

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2



(19) RU (11) 2 481 117 (13) C2

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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011128783/15, 14.01.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.01.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.01.2009 US 61/144,620

(45) Опубликовано: 10.05.2013 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6045834 A, 04.04.2000. US 634221 B1, 05.02.2002. US 20050281781 A1, 22.12.2005. RU 2327472 C1, 27.06.2008.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **15.08.2011**

(86) Заявка РСТ:
US 2010/021076 (14.01.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/083336 (22.07.2010)

Адрес для переписки:

190000, Санкт-Петербург, ул. Малая
Морская, 15, офис 5, BOX 1125, ООО
"ПАТЕНТИКА", пат.пov. М.И.Ниловой,
рег.№ 378

(72) Автор(ы):

**ИЯННИКУРИС Александрос (US),
ТИЛИН Урсула Анна (US)**

(73) Патентообладатель(и):

ОЛТЕК ИНК. (US)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДРОЖЖЕЙ С СЕТЧАТЫМИ СТРУКТУРАМИ ГЛИНЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к композиции, включающей клетки дрожжей, для снижения или устранения отрицательных эффектов микотоксинов. Клетка дрожжей, включающая клеточную стенку дрожжей, содержащую определенное количество глины или глиносодержащего компонента, встроенных в указанную клеточную стенку дрожжей, для снижения или устранения отрицательных эффектов микотоксинов. Композиция для снижения биодоступности микотоксинов, содержащая экстракт клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или

глиносодержащим компонентом. Корм для животных для снижения биодоступности микотоксинов, содержащий экстракт клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Способ снижения биодоступности микотоксинов для животного или человека. Способ получения экстракта клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом для снижения биодоступности микотоксина. Вышеописанная клетка дрожжей, композиция на ее основе и ее экстракт, эффективно снижают или устраняют отрицательные эффекты микотоксинов. 5 н. и 45

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2

з.п. ф-лы, 9 ил., 5 табл., 7 пр.

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 481 117 (13) C2

(51) Int. Cl.
A61K 36/06 (2006.01)
A23L 1/28 (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011128783/15, 14.01.2010

(24) Effective date for property rights:
14.01.2010

Priority:

(30) Convention priority:
14.01.2009 US 61/144,620

(45) Date of publication: 10.05.2013 Bull. 13

(85) Commencement of national phase: 15.08.2011

(86) PCT application:
US 2010/021076 (14.01.2010)

(87) PCT publication:
WO 2010/083336 (22.07.2010)

Mail address:

190000, Sankt-Peterburg, ul. Malaja Morskaja, 15,
ofis 5, VOKh 1125, OOO "PATENTIKA", pat.pov.
M.I.Nilovoj, reg.№ 378

(72) Inventor(s):
IJaNNIKURIS Aleksandros (US),
TILIN Ursula Anna (US)

(73) Proprietor(s):
OLTEK INK. (US)

(54) YEAST COMPOSITIONS WITH CLAY NETS AND METHODS FOR USING THEM

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to a composition containing yeast cells for reducing or eliminating the negative effects of mycotoxins. The yeast cell including a yeast cell wall containing a certain amount of clay or a clay-containing ingredient built into said yeast cell wall, for reducing or eliminating the negative effects of mycotoxins. The composition for reducing the bioavailability of mycotoxins, which contains a yeast cell wall extract with the in-built clay or clay-containing ingredient.

Animal feed for reducing the bioavailability of mycotoxins, which contains the yeast cell wall extract with the in-built clay or clay-containing ingredient. The method for reducing the bioavailability of mycotoxins for animals or a human. The method for preparing the yeast cell wall extract with the in-built clay or clay-containing ingredient for reducing the bioavailability of mycotoxins.

EFFECT: yeast cell described above, the based composition and the extract thereof effectively reduce or eliminate the negative effects of mycotoxins.

50 cl, 9 dwg, 5 tbl, 7 ex

R U 2 4 8 1 1 1 7 C 2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/144620, поданной 14 января 2009 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.
5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композициям, которые содержат клетки дрожжей и/или компоненты, содержащие клетки дрожжей, и способам их получения и применения. В частности, согласно настоящему изобретению предложен новый тип дрожжей, включающих измененную структуру клеточной стенки (например, клеточную 10 стенку(и) с включенной в нее (например, вплетенной) глиной и/или глиносодержащим(и) компонентом(ами) и/или клеточную стенку(и) с измененным соотношением глюкан:маннан), способы их получения, композиции, включающие и/или получаемые из них, и способы их применения (например, для связывания и/или адсорбции бактерий и 15 токсинов). Композиции и способы согласно настоящему изобретению находят множество применений, включая пищевые (например, добавление в корма или использование для 20 питания животных иным образом), терапевтические, профилактические (например, добавление в исходные материалы для подстилки для скота и/или прочие материалы, 25 которые входят в контакт с животными, использование при обработке и изготовлении пищевых продуктов и напитков и использование при фильтрации жидкостей), а также 30 исследовательские приложения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Грибы распространены повсеместно, и являются незаметными, поскольку чаще всего имеют микроскопические размеры. Микотоксины представляют собой вторичные метаболиты, выделяемые грибами. Микотоксины являются ядовитыми и/или канцерогенными соединениями, которые вырабатываются различными видами грибов, 35 растущими на различных сельскохозяйственных продуктах. Примеры микотоксинов включают, но не ограничиваются ими, афлатоксины, фумонизины, охратоксин А, 40 канареоксин, дезоксигиперниваленол (также известный как "ДОН" или "вомитоксин"), патулин и зеараленон. 45

50

Микотоксины часто вырабатываются в зернах хлебных злаков, а также в кормовых растениях до, во время и после сбора урожая. Некоторые микотоксины смертельны, другие вызывают характерные заболевания или проблемы со здоровьем, третья ослабляют иммунную систему, не вызывая симптомы, специфичные для данного микотоксина, четвертые действуют как аллергены или раздражители и у пятых отсутствует какое-либо известное действие в отношении животных или людей. Наибольший экономический 5 эффект загрязнения микотоксинами ощущают производители сельскохозяйственных растений и производители домашней птицы, также как и производители продуктов питания и корма для скота. Микотоксины могут попадать в пищевую цепь в результате грибковой инфекции растительных продуктов и могут быть поглощены людьми либо 10 напрямую, либо через загрязнение корма(ов) домашнего скота. Микотоксины загрязняют 15 как органические материалы (например, подстилку), так и воду и обладают высокой устойчивостью к перевариванию, оставаясь в пищевой цепи в составе пищевых продуктов 20 (например, мяса, яиц и молочных продуктов). Ни один из регионов мира не лишен микотоксинов и их негативного воздействия на здоровье животных и человека. Развитие 25 глобальной торговли кормами увеличивает вероятность того, что смешивание зерен приведет к комбинациям микотоксинов в конкретной диете, и того, что необычные и 30 неожиданные микотоксины будут присутствовать в конкретном регионе независимо от его климатических условий.

Стратегии, используемые для предотвращения загрязнения микотоксинами, 35 включают контроль факторов, допускающих выработку микотоксинов, контроль роста плесени, а также осуществление контроля качества продуктов питания и корма с помощью соответствующих методов отбора образцов, детекции и количественного анализа. Тем не менее, загрязнение микотоксинами неизбежно.

Для снижения отрицательных эффектов микотоксинов в состав кормов традиционно добавляют неорганические материалы, такие как глины, бентониты и 40 алюмосиликаты, известные своими адсорбционными свойствами. Такие добавки к кормам, в больших количествах связывают некоторые микотоксины в желудочно-кишечном тракте животного и минимизируют их токсическое действие. Однако добавки препятствуют 45 абсорбции многих полезных питательных веществ, которые важны для животных, таких как витамины, неорганические вещества и аминокислоты, тем самым снижая питательность пищи. Кроме того, добавки к кормам, особенно в экскрементах животных, оказывают чрезвычайно вредное воздействие на окружающую среду.

50

Для разрушения микотоксинов, особенно афлатоксинов, в загрязненном корме использовали химические агенты, такие как кислоты, основания (например, аммиак, каустическая сода), окислители (например, перекись водорода, озон), восстановители (например, бисульфиты), хлорированные агенты и формальдегид, (См., например, Hagler 1991; Phillips et al 1994; Lemke et al 2001). Однако, эти методы неэффективны, дороги, производят существенное количество химических отходов и часто в целом опасны.

