein, the term "pharmaceutical composition" refers to the combination of an active agent (e.g., a composition comprising a viable yeast cell, yeast cell wall, or modified yeast cell wall component of the invention) with a carrier, inert or active, making the composition especially suitable for diagnostic or therapeutic use in vitro, in vivo or ex vivo.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" and the term "pharmacologically acceptable" refer to compositions that do not substantially produce more known adverse reactions than known beneficial reactions.

As used herein, the term "antifoaming agent" refers to an additive used to prevent formation of foam or is added to break foam already formed. An "antifoaming agent" also referred to as "antifoamer" or "defoamer" refers to an additive which reduces the surface

tension of a solution or media or emulsion or broth in fermenters because of aeration or agitation, thus inhibiting or modifying the formation of a foam. Commonly used agents are insoluble oils, dimethyl polysiloxanes and other silicones, certain alcohols such as stearyldecanol, octyl decanol, sulphonates, stearates and glycols.

5 As used herein, the term "cell" refers to an autonomous self-replicating unit that may exist as functional independent unit of life (as in the case of unicellular organism, e.g. yeast), or as sub-unit in a multicellular organism (such as in plants and animals) that is specialized into carrying out particular functions towards the cause of the organism as a whole. There are two distinct types of cells: prokaryotic cells and eukaryotic cells.

10 As used herein, the term "eukaryote" refers to organisms whose cells are organized into complex structures enclosed within membranes. "Eukaryotes" are distinguishable from "prokaryotes." The term "prokaryote" refers to organisms that lack a cell nucleus or other membrane-bound organelles. The term "eukaryote" refers to all organisms with cells that exhibit the typical characteristics of eukaryotes, such as the presence of a true nucleus
15 bounded by a nuclear membrane, within which lie the chromosomes, the presence of membrane-bound organelles, and other characteristics commonly observed in eukaryotic organisms. Thus, the term includes, but is not limited to such organisms as fungi, protozoa, and animals.

 As used herein, the term "cell culture" refers to any in vitro culture of cells. Included
20 within this term are continuous cell lines (e.g., with an immortal phenotype), primary cell cultures, transformed cell lines, finite cell lines (e.g., non-transformed cells), and any other cell population maintained in vitro.

 As used herein, the term "cell reproduction" refers to a process of cell multiplication having three primary stages. The first stage of cell reproduction involves the replication of
25 the "parental cell's DNA. The second stage is the separation of the duplicated DNA into two equally sized groups of chromosomes. The third stage is the physical division of entire cells, usually called cytokinesis. Cell reproduction is more complex in eukaryotes than in other organisms. Non-eukaryotic cells such as bacterial cells reproduce by binary fission, a process that includes DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. Eukaryotic cell
30 reproduction either involves mitosis or a more complex process called meiosis. Mitosis and meiosis are sometimes called the two "nuclear division" processes. Binary fission is similar to eukaryotic cell reproduction that involves mitosis. Both lead to the production of two daughter cells with the same number of chromosomes as the parental cell. Meiosis is used for a special cell reproduction process of diploid organisms. It produces four special "daughter

cells" (gametes) which have half the normal cellular amount of DNA. A male and a female gamete can then combine to produce a zygote, a cell which again has the normal amount of chromosomes.

As used herein, the term "yeast reproduction" refers to the reproduction cycle of yeast, which have asexual and sexual reproductive cycles, however the most common mode of vegetative growth in yeast is asexual reproduction by "budding" or "fission" with a "daughter cell" that is formed on the "parent cell". The nucleus of the parent cell splits into a daughter nucleus and migrates into the daughter cell. The bud continues to grow until it separates from the "parent cell", forming a new cell. Under high stress conditions haploid cells will generally die, however under the same conditions diploid cells can undergo sporulation, entering sexual reproduction (meiosis) and producing a variety of haploid spores, which can go on to mate (conjugate), reforming the diploid.

As used herein, the term "budding" refers to a type of cell division in fungi (e.g. yeast) and in protozoa in which one of the "daughter cells" develops as a smaller protrusion from the other. Usually the position of the budding cell is defined by polarity in the "parent cell". In some protozoa the budded daughter may lie within the cytoplasm of the other daughter.

As used herein, the term "daughter cell" refers to one of the two or more cells formed in the division of a parent cell.

As used herein, the term "parent cell" and the term "mother cell" refer to the cell giving rise to daughter cells by cell division.

As used herein, the term "inoculation" refers to the act of introducing a microorganism or suspension of microorganisms (e.g. yeast, fungi, bacteria, etc.) into a culture medium. Inoculation is the act or process of introducing something to where it will grow or reproduce.

As used herein, the term "inoculum" and the term "pre-inoculum" refer to cells used in an inoculation, such as cells added to start a culture.

As used herein, the term "growth procedure" refers to the reproduction of living cells applied to yeast cells where the phrase "cell growth" is shorthand for the idea of "growth in cell numbers by means of cell reproduction." During cell reproduction one cell (the "parental cell" or "mother cell") divides to produce "daughter cells".

As used herein, the term "cultivate yeast" and the term "growing yeast" refer to the act of populating and/or propagating yeast.

As used herein, the term “centrifugation” refers to the separating of molecules by size or density using centrifugal forces generated by a spinning rotor that puts an object in rotation around a fixed axis, applying a force perpendicular to the axis. The centrifuge works using the sedimentation principle, where the centripetal acceleration is used to evenly distribute substances of greater and lesser density into different layers of density.

As used herein, the term “concentration” refers to the amount of a substance per defined space. Concentration usually is expressed in terms of mass per unit of volume. To dilute a solution, one must add more solvent, or reduce the amount of solute (e.g., by selective evaporation, spray drying, freeze drying, e.g., concentrated yeast cell wall extract or concentrated modified yeast cell wall extract). By contrast, to concentrate a solution, one must add more solute, or reduce the amount of solvent.

As used herein, the term “layer” refers to a usually horizontal deposit organized in stratum of a material forming an overlying part or segment obtained after separation by centrifugation in relation with the density properties of the material.

As used herein, the term “harvest” refers to the act of collecting or bringing together materials that have been produced (e.g. bringing together materials produced during yeast production).

As used herein, the term “clay” refers to mineral clays, synthetic, organoclays and any mixture(s) thereof.

As used herein, the term “mineral clay” refers to a naturally occurring or synthetic material composed primarily of fine-grained minerals (silicates) that show plasticity through a variable range of water content (which may be a result of water trapped in the structure by polar attraction) and can be hardened when dried and/or fired. Examples of silicates include, but are not limited to, phyllosilicate, bentonite, zeolite, aluminosilicate, montmorillonite, smectite, kaolinite.

As used herein, the term “organoclay” and the term “modified clay” refer to an organically modified phyllosilicate, derived from a naturally occurring clay mineral. By exchanging the original interlayer cations for organocations (typically quaternary alkylammonium ions) or polysaccharides, an organophilic surface is generated, consisting of covalently linked organic moieties. The lamellar structure remains analogous to the parent phyllosilicate.

As used herein, the term “drying” refers to spray drying, freeze drying, air drying, vacuum drying or any other kind of process that reduces or eliminates liquid in a substance.

As used herein, the term "spray drying" refers to a commonly used method of drying a substance containing liquid using hot gas to evaporate the liquid to reduce or eliminate liquid in the substance. In other words the material is dried byway of spraying or atomizing into a draft of heated dry air.

5 As used herein, the term "freeze-drying" and the term "lyophilization" and the term "cryodesiccation" refer to the removal of a solvent from matter in a frozen state by sublimation. This is accomplished by freezing the material to be dried below its eutectic point and then providing the latent heat of sublimation. Precise control of heat input permits drying from the frozen state without product melt-back. In practical application, the process
10 is accelerated and precisely controlled under reduced pressure conditions.

As used herein, the term "dry free flowing powder" refers to a free flowing dry powder.

As used herein, the term "grinding" refers to reducing particle size by impact, shearing, or attrition.

15 As used herein, the term "washing" refers to the removal or cleansing (e.g., using any type of solute (e.g. distilled water, buffer, or solvent) or mixture) of impurities or soluble unwanted component of a preparation (e.g., a yeast cell wall extract may be washed to remove non-yeast cell wall components from the sample).

As used herein, the term "enzyme" refers to as a protein or protein-based molecule
20 with a characteristic sequence of amino acids that fold to produce a specific three-dimensional structure which gives the molecule unique properties and that acts as a catalyst or a chemical for specific chemical reactions, converting a specific set of reactants (called substrates) into specific products.

As used herein, the term "peptide," the term "polypeptide" and the term "protein"
25 refer to a primary sequence of amino acids that are joined by covalent "peptide linkages." Generally, a peptide consists of a few amino acids, typically from 2-50 amino acids, and is shorter than a protein. The term "polypeptide" encompasses peptides and proteins. Peptides, polypeptides or proteins can be synthetic, recombinants or naturally occurring. A synthetic peptide is produced by artificial means in vitro (e.g., was not produced in vivo).

30 As used herein, the term "proteases" refers to any of various enzymes, including the endopeptidases and exopeptidases that catalyze the hydrolytic breakdown of proteins into peptides or amino acids.

As used herein, the term "lysis" refers to the disintegration or rupture of the yeast cell membrane and yeast cell wall resulting in the release of the intracellular components. As used

herein, "lysis" occurs as a result of physical/ mechanical, enzymatic (including autolysis and hydrolysis) or osmotic mechanisms (including "alcohol shocking" and hydrolysis).

As used herein, the term "autolysis" refers to the breakdown of a part or whole cell or tissue by self-produced enzymes.

5 As used herein, the term "hydrolysis", refers to the process of splitting a compound into fragments with the addition of water (e.g., that is used to break down polymers into simpler units (e.g. starch into glucose)).

As used herein, "alcohol shocking" refers to an osmotic stress generated by the addition of an alcohol (e.g. ethanol) to growth medium to create a difference between the
10 osmotic pressure of the medium and the osmotic pressure inside cells (e.g., yeast cells) growing in the medium. Alcohol shocking may lead to the lysis of cells (e.g., yeast cells) grown in the medium.

As used herein, the term "osmosis" refers to the diffusion of a solvent (e.g., water) through a semi-permeable membrane, from a solution of low solute concentration (high water
15 potential) to a solution with high solute concentration (low water potential), up a solute concentration gradient. It is a physical process in which a solvent moves, without input of energy, across a semi-permeable membrane (permeable to the solvent, but not the solute) separating two solutions of different concentrations. Net movement of solvent is from the less-concentrated (hypotonic) to the more-concentrated (hypertonic) solution, which tends to
20 reduce the difference in concentrations.

As used herein, the term "osmotic stress" and the term "osmotic shock" refer to a sudden change in the solute concentration around a cell, causing a rapid change in the movement of water across its cell membrane. Under conditions of high concentrations of either salts, substrates or any solute in the supernatant water is drawn out of the cells through
25 osmosis. This also inhibits the transport of substrates and cofactors into the cell thus "shocking" the cell. Alternatively, at low concentrations of solutes, water enters the cell in large amounts, causing it to swell and either burst or undergo apoptosis.

As used herein, the term "sample" is used in a broad sense including a specimen or culture obtained from any source, as well as biological and environmental samples.
30 Biological samples may be obtained from animals (including humans) and encompass fluids, solids, tissues, and gases. Biological samples include blood products, such as plasma, serum and the like. Environmental samples include environmental material such as surface matter, soil, water, crystals and industrial samples.

As used herein, the term “complex” refers to an entity formed by association between two or more separate entities (e.g., association between two or more entities wherein the entities are the same or different (e.g., same or different chemical species). The association may be via a covalent bond or a non-covalent bond (e.g., via van der Waals, electrostatic, charge interaction, hydrophobic interaction, dipole interaction, and/or hydrogen bonding forces (e.g., urethane linkages, amide linkages, ester linkages, and combination thereof)).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides novel yeast cells comprising a cell wall structure that has been modified (e.g., clay and/or clay components are interlaced into the yeast cell wall and/or the glucan:mannan ratio has been altered), methods of producing the same, compositions comprising and/or derived from the same, and methods of using the same (e.g., to sequester bacteria and mycotoxins).

In some embodiments, the present invention provides a yeast cell wall extract (e.g., an isolated, purified, modified and/or concentrated cell wall extract) comprising clay and/or clay component(s) interlaced into the cell wall (e.g., due to cultivation of the yeast cell in the presence of a clay) and/or yeast cell wall extract comprising altered glucan:mannan structure. In some embodiments, the clay interlaced yeast cell wall extract comprising clay and/or clay component interlaced into the yeast cell wall and/or yeast cell wall extract comprising altered glucan:mannan structure is admixed or otherwise added to feedstuffs, organic matter (e.g., bedding), and/or water thereby sequestering mycotoxins (e.g., while in the gastrointestinal tract of the animal or during filtration), and negating or reducing the negative effects of mycotoxins. Thus, in some embodiments, the present invention provides methods that significantly improve the adsorptive/sequestering properties of yeast cell wall-based material toward mycotoxins (e.g., that significantly adsorb and/or sequester and/or limit the bioavailability of a variety of mycotoxins (e.g., not adsorbed to and/or not sequestered using clay alone, yeast cell wall extract alone, a combination of yeast cell wall extract to which a clay is later added on a dry blend basis; and/or a chemical grafting of polysaccharide materials on top of clay based products) in the digestive tract of an animal).

In some embodiments, the present invention provides a novel preparation of yeast cells grown in the presence of one or more clays. In some embodiments, clay interlaced yeast cell walls are extracted from the clay interlaced yeast cells grown in the presence of one or more clays. In some embodiments, the clay interlaced yeast cell wall extract is purified and/or concentrated. As described herein, the present invention is not limited to any

particular yeast cell strain or to any particular clay. In some embodiments, the clay source is a standard commercial grade clay source (e.g., selected for exhibiting in vitro, in vivo, and/or ex vivo properties toward mycotoxins, or a clay source selected because it does not exhibit in vitro, in vivo, and/or ex vivo properties toward mycotoxins). Compositions and methods of the present invention can be utilized for adsorbing and/or sequestering of mycotoxins in a variety of subjects. Indeed, the present invention is not limited by the type of subject that benefits from the compositions and methods described herein. The present invention can benefit all animals, however, exemplary subjects include, but are not limited to, humans, avian, bovine, porcine, equine, ovine, caprine, canine, feline, piscine, camelid, rodent species as well as fish and shellfish subjects. In some embodiments, when admixed with organic matter (e.g., including bedding and feedstuffs), and/or water, and/or fed directly to a subject, compositions of the present invention decrease the absorption or uptake of mycotoxins by the subject, thereby alleviating reduced performance, health and/or reducing the incidence mycotoxin-associated diseases and pathological responses in the subject.