У некоторых штаммов молочно-кислых бактерий, пропионибактерий и бифидобактерий, в клеточной стенке присутствуют структуры, которые связывают микотоксины (См., например, Ahokas et al 1998; El-Nemazi et al 1998; Yoon et al 1999) и ограничивают их бионакопление в теле животного. Однако эти биологические процессы обычно медленны, приводят к образованию токсичных метаболитов и неэффективны.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена клетка дрожжей, имеющая дрожжевую клеточную стенку, содержащую глину или глиносодержащий компонент, внедренный в клеточную стенку дрожжей. Согласно некоторым вариантам реализации, клетка дрожжей выращена в среде для культивирования клеток, содержащей глину. Согласно некоторым вариантам реализации, глина представляет собой минеральную глину или синтетическую глину, принадлежащую к силикатной группе. Согласно некоторым вариантам реализации, глина выбрана из цеолита, бентонита, алюмосиликата, монтмориллонита, смектита, каолинита, органоглины и их смесей. Согласно некоторым вариантам реализации, глина представляет собой алюмосиликатную глину. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от приблизительно 0,125 % до приблизительно 4,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от 0,125 % до 4,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от приблизительно 0,5 % до приблизительно 2,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от 0,5 % до 2,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, дрожжи выбраны из *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации, дрожжи представляют собой *Saccharomyces cerevisiae*.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный 5 экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом получен из клеток дрожжей, выращенных в питательной среде, содержащей глину. Согласно некоторым вариантам реализации, для приготовления экстракта 10 клеточной стенки дрожжей используют стеклянные шарики и битер (beater) для шариков. Согласно некоторым вариантам реализации, для приготовления экстракта клеточной стенки дрожжей применяют ферментативную обработку. Согласно некоторым вариантам реализации, 15 экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом добавляют к корму. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный корм выбран из Полного Смешанного Рациона (ПСР), фураж, кормовых гранул, концентрата, премикса, побочного продукта, зерна, барды, патоки, 20 волокна, кормовых растений, травы, сена, косточек, листьев, муки, растворимых веществ и кормовых добавок. Согласно некоторым вариантам реализации, экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом добавляют в 25 органический материал. Согласно некоторым вариантам реализации, экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом добавляют в воду. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, жидкость 30 фильтруют через экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, указанная жидкость представляет собой сок, воду, пиво или вино. Согласно некоторым вариантам реализации, композиция приготовлена для введения с пищей 35 любому члену Царства Животных. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный член Царства Животных выбран из видов птиц, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, овец и коз, рыб, моллюсков, верблюдовых, кошачьих, собачьих и грызунов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, указанный экстракт клеточной 40 стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом связывает один или несколько микотоксинов. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный микотоксин выбран из Афлатоксинов, Зеараленона, Трихотецинов, Фумонизинов и 45 Охратоксинов. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный микотоксин выбран из ацетоксисцирпендиола, ацетилдезоксиниваленола, ацетилниваленола, ацетилнеосоланиола, ацетил Т-2 токсина, охватывает все афлатоксины, афлатоксин В1, В2,

50

G1 и G2, афлатрем, альтенуевую кислоту, альтернаиол, аустдиол, аустамид, аустоцистин, авенацеин +1, боверицин +2, бентенолид, бревианамид, бутенолид, калонектрин, хетоглобозин, цитринин, цитреовиридин, кохлиодинол, цитохалазин Е, циклопиазоновую кислоту, деацетилкалонектрин, деацетилнеосоланиол, диацетат дезоксиниваленола, моноацетат дезоксиниваленола, диацетоксисцирпенол, деструксин В, эннатины, распространяется на все токсины спорыни и эндофитов, фруктигенин +1, фумагиллин, фумонизины, фумонизины В1 и В2 и В3, Фузаренон-Х, Фузарохроманон, фузаровую кислоту, фузарин, глиотоксин, токсин НТ-2, ипомеанин, исландитоксин, латеритин +1, ликомаразмин +1, малформин, мальторизин, монилиформин, моноацетоксисцирпенол, неосоланиол, ниваленол, токсин NT-1, токсин NT-2, распространяется на все охратоксины, ооспореин, щавелевую кислоту, патулин, пенициллиновую кислоту, пенитрем, роридин Е, рубратоксин, руброскирин, рубросульфин, ругулозин, самбуцинин +1, сатратоксины F,G,H, сцирпентриол, слафрамин, стеригматоцистин, токсин T-1, токсин T-2, триацетоксисцирпендиол, распространяется на все трихотецины, триходермин, трихотецин, триховеррины, триховерролы, триптокивален, веррукарин, веррукулоген, виопурпурин, виомеллеин, виридитоксин, ксантоциллин, яваницин +1, зеараленолы и зеараленон.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены композиции, содержащие экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, причем указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом присутствует в количестве, эффективном для секвестрирования микотоксинов. Например, согласно некоторым вариантам реализации, указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом присутствует в количестве приблизительно от 0,0125 % до 10 % по весу корма. Согласно некоторым вариантам реализации, экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом присутствует в количестве приблизительно от 0,0125 % до 4,0 % по весу корма. Настоящее изобретение не ограничивается типом корма.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения биодоступности микотоксинов для животного или человека, включающий: (а) обеспечение: (i) композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, и (ii) материала, потребляемого животным или человеком; (б) введение в этот материал экстракта

50

клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом с получением материала, который содержит экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом; и (в) предоставление 5 возможности потребления животным или человеком указанного материала, содержащего экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, 10 указанный материал представляет собой корм. Согласно некоторым вариантам реализации, в указанный корм добавляют приблизительно от 0,0125 % до 0,4 % по весу композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный 15 материал представляет собой подстилку. Согласно некоторым вариантам реализации, в подстилку добавляют приблизительно от 0,0125 % до 99,0 % по весу композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации, материал 20 представляет собой жидкость. Согласно некоторым вариантам реализации, в указанную жидкость добавляют приблизительно от 0,0125 % до 99,0 % по весу композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего 25 изобретения, указанное животное выбрано из видов птиц, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, овец и коз, рыб, моллюсков, верблюдовых, кошачьих, собачьих и грызунов. Согласно некоторым вариантам реализации, композиция, содержащая экстракт 30 клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, связывает один или несколько типов микотоксинов. Согласно некоторым вариантам реализации, микотоксины представляют собой Афлатоксины, Заараленон, Трихотецины, 35 Фумонизины, Охратоксины или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения также предложено введение дополнительного агента в материал с введенным экстрактом клеточной стенки дрожжей, в которую встроена глина 40 или глиносодержащий компонент, причем агент выбран из эстеразы, эпоксидазы, дрожжевого и/или бактериального штамма.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен 45 способ получения экстракта клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом в промышленном масштабе, включающий: (а) обеспечение: (i) стартовой культуры дрожжей и (ii) среды для культивирования клеток 50

дрожжей, причем указанная среда для культивирования клеток дрожжей включает питательные вещества, необходимые для роста дрожжей, а также глину или глиносодержащий компонент; (б) внесение стартовой культуры дрожжей в указанную среду для культивирования клеток дрожжей; (в) инкубацию дрожжей в промышленном ферментере в условиях, оптимизированных для роста дрожжей, причем во время роста происходит включение глины или глиносодержащего компонента в клеточную стенку дрожжей; (г) добавление пеногасителя в ферментер; (д) лизис клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом; и (е) отделение клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом от других компонентов дрожжей. Согласно некоторым вариантам реализации, дрожжи выбраны из *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации, глина представляет собой минеральную глину или синтетическую глину, принадлежащую к силикатной группе. Согласно некоторым вариантам реализации, глина представляет собой цеолит, бентонит, алюмосиликат, монтмориллонит, смектит, каолинит, органоглину или их смесь. Согласно некоторым вариантам реализации, глина представляет собой алюмосиликатную глину. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от приблизительно 0,125 % до приблизительно 4,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от приблизительно 0,5 % до приблизительно 2,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от 0,125 % до 4,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет от 0,5 % до 2,0 %. Согласно некоторым вариантам реализации, объем промышленного ферментера составляет от одной тысячи до пяти миллионов литров. Согласно некоторым вариантам реализации, пеногаситель добавляют для ослабления влияния глины на процесс инкубации. Согласно некоторым вариантам реализации, указанный пеногаситель представляет собой несиликоновый молекулярный пеногаситель, масляный пеногаситель, порошковый пеногаситель, пеногаситель на водной основе, пеногаситель на основе кремния, пеногаситель на основе полиэтиленгликоля, пеногаситель на основе полипропиленгликоля или полиакрилаты алкила. Согласно некоторым вариантам реализации, пеногаситель представляет собой несиликоновый молекулярный пеногаситель. Согласно некоторым вариантам реализации, лизис включает

50

использование стеклянных шариков, битера (beater) для шариков и/или ферментативной обработки.

5 ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлено А) изображение клетки дрожжей с глиной и/или глиносодержащими компонентами, включенными в клеточную стенку дрожжей, и Б) 10 сравнительное изображение (а) клеточной стенки клетки дрожжей, культивированной в отсутствие глины, и (б) клеточной стенки клетки дрожжей, культивированной/выращенной в присутствии глины.

На Фигуре 2 15 представлен снимок, полученный с помощью сканирующего электронного микроскопа, (А) бентонитовой глины (Fluka); (Б) клеток дрожжей, выращенных в отсутствие глины, и крупный план глюкановой части дрожжевой клеточной стенки; (В1) клеток дрожжей, выращенных в присутствии 2%-ой бентонитовой 20 глины, с фрагментом конгломератного образования нескольких клеток дрожжей, заключенных в слоистую структуру бентонита; (В2) клеток дрожжей, выращенных в присутствии 2%-ой бентонитовой глины, с фрагментом включения глины, встроенным 25 непосредственно в структуру клеточной стенки дрожжей.

На Фигуре 3 30 приведены характеристики экстрактов клеточной стенки дрожжей, приготовленных с использованием стеклянных шариков и битера для минишариков из клеток дрожжей: выращенных в отсутствие глины (только Клеточная Стенка Дрожжей "КСД"), клеток дрожжей, выращенных в присутствии 0,5% глины (КСД + 0,5%), клеток дрожжей, выращенных в присутствии 1% глины (КСД + 1,0%), и клеток дрожжей, выращенных в присутствии 2,0% глины. Кроме того, указаны проценты адсорбции 35 микотоксина зеараланона для каждого из образцов.

На Фигуре 5 показана анатомия клетки дрожжей.

На Фигуре 6 40 показан состав двух партий КСДВГ, произведенных в полупромышленном масштабе.

На Фигуре 7 45 приведены результаты экспериментов по эффективности связывания для клеточной стенки дрожжей, проведенных в полупромышленном масштабе, в присутствии или отсутствии смектитовой глины и при использовании экстракции с помощью ферментативного гидролиза или без нее. Степень включения связываемых продуктов для АФВ1 и ЗЕА составляла соответственно 0,1 и 0,4 % в реакционной среде, поддерживаемой при постоянном значении pH 4,0. Эксперимент проводили при круговом 50

перемешивании в течение 90 минут при 37°C, и количество связанного токсина оценивали с помощью прибора ВЭЖХ, оборудованного флуоресцентным детектором.

На Фигуре 8 приведены результаты экспериментов по эффективности связывания, полученные для клеточной стенки дрожжей, полученной с использованием смектитовой глины и экстракции с помощью ферментативного гидролиза. Степень включения связываемых продуктов для АФВ1 и ЗЕА составляла соответственно 0,1 и 0,4 % в реакционной среде, поддерживаемой при постоянном pH 4,0. Эксперимент проводили при круговом перемешивании в течение 90 минут при 37°C, и количество связанного токсина оценивали с помощью прибора ВЭЖХ, оборудованного флуоресцентным детектором.

На Фигуре 9 приведены результаты экспериментов по адсорбции, полученные с различными вариантами клеточной стенки дрожжей из трех штаммов, выращенных в присутствии или отсутствии глины МВВ02, и при использовании экстракции с помощью ферментативного гидролиза или без нее. Степень включения связываемых продуктов для АФВ1 и ЗЕА составляла соответственно 0,1 и 0,4 % в реакционной среде, поддерживаемой при постоянном значении pH 4,0. Эксперимент проводили при круговом перемешивании в течение 90 минут при 37°C, и количество связанного токсина оценивали с помощью прибора ВЭЖХ, оборудованного флуоресцентным детектором.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей заявке термин “дрожжи” и “клетки дрожжей” относится к эукариотическим микроорганизмам, принадлежащим к царству Грибов, имеющим клеточную стенку, клеточную мембрану и внутриклеточные компоненты. Дрожжи не образуют отдельную таксономическую или филогенетическую группу. В настоящее время известно около 1500 видов; считается, что описан лишь 1% всех видов дрожжей. Термин “дро~~ж~~иси” часто используется в качестве синонима для *S. cerevisiae*, но размещение дрожжей в обоих отделах *Ascomycota* и *Basidiomycota* показывает их филогенетическое разнообразие. Почкиющиеся дрожжи (“настоящие дрожжи”) относят к порядку *Saccharomycetales*. Большинство видов дрожжей размножаются бесполым путем посредством почкования, хотя некоторые размножаются делением надвое. Дрожжи одноклеточны, хотя некоторые виды становятся многоклеточными посредством формирования нитей из связанных почкиящихся клеток, известных как *псевдогифы* или *ложные гифы*. Размер дрожжей может варьировать в широких пределах в зависимости от

видов, как правило, составляя 3–4 мкм в диаметре, хотя некоторые дрожжи могут достигать более 40 мкм.

В настоящей заявке термин “клеточная стенка дрожжей” или “КСД” относится к клеточной стенке организма дрожжей, которая окружает плазматическую мембрану и внутриклеточные компоненты дрожжей. Клеточная стенка дрожжей включает как наружный слой (главным образом маннан), так и внутренний слой (главным образом глюкан и хитин) клеточной стенки дрожжей. Функция клеточной стенки заключается в обеспечении структурной основы и защиты внутренней области дрожжевой клетки (ее центра метаболической активности). Через клеточную стенку дрожжей пролегают пути сигналинга и распознавания. Состав клеточной стенки дрожжей варьирует от штамма к штамму и зависит от условий роста дрожжей.

В настоящей заявке термин “экстракт клеточной стенки дрожжей” относится к клеточной стенке дрожжевых клеток, которые были вскрыты или “лизированы” (например, на стадиях вскрытия и лизиса) и отделены от растворимых внутриклеточных компонентов дрожжевой клетки.

Термин “изолированный” при использовании применительно к клеточной стенке дрожжей, как например “изолированная клеточная стенка дрожжей” или “изолированная клеточная стенка дрожжей, включающая глину” или “изолированная клеточная стенка дрожжей, включающая измененную структуру глюкан:маннан”, относится к клеточной стенке дрожжей или ее компоненту, которые идентифицированы и отделены по крайней мере от одного компонента, с которым они обычно связаны в составе своего природного источника. Таким образом, изолированная клеточная стенка дрожжей такова, что присутствует в форме или окружении, отличающихся от наблюдаемых в природе (например, отдельно от внутриклеточных компонентов дрожжей). Напротив, неизолированная клеточная стенка дрожжей представляет собой клеточную стенку дрожжей или ее компонент, находящиеся в том состоянии, в котором они существуют в природе. Согласно некоторым вариантам реализации, изолированная клеточная стенка дрожжей используется для описания экстракта клеточной стенки дрожжей.

В настоящей заявке термин “очищенный” или “очищать” относится к удалению компонентов из образца. Например, клеточные стенки дрожжей или экстракти клеточной стенки дрожжей очищают путем удаления компонентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей (например, плазматической мембранны и/или внутриклеточных компонентов дрожжей); их также очищают путем удаления загрязнителей или других

50

агентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей. Удаление компонентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей, и/или загрязнителей, не относящихся к клеточной стенке дрожжей, приводит к увеличению доли клеточной стенки дрожжей или ее компонентов в образце. В другом примере клеточные стенки дрожжей, содержащие глину или глиносодержащие компоненты, встроенные/интегрированные в клеточную стенку дрожжей, очищали путем удаления компонентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей (например, плазматической мембраны и/или внутриклеточных компонентов дрожжей), тем самым увеличивая в образце долю клеточных стенок дрожжей, содержащих глину или глиносодержащие компоненты, встроенные/интегрированные в клеточную стенку дрожжей.

В настоящей заявке термин “концентрированный экстракт клеточной стенки дрожжей” относится к экстракту клеточной стенки дрожжей, который сконцентрирован с помощью одной или нескольких процедур (например, высушивания (например, на стадии высушивания и концентрирования)). В другом примере концентрированный экстракт клеточной стенки дрожжей представляет собой препарат клеточной стенки дрожжей или препарат экстракта клеточной стенки дрожжей, который очищен путем удаления компонентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей.