In some embodiments, the present invention provides a method for making and/or generating yeast cells comprising clay and/or clay component(s) interlaced into the yeast cell wall, and/or comprising an altered glucan:mannan structure. For example, in some embodiments, the present invention provides a yeast cell generated and/or cultivated in the presence of a clay wherein the yeast cell wall comprises a glucan:mannan ratio that is greater than (e.g., 2.5% greater, 5% greater, 10% greater, 15%, 20% greater, 25% greater, 30% greater, 40% greater, 50% greater or more) the glucan:mannan ratio of yeast cells generated/cultivated in the absence of a clay (See, e.g., Example 2). In some embodiments, the present invention provides a yeast cell wall extract obtained from (e.g., isolated, purified and/or concentrated from) a viable yeast cell generated and/or cultivated in the presence of a clay wherein the yeast cell wall comprises a glucan:mannan ratio that is greater (e.g., 2.5% greater, 5% greater, 10% greater, 15%, 20% greater, 25% greater, 30% greater, 40% greater, 50% greater or more) than the glucan:mannan ratio of yeast cells generated/cultivated in the absence of a clay (See, e.g., Example 2).

Thus, the present invention provides novel, clay interlaced yeast cell wall extract from yeast cultivated in the presence of a clay, and methods of generating the same. In some embodiments, a method of generating yeast cells comprises cultivating yeast cells including, but not limited to, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, and *Torulaspora* species in the presence of one or more clays in order to alter or otherwise modify the yeast cell wall (e.g., in order to enhance the ability of the yeast cell wall to adsorb and/or sequester mycotoxins (e.g.,

due to the yeast cell wall interlaced with clay and/or clay component(s) and/or comprising an altered glucan:mannan structure)). In some embodiments, the present invention provides the blending of one or more clay based materials including, but not limited to, silicates (e.g., group of tectosilicates (e.g., zeolites, quartz, feldspars); phyllosilicates (e.g., kaolinite, halloysite, dickite, nacrit, chrysotile, antigorite, lizardite, talc), pyrophyllites, smectites (e.g., montmorillonite, beidellite, nontronite; vermiculites, micasantigorite, muscovite, illite, phengite, biotite); sepiolite, palygorskite, attapulgite), and/or a hydrated aluminum silicate (e.g., montmorillonites, bentonite)) to a yeast cell culture medium (e.g., as described in Examples 1, 5, and 6). The present invention provides that the viable yeast cells incorporate the clay and/or clay components into the yeast cell wall structure (e.g., as shown in Figures 1A and 1B and Figure 2). In some embodiments, the one or more clays blended into a yeast cell culture medium are present at a concentration of about 0.075%, 0.1%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, or more of the total growth medium. In some embodiments, the amount of one or more clays blended into a yeast cell culture medium does not exceed 2% of the final content of a reactor in which the yeast cells are grown. In some embodiments, an amount of clay added to yeast cell culture medium is chosen that does not lead to swelling of the yeast cell culture medium (e.g., is about 2.0% or less). In some embodiments, the amount of clay added to yeast cell culture medium is chosen that produces a yeast cell wall extract harvested from the yeast that comprises an amount of clay that has regulatory approval for use as a feed additive in non-medicated animal feed (e.g., does not to exceed 2% in total ration). In some embodiments, a food-grade anti-foaming agent or defoamer is added to the cell culture medium, (e.g., including but not limited to, nonsilicone molecular defoamers, oil based defoamers (e.g., mineral oil, vegetable oil, white oil, or other oil that is insoluble in the foaming medium) or silicone compound based defoamers (e.g., delivered as an oil or water based emulsion)). In some embodiments, waxes (e.g., ethylene bis stearamide (EBS), paraffinic waxes, ester waxes or fatty alcohol waxes) and/or hydrophobic silica are added to improve emulsification and spreading in the foaming medium.

Experiments conducted during development of embodiments of the invention identified a number of factors as important for growth of yeast cells in the presence of one or more clays. For example, in some embodiments, it is preferred to maintain the (w/v) relationship (e.g., corresponding to grams/cubic centimeter (g/cc)) between the clay support material and the water at or below 3% (e.g., to avoid reaching a solid or semi-solid state (e.g., due to water adsorption and retentiveness of the clay material)). Thus, water sorption of the

water-swellable hydrated aluminum silicate is a limiting factor impacting the ratio of clay support material to water in the formulation of a culture medium of the present invention. In some embodiments, culture media and bottles used are sterilized, and inoculation with microorganisms is effected in accordance with standard procedures. For example, in some
5 embodiments, a pre-inoculum is prepared with active dry yeast in a bottle of sterile deionized water and incubated at about 25-30 °C (e.g., 28°C) for a set period of time (e.g., 20 min). In some embodiments, inoculation of the pre-inoculum is aseptically performed (e.g., at a temperature of about 30°C). In some embodiments, pH and glucose levels are monitored and maintained. In some embodiments, agitation of the culture is increased incrementally (e.g.,
10 from 100 to 500 rpm) during growth. In some embodiments, one or more clays are added aseptically to the culture during growth (e.g., when less than half, about half, or more than half of the culture nutrients are consumed).

 In some embodiments, as the amount of clay blended into the yeast cell culture medium increases (e.g., in an amount dependent upon the type of clay or clays used) the
15 swelling properties of the clay material inhibits yeast cell growth.

 In some embodiments, growing yeast in clay-blended yeast cell culture medium provides conditions which stress the growing yeast. Although the present invention is not limited to any particular mechanism of action, and an understanding of the mechanism of action is not necessary to practice the present invention, in some embodiments, the stress
20 applied to the yeast by the clay-blended cell-culture medium causes yeast to produce more glucan, resulting in increased ratios of glucan:mannan.

 In some embodiments, the present invention provides that yeast cells cultivated in the presence of one or more clays not only interlaces the clay and/or a component of the clay into the yeast cell wall, but also display an altered cell wall composition (e.g., characterized by
25 altered ratios of glucan:mannan, total protein content, and/or remnant amounts). For example, the present invention provides yeast cells comprising a glucan:mannan ratio that is greater (e.g., 2.5% greater, 5% greater, 10% greater, 15%, 20% greater, 25% greater, 30% greater, 40% greater, 50% greater or more) than the glucan:mannan ratio of the yeast cells cultivated in the absence of clay (See, e.g., Example 2). The present invention also provides
30 yeast cells and yeast cell wall extracts comprising an enhanced total protein content (e.g., 100%, 200%, 300%, 400%, 500% or more enhance protein content) compared to the total protein content of yeast cells and/or yeast cell wall extracts generated in the absence of a clay (See, e.g., Example 2).

In some embodiments, the present invention provides yeast cell wall extracts comprising clay and/or clay component(s) interlaced into the yeast cell wall and/or comprising an altered glucan:mannan ratio of the structure, that provides superior mycotoxin sequestration properties than conventional compositions. The present invention is not limited by any particular method of generating a yeast cell wall extract from yeast cultivated in the presence of one or more clays. Indeed, a variety of procedures may be utilized to generate yeast cell wall extracts including, but not limited to, use of glass beads and a bead beater, enzymatic (e.g., protease (e.g., papain)) treatment, mechanical lysis, autolysis and hydrolysis, and other methods known in the art (See, e.g., Peppler, H. J. 1979. Production of yeasts and yeast products. Page 157 in: Microbial Technology & Microbial Processes, Vol.1 (2d Ed.), Academic Press). Following lysis and extraction, clay and/or clay component interlaced/integrated yeast cell wall is washed to remove intracellular components and to purify and concentrate the extract. The resulting extract may be dried by any of a number of methods common in the art including, but not limited, freeze-drying and/or spray-drying (e.g., to form a hygroscopic water-insoluble powder).

Accordingly, the invention provides, in some embodiments, yeast cell wall extract comprising clay and/or clay component interlaced directly into the yeast cell wall. In some embodiments, a composition comprising a yeast cell wall extract of the invention comprising clay and/or clay components integrated directly into the yeast cell wall comprises less than about 0.5% clay, 0.5-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70% or more clay and/or clay component as part of a yeast cell wall extract (on a w/w % basis). In some embodiments, increasing the amount of clay in a culture medium increases the amount of clay and/or clay component content of a yeast cell wall extract.

In some embodiments, clay that is added to yeast cell growth medium that is not incorporated into a yeast cell is collected and utilized in a subsequent yeast cell growth procedure (e.g., the unincorporated clay material is recycled). For example, recycling of clay material is facilitated by the sedimentation properties of the clay compared to yeast. Indeed, experiments conducted during development of embodiments of the invention have produced two recoverable layers, (i) a bottom layer containing clay material only (at 99%); and (ii) a top layer containing a clay fraction incorporated into yeast. Thus, although a mechanism is not necessary to practice the present invention and the present invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, the present invention provides a direct inclusion of clay particles into and/or onto the yeast cell wall (e.g., that survives yeast cell

wall extract preparation processes (e.g., via direct interlacing of clay or clay component into the glucan polymer chains of the yeast cell wall)). In other embodiments, a clay fraction traps a yeast cell during culture and upon budding, together with daughter cells, the yeast cells are encaged in a clay comprising macrostructure before the yeast is lysed and its

5 intracellular components removed by washing. In some embodiments, glucan chains grow in between the lamellar structure of the clay.

In some embodiments, a yeast cell or yeast cell wall component (e.g., a yeast cell wall extract generated and isolated as described herein (e.g., comprising clay or clay component interlaced into the yeast cell wall and/or comprising an altered glucan and/or mannan

10 structure)) is combined with one or more other agents including, but not limited to, an enzyme (e.g., esterase, epoxidase), a bacteria, a yeast or yeast component, clay, etc. (e.g., prior to admixing with feeds, incorporating into pelleted feeds, and/or feeding to animals)).

In some embodiments, the present invention utilizes yeast cells comprising altered yeast cell wall structure (e.g., clay and/or clay component interlaced into the yeast cell walls

15 and/or cell walls comprising altered glucan and/or mannan structure), compositions comprising the same, and/or compositions derived from the same, that are utilized with one or more methods and/or materials described herein for use in compositions and/or methods for the reduction, removal and/or elimination of mycotoxins (e.g., physical, mixing, chemical, microbiological methods described herein (e.g., to adsorb and/or sequester bacteria and

20 toxins)). For example, in some embodiments, a yeast cell or yeast cell wall component (e.g., a yeast cell wall extract produced as described herein (e.g., comprising clay or clay component(s) interlaced into the yeast cell wall and/or comprising an altered glucan and/or mannan structure)) is utilized with one or more physical, mixing, chemical, or microbiological methods described herein to sequester mycotoxins.

25 The present invention is not limited by the type of mycotoxin sequestered. Indeed, compositions of the present invention (e.g., clay interlaced yeast cell wall extracts) can be utilized to adsorb and/or sequester a variety of mycotoxins including, but not limited to, acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, extended to all aflatoxins, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid,

30 alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacin +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasin E, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, enniatins, extended to all ergot toxins and endophytes, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins B1 and

B2 and B3, Fusarenon-X, Fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, ipomeanine, islanditoxin, lateritin +1, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, extended to all ochratoxins, oosporein, oxalic acid, patulin, penicillic acid, penitrem, roridin E, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, slaframmine, stericoncentrated modified yeast cell wall extracttocystin, T-1 toxin, T-2 toxin, triacetoxyscirpendiol extended to all trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucaric acid, verruculogen, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, xanthocillin, yavanicin+1, zearalenols, zearalanones, zearalenone, and subfamilies and/or derivatives of the same. In some embodiments, compositions and methods of the invention are utilized to adsorb and/or sequester aflatoxins, zearalenone, ochratoxins, trichothecene, fumonisin, patulin, and/or endophyte related ergot and possible conjugates and metabolites of the aforementioned mycotoxins. Experiments conducted during development of the invention demonstrate the benefit(s) of using the present invention compared to historical or conventional methods. For example, as described herein, a drawback of using a composition comprising only (1) a clay, (2) a composition comprising only a yeast cell wall extract, as well as (3) a composition comprising a yeast cell wall extract to which a clay has been added, is that such compositions and methods of using the same are less effective means than the present invention for reducing the negative effects of mycotoxins and have more drawbacks. However, clay interlaced yeast cell wall extracts of the present invention (e.g., comprising clay and/or clay component interlaced into the yeast cell wall, and/or comprising an altered glucan and/or mannan structure) display the unexpected ability to sequester a variety of mycotoxins, and also display a strikingly enhanced ability to adsorb mycotoxins compared to conventional compositions (e.g., a composition comprising only clay(s), a composition comprising only a yeast cell wall extract, as well as a composition comprising a yeast cell wall extract to which clay(s) has been added, See Examples 2-3). Thus, the present invention provides compositions and methods that display unexpected and superior sequestration and/or adsorption properties with respect to a variety of mycotoxins not found in conventional compositions and methods. Thus, the present invention provides clay interlaced yeast cell wall-based materials and methods of making and using the same to provide an efficient method to sequester mycotoxins in the digestive tract of animals and humans (e.g., via adsorbing mycotoxins present in feedstuffs, other organic matter and/or water) while also providing lower or no adsorption of beneficial nutrients and lesser or no negative effects on the environment.

In some embodiments, a preferred physical form of the invention is a dry free-flowing powder suitable for direct inclusion into feedstuffs, other organic matter (e.g., bedding) or as a direct supplement to an animal.

Compositions of the invention can be added to any organic matter (e.g., bedding, feedstuff for animals, feedstuff for humans) and/or water (e.g., water used for animal and/or human consumption, environmental water (e.g., ponds, lakes, reservoirs, fish tanks, etc.)) to remove mycotoxins from the matter. When incorporated directly into animal feedstuffs, a composition of the invention is added in amounts ranging from about 0.0125% to about 0.4% by weight of feed. When incorporated into other organic matter (e.g., animal bedding), a composition of the invention is added in amounts ranging from about 0.0125% to about 99.9%. When incorporated into a liquid (e.g., water (e.g., for filtration)), a composition of the invention is added in amounts ranging from about 0.0125% to about 100%. In some embodiments, a composition of the invention is added to feedstuffs in amounts from about 0.025% to about 0.2% by weight of feedstuff. Alternatively, compositions of the invention are directly fed to animals as a supplement (e.g., in an amount ranging from about 2.5 to about 20 grams per animal per day). One of ordinary skill in the art immediately appreciates the amount to be fed varies depending upon animal species, size, the type of feedstuff to which a composition of the invention is added, bedding material, water source, etc.