В настоящей заявке термины “модифицированные дрожжи” и “измененные дрожжи” относятся к дрожжам, выращенным таким образом, что состав, структура и/или функция дрожжей изменены (например, изменен состав, структура и/или функция клеточной стенки дрожжей (например, клеточная стенка дрожжей, включающая измененное соотношение глюкан:маннан и/или глину/глиносодержащий компонент, встроенные/ интегрированные в клеточную стенку дрожжей, которая функционирует иначе, чем клеточная стенка дрожжей без измененного соотношения глюкан:маннан и/или без глины/ глиносодержащего компонента, встроенных/ интегрированных в клеточную стенку дрожжей).

В настоящей заявке термин “модифицированная клеточная стенка дрожжей” относится к клеточной стенке модифицированных или измененных дрожжей.

В настоящей заявке термин “экстракт модифицированной клеточной стенки дрожжей” относится к экстракту клеточной стенки модифицированных или измененных дрожжей.

В настоящей заявке термин “концентрированный экстракт модифицированной клеточной стенки дрожжей” относится к концентрированному экстракту клеточной

50

стенки дрожжей, полученному из модифицированных или измененных дрожжей, например, в Патенте США № 6045834.

В настоящей заявке термины “дрожжи с встроенной глиной”, “дрожжи с интегрированной глиной”, “дрожжи с встроенным глиносодержащим компонентом”, “дрожжи с интегрированным глиносодержащим компонентом” относятся к дрожжам, выращенным или культивированным в присутствии глины или глиносодержащего компонента, которые содержат встроенные/ интегрированные в клеточную стенку дрожжей глину или глиносодержащие компоненты. Дрожжи с сетчатыми структурами глиной или глиносодержащим компонентом являются специальным типом модифицированных дрожжей.

В настоящей заявке термины “встроенные (образующие сетчатые структуры) (interlaced)”, как например в выражении “экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной”, “экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенным глиносодержащим компонентом” и т.п., относятся к интегрированию глины или глиносодержащего компонента в состав клеточной стенки дрожжей. Хотя описание механизма этого явления не является необходимым для осуществления настоящего изобретения, и настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, согласно некоторым вариантам реализации, образование сетчатых структур глины или глиносодержащего компонента, встроенных в клеточную стенку дрожжей происходит во время роста дрожжей (например, после цикла бесполого размножения (почкования) (например, по мере роста дочерней клетки и формирования сети ее клеточной стенки происходит интегрирование глины или глиносодержащего компонента в клетку дрожжей)). В одном примере удлинение цепей глюкана и/или хитина формирует область(и) включения, участвующую в интегрировании глины или компонента глины при почковании, приводя к наличию в дочерней клетке глины или глиносодержащего компонента, интегрированного в ее клеточную стенку. В другом примере макромолекулярная структура глины заключает клетку(и) дрожжей в свою слоистую сеть, внутри которой, когда клетка дрожжей переходит к почкованию, происходит встраивание глины или глиносодержащего компонента в клеточную стенку дрожжей. Глина и/или компонент(ы) глины, интегрированные/встроенные в клеточную стенку дрожжей, остаются интегрированными/ встроенными в клеточную стенку дрожжей после выделения клеточной стенки.

В настоящей заявке термины “клеточная стенка дрожжей с встроенной глины”, “клеточная стенка дрожжей с интегрированным глиносодержащим компонентом”, “клеточная стенка дрожжей с встроенным глиносодержащим компонентом” и “клеточная стенка дрожжей с интегрированной глиной” относятся к клеточной стенке дрожжей, выращенных или культивированных в присутствии глины, и содержащих интегрированные или встроенные в клеточную стенку дрожжей глину или глиносодержащий компонент.

В настоящей заявке термины “экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной”, “экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенным глиносодержащим компонентом”, “экстракт клеточной стенки дрожжей с интегрированным глиносодержащим компонентом” и “экстракт клеточной стенки дрожжей с интегрированной глиной” относятся к экстракту клеточной стенки дрожжей (например, в случае, когда дрожжи, из которых получен экстракт клеточной стенки, выращены или культивированы в присутствии глины), которые содержат встроенные или включенные в клеточную стенку дрожжей глину или глиносодержащие компоненты.

В настоящей заявке термины “концентрированный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенными [компонентами]” и “концентрированный экстракт клеточной стенки дрожжей с интегрированными [компонентами] (включениями)” относятся к концентрированному экстракту клеточной стенки дрожжей, выращенных или культивированных в присутствии глины, которые содержат встроенные или включенные в клеточную стенку дрожжей глину или глиносодержащий компонент.

В настоящей заявке термин “*in vivo*” относится к исследованиям и/или экспериментам, проводимым в живом организме, происходящим в биологическом организме.

В настоящей заявке термин “*in vitro*” относится к искусственной среде вне живого организма и к биологическим процессам или реакциям, которые в норме происходили бы в организме, но проводятся в искусственной среде. Среда “*in vitro*” может включать, но не ограничивается, пробирки и клеточную культуру.

В настоящей заявке термин “высокоэффективная жидкостная хроматография” и термин “ВЭЖХ” относятся к форме жидкостной хроматографии для разделения соединений. Соединения находятся в растворе. Соединения разделяют путем нанесения порции смеси образца на колонку. Инструменты ВЭЖХ включают резервуар подвижной фазы, насос, инжектор, разделительную колонку и детектор. Присутствие анализируемых

50

веществ в элюате колонки регистрируется по количественному анализу изменения показателя преломления, поглощения УФ и видимой области спектра заданной длины волны, флюoresценции после возбуждения подходящей длиной волны или 5 электрохимического ответа.

В настоящей заявке термин “сканирующая электронная микроскопия” и термин “СЭМ” относятся к виду электронного микроскопа, который снимает поверхность образца 10 путем ее сканирования высокоенергетическим лучом электронов по способу растровой развертки. Электроны взаимодействуют с атомами в составе образца, испуская сигналы, которые содержат информацию о топографии поверхности образца, составе и других свойствах, таких как электрическая проводимость. 15

В настоящей заявке термин “фиксирующий агент” относится к химикату, который способен связывать одно вещество с другим с тем, чтобы “зафиксировать”, стабилизировать или иным образом сохранить вещество в его текущей форме и 20 предотвратить деградацию или иное изменение вещества. Часто фиксирующие агенты используются в сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) для подготовки образца. Основной фиксирующий агент: в настоящей заявке термин “основной фиксирующий 25 агент” относится к первому фиксирующему агенту, используемому для того, чтобы “зафиксировать” вещество. Вторичный фиксирующий агент: в настоящей заявке термин “вторичный фиксирующий агент” относится ко второму фиксирующему агенту, используемому для того, чтобы “зафиксировать” вещество. Третичный фиксирующий 30 агент: в настоящей заявке термин “третичный фиксирующий агент” относится к третьему фиксирующему агенту, используемому для того, чтобы “зафиксировать” вещество.

В настоящей заявке термин “анализируемое вещество” относится к атому, молекуле, группе атомов и/или молекул, веществу или химическому компоненту. Анализируемое вещество само по себе не может быть измерено, в то время как аспекты или свойства (физические, химические, биологические и т.д.) анализируемого вещества могут быть определены с использованием аналитической процедуры, такой как ВЭЖХ. Например, нельзя измерить “стул” (анализируемое вещество-компонент) сам по себе, но можно измерить высоту, ширину и т.д. стула. Аналогично, нельзя измерить микотоксин, но можно измерить флюoresценцию микотоксина, которая связана с его концентрацией. 40

В настоящей заявке термин “сигнал” используется в целом в отношении любого детектируемого процесса, указывающего на то, что реакция произошла (например, связывание антигена антителом). Сигналы могут оцениваться как качественно, так и 45

50

количественно. Примеры видов “сигналов” включают, но не ограничиваются, радиоактивные сигналы, флуориметрические сигналы или колориметрические сигналы продукта/реагента.

5 В настоящей заявке термин “биодоступность” относится к доле молекул или компонентов, которая доступна организму или достигает системного кровотока. Когда молекула или компонент вводятся внутривенно, их биодоступность составляет 100%.
 10 Однако, когда молекула или компонент вводятся другими путями (такими как оральный), их биодоступность уменьшается (из-за неполной абсорбции и пресистемного метаболизма).

15 В настоящей заявке термин “абсорбировать” относится к процессу, с помощью которого материал “принимает в себя” или “засасывает” другое вещество. Например, “абсорбция” может относиться к процессу абсорбирования или ассимиляции веществ в клетки или через ткани и органы путем диффузии или осмоса (например, абсорбция питательных веществ пищеварительной системой или абсорбция лекарств в кровоток).

20 В настоящей заявке термин “адсорбция” относится к процессу, который происходит, когда материал связывается и/или накапливается на поверхности твердого тела или жидкости (связывающего вещества и/или адсорбента) (например, с формированием пленки из молекул или атомов (адсорбат)).

25 В настоящей заявке термин “связывать” и/или термин “связывание” относится к физической ассоциации (например, через стыковку или инкапсуляцию) двух или больших объектов, которые входят в контакт друг с другом (например, с формированием стабильного комплекса). Примеры форм ассоциаций включают, но не ограничиваются ими, водородные связи, координацию и формирование ионной пары. Взаимодействия связывания могут включать различное число химических взаимодействий (например, химических связей) в зависимости от стереохимии и геометрии каждого объекта (например, далее определяя специфичность связывания). Когда связываются два или несколько объектов, они могут связываться посредством химических связей, но могут также быть связаны с помощью зарядов или другого типа взаимодействий.

30 40 В настоящей заявке термин “связывающий агент” и/или “связывание агента” относится к объекту, который способен индуцировать или иначе участвовать в связывании и/или формировании комплекса с другим объектом.

45 В настоящей заявке термин “сорбция” относится как к адсорбции, так и к абсорбции.

50

В настоящей заявке термин “эффективное количество” относится к количеству композиции (например, включающей клетку дрожжей, клеточную стенку дрожжей или модифицированный компонент клеточной стенки дрожжей настоящего изобретения), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно ввести и/или сочетать с другим материалом в одном или нескольких введениях, нанесениях или дозировках, и оно не подразумевает ограничение конкретным составом или путем введения.

В настоящей заявке термин “пищеварение” относится к преобразованию еды, кормов или других органических соединений в абсорбируемую форму; к размягчению, разложению или разрушению с помощью высокой температуры и влажности или химического воздействия.

В настоящей заявке “пищеварительная система” относится к системе (включая желудочно-кишечную систему), в которой пищеварение может происходить или происходит.

В настоящей заявке термин “корма” относится к материалу(ам), который потребляется животными и вносит энергию и/или питательные вещества в диету животного. Примеры кормов включают, но не ограничиваются, Полный Смешанный Рацион (ПСР), фураж(и), кормовые гранулы, концентрат(ы), премикс(ы), побочный продукт(ы), зерно(а), барду(ы), патоку, волокно(а), кормовое растение(я), траву(ы), сено, косточки, листья, муку, растворимое вещество(а) и кормовую добавку(ы).

В настоящей заявке термин “животное” относится к таковым из царства Животных. Они включают, но не ограничиваются, домашний скот, сельскохозяйственных животных, домашних животных, комнатных животных, морских и пресноводных животных и диких животных.

В настоящей заявке термин “введение” и термин «осуществление введения» относятся к акту введения вещества, включая лекарство, пролекарство или другой агент или терапевтическое лечение субъекта (например, субъекта или клеток, тканей и органов *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*). Примеры путей введения включают введение через глаза (офтальмический путь), рот (оральный), кожу (местный или трансдермальный), нос (назальный), легкие (ингаляционный), слизистую оболочку полости рта (буккальный), ухо, ректальный, вагинальный, через инъекцию (например, внутривенно, подкожно, внутриопухолево, внутрибрюшинно и т.д.) и т.п.

50

В настоящей заявке термины “совместное введение” и “осуществление совместного введения” относятся к введению по меньшей мере двух агентов или осуществление по меньшей мере двух терапевтических методов субъекту и/или в материал (например, в корм). Совместное введение двух или нескольких агентов или осуществление двух или нескольких терапевтических методов может быть одновременным или первый агент/терапевтический метод может быть введен перед введением второго агента/осуществлением второго терапевтического метода.

В настоящей заявке термин “лечение” относится к улучшению и/или обращению симптомов болезни (например, микотоксикоза). Термин “лечение” относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам. Например, субъекты, которым может быть полезно лечение с помощью композиций и способов настоящего изобретения, включают как тех, у кого заболевание и/или расстройство (например, микотоксикоз) уже присутствует, так и тех, у кого необходимо предупредить заболевание и/или расстройство (например, с использованием профилактического лечения настоящего изобретения).

В настоящей заявке термин “подверженный риску заболевания” относится к субъекту, который предрасположен к конкретному заболеванию. Эта предрасположенность может быть генетической (например, определенная генетическая склонность к заболеванию, такая как наследственные нарушения) или обусловленной иными факторами (например, возрастом, весом, условиями окружающей среды, контактом с вредными соединениями, присутствующими в окружающей среде и т.д.).

В настоящей заявке термин “заболевание”, термин “инфекция” и термин “патологическое состояние или ответ” относится к состоянию, признакам и/или симптомам, связанным с нарушением нормального состояния активного животного или любого из его органов или тканей, которое прерывает или изменяет выполнение нормальных функций и может быть ответом на факторы окружающей среды (такие как недостаточное питание, индустриальные опасности или климат, включая микотоксикоз), определенные инфекционные агенты (такие как черви, бактерии или вирусы), на врожденный дефект организма (такие как различные генетические аномалии) или комбинации этих и других факторов.

В настоящей заявке термин “микотоксикоз” относится к состоянию, в котором микотоксины преодолевают барьеры сопротивления тела животного или человека.

Микотоксикоз можно считать инфекцией или заболеванием, и он может иметь отрицательный эффект на пораженных им субъектов.

В настоящей заявке термин “микотоксин” относится к токсичному и/или канцерогенному соединению(ям), вырабатываемому различными видами грибов.

В настоящей заявке термин “страдающий заболеванием” относится к субъекту (например, субъекту-животному или человеку), пораженному определенным заболеванием, и не ограничен какими-либо определенными признаками или симптомами, или заболеванием.

В настоящей заявке термин “токсичный” относится к любому пагубному, вредному, неблагоприятному или имеющему иной отрицательный эффект(ы) на субъекта, клетку или ткань по сравнению с той же самой клеткой или тканью до контакта или введения токсина/ядя.

В настоящей заявке термин “кислота” относится к любому химическому соединению, которое может выступать донором протона(ов) и/или акцептором электрона(ов). Кислоты включают, но не ограничиваются, хлористоводородную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликоловую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-*n*-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, сульфоновую, нафтилин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т.п. Другие кислоты, такие как щавелевая, сами по себе не являющиеся фармацевтически приемлемыми, можно использовать при приготовлении солей, пригодных в качестве промежуточных продуктов при получении соединений настоящего изобретения и их фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей.

В настоящей заявке термин “основание” относится к любому химическому соединению, которое может выступать акцептором протона(ов) и/или донором электрона(ов) или гидроксид-ионов. Основания включают, но не ограничиваются, гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щёлочноземельных металлов (например, магния), аммиак и соединения формулы NW₄⁺, где W представляет собой алкил с числом атомов углерода от 1 до 4, и т.п.

В настоящей заявке термин “соль” относится к соединениям, которые могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Примеры солей включают, но не ограничиваются, ацетат, адипинат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, гидросульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат,

50

цикlopентанпропионат, биглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, хлорид, бромид, йодид, 2-гидроксизетансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканоат и т.п. Другие примеры солей включают анионы соединений настоящего изобретения, соединенные с подходящим кationом, таким как Na^+ , NH_4^+ и NW_4^+ (где W представляет собой алкильную группу с числом атомов углерода от 1 до 4) и т.п.

В настоящей заявке термин “фармацевтическая композиция” относится к комбинации активного агента (например, композиция, включающая жизнеспособную клетку дрожжей, клеточную стенку дрожжей или компонент модифицированной клеточной стенки дрожжей настоящего изобретения) с носителем, инертным или активным, делающим композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического использования *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

В настоящей заявке термин “фармацевтически приемлемый” и термин “фармакологически приемлемый” относятся к композициям, которые существенным образом не вызывают больше известных неблагоприятных реакций, чем известных полезных реакций.

В настоящей заявке термин “пеногаситель” относится к добавке, используемой для предотвращения образования пены или добавляемой для разрушения уже образовавшейся пены. “Пеногаситель”, также называемый “противопенообразователь” или “противовспениватель”, относится к добавке, которая снижает поверхностное натяжение раствора, среды, эмульсии или бульона в ферmentерах из-за аэрации или перемешивания, тем самым ингибируя или модифицируя образование пены. Обычно используемые агенты представляют собой нерастворимые масла, диметилполисилоксаны и другие кремнийорганические соединения, некоторые спирты, такие как стеарилдеканол, октадеканол, сульфонаты, стеараты и гликоли.

В настоящей заявке термин “клетка” относится к автономной самовпроизводящейся единице, которая может существовать как функционально независимая единица жизни (как в случае одноклеточных организмов, например дрожжей) или как субъединица многоклеточного организма (такого как в растения и животные), специализированная для выполнения определенных функций на благо организма в целом.