Compositions of the invention can be fed to any animal and humans. When admixed with feedstuffs or used as a feed supplement, compositions of the invention decrease mycotoxin bioavailability, absorption or uptake of mycotoxins by the animal, improve performance and/or health and reduce incidence of disease. In some embodiments, when, compositions of the invention are added to organic material that animals and humans come into contact with (e.g. bedding), compositions of the invention decrease mycotoxin bioavailability (e.g., decrease absorption and/or uptake of mycotoxins by the animal) thereby improving performance and health and reducing incidence of disease. In some embodiments, compositions of the invention are added to water that is intended for use by animals or humans (e.g., for consumption or other purpose), thereby decreasing mycotoxin bioavailability (e.g., decrease absorption and/or uptake of mycotoxins by an animal or human subject) and improving performance and health and reducing incidence of disease (e.g., compositions of the invention decrease bioavailability, absorption or uptake of mycotoxins. In some embodiments, a composition of the invention is added to water used for human consumption (e.g., water used for manufacture of juice, wine, water bottles, coffee, tea, milk or other type of consumed liquid). In some embodiments, a composition of the invention is

added to environmental water (e.g., ponds, lakes, reservoirs, rivers, streams, irrigation channels, tanks used to house fish or other type of aquatic species, etc.). Thus, in some embodiments, a composition of the invention (e.g., yeast cell wall extract comprising clay or clay component integrated into the cell wall) is utilized in the filtration of liquids (e.g., consumable liquids (e.g., water used in beverage production, beverages)). For example, in some embodiments, a composition of the invention is utilized as or in a filter, wherein a liquid (e.g., consumable liquid (e.g., orange juice, apple juice, prune juice, grapefruit juice, cranberry juice, or other type of juice, beer, wine, distilled liquid, etc.)) is processed through a filter comprising a composition of the invention, wherein the composition removes one or more types of mycotoxins from the liquid.

As described in Examples 1-4, cultivation of yeast in the presence of clay provides a dramatic increase in the yeast cell wall adsorption of mycotoxins (e.g., from 6.917% when the yeast is not cultivated with clay, and reaching 73.553% and 79.337% when 1.0 and 2.0% of clay are respectively included to the medium without the specific extraction of the glucan of the inner yeast cell wall layer (See, e.g., Example 2)). Moreover, the ratio of glucan:mannan increases from 1.066 to 1.366 with the addition of clay. Despite a decrease of mannan, the concentration of the proteins of the cell wall increased. Also, the remnant fraction (e.g., representing losses of glucans, mannan, proteins, clay, N-acetylglucosamine and/or chitin present in the yeast cell wall during the extraction process) increased in the presence and surface area of clay. Although a mechanism is not necessary to practice the invention and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, the increase is due to the enhancement of chitin fraction involved in compensatory mechanisms of the yeast due to changes of the environment and conditions of growth. Moreover, compositions of the present invention (comprising yeast cell wall extract from altered yeast cells (e.g., yeast cells comprising clay and/or clay component interlaced into the yeast cell walls and/or cell walls comprising altered glucan and/or mannan structure)) provided a significant and unexpected ability to adsorb and/or sequester mycotoxins (e.g., zearalenone (e.g., displaying a 79.33% efficacy compared to only a 44.7% efficacy for a conventional composition comprising a combination of yeast cell wall extract to which a clay is later added on a dry blend basis, See Examples 1-4)).

The use of an alternative method to extract clay interlaced yeast cell wall of clay interlaced yeast cells using a protease cut was investigated (See Example 3). The specific extraction of the inner layer (glucan) of clay interlaced yeast cell wall generated an increase of the sequestering and adsorption properties of the clay interlaced yeast cell wall for

mycotoxins (e.g., zearalenone). Moreover, cultivating yeast cells in a cell culture medium comprising clay at 1.0% and 2.0% enhanced significantly the sequestering and adsorption activity of clay interlaced yeast cell wall with mycotoxins, (e.g. zearalenone). For example, a conventional composition comprising a combination of yeast cell wall extract to which a clay is later added on a dry blend basis accounted for a 44.7 % efficacy rate for sequestering mycotoxins, compared to a 85.89% efficacy rate for sequestering mycotoxins obtained with a composition of the present invention and an increase of aflatoxin B1 adsorption from 2.65 up to 53.70% (See, e.g., Example 3).

In some embodiments, the present invention provides methods for producing yeast cells comprising a clay-interlaced yeast cell wall. In some embodiments, yeast cells comprising a clay-interlaced yeast cell wall are produced on a variety of scales (e.g. test scale, batch-scale, pilot-scale, pre-production-scale, production-scale, commercial-scale, industrial scale). In some embodiments, yeast are grown in a fermenter. A fermenter may be of any suitable size (e.g. 5 liter...10 liter... 25 liter... 50 liter... 100...500 liter...1K liter...5K liter...10K liter...50K liter...100K liter...500K liter...1 million liter, etc.) to produce the desired scale of yeast for use with the present invention (e.g. test-scale, pilot scale, industrial-scale, etc.). In some embodiments, media for growing yeast can be of any suitable composition for growing yeast in accordance with the present invention. Suitable nutrients are sources of carbon, nitrogen, phosphorus, magnesium, sulphur, potassium and trace elements. In some embodiments, nutrients are added to the culture in concentrations (% w/w of the source compound) within the ranges (percentages by weight): Carbon source 0.01 - 20% (e.g. 0.05 - 10%), Nitrogen source 0.001 - 10% (e.g. 0.001 - 3%), Phosphorus source 0.001 - 5% (e.g. 0.01 - 0.5%), Magnesium source 0.001 - 0.2% (e.g. 0.001 - 0.2%), Sulphur source 0.01 - 0.25% (e.g. 0.01 - 0.25%), Potassium source 0.001 - 0.5% (e.g. 0.01 - 0.25%), Organic nitrogen source 0.001 - 5% (e.g. 0.01 - 5%), and trace elements are added in excess. In some embodiments, yeast culture media comprises water, carbon source (e.g. sugar, glucose, dextrose, sugar cane, molasses, etc.), suitable nitrogen source (e.g. ammonia, urea, etc.), amino acid source (e.g. peptone, etc.), salts (e.g. sodium chloride, calcium hypochloride, magnesium chloride, magnesium sulphate, zinc sulphate, etc.), and source of clay or clay component (e.g. zeolite, bentonite, aluminosilicate, montmorillonite, smectite, kaolinite, organoclay, mixtures thereof, etc.). In some embodiments, yeast culture media components may be present in any suitable amounts for yeast cell growth (See e.g. Example 5). In some embodiments, the presence of clay in yeast culture media presents unanticipated complications to standard yeast growing protocols. In some embodiments, the presence of

clay in culture media results in unusually large amounts of foaming in the fermentor. In some embodiments, the present invention provides antifoaming agents in the cell culture medium (e.g. nonsilicone molecular defoamers, oil based defoamers (e.g. mineral oil, vegetable oil, white oil, etc.), powder defoamers (e.g. silica), water based defoamers, silicone based defoamers, polyethylene glycol polypropylene glycol copolymers, alkyl polyacrylates, etc.). In some embodiments, antifoaming agents are required for increasing the scale of the present invention. In some embodiments, use of an antifoaming agent is associated with an enhanced ability to scale up production of a composition of the invention

10 EXPERIMENTAL

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

15 Example 1

Materials and methods

Yeast culture. The following protocol was used for each Bioflow fermenter (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) to grow the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (active dry yeast (ADY) from Fermin, Alltech Inc., Batch #689, Yeast count: 2.38×10^{10} cells/gram, Viability: 92.6%). The yeast inoculum was prepared by transferring 28 g of fresh ADY Fermin to a pre-warmed bottle of 250ml sterile deionized water. Then, the solution was incubated at 30°C (in water bath) for 20 min and swirled several times. The BioFlow media was composed of 66 g of yeast extract, 10 g of peptone, 4 g of dextrose, 4 g of yeast nitrogen base and 1750 mL of deionized water. A control batch was produced by growing yeast alone, which required an additional 250 mL of deionized water to the reactor volume. Three batches containing yeast and bentonite K10 (Fluka) were produced by adding 8, 16, and 32 g to the reactor. The Bioflow reactor media was warmed up at 30°C and air was injected at 1L/min flow rate during 10 min prior inoculation. Agitation was set at 300 rpm and the media monitored and maintained at a minimum of pH 5.0 during the entire growth. An anti-foaming agent was added (Antifoam AES, 1:10, as needed). Ammonium phosphate dibasic (DAP) was then injected aseptically (4 g in 10 mL at pH 4.0). The previously re-suspended yeast was added to the fermentor. The glucose level was tested during growth with diabetic stripes (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) and supplemental glucose was added when glucose level fell below

0.8 mg/mL. The agitation was progressively increased to 500 rpm over 2 h of incubation as well as the air flow (up to 4 L/min over 3 hrs). When half of the supplemental glucose substrate was consumed, additional bentonite was added (8, 16, 32 g in 250 ml deionized water) to the reactor for a final concentration of 0.5%; 1.0%; and 2.0%, respectively, of clay in the final media.

Yeast cultures were harvested when all sugar had been utilized. The content of the BioFlow was collected into sterile bottles and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was removed and the pellet was washed with 0.125 % NaCl in H₂O. The pellet was separated into 2 fractions by the distinct formation of 2 layers after centrifugation: (i) a clay containing layer and (ii) a yeast and clay containing layer. Yeast were then washed three times with 0.125% NaCl solution.

Clay interlaced yeast cell wall extraction method. Two separate methods were used for the isolation of yeast cell wall fractions from yeast produced as described above.

In a first method, a 'micro-method' was used employing glass beads and a minibead beater (Bead-Beater, Model #1107900, Biospec Products, Inc., Hamilton Beach/Proctor-Silex, Inc., Southern Pines, North Carolina, U.S.A.). The pellet was resuspended with two volume of 10mM Tris-Cl, pH 7.4 with phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and beat with glass beads (50:50, yeast slurry:beads) in a total volume of 5mL for 30 sec with 1 min interval rest, all the while on ice. The beating was repeated 10 times or until 95% of the cells were disrupted. The beads were re-collected and washed. The fractions were pooled and centrifuged at 4000 g for 20 min. The pellets were then collected, freeze-dried and ground.

In a second method, the yeast pellet was resuspended with sterile deionized water to a concentration of 13 to 15 % of dry matter. The yeast slurry was stirred at 60°C. The pH was adjusted using 10 % NaOH to 8.0 before adding enzyme at 0.3 mL/L. The temperature and stirring conditions were maintained over 8 h. The pH was monitored and adjusted every 15 min (using the 10 % NaOH) for the first two hours, and then the pH was monitored and adjusted every hour for the next six hours. The slurry was transferred to sterile centrifuge bottles and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with three volume of cold sterile water, and then centrifuged again at 4000 g for 20 min. The washing step was repeated two times before the pellet was frozen, freeze dried and ground.

EXAMPLE 2

Characterization of yeast cell wall extracts isolated utilizing glass beads and a minibead beater from yeast cells cultivated in the absence and presence of clay

Yeast cells were disrupted after re-suspension of the cells in Tris-HCl buffer, pH 7.4 with PMSF using a micro-method using a bead-beater and glass beads as described (See Example 1). Yeast cell wall lysates were then analyzed in order to characterize the yeast cell walls and their ability to adsorb mycotoxins (expressed as a percent of efficacy compared to total mycotoxins present) under physiological pH conditions for each individual mycotoxin considered. The overall adsorbing/binding activity was evaluated kinetically. Test samples comprised a minimum of 5 levels up to 10 levels of mycotoxin concentrations tested with the different yeast cell wall preparations used at a concentration between 0.25 and 4g/L dispersed in an aqueous medium with a fixed value of pH 4 representative of digestive conditions of pH in the animal tract. Adsorption evaluation was calculated using a High Performance Liquid Chromatography coupled to fluorometric and diode-array detectors (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin adsorbed/sequestered).

Data is shown in Figure 3. Yeast cell wall extracts obtained from yeast cells cultured in the presence of clay (clay interlaced yeast cells) display a significant, unexpected, ability to sequester and to adsorb zearalenone (e.g., displaying a 79.33% efficacy for yeast cell walls extracted from yeast cells cultivated in the presence of 2% clay compared to only 6.91% efficacy of yeast cell walls extracted from yeast cells cultivated in the absence of clay. The 79.33 efficacy rate for yeast cell wall compositions extracted from yeast cells cultivated in the presence of 2% clay was also significantly higher than previously documented efficacy rates of only 44.7% for a conventional composition comprising a combination of yeast cell wall extract to which a clay is later added on a dry blend basis. The level of inclusion of the sequestrants product for AFB1 and ZEA were respectively of 0.1 and 0.4% in the reaction medium that was maintained at a constant pH of 4.0. The assay was performed under orbital agitation during 90 min at 37°C and the amount of bound toxin evaluated using HPLC equipped with a fluorescent detector.

Additionally, yeast grown/cultivated in the presence of clay displayed significant alteration in cell wall component/structure. For example, as the amount of clay was increased, the ratio of mannan:glucan increases (e.g., as clay increases from none, 0.5%, 1.0% to 2.0%, the mannan:glucan ratio increases from 1.01 to 1.2, 1.35 and 1.45, respectively. The total amount of protein also increased with increasing amounts of clay added to the cell culture medium.

EXAMPLE 3**Characterization of yeast cell wall extracts isolated utilizing protease cutting from yeast cells grown/cultivated in the absence and presence of clay**

Yeast cells were treated with a protease as described in Example 1. Yeast cell wall lysates were then analyzed in order to characterize the yeast cell walls and their ability to adsorb mycotoxins (expressed as a percent of efficacy compared to total mycotoxins present) under physiological pH conditions for each individual mycotoxin considered. The overall adsorbing activity was evaluated kinetically. Tests samples comprised a minimum of 5 levels up to 10 levels of mycotoxin concentrations tested with the different yeast cell wall preparations used at a concentration between 0.25 and 4g/L dispersed in an aqueous medium with a fixed value of pH 4) representative of digestive conditions of pH in the animal tract. Adsorption evaluation was calculated using a High Performance Liquid Chromatography coupled to fluorometric and diode-array detectors (e.g., to detect amounts of mycotoxin and mycotoxin adsorbed/sequestered).

Data is shown in Figure 4. Clay interlaced yeast cell wall extracts obtained from yeast cells cultured in the presence of clay displayed a significant, unexpected, ability to sequester and/or adsorb zearalenone and aflatoxin B1. For example, yeast cell wall extracts obtained from yeast grown in the presence of 2.0% clay displayed an 85.89% efficacy for zearalenone whereas yeast cell wall extracts from yeast cultivated in the absence of clay display only a 69% adsorption efficacy rate. Clay interlaced yeast cell wall extracts obtained from yeast grown in the presence of 2.0% clay displayed a 53.7% efficacy for aflatoxin B1 whereas yeast cell wall extracts from yeast cultivated in the absence of clay display only a 2.65% adsorption efficacy rate. Additionally, clay interlaced yeast grown/cultivated in the presence of clay displayed significant alteration in cell wall component/structure. The level of inclusion of the sequestrants product for AFB1 and ZEA were respectively of 0.1 and 0.4% in the reaction medium that was maintained at a constant pH of 4.0. The assay was performed under orbital agitation during 90 min at 37°C and the amount of bound toxin evaluated using HPLC equipped with a fluorescent detector.