Существуют два различных типа клеток: прокариотические клетки и эукариотические клетки.

В настоящей заявке термин “эукариоты” относится к организмам, клетки которых организованы в сложные структуры, заключенные в мембранны. “Эукариоты” отличимы от “прокариот”. Термин “прокариоты” относится к организмам, у которых отсутствует ядро клетки или другие ограниченные мембранные органеллы. Термин “эукариоты” относится ко всем организмам, клетки которых демонстрируют типичные характеристики эукариот, такие как присутствие настоящего ядра, ограниченного ядерной мембраной, в котором находятся хромосомы, присутствие ограниченных мембранных органелл и другие характеристики, обычно наблюдаемые у эукариотических организмов. Таким образом, термин включает, но не ограничивается, такими организмами, как грибы, простейшие и животные.

В настоящей заявке термин “клеточная культура” относится к любой культуре клеток *in vitro*. В этот термин включены постоянные клеточные линии (например, с иммортализированным фенотипом), первичные клеточные культуры, трансформированные клеточные линии, перевиваемые клеточные линии (например, нетрансформированные клетки) и любые другие популяции клеток, поддерживаемые *in vitro*.

В настоящей заявке термин “воспроизведение клетки” относится к процессу размножения клетки, имеющему три основных стадии. Первая стадия воспроизведения клетки включает репликацию ДНК “родительской” клетки. Вторая стадия заключается в разделении дуплицированной ДНК на две группы хромосом одинакового размера. Третья стадия представляет собой физическое деление целых клеток, обычно называемое цитокинезом. Воспроизведение клетки эукариот сложнее, чем у других организмов. Клетки видов, не относящихся к эукариотам, такие как бактериальные клетки, воспроизводятся делением надвое, которое включает репликацию ДНК, разделение хромосомы и цитокинез. Воспроизведение эукариотической клетки включает митоз или более сложный процесс, называемый мейозом. Митоз и мейоз иногда называют двумя процессами “деления ядра”. Деление надвое сходно с воспроизведением эукариотической клетки по типу митоза. Оба процесса приводят к появлению двух дочерних клеток с тем же самым числом хромосом, что и у родительской клетки. Мейоз существует в специальном процессе воспроизведения клетки диплоидных организмов. В результате него возникает четыре специализированных “дочерних клетки” (гаметы), имеющих половину нормального количества ДНК в клетке. Мужская и женская гаметы могут затем

объединяться с образованием зиготы, у которой снова присутствует нормальное число хромосом.

В настоящей заявке термин “воспроизведение дрожжей” относится к 5 репродуктивному циклу дрожжей, у которых есть бесполый и половой репродуктивные циклы, однако наиболее распространенным типом вегетативного роста у дрожжей 10 является бесполое размножение путем “почкования” или “деления”, при котором “дочерняя клетка” образуется на “родительской клетке”. От ядра родительской клетки 15 отделяется ядро дочерней клетки и мигрирует в дочернюю клетку. Почка продолжает расти до тех пор, пока не отделяется от “родительской клетки”, формируя новую клетку. В условиях сильного стресса гаплоидные клетки обычно гибнут, однако у диплоидных 20 клеток в тех же самых условиях может происходить споруляция, приводящая ко вступлению в половое размножение (мейоз) и образованию множества гаплоидных спор, которые могут приступать к спариванию (слиянию), восстанавливая диплоид.

В настоящей заявке термин “почкование” относится к типу клеточного деления у 25 грибов (например, дрожжей) и простейших, при котором одна из “дочерних клеток” развивается как выпячивание меньшего размера на поверхности другой клетки. Обычно положение клетки-почки определяется полярностью “родительской клетки”. У некоторых 30 простейших отпочковавшаяся дочерняя клетка может находиться в цитоплазме другой дочерней клетки.

В настоящей заявке термин “дочерняя клетка” относится к одной из двух или 35 нескольких клеток, образовавшихся при делении родительской клетки.

В настоящей заявке термин “родительская клетка” и термин “материнская клетка” относятся к клетке, дающей начало дочерним клеткам путем клеточного деления.

В настоящей заявке термин “инокуляция” относится к акту введения 40 микроорганизма или суспензии микроорганизмов (например, дрожжей, грибов, бактерий и т.д.) в культуральную среду. Инокуляция представляет собой акт или процесс введения чего-то туда, где оно будет расти или воспроизводиться.

В настоящей заявке термин “инокулум” и термин “пре-инокулум” относятся к 45 клеткам, используемым для инокуляции, таким как клетки, добавляемые для того, чтобы начать культуру.

В настоящей заявке термин “процесс роста” относится к воспроизведению живых 50 клеток применительно к клеткам дрожжей, причем фраза “рост клеток” является условным обозначением идеи “роста числах клеток путем воспроизведения клеток”. При

воспроизведении клеток одна клетка (“родительская клетка” или “материнская клетка”) делится с образованием “дочерних клеток”.

В настоящей заявке термин “культивировать дрожжи” и термин “выращивать дрожжи” относятся к акту заселения дрожжами и/или размножения дрожжей.

В настоящей заявке термин “центрифугирование” относится к разделению молекул по размеру или плотности с использованием центробежных сил, производимых вращающимся ротором, который раскручивает объект вокруг неподвижной оси, прикладывая силу в направлении, перпендикулярном этой оси. Центрифуга использует принцип седиментации, согласно которому с помощью центростремительного ускорения происходит равномерное распределение веществ большей и меньшей плотности по различным слоям в соответствии с их плотностью.

В настоящей заявке термин “концентрация” относится к количеству вещества в определенном пространстве. Концентрацию обычно выражают в единицах массы на единицу объема. Для разбавления раствора нужно добавить больше растворителя или уменьшить количество растворенного вещества (например, с помощью селективного испарения, распылительной сушки, сублимационной сушки, например, концентрированного экстракта клеточной стенки дрожжей или концентрированного экстракта модифицированной клеточной стенки дрожжей). Напротив, для концентрирования раствора нужно добавить больше растворенного вещества или уменьшить количество растворителя.

В настоящей заявке термин “слой” относится к обычно горизонтальному отложению, организованному в виде пласти материала, образующего перекрывающую часть или сегмент, полученный после разделения центрифугированием в соответствии со свойствами плотности материала.

В настоящей заявке термин “собирать” относится к акту сбора или объединения произведенных материалов (например, сбор материалов, произведенных при культивировании дрожжей).

В настоящей заявке термин “глина” относится к минеральным глинам, синтетическим, органоглинам и любой их смеси(ям).

В настоящей заявке термин “минеральная глина” относится к природному или синтетическому материалу, состоящему прежде всего из мелкозернистых минералов (силикатов), демонстрирующих пластичность благодаря переменному содержанию воды (что может быть результатом удержания воды в структуре минерала в силу полярного

притяжения) и способных затвердевать при высушивании и/или обжиге. Примеры силикатов включают, но не ограничиваются, филлосиликат, бентонит, цеолит, алюмосиликат, монтмориллонит, смектит, каолинит.

5 В настоящей заявке термин “органоглина” и термин “модифицированная глина” относятся к органически модифицированному филлосиликату, полученному из природного минерала глины. Благодаря обмену исходных катионов прослойки на 10 органокатионы (как правило, четвертичные ионы алкиламмония) или полисахарида, образуется органофильная поверхность, состоящая из ковалентно связанных органических групп. Слоистая структура остается аналогичной родительскому филлосиликату.

15 В настоящей заявке термин “высушивание” относится к распылительной сушке, сублимационной сушке, воздушной сушке, вакуумной сушке или любому другому виду процесса, который уменьшает содержание или удаляет жидкость из вещества.

20 В настоящей заявке термин “распылительная сушка” относится к обычно применяемому методу высушивания вещества, содержащего жидкость, использующему горячий газ для испарения жидкости с целью уменьшения содержания или удаления 25 жидкости из этого вещества. Иначе говоря, материал высушивают путем разбрзгивания или распыления в потоке горячего сухого воздуха.

30 В настоящей заявке термин “сублимационная сушка”, термин “лиофилизация” и термин “сушка вымораживанием” относятся к удалению растворителя из материала в замороженном состоянии путем сублимации. Это достигается путем замораживания 35 материала, который необходимо высушить, ниже его эвтектической точки и последующего сообщения ему скрытой теплоты возгонки. Точный контроль подачи тепла позволяет провести высушивание в замороженном состоянии без таяния продукта. Для практических нужд процесс ускоряют и точно контролируют в условиях пониженного давления.