The method of Example 1 was used with alternate sources of yeast to evaluate the influence of a smectite clay (American Colloid Company, Arlington Height, IL, USA) added at 1.0% in the growing media on the composition of the clay interlaced yeast cell wall material. Three yeast types were investigated belonging to *Saccharomyces cerevisiae*, ADY Fermin (08-032/460-89), a baker's yeast from Levapan (Batch # 7169281, Levapan S.A.,

45
Bogota, Columbia) and an active dry yeast from DCL (lot #1390, DCL Yeast Ltd., Alloa, Great Britain).

Variation between the clay interlaced yeast cell wall were observed with levels of 19.9, 17.0, and 10.3% of glucan; 10.6, 10.4, and 8.4% of mannan; and 1.5, 1.4, 0.9% of chitin (N-acetyl-glucosamine) present in the yeast cell wall (and expressed by reference to the total cell) for ADY Fermin, Levapan, DCL CIYCW prior hydrolysis.

The sequestration efficacy of the produced material exhibited also differences according to the yeast cell type selected (SEE FIG. 9). The variations observed in terms of efficacy were also related to the type of mycotoxin considered.

EXAMPLE 4

Electron microscopy imaging of yeast cell wall extracts from yeast cells grown/cultivated in the absence and presence of clay

Experiments were conducted during development of embodiments of the invention in order to characterize and observe several yeast samples (See, e.g., Figure 2). The samples were prepared by the filtration of a rehydrated solution of yeast in 2.5 % glutaraldehyde (GTA) in 0.85 % NaCl solution. The solution was then filtered through a nylon nucleopore 13 mm diam., 0.1 μ m pore size pre-wetted with 0.85 % NaCl. The filter was then transferred to a Petri dish and covered with drops of GTA/cacodylate (Cac) fixative at room temperature during 90 min. The filters were then rinsed with 0.1 M Na Cac pH 7.2. The secondary fixation was achieved by placing the filters in a tube during 60 min with 100 μ L of 2 % osmium tetroxide in 0.1 M Na Cac pH 7.2. The samples were then rinsed with 0.1 M Na Cac pH 7.2 and 3 times with deionized water. The dehydration of the sample was achieved by ethanol series (25% to 100%). Then, the samples were freeze-dried, mounted on a stub prepared with a carbon tape for conductivity purpose, and coated with Au/P alloy. The observations were made at 3.0 keV on an S-4300 FESEM (Hitachi, Japan). To remove any unspecific interaction between the yeast and clay, a nitrogen high pressurized gas stream was applied on each mounted sample before coating with Au/P.

EXAMPLE 5

Semi-industrial scaling-up of the production of yeast cell wall cultivated with clay

Scaled-up yeast culture. A 150 L fermenter (ML-4100, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) was used to grow the yeast *Sacchromyces cerevisiae*

(active dry yeast (ADY) from Fermin, Alltech Inc., Batch #609, Yeast count: 2.38×10^{10} cells/gram, Viability: 92.6%). The yeast inoculum was prepared by transferring 0.84 kg of fresh ADY Fermin to a pre-autoclaved (121°C during 40 min) 19 L carboy with tubing, covered with a BioShield containing 7.5 L of water and that has been maintained after autoclaving at 30°C in an incubator overnight. Two 19 L Food carboy, covered with a BioShield were prepared by adding 9 L of water, 6 kg of dextrose and a stir bar. After mixing and dissolution of the carbon source, the food media was autoclaved (121°C during 40 min). A Nitrogen solution was prepared using 1 L sterile capped bottle containing 250 ml of deionized water, 120 g of diammonium phosphate adjusted to pH 4.0-4.1 with concentrated HCl. Two 1 L sterile capped bottle of Food Nitrogen were prepared by adding 700 mL of deionized water, 192 g of diammonium phosphate adjusted to pH 4.0-4.1 with concentrated HCl. A Base solution was prepared in a 19 L carboy with tubing, covered with a BioShield and containing 13.5 L of water, 1.5 L KOH. The tubing was then connected to a peristaltic pump. An anti foaming agent (Antifoam AES, 1:10) solution was prepared in a 19 L carboy with tubing, covered with a BioShield and containing 12 L of water, 3 L of antifoaming agent (Antifoam AES, 3 kg) and mixed. The tubing was then connected to a peristaltic pump. The 150 L fermentor media was composed of 1.98 kg amber, 0.3 kg of peptone, 0.12 kg of dextrose, 0.12 kg of yeast nitrogen base, 0.516 g of smectite clay (American Colloid Company, Arlington Height, IL, USA) and 60 L of water that was brought to 121°C, 15psi for 1hr with agitation. The medium was cooled down to 30°C and this temperature was maintained throughout the propagation.

The propagation was performed on the 150 L fermenter maintained at 30 °C with mild agitation (70% of power) and air injection (at 5 psi) prior inoculation and during entire fermentation. The inoculum containing 0.84 kg of ADY in 7.5 L of water was stirred for 20-30 min prior to inoculation in the 150L Fermentor. One bottle of Food Nitrogen was added to each Food carboy under mixing. The Nitrogen solution was pumped into the 150 L fermentor and allowed to mix for a minimum of 10 min prior to inoculation. The antifoam Carboy was attached and the anti-foaming agent pumped through the tubing into the 150 L fermentor as needed. A foam probe was set inside the fermentor to monitor the foaming and to allow supplementing correctly with the anti-foaming agent. The Base solution was attached and pumped through the tubing into the 150 L fermentor as needed. The evolution of the pH of the 150 L fermentor media was monitored and maintained at a minimum of pH 5.0 during the entire growth. The inoculation was performed by attaching the inoculum Carboy to the port and by pumping the content into the 150L fermentor. Mixing of the inoculum in the

fermentor was done for 20-30 min prior to first sampling. The foam was monitored throughout the propagation, adjusting air and agitation up hourly. The pH was monitored internally and externally and adjusted as necessary to maintain a pH of 5.0 or higher. The glucose level was tested during growth with diabetic strips (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) and supplemental glucose was added when glucose level fell below 0.8 mg/mL by slowly pumping in the Food solution or speeding up gradually overtime. If the sugar level rose above 0.8 mg/mL, the feed rate was slowed down or shut off if necessary.

Yeast cultures were harvested when all sugar had been utilized. The content of the 150 L fermenter was collected into sterile bottles and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was removed and the percentage of dry matter of the washed yeast measured. The material was then transferred back to the 150 L fermenter and water was added to bring the slurry from 9-11% to a concentration 13-15% of dry matter. Agitation was maintained at all times.

Clay interlaced yeast cell wall extraction through enzyme hydrolysis. The 13-15% of dry matter yeast slurry was stirred at 60°C. The pH was adjusted using 10 % NaOH to 8.0 before adding enzyme at 0.3 mL/L. The temperature and stirring conditions were maintained over 8 h. The pH was monitored and adjusted every 15 min (using the 10 % NaOH) for the first two hours, and then the pH was monitored and adjusted every hour for the next six hours. The slurry was transferred to sterile centrifuge bottles and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with three volume of cold sterile water, and then centrifuged again at 4000 g for 20 min. The washing step was repeated two times before the pellet was frozen, freeze dried and ground. The increase of the temperature during the spray drying phase resulted in a slightly higher yield and less accumulation of product in the spray drier.

The inclusion of the clay material can be followed by the change in the ash concentration of the sample reaching values around 20 % for the clay interlaced yeast cell wall compared to a 5% concentration in a yeast cell wall extract that is not containing any clay material (SEE FIG. 6). A significant difference in terms of composition between the ADY Fermin yeast cell line produced previously in the Bioflow fermenters compared to the 150 L fermenter was also found with a decrease of the glucan and mannan composition in the large scale production but also an increase of the chitin content of the yeast cell wall (1.5% to 3%) accounting for the responses by the yeast cell wall to perturbing agent and implicating the cell wall signaling pathway.

Semi-industrial scale CIYCW products were evaluated for sequestration efficacy of mycotoxins (See, e.g. Figure 7), and the results confirm increase of mycotoxin adsorption capabilities of CIYCW.

5 **EXAMPLE 6**

Production of clay interlaced yeast cell wall utilizing an industrial source of sugar

Yeast culture. *Sacchromyces cerevisiae* (active dry yeast (ADY) from Fermin, Alltech Inc., Yeast count: 2.38×10^{10} cells/gram, Viability: 92.6%) were grown in a Bioflow fermenter (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.). The yeast
 10 inoculum was prepared by transferring 29 g of fresh ADY Fermin to a pre-warmed bottle of 87 ml sterile deionized water. Then, the solution was incubated at 30°C (in water bath) for 20 min and swirled several times. The BioFlow media was composed of 0.048 g calcium hypochloride, 0.24 g magnesium sulphate, 0.168 g zinc sulphate, 0.24 g magnesium chloride, 2.4 g (2.5ml of prepared food) sugar cane must, 7.5 smectite clay (0.5% in the final media,
 15 (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, USA)) and 1440 mL of deionized water. The sugar cane must is a 30% of total reducing sugars (TRS) solution of molasses diluted with water. Preparation of the must was made with 669 g of molasses (62.8% TRS) and 731 mL of deionized water. A nitrogen source was prepared with 54.5 g of urea in 163.5 mL of deionized water.

20 The Bioflow reactor media was warmed up at 30°C and air was injected at 1L/min flow rate during 10 min prior inoculation. Agitation was set at 300 rpm and the media monitored and maintained at a minimum of pH 5.0 during the entire growth using phosphoric acid, 85%. An anti-foaming agent was added (Antifoam AES, 1:10, as needed). The previously re-suspended yeast was added to the fermentor. The glucose level was tested during growth
 25 with diabetic stripes (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) and supplemental food (from the sugar cane must) was added when glucose level fell below 0.8 mg/mL. The agitation was progressively increased to 500 rpm over 2 h of incubation as well as the air flow (up to 4 L/min over 3 hrs). The final concentration of clay to the reactor was 0.5% in the final media.

30 The amount of molasses to be added to the fermenter depended on the efficiency of the yeast to utilize the sugar and was comprised between 400 and 600 g. Overfeeding of molasses encountered production issues resulting in the incapacity to generate any yeast biomass through fermentation. Yeast cultures were harvested when no further growth was observed. The content of the BioFlow was collected into sterile bottles and centrifuged at 4000 g for

20 min. The supernatant was removed and the pellet was washed with 0.125 % NaCl in H₂O. No separate fraction was found when molasses were used to perform the propagation of the yeast. Yeasts were then washed three times with 0.125% NaCl solution.

5 *Clay interlaced yeast cell wall extraction method.* The yeast pellet was resuspended with sterile deionized water to a concentration of 13 to 15 % of dry matter. The yeast slurry was stirred at 60°C. The pH was adjusted using 10 % NaOH to 8.0 before adding enzyme at 0.3 mL/L. The temperature and stirring conditions were maintained over 8 h. The pH was monitored and adjusted every 15 min (using the 10 % NaOH) for the first two hours, and then the pH was monitored and adjusted every hour for the next six hours. The slurry was
10 transferred to sterile centrifuge bottles and centrifuged at 4000 g for 20 min. The supernatant was discarded and the pellet washed with three volume of cold sterile water, and then centrifuged again at 4000 g for 20 min. The washing step was repeated two times before the pellet was frozen, freeze dried and ground.

15 The sequestration efficacy of the produced material exhibited also differences according to the carbon source used to propagate the yeast (SEE FIG. 8). The variations observed in terms of efficacy were also related to the type of mycotoxin considered. The composition of the material was also different from the composition of the material previously produced with dextrose as sole source of carbon. Levels of 13.4% of glucan; 17.8% of mannan; and 2.7% of chitin (N-acetyl-glucosamine) present in the yeast cell wall (and expressed by reference to the
20 total cell) were found.

EXAMPLE 7

In vivo efficacy against Fusarium Mycotoxicoeses

25 One-day-old Hybrid turkey poults (Hybrid Turkeys, Kitchener, ON, Canada) were individually weighed, wing-banded and distributed randomly into groups at the Arkell Poultry Research Station of the University of Guelph. Poults were randomly assigned to each of 5 diets. Poults were initially maintained at 32°C, and the temperature was gradually reduced by 3°C per week to reach a temperature of 21°C by the end of wk 4. This temperature was maintained for the duration of the experiment. Turkey poults were fed corn, wheat and
30 soybean meal-based starter (0-3 wk), and grower (4-6 wk) diets formulated with control grains, control+ 0.2% clay interlaced yeast cell wall, contaminated grains, and contaminated grains + 0.2 % clay interlaced yeast cell wall. The control diet was formulated to meet or exceed the minimum nutrient requirements of turkeys according to the NRC (1994). Mycotoxin-contaminated diets were prepared by replacing 25 and 10% and 26 and 5% of the

control corn and wheat with contaminated corn and wheat naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins during starter and grower phases, respectively. The levels of replacement of control grains with the contaminated grains were calculated in order to achieve a mycotoxin challenge of about 4 mg DON/kg of diet during starter and grower phases. Polymeric glucomannan adsorbent supplemented diets were prepared by substituting control corn in the diets with 0.2 % of clay interlaced yeast cell wall (CIYCW). Feed and water were provided ad libitum. Representative feed samples were taken at the beginning of each phase for proximate and mycotoxin analyses. Dietary contents of protein, dry matter and ash were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1980).

The diet formulations and nutrient contents are presented in Table 1. The experimental procedures were approved by the University of Guelph Animal Care Committee following the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Table 1. Composition of experimental diets (%).

Ingredients	Starter diet (0-3 wk)			
	Control	Control+ CIYCW	Contaminated	Contaminated+ CIYCW
Corn	36.00	35.80	11.92	10.82
Contaminated corn			24.98	24.98
Wheat	10.00	10.00		
Contaminated wheat	0.00	0.00	10.00	10.00
Soybean meal	45.00	45.00	45.00	45.00
Monocalcium phosphate	2.30	2.30	2.30	2.30
Calcium carbonate	1.84	1.84	1.84	1.84
Fat/Tallow	3.00	3.00	3.00	3.00
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
DL-Methionine	0.22	0.22	0.22	0.22
HCl-Lysine	0.15	0.15	0.15	0.15
Vitamin and mineral premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
Anticoccidial ²	0.10	0.10	0.10	0.10
CIYCW ³		0.20		0.20
<u>Calculated values</u>				
ME, kcal/kg			2800	
Crude Protein			26.50	
Lysine			1.60	
Methionine			0.62	
Calcium			1.20	
Available phosphorus			0.60	
<u>Analyzed values</u>				
Crude protein	26.41	24.97	27.15	26.70
DM	88.70	89.03	88.99	89.14
Ash	8.10	6.97	7.12	7.00

Ingredients	Grower diet (4-6 wk)			
	Control	Control+ CNCW	Contaminated	Contaminated+ CNCW
Corn	42.68	42.48	16.86	16.66
Contaminated corn			25.82	25.82
Wheat	5.00	5.00		
Contaminated wheat			5.00	5.00
Soybean meal	42.00	42.00	42.00	42.00
Monocalcium phosphate	2.20	2.20	2.20	2.20
Calcium carbonate	1.40	1.40	1.40	1.40
Fat/Tallow	5.00	5.00	5.00	5.00
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
DL-Methionine	0.16	0.16	0.16	0.16
HCl-Lysine	0.06	0.06	0.06	0.06
Vitamin and mineral premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00
Anticoccidial ²	0.10	0.10	0.10	0.10
CNCW ³		0.20		0.20
<u>Calculated values</u>				
ME, kcal/kg			3050	
Crude Protein			23	
Lysine			1.36	
Methionine			0.5	
Calcium			1.1	
Available phosphorus			0.52	
<u>Analyzed values</u>				
Crude protein	23.31	24.29	24.27	27.70
DM	89.30	88.99	88.54	88.38
Ash	6.33	6.39	6.73	6.75

¹ Vitamin-mineral mixture provided per kilogram of diet: vitamin A (all-trans-retinyl palmitate), 8,800 IU; cholecalciferol, 3,300 IU; vitamin E (all-rac- α -tocopheryl acetate), 40 IU; menadione, 3.3 mg; thiamin, 4.0 mg; riboflavin, 8.0 mg; pantothenic acid, 15.0 mg; niacin,

50 mg; pyridoxine, 3.3 mg; choline, 600 mg; folic acid, 1.0 mg; biotin, 220 μ g; vitamin B₁₂, 12 μ g; ethoxyquin, 120 mg; manganese, 70 mg; zinc, 70 mg; iron, 60 mg; copper, 10 mg; iodine, 1.0 mg; selenium, 0.3 mg.

² Monensin sodium, 10%.

³ Clay Interfaced Yeast Cell Wall.

Dietary concentrations of DON, 15-acetyl-DON, ZEN, fumonisin and ochratoxin A are given in Table 2. Other mycotoxins were below the method detection limits which were 0.12 mg/kg for nivalenol, 0.05 mg/kg for 3-acetyl-DON, 0.07 mg/kg for neosolaniol, 0.06 for diacetoxyscirpenol and T-2 toxin and 0.04 mg/kg for HT-2 toxin, and 0.001 mg/kg for aflatoxins. The detection limits for DON, 15-acetyl-DON, ZEN, fumonisin and ochratoxin A were 0.06, 0.05, 0.025, 0.05 and 0.0003 mg/kg, respectively.

Table 2. Mycotoxin concentrations ($\mu\text{g/g}$) in experimental diets.

Diet	Mycotoxin ¹				
	Deoxynivalenol	15-acetyl-deoxynivalenol	Zearalenone	Fumonisin	Ochratoxin
Starter (0-3 wk)					
Control	0.44	0.055	<0.025	BDL ⁴	0.46
Control + CWCW ²	0.53	0.087	<0.025	BDL	0.79
Contaminated	3.3	0.17	0.35	56	BDL
Contaminated + CWCW	4.1	0.17	0.47	BDL	BDL
Grower (4-6 wk)					
Control	0.44	0.12	BDL	BDL	0.62
Control + CWCW	0.37	0.12	BDL	BDL	0.71
Contaminated	3.7	0.29	0.34	61	1.0
Contaminated + CWCW	3.2	0.28	0.27	63	0.35

¹ Other mycotoxins, including diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, nivalenol, 3-acetyl-DON, neosolaniol, HT-2 toxin, and aflatoxins were also measured in the experimental diets, but were not detected.

² Clay Interlaced Yeast Cell Wall.

⁴ Below detection limit.

The feeding of contaminated grains did not significantly affect the body weight gain, feed consumption and efficiency of feed utilization at the end of starter phase (Table 3). Feeding contaminated diet significantly increased the body weight gain and improved the feed efficiency compared to control at the end of grower phase. There was no effect of the diet on the feed intake during grower phase (Table 3). At the end of grower phase, supplementation of clay interlaced yeast cell wall to the contaminated diets increased the body weight gain, feed consumption and improved the efficiency of feed utilization compared to control. Body weight gain and feed efficiency over 6 wk experimental period were significantly higher in the birds fed contaminated diets and contaminated diets supplemented with clay interlaced yeast cell wall.

Table 3. Effect of dietary *Fusarium* mycotoxins on turkey performance¹

Diet	0-3 wk	4-6 wk	0-6wk
Body weight gain (g/bird)			
Cont ²	474.50	1420.81	1895.32
Cont + CIYCW ³	501.45	1461.74	1963.19
MYCO ⁴	511.93	1572.97	2084.90
MYCO + CIYCW	502.60	1627.63	2130.24
SEM	15.35	29.48	37.79
Cont vs Cont + CIYCW	NS ⁵	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0.0023	0.002
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.0067	0.0004
MYCO vs MYCO + CIYCW	NS	NS	NS
Feed intake (g/bird/day)			
Cont	32.44	117.85	75.14
Cont + CIYCW	32.54	116.87	75.26
MYCO	33.75	119.86	76.81
MYCO + CIYCW	33.67	124.40	79.33
SEM	0.91	2.21	1.40
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.05	NS
MYCO vs MYCO + CIYCW	NS	NS	NS
Feed efficiency (body weight gain / feed intake)			
Cont	0.69	0.57	0.60
Cont + CIYCW	0.71	0.59	0.62
MYCO	0.71	0.61	0.63
MYCO + CIYCW	0.71	0.62	0.64
SEM	0.01	0.008	0.003
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0.0023	0.004
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.0067	0.001
MYCO vs MYCO + CIYCW	NS	NS	NS

¹ Values are least square means; n=4 pens for body weight gain, feed intake and feed efficiency (7-birds/pen/phase).

²Control;

³New polymeric glucanmannan mycotoxin adsorbent;

⁴Contaminated diet;

⁵Old polymeric glucanmannan mycotoxin adsorbent; ⁶P > 0.05

The feeding of contaminated grains increased (P<0.05) eosinophil counts at wk 6 (Table 4). Supplementation of the contaminated diets with clay interlaced yeast cell wall prevented this. Supplementation of clay interlaced yeast cell wall to the control diet significantly increased the hematocrit compared to un-supplemented control. There was a significant reduction in the concentration of glucose and activities of γ -glutamyl transferase in the birds fed contaminated diet at wk 3 compared to control (Table 5). Supplementation of clay interlaced yeast cell wall prevented this. Clay interlaced yeast cell wall supplementation to the contaminated diets significantly increased the concentrations of uric acid compared to control at wk 3 and 6. There was a significant decrease in the activity of lactate dehydrogenase at wk 3 in the birds fed contaminated diet + clay interlaced yeast cell wall compared to control.

Table 4. Effect of dietary *Fusarium* mycotoxins on hematology¹

Diet	3 wk	6 wk
Hemoglobin (g/L)		
Cont ²	93.59	105.88
Cont + CIYCW ³	98.12	107.98
MYCO ⁴	93.59	108.75
MYCO + CIYCW	95.87	106.38
SEM	2.27	1.80
Cont vs Cont + New GMA	NS ⁶	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + New GMA	NS	NS
Cont vs MYCO + Old GMA	NS	NS
Hematocrit (L/L)		
Cont	0.30	0.31
Cont + New GMA	0.32	0.31
MYCO	0.30	0.32
MYCO + New GMA	0.30	0.32
MYCO + Old GMA	0.31	0.31
SEM	0.003	0.007
Cont vs Cont + New GMA	0.05	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + New GMA	NS	NS
MCHC (g/L)		
Cont	302.80	335.38
Cont + New GMA	300.88	345.25
MYCO	303.19	336.13
MYCO + New GMA	310.88	331.63
MYCO + Old GMA	301.00	335.83
SEM	5.44	5.32
Cont vs Cont + New GMA	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + New GMA	NS	NS
Cont vs MYCO + Old GMA	NS	NS
WBC (10 ⁹ /L)		
Cont	15.37	16.75
Cont + CIYCW	18.71	16.75
MYCO	17.96	16.07
MYCO + CIYCW	18.93	19.96
SEM	1.93	2.26
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Heterophils (10 ⁹ /L)		
Cont	6.29	9.37
Cont + CIYCW	8.36	9.19
MYCO	7.58	8.71
MYCO + CIYCW	7.86	10.36
SEM	0.93	1.26
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Lymphocytes (10 ⁹ /L)		
Cont	7.57	5.54
Cont + CIYCW	8.00	5.61
MYCO	8.60	5.48
MYCO + CIYCW	8.92	8.54
SEM	1.22	1.29
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS

Diet	3 wk	6 wk
Monocytes ($10^9/L$)		
Cont	0.74	0.72
Cont + CIYCW	1.34	0.85
MYCO	0.56	0.75
MYCO + CIYCW	0.93	0.25
SEM	0.29	0.22
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Eosinophils ($10^9/L$)		
Cont	0.27	0.15
Cont + CIYCW	0.38	0.34
MYCO	0.34	0.38
MYCO + CIYCW	0.33	0.06
SEM	0.11	0.079
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0.04
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Basophils ($10^9/L$)		
Cont	0.79	0.61
Cont + CIYCW	0.65	0.59
MYCO	0.47	0.74
MYCO + CIYCW	0.87	0.71
SEM	0.19	0.16
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS

¹ Values are least square means; for each diet and phase n = 4 pens and 2 birds per pen.

² Control; ³ Clay Interlaced Yeast Cell Wall; ⁴ Contaminated diet; ⁵ P > 0.05.

Table 5. Effect of dietary *Fusarium* mycotoxins on plasma chemistry¹

Calcium (mmol/L)		
Cont	3.05	2.94
Cont + CIYCW	3.05	2.98
MYCO	3.05	3.03
MYCO + CIYCW	3.13	3.14
SEM	0.04	0.04
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.062
Phosphorus (mmol/L)		
Cont	2.57	2.46
Cont + CIYCW	2.59	2.44
MYCO	2.67	2.47
MYCO + CIYCW	2.64	2.64
SEM	0.08	0.08
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.05
Total Protein (g/L)		
Cont	29.12	31.25
Cont + CIYCW	30.12	31.12
MYCO	29.62	32.82
MYCO + CIYCW	29.75	34.25
SEM	0.52	0.68
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.063
Albumin (g/L)		
Cont	8.37	8.37
Cont + CIYCW	8.37	8.37
MYCO	8.25	8.50
MYCO + CIYCW	8.75	9.00
SEM	0.29	0.25
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Globulin (g/L)		
Cont	20.75	22.87
Cont + CIYCW	22.00	22.50
MYCO	21.57	24.12
MYCO + CIYCW	21.00	25.25
SEM	0.55	0.57
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	0.086
Albumin:Globulin ratio		
Cont	0.40	0.36
Cont + CIYCW	0.37	0.38
MYCO	0.38	0.35
MYCO + CIYCW	0.42	0.35
SEM	0.01	0.01
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS

Glucose (mmol/L)		
Cont	18.35	17.82
Cont + CIYCW	18.35	17.82
MYCO	17.41	17.41
MYCO + CIYCW	17.63	17.23
SEM	0.37	0.34
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	0.05	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS
Cholesterol (mmol/L)		
Cont	4.12	4.17
Cont + CIYCW	3.99	4.23
MYCO	4.10	4.04
MYCO + CIYCW	4.03	3.73
SEM	0.12	0.13
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	0.02
Total Bilirubin (mmol/L)		
Cont	5.37	2.37
Cont + CIYCW	5.87	2.37
MYCO	4.87	2.12
MYCO + CIYCW	5.12	2.62
SEM	0.70	0.38
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

Cont	1.75	1.75
Cont + CIYCW	2.00	1.50
MYCO	1.75	1.75
MYCO + CIYCW	0.87	1.00
Cont	809.63	877.58
SEM	0.33	0.18
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	0.04	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	0.008
Aspartate aminotransferase (U/L)		
Cont	211.38	212.63
Cont + CIYCW	226.25	207.75
MYCO	226.75	211.63
MYCO + CIYCW	205.00	203.75
SEM	8.15	6.42
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS
Creatine Kinase (U/L)		
Cont	1352.63	1047.13
Cont + CIYCW	1309.38	907.63
MYCO	1649.25	953.38
MYCO + CIYCW	1147.00	1026.63
SEM	173.46	145.41
Cont vs. Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs. MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

Cont + CIYCW	821.63	754.88
MYCO	872.50	913.25
Cont + CIYCW	801.75	807.88
Lactate dehydrogenase (U/L)		
SEM	664.88	581.40
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Lipase (U/L)		
Cont	5.37	2.87
Cont + CIYCW	4.37	4.50
MYCO	4.75	3.52
MYCO + CIYCW	5.87	4.25
SEM	0.94	0.72
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS
Uric acid (U/L)		
Cont	247.75	167.13
Cont + CIYCW	221.50	144.38
MYCO	292.50	164.75
MYCO + CIYCW	334.50	279.00
SEM	28.22	24.77
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	0.93	0.003
Glutamate dehydrogenase (U/L)		
Cont	4.62	1.87
Cont + CIYCW	3.25	2.62
MYCO	4.25	2.37
MYCO + CIYCW	3.50	2.59
SEM	0.70	0.36
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCO + CIYCW	NS	NS

¹ Values are least square means; for each diet and phase n = 4 pens and 2 birds per pen.

² Control; ³ Clay Interlaced Yeast Cell Wall; ⁴ Contaminated diet; *P < 0.05.

The feeding of contaminated grains significantly decreased the activities of lactate dehydrogenase at wk 6 compared to control (Table 5). Supplementation of clay interlaced yeast cell wall prevented this. There was a significant increase in the concentrations of calcium and phosphorus in the birds fed contaminated and clay interlaced yeast cell wall diet compared to control at wk 6. The same diet at wk 6 also significantly decreased the activities of γ -glutamyl transferase compared to control. A significant increase in the concentrations of

total protein and globulin, and decrease in cholesterol levels were observed in the birds fed contaminated diet when supplemented with clay interlaced yeast cell wall.

5 The feeding of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins to turkeys resulted in a hormetic response with respect to body weight gain and feed efficiency. Feed-borne *Fusarium* mycotoxins resulted in some effects on blood parameters compared to controls including increased eosinophil counts and decreased lactate dehydrogenase activities at week 6 and decreased glucose concentrations and gamma-glutamyl transferase activity at week 3. The feeding of clay interlaced yeast cell wall prevented all of these effects. The feeding of clay interlaced yeast cell wall resulted in numerical increases ($P>0.05$) in growth compared to the feeding of unsupplemented contaminated grains.

15 All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described compositions and methods of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention that are obvious to those skilled in the relevant fields are intended to be within the scope of the present invention.