40 В настоящей заявке термин “сухой сыпучий порошок” относится к сыпучему сухому порошку.

В настоящей заявке термин “измельчение” относится к уменьшению размера частиц с помощью удара, разрезания или трения.

45 В настоящей заявке термин “промывка” относится к удалению или очистке (например, с использованием любого типа раствора (например, дистиллированной воды, буфера или растворителя) или смеси) примесей или растворимых нежелательных

50

компонентов препарата (например, можно промывать экстракт клеточной стенки дрожжей для удаления из образца компонентов, не относящихся к клеточной стенке дрожжей).

В настоящей заявке термин “фермент” относится к белку или молекуле на основе 5 белка с характерной последовательностью аминокислот, которая укладывается с образованием определенной трехмерной структуры, придающей молекуле уникальные свойства, и действует в качестве катализатора или реактива для определенных 10 химических реакций, превращающих определенный набор реагентов (называемых субстратами) в определенные продукты.

В настоящей заявке термин “пептид”, термин “полипептид” и термин “белок” 15 относятся к первичной последовательности аминокислот, которые связаны ковалентными “пептидными связями”. Вообще, пептид состоит из нескольких аминокислот, как правило из 2-50 аминокислот, и является более коротким по сравнению с белком. Термин “полипептид” включает пептиды и белки. Пептиды, полипептиды или белки могут быть 20 синтетическими, рекомбинантными или природными. Синтетический пептид получают с помощью искусственных средств *in vitro* (например, не вырабатывается *in vivo*).

В настоящей заявке термин “протеазы” относится к любому из ряда ферментов, 25 включая эндопептидазы и экзопептидазы, которые катализируют гидролитическое расщепление белков на пептиды или аминокислоты.

В настоящей заявке термин “лизис” относится к разрушению или разрыву 30 клеточной мембранны дрожжей и клеточной стенки дрожжей, приводящему к высвобождению внутриклеточных компонентов. В настоящей заявке “лизис” является результатом действия физических/механических, ферментативных (включая автолиз и гидролиз) или осмотических механизмов (включая “алкогольный шок” и гидролиз).

В настоящей заявке термин “автолиз” относится к разрушению части или целой 35 клетки или ткани ферментами, вырабатываемыми в ней самой.

В настоящей заявке термин “гидролиз” относится к процессу расщепления 40 соединения на фрагменты с добавлением воды (например, используемому для разложения полимеров на более простые единицы (например, крахмала до глюкозы)).

В настоящей заявке “алкогольный шок” относится к осмотическому стрессу, 45 вызываемому добавлением алкоголя (например, этанола) в питательную среду с возникновением разницы между осмотическим давлением среды и осмотическим давлением внутри клеток (например, клеток дрожжей), растущих в среде. Алкогольный шок может привести к лизису клеток (например, клеток дрожжей), выращиваемых в среде.

50

В настоящей заявке термин “осмос” относится к диффузии растворителя (например, воды) через полупроницаемую мембрану из раствора с низкой концентрацией растворенного вещества (высокий водный потенциал) в раствор с высокой концентрацией растворенного вещества (низкий водный потенциал), против градиента концентрации растворенного вещества. Это физический процесс, в котором растворитель перемещается без сообщения ему энергии через полупроницаемую мембрану (проницаемую для растворителя, но не для растворенного вещества), разделяющую два раствора с различными концентрациями. Результирующее движение растворителя происходит из менее концентрированного (гипотонического) в более концентрированный (гипертонический) раствор, стремясь уменьшить разницу в концентрации.

В настоящей заявке термин “осмотический стресс” и термин “осмотический шок” относятся к внезапному изменению концентрации растворенного вещества вокруг клетки, вызывающему быстрое изменение движения воды через ее клеточную мембрану. В условиях высоких концентраций солей, субстратов или любого растворенного вещества культуральной среды, вода покидает клетки в результате осмоса. Это также ингибирует транспорт субстратов и кофакторов в клетку, таким образом “шокируя” клетку. Альтернативно, при низких концентрациях растворенных веществ вода входит в клетку в большом количестве, вызывая набухание клетки и либо ее разрыв, либо апоптоз.

В настоящей заявке термин “образец” используется в широком смысле, включая экземпляр или культуру, полученные из любого источника, а также биологические образцы и образцы окружающей среды. Биологические образцы могут быть получены от животных (включая людей) и включают жидкости, твердые вещества, ткани и газы. Биологические образцы включают производные крови, такие как плазма, сыворотка и т.п.. Образцы окружающей среды включают материал окружающей среды, такой как поверхностный материал, почва, вода, кристаллы и промышленные образцы.

В настоящей заявке термин “комплекс” относится к объекту, образованному путем ассоциации двух или нескольких отдельных объектов (например, ассоциация между двумя или несколькими объектами, при которой объекты являются одинаковыми или различными (например, одинаковые или различные химические вещества)). Ассоциация может осуществляться посредством ковалентной связи или нековалентной связи (например, посредством Ван-дер-Ваальсового, электростатического взаимодействий, взаимодействия зарядов, гидрофобного взаимодействия, дипольного взаимодействия

и/или водородных связей (например, уретановые связи, амидные связи, эфирные связи и их комбинация)).

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10

Согласно настоящему изобретению предложены новые клетки дрожжей, структура клеточной стенки которых была модифицирована (например, в клеточную стенку дрожжей встроены с образованием включений глина и/или глиносодержащий компонент и/или изменено соотношение глюкан:маннан), способы их производства, композиции, включающие и/или получаемые из них, и способы их применения (например, для связывания бактерий и микотоксинов).

15

20

25

30

35

40

45

50

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен экстракт клеточной стенки дрожжей (например, выделенный, очищенный, модифицированный и/или концентрированный экстракт клеточной стенки), содержащий глину и/или компонент(ы) глины, встроенные в клеточную стенку (например, вследствие культивирования клеток дрожжей в присутствии глины), и/или экстракт клеточной стенки дрожжей, содержащий измененную структуру глюкан:маннан. Согласно некоторым вариантам реализации экстракт клеточной стенки дрожжей с включениями глины, содержащий глину и/или глиносодержащий компонент, включенные в клеточную стенку дрожжей, и/или экстракт клеточной стенки дрожжей, содержащий измененную структуру глюкан:маннан, смешивают или иным образом добавляют к кормам, органическим материалам (например, подстилке) и/или воде, тем самым обеспечивая связывание микотоксинов (например, при нахождении в желудочно-кишечном трактате животного или во время фильтрации) и устранение или снижение отрицательных эффектов микотоксинов. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы, которые значительно улучшают адсорбционные/связывающие свойства материалов, основанных на клеточной стенке дрожжей, по отношению к микотоксинам (например, такие, которые в значительной степени адсорбируют и/или связывают и/или ограничивают биодоступность ряда микотоксинов (например, тех, которые не адсорбируются и/или не связываются самой по себе глиной, самим по себе экстрактом клеточной стенки дрожжей, комбинацией экстракта клеточной стенки дрожжей, к которому позже добавлена глина на основе сухой смеси; и/или основанными на глине продуктами, с поверхностью которых химически связаны полисахаридные материалы) в пищеварительном тракте животного).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен новый способ приготовления клеток дрожжей, выращенных в присутствии одной или нескольких глин. Согласно некоторым вариантам реализации, клеточные стенки дрожжей с встроенной глиной выделяют из клеток дрожжей с встроенной глиной, выращенных в присутствии одной или нескольких глин. Согласно некоторым вариантам реализации, экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной очищают и/или концентрируют.