CLAIMS

What Is Claimed Is:

- 5
1. A yeast cell comprising a yeast cell wall comprising clay or a clay component interlaced into said yeast cell wall.
2. The yeast cell of Claim 1, wherein said yeast cell is cultivated in a cell culture medium comprising clay.
- 10
3. The yeast cell of Claim 2, wherein said clay is a mineral clay or synthetic clay belonging to the silicate group.
4. The yeast cell of Claim 3, wherein said clay is selected from the group consisting of a
- 15
- zeolite, a bentonite, an aluminosilicate, a montmorillonite, a smectite, a kaolinite, an organoclay and mixtures thereof.
5. The yeast cell of Claim 4, wherein the clay is an aluminosilicate clay.
- 20
6. The yeast cell of Claim 2, wherein the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.125% to 4.0%.
7. The yeast cell of Claim 6, wherein the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.5% to 2.0%.
- 25
8. The yeast cell of Claim 1, wherein said yeast is selected from the group consisting of *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* and combinations thereof.
9. The yeast cell of Claim 8, wherein said yeast is *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30
10. A composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract.
11. The composition of Claim 10, wherein the clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is derived from a yeast cell cultivated in growth medium comprising a clay.

12. The composition of Claim 10, wherein glass beads and a bead beater are utilized to prepare said yeast cell wall extract.

5 13. The composition of Claim 10, wherein enzymatic treatment is utilized to prepare said yeast cell wall extract.

14. The composition of Claim 10, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to a feedstuff.

10

15. The composition of Claim 14, wherein the feedstuff is selected from the group consisting of a Total Mixed Ration (TMR), a forage, a pellet, a concentrate, a premix, a coproduct, grain, distiller grain, molasses, fiber, fodder, grass, hay, kernel, leaves, meal, solubles, and a supplement.

15

16. The composition of Claim 10, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added to organic material.

17. The composition of Claim 10, wherein said clay or clay component interlaced yeast
20 cell wall extract is added to water.

18. The composition of Claim 10, wherein a liquid is filtered through said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract.

25 19. The composition of Claim 18, wherein said liquid is a juice, water, beer or wine.

20. The composition of Claim 10, formulated for feeding to any member of Kingdom Animalia.

30 21. The composition of Claim 20, wherein said member is selected from the group consisting of avian, bovine, porcine, equine, ovine, and caprine, piscines, shellfish, camelids, feline, canine, and rodent species.

22. The composition of Claim 10, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract sequester one or more mycotoxins.

23. The composition of Claim 22, wherein said mycotoxin is selected from the group consisting of Aflatoxins, Zearalenone, Trichothecenes, Fumonisin, and Ochratoxins.

24. The composition of Claim 22, wherein said mycotoxin is selected from the group consisting of acetoxyscirpenediol, acetyldeoxynivalenol, acetylnivalenol, acetylneosolaniol, acetyl T-2 toxin, extended to all aflatoxins, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, aflatrem, altenuic acid, alternariol, austdiol, austamide, austocystin, avenacin +1, beauvericin +2, bentenolide, brevianamide, butenolide, calonectrin, chaetoglobosin, citrinin, citreoviridin, cochliodinol, cytochalasin E, cyclopiazonic acid, deacetylcalonectrin, deactylneosolaniol, deoxynivalenol diacetate, deoxynivalenol monoacetate, diacetoxyscirpenol, destruxin B, enniatins, extended to all ergot toxins and endophytes, fructigenin +1, fumagilin, fumonisins, fumonisins B1 and B2 and B3, Fusarenon-X, Fusarochromanone, fusaric acid, fusarin, gliotoxin, HT-2 toxin, ipomeanine, islanditoxin, lateritin +1, lycomarasmin +1, malformin, maltoryzine, moniliformin, monoacetoxyscirpenol, neosolaniol, nivalenol, NT-1 toxin, NT-2 toxin, extended to all ochratoxins, oosporein, oxalic acid, patulin, penicillic acid, penitrem, roridin E, rubratoxin, rubroskyrin, rubrosulphin, rugulosin, sambucynin +1, satratoxins, F,G,H, scirpentriol, slaframine, stericoncentrated modified yeast cell wall extractocystin, T-1 toxin, T-2 toxin, triacetoxyscirpendiol extended to all trichothecenes, trichodermin, trichothecin, trichoverrins, trichoverrols, tryptoquivalene, verrucaric acid, verruculogen, viopurpurin, viomellein, viriditoxin, xanthocillin, yavanicin+1, and zearalenols, and zearalenone.

25. An animal feedstuff comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount effective to sequester mycotoxins.

26. The animal feedstuff of Claim 25, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount of about 0.0125% to about 10% by weight of the feed.

27. The animal feedstuff of Claim 25, wherein said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is present in an amount of about 0.0125% to about 4.0% by weight of the feed.

5 28. A method for reducing bioavailability of mycotoxins to an animal or human comprising:

a) providing

i.) a composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract; and

10 ii.) a material consumed by animal or human;

b) incorporating said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract into said material to produce a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material; and

15 c) allowing said animal or human to consume said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material.

29. The method of Claim 28, wherein said material is a feedstuff.

20 30. The method of Claim 29, wherein about 0.0125% to about 0.4% of said composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added by weight to said feedstuff.

31. The method of Claim 28, wherein said material is bedding.

25 32. The method of Claim 31, wherein about 0.0125% to about 99.0% of said composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added by weight to said bedding.

33. The method of Claim 28, wherein said material is a liquid.

30 34. The method of Claim 33, wherein about 0.0125% to about 99.0% of said composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract is added by weight to said liquid.

35. The method of Claim 28, wherein said animal is selected from the group consisting of avian, bovine, porcine, equine, ovine, and caprine, piscines, shellfish, camelids, feline, canine, and rodent species.
- 5 36. The method of Claim 28, wherein said composition comprising a clay or clay component interlaced yeast cell wall extract sequesters one or more types of mycotoxins.
37. The method of Claim 36, wherein said mycotoxins is selected from the group consisting of Aflatoxins, Zearalenone, Trichothecenes, Fumonisin, Ochratoxins, and combinations thereof.
- 10 38. The method of Claim 28, further comprising incorporating an additional agent into said clay or clay component interlaced yeast cell wall extract incorporated material, wherein said agent is selected from the group consisting of an esterase, epoxidase, yeast and bacterial strain.
- 15 39. A method of producing a commercial-scale quantity of clay or clay component interlaced yeast cell wall extract comprising:
- a) providing:
 - 20 i) yeast starter culture; and
 - ii) yeast cell culture media, wherein said yeast cell culture media comprises the required nutrients for yeast growth and a clay or clay component;
 - b) introducing said yeast starter culture into said yeast cell culture media;
 - 25 c) incubating said yeast in an industrial-scale fermenter under conditions configured to allow yeast growth, wherein said yeast incorporate said clay or clay component into the yeast cells wall during growth;
 - d) adding anti-foaming agent to said fermenter;
 - e) lysing the clay or clay component interlaced yeast cells walls; and
 - 30 f) separating said or clay component interlaced yeast cells walls from the other yeast components.
40. The method of Claim 39, wherein said yeast is selected from the group consisting of *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* and combinations thereof.

41. The method of Claim 39, wherein said clay is a mineral clay or synthetic clay belonging to the silicate group.

5 42. The method of Claim 40, wherein said clay is selected from the group consisting of a zeolite, a bentonite, an aluminosilicate, a montmorillonite, a smectite, a kaolinite, an organoclay and mixtures thereof.

43. The method of Claim 42, wherein the clay is an aluminosilicate clay.

10

44. The method of Claim 39, wherein the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.125% to 4.0%.

15 45. The method of Claim 44, wherein the amount of clay in the cell culture medium is from about 0.5% to 2.0%.

46. The method of claim 39, wherein said industrial-scale fermenter is between one thousand and five million liters.

20 47. The method of claim 39, wherein said anti-foaming agent is added to alleviate effects of said clay on the incubation process.

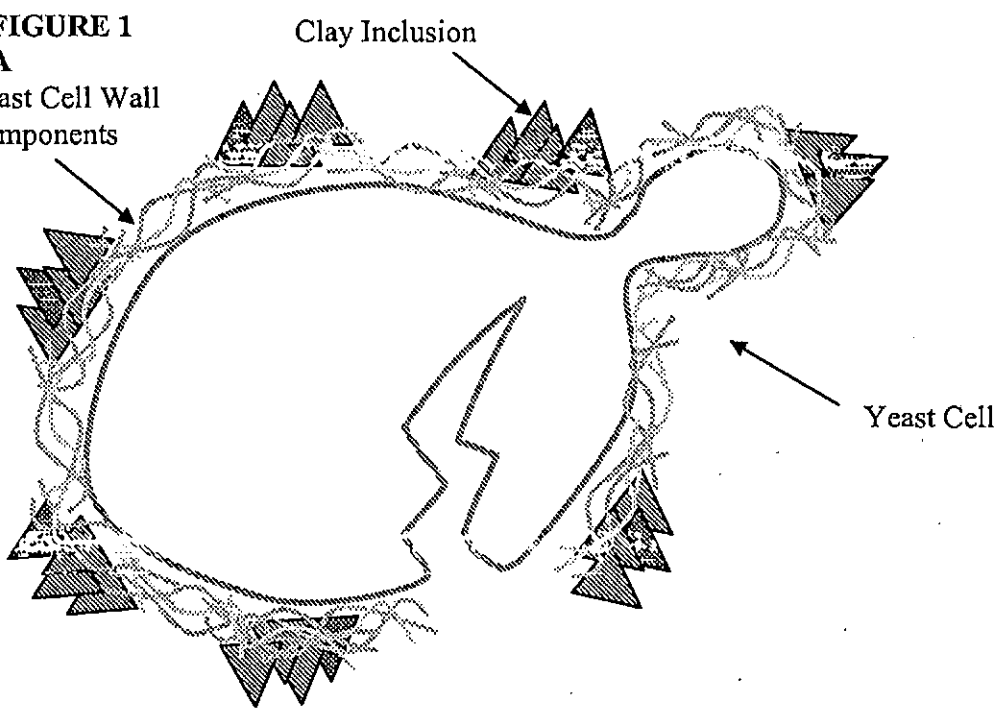
48. The method of claim 39, wherein said anti-foaming agent is selected from the group consisting of a nonsilicone molecular defoamer, oil-based defoamer, powder defoamer,
25 water-based defoamer, silicone based defoamer, polyethylene glycol-based defoamer, polypropylene glycol-based defoamer, and alkyl polyacrylates.

49. The method of claim 39, wherein said anti-foaming agent comprises a nonsilicone molecular defoamer.

30

50. The method of claim 39, wherein said lysing comprises glass beads, a bead beater and/or enzymatic treatment.

FIGURE 1
A
Yeast Cell Wall Components



B

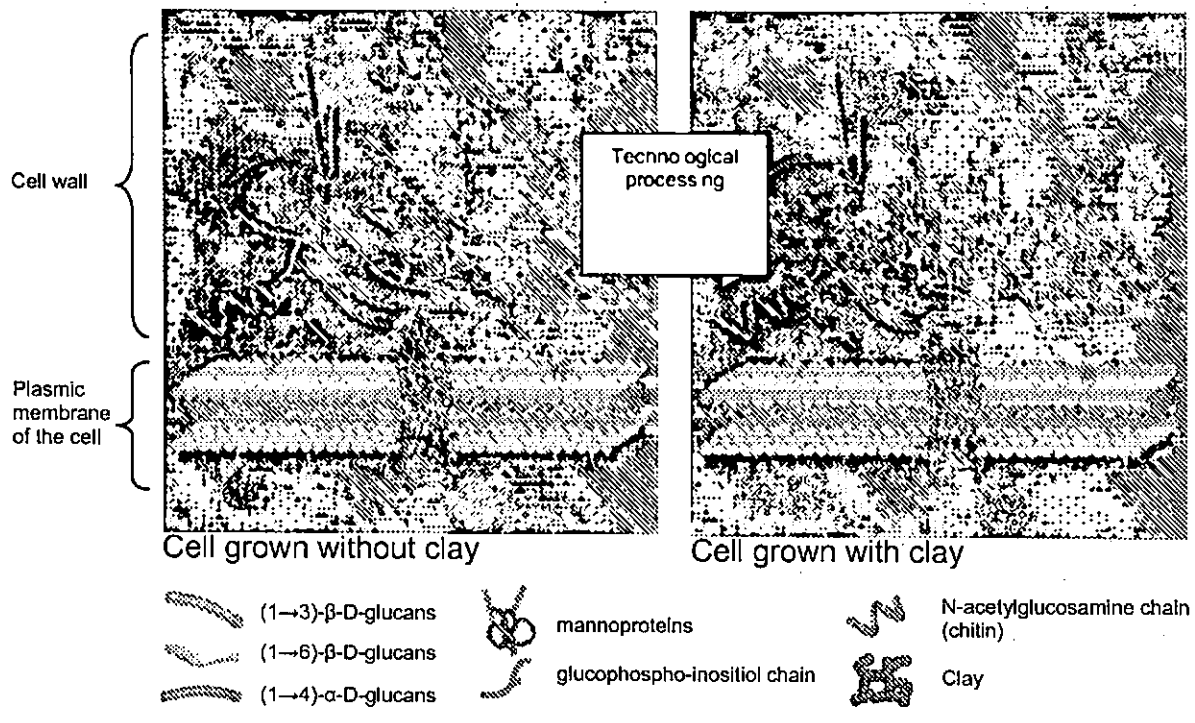


FIGURE 2

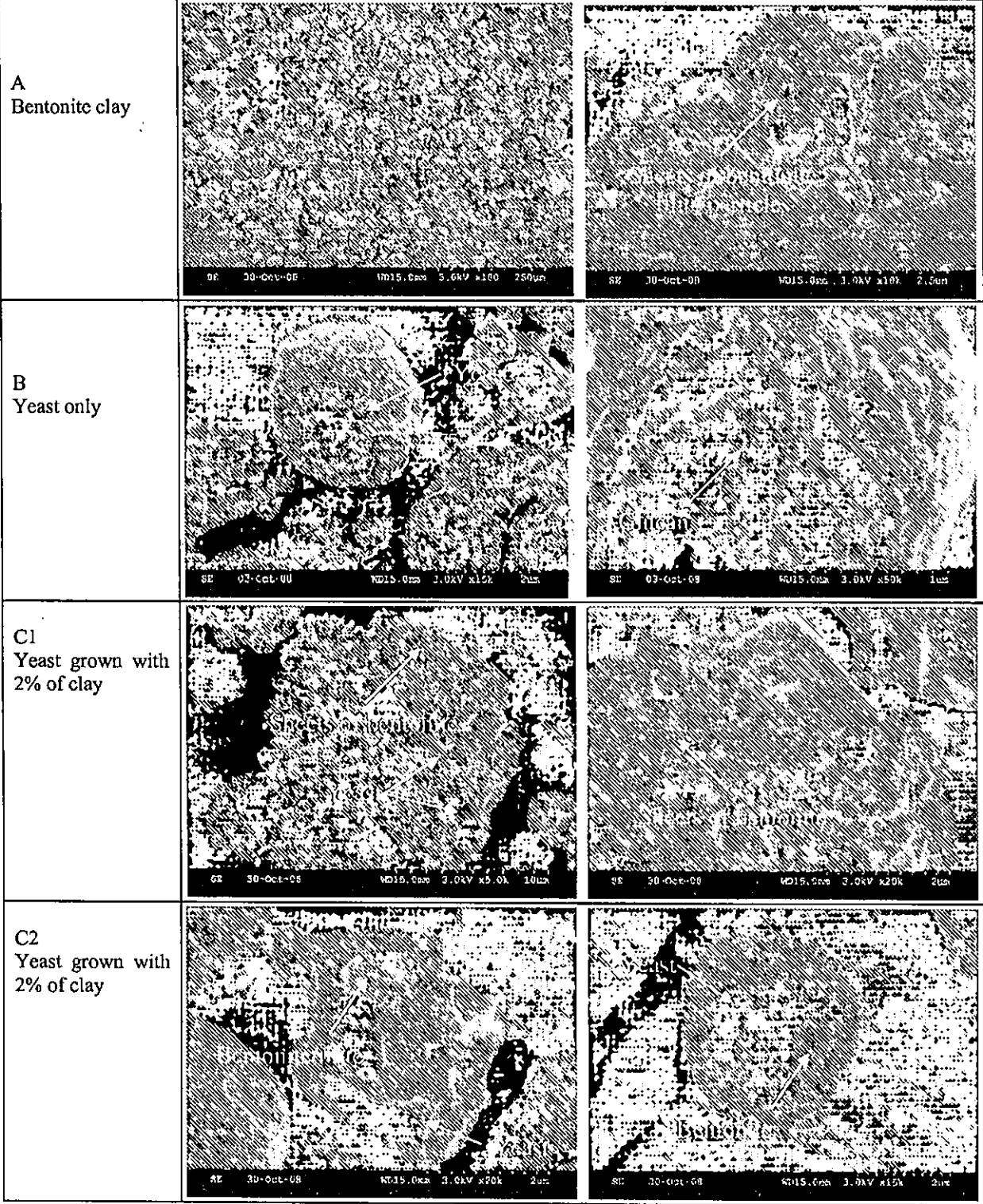


FIGURE 3

Sample	Glucan (%)	Mannan (%)	Ratio G/M	Protein (%)	Remnant (%)	Adsorption ZEARALENONE (%)
YCW only	45.52 ± 0.54	41.29 ± 0.62	1.01	12.38	0.81	6.91 ± 2.19
YCW + 0.5%	42.68 ± 0.49	35.70 ± 0.20	1.20	14.34	7.28	45.64 ± 5.30
YCW + 1.0%	42.69 ± 0.39	31.67 ± 0.37	1.35	15.83	9.81	73.55 ± 2.98
YCW + 2.0%	38.24 ± 0.28	26.34 ± 0.17	1.45	19.89	15.53	79.33 ± 2.24

FIGURE 4

Sample	Glucan (%)	Mannan (%)	Ratio G/M	Adsorption ZEARALENONE (%)	Adsorption AFLATOXIN B1 (%)	Ash Content (%)
YCW only	32.457 ± 0.19	25.92 ± 0.28	1.25	69.34 ± 0.58	2.65 ± 0.55	2.76
YCW + 1.0%	39.93 ± 0.26	22.29 ± 0.23	1.79	80.33 ± 0.28	40.73 ± 3.30	7.58
YCW + 2.0%	36.14 ± 0.20	20.97 ± 0.12	1.72	85.89 ± 1.02	53.70 ± 1.97	10.33

FIGURE 5

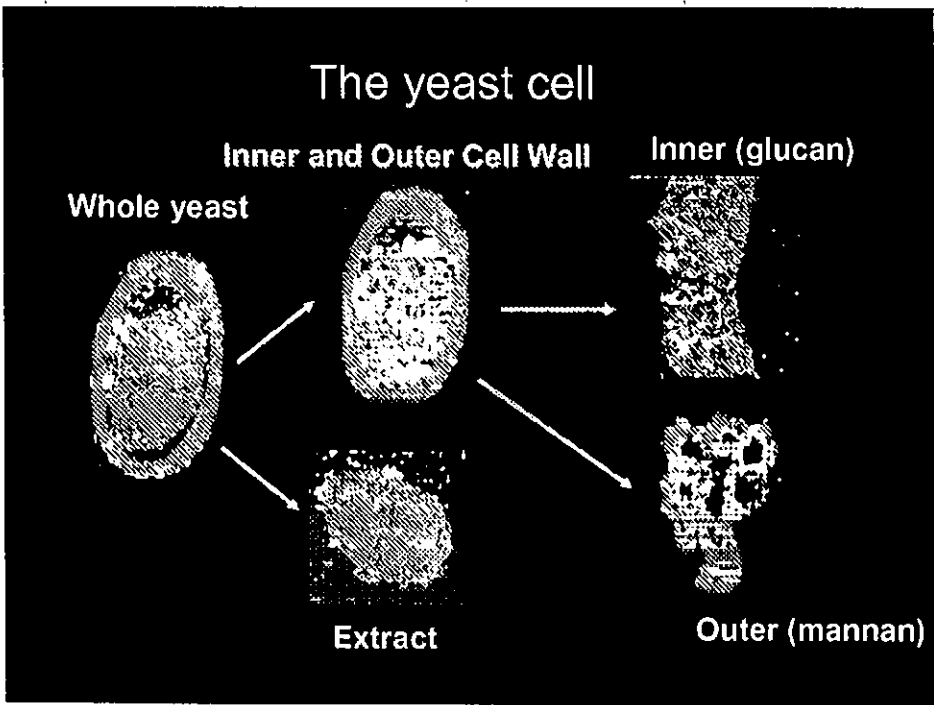


FIGURE 6

Exp/Batch #	08-036	09-002
Material ID	0.5.% Smectite CIYCW Spray-dried	0.5.% Smectite CIYCW Spray-dried
% ash	21.59	20.26%
%C	37.82	37.43
%H	5.3	5.1745
%N	3.75	5.15
%Protein	23.46	32.14
Total Plate Count (cfu/g)	9.35 × 10 ⁴	-
	1.79 (5hrs)	0.14 (0hr)
	4.07 (9hrs)	0.60 (3hrs)
% alcohol	4.72 (11hrs)	1.64 (6hrs)
	-	2.90 (9hrs)
	-	4.82
% glucose	27.5	28.2
% mannose	19.4	16.1

FIGURE 7

Yeast	Clay (1%, smectite)	Enzyme hydrolysis	Adsorption (%)	
			AFB1	ZEA
ADY (YCW only)	-	+	6.9 ± 4.5	39.3 ± 2.4
ADY (#08-036)	+	+	85.3 ± 5.3	57.9 ± 1.1
(#09-002)			99.8 ± .02	55.1 ± 1.1

FIGURE 8

Yeast	Clay (0.5%, Smectite)	Enzyme hydrolysis	Adsorption (%)	
			AFB1	ZEA
ADY	+	+	75.4 ± 13.2	69.2 ± 1.2

FIGURE 9

Yeast	Clay (1%, MBB02)	Enzyme hydrolysis	Adsorption (%)	
			AFB1	ZEAN
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

**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 INVENCIÓN

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 alergenicos 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

láceos)... 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
5 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.

Las estrategias usadas para evitar la aparición de
10 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 INVENCIÓN

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 montmorilonita,

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
 arcilla o extracto de la pared celular de levadura
 10 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
 formas de realización, el líquido es un jugo, agua,
 15 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 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, cochliodiol, 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 tricondermina, tricotecina, tricoverrininas, 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 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 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 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 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 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 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, Fumonisinás, 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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/entrelazada 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 "microscopia 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 microscopia 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
30 interacciones secuestrantes pueden involucrar una

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 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 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.

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 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.

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.

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 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 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.

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), oreja, rectal, vaginal, por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, etc.) y similares.

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

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 fórmula 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

 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 citokuinesis. 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.

10 Como se usa en la presente, el término "arcilla mineral" se refiere a un material natural o sintético 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.

20 Como se usa en la presente, el término "organoarcilla" y el término "arcilla modificada" se 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.

30 Como se usa en la presente, el término "secado" se refiere a secado por aspersión, secado por congelación, 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 "liofilización" 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)
20 a través de una membrana semipermeable, desde una 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, 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, 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 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 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 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 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 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 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, 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 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 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) 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, zeólitas, 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, aproximadamente la mitad o más de la mitad de los
15 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, citochalasina E, ácido ciclopiazónico, desacetilcalonectrina, desactilneosolaniol, 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, rubroskírina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, scirpentriol, slaframina, stericoncentrated modified yeast cell wall
5 extracttocistin, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricondermina, tricotecina, tricoverrininas, tricoverroles, 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, trichoteceno, 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 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 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 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 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 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 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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, montmorillonita, 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 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 invención.

PARTE EXPERIMENTAL

Se proveen los siguientes ejemplos a efectos de demostrar e ilustrar en mayor grado determinadas formas 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

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, 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 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 substrato 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 hemogeneizador 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 fluorométricos 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 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 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 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.

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

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 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 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, 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, 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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	2,30	2,30	2,30	2,30

monocálcico				
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 (3)		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	2582
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 (3)		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 analizados</u>	23,31	24,29	24,27	27,70
Proteína bruta	89,30	88,99	88,54	88,38
DM	6,33	6,39	6,73	6,75
Ceniza				

(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 mg; niacina 50 mg; pirodoxina, 3,3 mg; colina, 600 mg; ácido fólico, 1,0 mg; biotina, 20 μ g; vitamina B12, 12 μ g; etóxiquina, 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 %

(3) Pared de célula de levadura entrelaza con arcilla

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
Inicial (semanas 0-3)					
Control	0,44	0,055	<0,025	BDL (4)	0,46
Control i CIYCW (2)	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, los que in deacetoxicirpenol, toxina T-2, nivalenol, 3-acetil-DON, neosolaniol, toxina HT-2, y aflatoxinas, pero no se detectaron.

10 (2) Pared de célula de levadura enlazada con arcilla

 (3) 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.

Tabla 3. Efecto de las micotoxinas dietarios de *Fusarium* sobre la performance de los pavos (1)

Dieta	Semanas 0-3	Semanas 4-6	Semanas 0-6
	Aumento (ganancia) de peso corporal (g/ave)		
Cont (2)	474,50	1.420,81	1.895,32
Cont - CIYCW (3)	501,45	1.461,74	1.963,19
MYCO (4)	511,93	1.527,97	2.084,90

MYCO - CIYCW	502,00	1.627,63	2,129,64
SEM	15,35	29,48	37,59
Cont vs Cont-CIYCW	NS (6)	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0,0023	0,002
Cont vs MYCI-CIYCW	NS	0,0002	0,0004
MYCO vs MYCO-CIYCW	NS	NS	NS
Ingesta de alimento (g/ave/día)			
Cont	32,44	117,85	75,14
Cont - CIYCW	33,54	116,87	75,20
MYCO	33,75	119,86	76,81
MYCO - CIYCW	33,87	124,40	79,13
SEM	0,91	2,21	1,40
Cont vs Cont-CIYCW	NS	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS	NS
Cont vs MYCI-CIYCW	NS	NS	NS
MYCO vs MYCO-CIYCW	NS	0,05	NS
Eficiencia del alimento (aumento de peso corporal/ingesta de alimento)			

Cont	0,69	0,57	0,60
Cont - CIYCW	0,71	0,59	0,62
MYCO	0,71	0,61	0,63
MYCO - CIYCW	0,71	0,62	0,64
SEM	0,01	0,008	0,008
Cont vs Cont-CIYCW	NS	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0,0027	0,004
Cont vs MYCI-CIYCW	NS	0,0007	0,001
MYCO vs MYCO-CIYCW	NS	NS	NS

(1) los valores son medios cuadráticos mínimos, m = 4 pens para aumento de peso corporal; ingesta de alimento y eficiencia del alimento (7-8 aves/pen/fase)

- 5
- (2) Control
- (3) Nuevo adsorbente polimérico glucomanano para la micotoxina
- (4) Dieta contaminada
- (5) Antiguo adsorbente polimérico glucomanano para la micotoxina; (6) $P > 0,05$
- 10

La alimentación con granos contaminados incrementó ($P < 0,05$) 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

15

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 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 alimentadas con dieta contaminada + paredes de célula de levadura entrelazada con arcilla, en comparación con el control.

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

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Hemoglobina (g/L)	
Cont (2)	93,50	105,88
Cont - CIYCW (3)	98,12	107,88
MYCO (4)	93,50	109,75
MYCO - CIYCW	95,87	106,38
SEM	2,27	1,80
Cont vs Cont- + GMA viejo	NS (6)	NS
Cont vs MYCO	NS	NS

Cont vs MYCI- CIYCW + GMA nuevo	NS	NS
MYCO vs MYCO- CIYCW + GMA viejo	NS	NS
	Hematocrito (L/L)	
Cont	0,30	0,31
Cont + GMA nuevo	0,32	0,31
MYCO	0,30	0,32
MYCO + GMA nuevo	0,30	0,32
MYCO + GMA viejo	0,31	0,31
SEM	0,005	0,007
Cont vs Cont + GMA nuevo	0,05	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + GMA nuevo	NS	NS
	MCHC (g/L)	
Cont	302,80	335,38
Cont + GMA nuevo	300,88	345,25
MYCO	303,13	336,13
MYCO + GMA	310,88	331,63

nuevo		
MYCO + GMA viejo	301,00	335,63
SEM	5,44	5,52
Cont vs Cont + GMA nuevo	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + GMA nuevo	NS	NS
Cont vs MYCO + GMA viejo	NS	NS

Dieta	Semana 3	Semana 6
	WBC ($10^9/L$)	
Cont	15,37	16,75
Cont + CIYCW	18,71	16,75
MYCO	17,96	16,07
MYCO + CIYCW	18,93	19,96
SEM	1,93	2,36
Cont vs Cont- + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI+ CIYCW	NS	NS
	Heterófilos ($10^9/L$)	

Cont	6,20	9,37
Cont + CIYCW	8,36	9,19
MYCO	7,98	8,71
MYCO + CIYCW	7,86	10,36
SEM	0,93	1,26
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS
	Linfocitos ($10^9/L$)	
Cont	7,37	5,54
Cont + CIYCW	8,00	5,61
MYCO	8,60	5,48
MYCO + CIYCW	8,92	8,54
SEM	1,22	1,29
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

Dieta	Semana 3	Semana 6
-------	----------	----------

	Monocitos (10^9 /L)	
Cont	0,71	0,52
Cont + CIYCW)	1,36	0,65
MYCO	0,56	0,75
MYCO + CIYCW	0,93	0,25
SEM	0,29	0,22
Cont vs Cont- + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	MS	NS
Cont vs MYCI- CIYCW	NS	NS
	Eosinófilos (10^9 /L)	
Cont	0,27	0,15
Cont + CIYCW	0,38	0,34
MYCO	0,34	0,38
MYCO + CIYCW	,33	0,06
SEM	0,11	0,079
Cont vs Cont + CIYCW	NS s	NS
Cont vs MYCO	NS	0,04
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS
	Basófilos (10^9 /L)	

Cont	0,79	0,61
Cont + CIYCW	0,65	0,89
MYCO	0,47	0,74
MYCO + CIYCW	0,87	0,7
SEM	0,19	0,18
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

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

(2) Control, (3) pared de célula de levadura entrelazado con arcilla; (4) dieta contaminada; (6) P > 5 0,05.

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

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Calcio (mmol/L)	
Cont	3,05	2,94
Cont + CIYCW	3,00	2,91
MYCO	3,05	3.03
MYCO - CIYCW	3,13	3,14

SEM	0,04	0,04
Cont vs Cont- + CIYCW	NS (6)	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI +CIYCW	NS	NS
	Fósforo (mmol/L)	
Cont	2,57	2,46
Cont + CIYCW	2,59	2,44
MYCO	2,67	2,47
MYCO + CIYCW	2,64	2,64
SEM	0,08	0,06
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	0,05
	Proteína total (g/L)	
Cont	29,12	31,25
Cont + CIYCW	30,12	31,12
MYCO	29,62	32,62
MYCO + CIYCW	29,75	34,25
SEM	0,52	0,68

Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	0,003

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Albúmina (g/L)	
Cont	8,37	8,37
Cont + CIYCW	8,72	8,62
MYCO	8,25	8,50
MYCO +- CIYCW	8,75	9,00
SEM	0,29	0,25
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI +CIYCW	NS	NS
	Globulina (g/L)	
Cont	20,75	22,87
Cont + CIYCW	22,00	22,50
MYCO	21,37	24,12
MYCO + CIYCW	21,00	23,25

SEM	0,55	0,57
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	0,06
	Relación: Albúmina/globulina	
Cont	0,40	0,36
Cont + CIYCW	0,37	0,38
MYCO	0,38	0,35
MYCO + CIYCW	0,42	0,35
SEM	0,01	0,01
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Glucosa (mmol/L)	
Cont	18,35	17,82
Cont + CIYCW)	18,13	17,45
MYCO	17,51	17,52
MYCO + CIYCW	7,63	17,23

SEM	0,37	0,34
Cont vs Cont- + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS
	Colesterol (mmol/L)	
Cont	4,12	4,17
Cont + CIYCW	3,99	4,23
MYCO	4,10	4,04
MYCO + CIYCW	4,03	3,73
SEM	0,12	0,13
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS
	bilirrubina total (mmol/L)	
Cont	5,37	2,37
Cont + CIYCW	5,87	2,37
MYCO	4,87	2,12
MYCO + CIYCW	5,12	2,62

SEM	0,70	0,38
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	ND

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Amilasa (U/L)	
Cont	1,75	1,75
Cont - CIYCW)	2,00	1,50
MYCO	0,75	1,87
MYCO - CIYCW	0,87	1,00
Cont	809,63	877,38
SEM	0,33	0,18
Cont vs Cont- + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	0,04	NS
Cont vs MYCI+CIYCW	NS	NS
	Aspartato aminotransferasa (U/L)	
Cont	211,38	212,63
Cont + CIYCW	226,25	207,75
MYCO	226,75	211,63

MYCO + CIYCW	205,00	203,75
SEM	8,15	6,42
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs MYCI + CIYCW	NS	NS
	Creatina quinasa (U/L)	
Cont	1.352,63	1.047,13
Cont + CIYCW	1.309,38	907,63
MYCO	1.649,25	953,38
MYCO + CIYCW	1.147,00	1.086,63
SEM	173.46	145,41
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

Dieta	Semana 3	Semana 6
	Lactato dehidrogenasa (U/L)	
Cont	664,88	531,00
Cont - CIYCW	661,75	543,13

Con vs MYCO	NS	NS
MYCO vs MYCO + CIYCW	NS	NS
	Lipasa (UY/L)	
Cont	5,37	2,87
Cont + CIYCW	4,37	4,50
MYCO	4,75	3,62
MYCO + CIYCW	5,87	4,25
SEM	0,94	0,72
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS
	Ácido Úrico (U/L)	
Cont	247,75	167,13
Cont + CIYCW	221,50	144,38
MYCO	292,50	279,00
MYCO + CIYCW	334,50	279,00
SEM	28,23	24,77
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS

Cont vs. MYCO + CIYCW	0,03	0,003
--------------------------	------	-------

MYCO	646,63	469,25
MYCO + CIYCW	566,13	497,63
SEM	30,24	20,84
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	0,04
Cont vs. MYCO + CIYCW	0,02	NS
	Glutamato dehidrogenasa (U/L)	
Cont	4,62	2,87
Cont + CIYCW	3,25	2,62
MYCO	4,25	2,37
MYCO + CIYCW	3,50	2,50
SEM	0,70	0,35
Cont vs Cont + CIYCW	NS	NS
Cont vs MYCO	NS	NS
Cont vs. MYCO + CIYCW	NS	NS

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

(2) Control, (3) pared de célula de levadura entrelazado con arcilla; (4) dieta contaminada; (6) $P > 0,05$

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 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 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 en las aves alimentadas con dieta 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 la 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
5 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,
10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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, desacetilneosolaniol, 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, moniliformina, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, toxina NT-1, toxina NT-2, extendida a todas las ocratoxinas, oosporeína, ácido oxálico, patulina, ácido penicílico, penitrem, roridina E, rubratoxina, rubroskirina, rubrosulfina, rugulosina, sambucinina +1, satratoxinas, F,G,H, scirpentriol, slaframina, stericoncentrated modified yeast cell wall extracttocistin, toxina T-1, toxina T-2, triacetoxiscirpendiol extendido a todos los tricotecenos, tricodermina, tricotecina, tricoverrininas, tricoverroles, 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
 - 15 ii) un material consumido por un animal o 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 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 montmorilonita, 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

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

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.

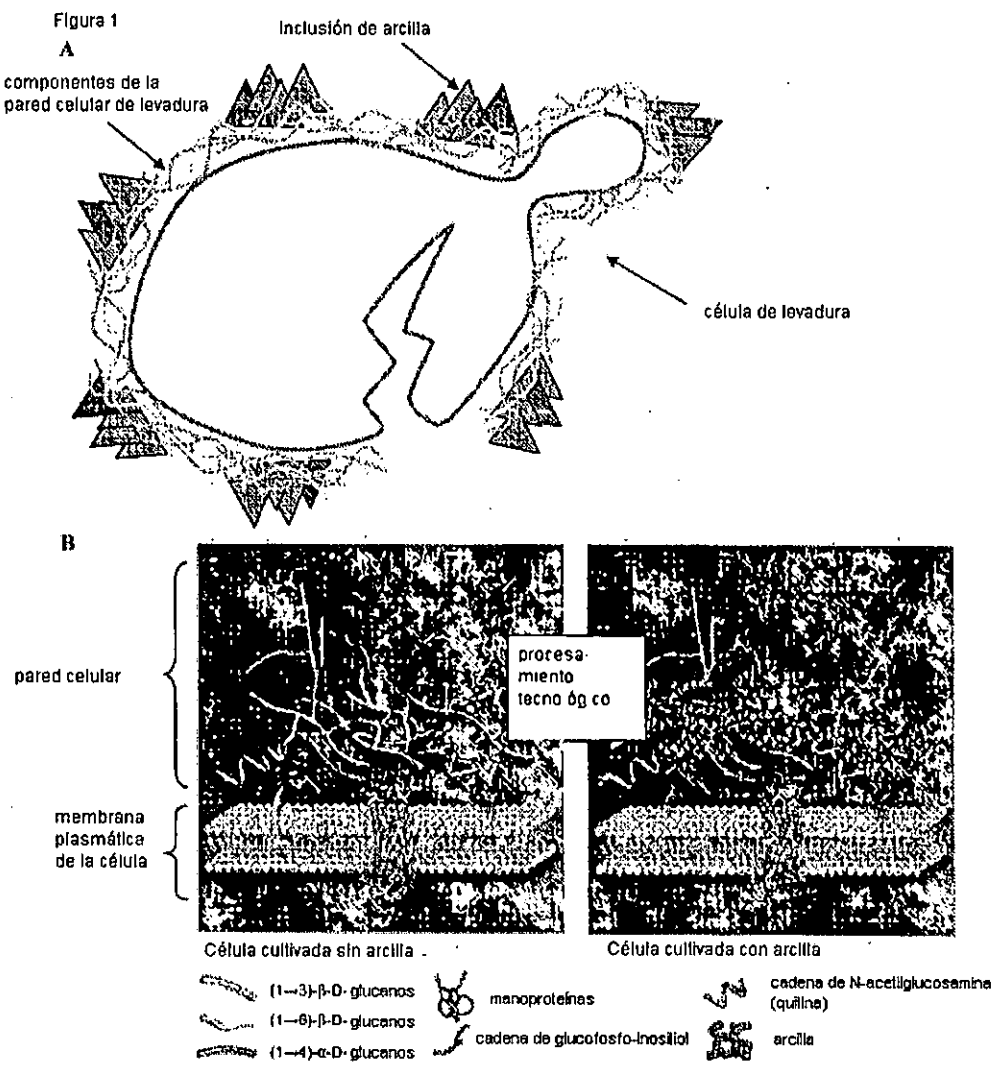


FIGURA 2

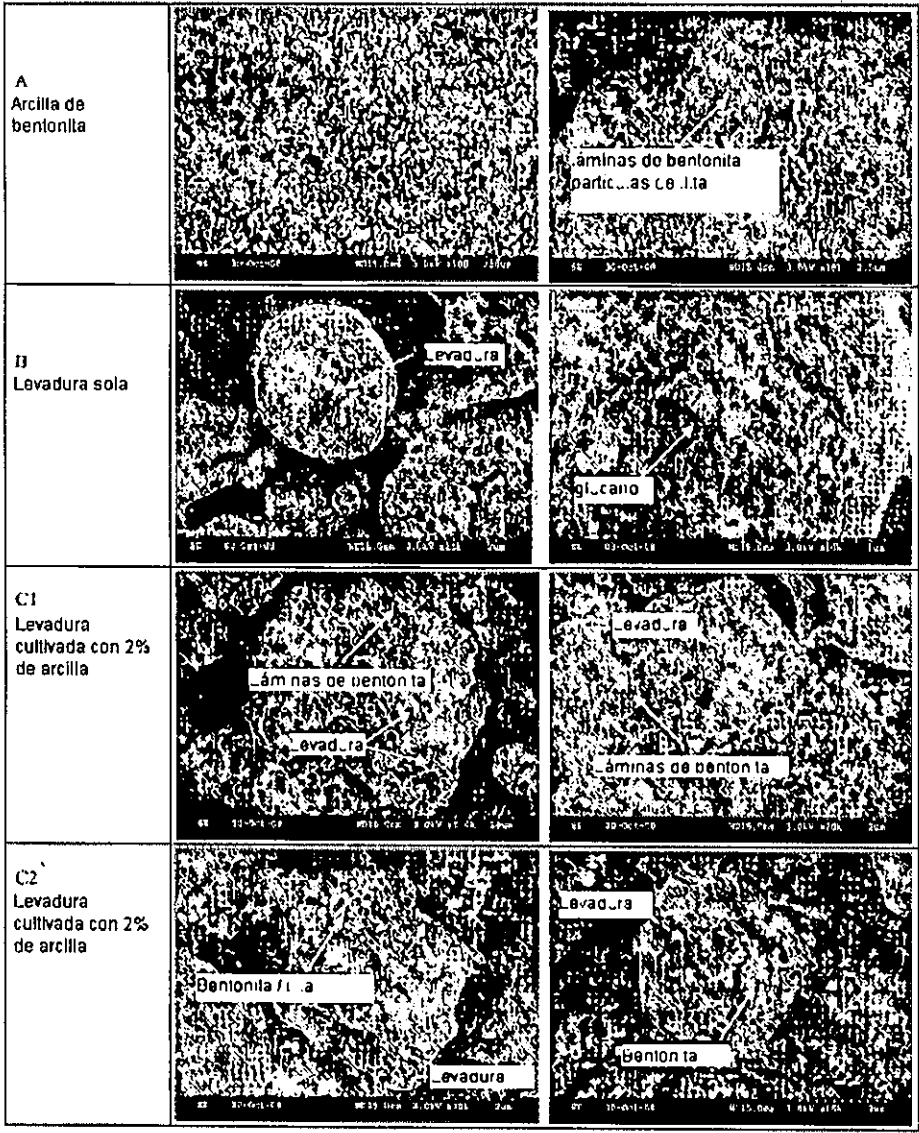


FIGURA 3

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

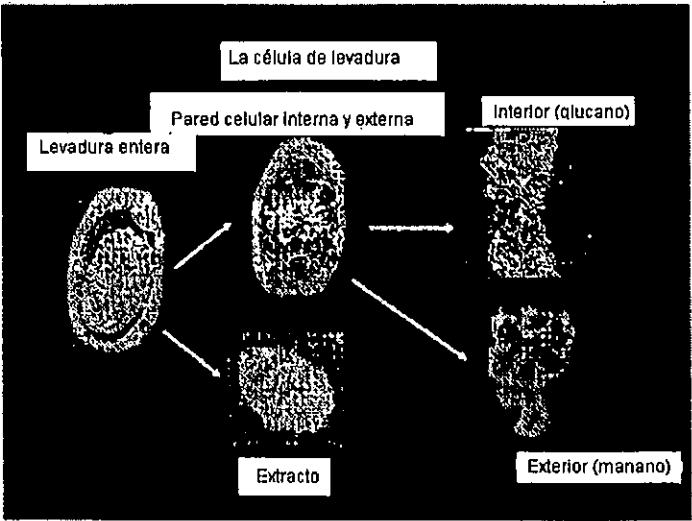


FIGURA 6

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%, esmeclita)	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



No. 11-098739-00000-0000

Fecha: 2011-08-04 16:02:38

Tra. 11 PATENTEIYI

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 192

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO I

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
ALLTECH, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 098739
	Solicitud internacional	PCT/US2010/021076
	Fecha inicio fase nacional	14/08/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 15082

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 23 SET. 2011,
adpa11