Как описано в настоящей заявке, данное изобретение не ограничено каким-либо определенным штаммом клеток дрожжей или каким-либо определенным видом глины. Согласно некоторым вариантам реализации, источником глины является стандартный источник глины коммерческого качества (например, выбранный из глин, обладающих активностью *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo* в отношении микотоксинов, или источник глины, выбранный, потому что он не демонстрирует *in vitro*, *in vivo* и/или *ex vivo* свойства в отношении микотоксинов). Согласно настоящему изобретению композиции и способы можно применить для адсорбирования и/или связывания микотоксинов у ряда субъектов. Действительно, настоящее изобретение не ограничено типом субъекта, которому полезны композиции и способы, описанные в настоящей заявке. Настоящее изобретение может быть полезно всем животным, однако, примеры субъектов включают, но не ограничиваются ими, людей, птиц, крупный рогатый скот, свиней, лошадей, овец, коз, собачьих, кошачьих, рыб, верблюдовых, виды грызунов, а также представителей моллюсков и рыб. Согласно некоторым вариантам реализации, при смешивании с органическими материалами (например, включая подстилку и корма) и/или водой, и/или при поступлении субъекту непосредственно с пищей, композиции настоящего изобретения снижают абсорбцию или поглощение микотоксинов субъектом, тем самым облегчая снижение продуктивности, здоровья и/или уменьшая частоту возникновения связанных с микотоксинами заболеваний и патологических ответов у субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ производства и/или выращивания клеток дрожжей, содержащих глину и/или компонент(ы) глины, встроенные в клеточную стенку дрожжей, и/или включающих измененную структуру глюкан:маннан. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена клетка дрожжей, полученная и/или культивируемая в присутствии глины, причем клеточная стенка дрожжей включает соотношение глюкан:маннан, которое больше (например, больше на 2,5%, больше на 5%, больше на 10%, больше на 15%, на 20%, больше на 25%, больше на 30%, больше на 40%,

50

больше на 50% или еще больше), чем соотношение глюкан:маннан клеток дрожжей, полученных/культивируемых в отсутствие глины (См., например, Пример 2). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен экстракт клеточной стенки дрожжей, полученный из (например, выделенный, очищенный и/или сконцентрированный из) жизнеспособной клетки дрожжей, полученной и/или культивированной в присутствии глины, причем клеточная стенка дрожжей включает соотношение глюкан:маннан, которое больше (например, больше на 2,5%, больше на 5%, больше на 10%, больше на 15%, на 20%, больше на 25%, больше на 30%, больше на 40%, больше на 50% или еще больше), чем соотношение глюкан:маннан клеток дрожжей, полученных/культивируемых в отсутствие глины (См., например, Пример 2).

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен новый экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной, полученный из дрожжей, выращенных в присутствии глины, и способы его производства. Согласно некоторым вариантам реализации, способ получения клеток дрожжей включает культивирование клеток дрожжей, включая, но не ограничиваясь ими, представителей родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* и *Torulaspora*, в присутствии одного или нескольких видов глины с целью изменения или иной модификации клеточной стенки дрожжей (например, с целью увеличения способности клеточной стенки дрожжей адсорбировать и/или связывать микотоксины (например, благодаря клеточной стенке дрожжей, включающей глину и/или компонент(ы) глины и/или включающей измененную структуру глюкан:маннан)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено добавление одного или нескольких материалов на основе глины, включая, но не ограничиваясь ими, силикаты (например, группу тектосиликатов (например, цеолиты, кварц, полевые шпаты); филlosиликаты (например, каолинит, галлуазит, диктит, накрит, хризотил, антигорит, лизардит, тальк), пирофиллиты, смектиты (например, монтмориллонит, бейделлит, нонtronит; вермикулиты, микасантигорит, мусковит, иллит, фенгит, биотит); сепиолит, пальгорскит, аттапульгит) и/или гидратированный силикат алюминия (например, монтмориллониты, бентонит)), в среду для культивирования клеток дрожжей (например, как описано в Примерах 1, 5 и 6). Настоящее изобретение обеспечивает жизнеспособные клетки дрожжей с встроенной в структуру клеточной стенки дрожжей глиной и/или глиносодержащими компонентами (например, как показано на Фигурах 1А и 1В и на Фигуре 2). Согласно некоторым вариантам реализации, один или несколько видов глины, добавленных в среду для культивирования клеток дрожжей,

50

присутствуют в концентрации приблизительно 0,075%, 0,1%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15% или более от общего количества питательной среды. Согласно некоторым вариантам реализации, количество одного или нескольких видов глины, добавленных в среду для культивирования клеток дрожжей, не превышает 2% конечного содержания биореактора, в котором выращивают клетки дрожжей. Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины, добавленной в среду для культивирования клеток дрожжей, выбрано так, что оно не приводит к набуханию среды для культивирования клеток дрожжей (например, составляет около 2,0% или меньше). Согласно некоторым вариантам реализации, количество глины, добавленной в среду для культивирования клеток дрожжей, выбрано так, что оно приводит к получению экстракта клеточной стенки дрожжей, выделенного из дрожжей, содержащих количество глины, официально разрешенное для использования в качестве кормовой добавки в несодержащем лекарственные вещества корме животных (например, не превышает 2% от полного рациона). Согласно некоторым вариантам реализации, в среду для культивирования клеток добавляют пищевой пеногаситель или противопенообразователь (например, включая, но не ограничиваясь, несиликоновый молекулярный пеногаситель, масляные пеногасители (например, минеральное масло, растительное масло, вазелиновое масло или другое масло, не растворимое в пенящейся среде) или пеногасители на основе соединений кремния (например, доставляемые в виде масляной или водной эмульсии)). Согласно некоторым вариантам реализации, добавляют воски (например, этилен-бис-стеарамид (ЭБС), парафиновые воски, эфирные воски или воски на основе спиртов жирного ряда) и/или гидрофобный диоксид кремния для улучшения эмульгирования и распространения в пенящейся среде.

Эксперименты, проведенные при разработке вариантов реализации настоящего изобретения, выявили ряд факторов, важных для роста клеток дрожжей в присутствии одного или нескольких видов глины. Например, согласно некоторым вариантам реализации, предпочтительно поддерживать соотношение (вес./об.) (например, соответствующее граммам/кубический сантиметр (г/к³)) между материалом субстрата из глины и водой около или ниже 3% (например, для предотвращения достижения твердого или полутвердого состояния (например, из-за адсорбции и удержания воды материалом глины)). Таким образом, сорбция воды водонабухающим гидратируемым силикатом алюминия является лимитирующим фактором, влияющим на соотношение между материалом субстрата из глины и водой при разработке состава культуральной среды

настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам реализации, культуральная среда и используемые сосуды стерилизуют, и инокуляцию микроорганизмами производят в соответствии со стандартными процедурами. Например, согласно некоторым вариантам реализации, пре-инокулум готовят из активных сухих дрожжей в сосуде со стерильной дезионизированной водой и инкубируют около 25-30 °C (например, при 28°C) в течение определенного промежутка времени (например, 20 минут). Согласно некоторым вариантам реализации, инокуляция пре-инокулумом выполняется стерильным образом (например, при температуре приблизительно 30°C). Согласно некоторым вариантам реализации, наблюдают за pH и уровнем глюкозы и поддерживают их. Согласно некоторым вариантам реализации, перемешивание культуры увеличивают с приращением (например, со 100 до 500 об/мин) во время роста. Согласно некоторым вариантам реализации, один или несколько видов глины стерильным образом добавляют в культуру во время роста (например, когда потреблено менее половины, приблизительно половина или более половины питательных веществ культуры).

Согласно некоторым вариантам реализации, по мере увеличения количества глины, добавленной в среду для культивирования клеток дрожжей (например, в количестве, зависящем от типа используемой глины или глин), свойства материала глины, связанные с его набуханием, ингибируют рост клеток дрожжей.

Согласно некоторым вариантам реализации, выращивание дрожжей в среде для культивирования клеток дрожжей с добавлением глины создает условия, которые вызывают стресс у растущих дрожжей. Хотя настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, и понимание механизма действия не является необходимым для осуществления настоящего изобретения, согласно некоторым вариантам реализации, стресс, который оказывает на дрожжи среда для культивирования клеток с добавлением глины, вызывает у дрожжей повышенную выработку глюкана, что приводит к увеличению соотношения глюкан:маннан.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, клетки дрожжей, культивируемые в присутствии одного или нескольких видов глины, не только образуют сетчатые структуры с глиной и/или глиносодержащим компонентом, встроенным в клеточную стенку дрожжей, но также характеризуются измененным составом клеточной стенки (например, имеют измененные соотношения глюкан:маннан, общее содержание белка и/или остаточных количеств). Например, согласно настоящему изобретению предложены клетки дрожжей, включающие соотношение глюкан:маннан, которое больше

50

(например, больше на 2,5%, больше на 5%, больше на 10%, больше на 15%, на 20%, больше на 25%, больше на 30%, больше на 40%, больше на 50% или еще больше), чем соотношение глюкан:маннан клеток дрожжей, культивируемых в отсутствие глины (См., например, Пример 2). Согласно настоящему изобретению также предложены клетки дрожжей и экстракты клеточной стенки дрожжей, включающие повышенное общее содержание белка (например, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или еще сильнее увеличенное содержание белка) по сравнению с общим содержанием белка клеток дрожжей и/или экстрактов клеточной стенки дрожжей, получаемых в отсутствие глины (См., например, Пример 2).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены экстракты клеточной стенки дрожжей, содержащие глину и/или компонент(ы) глины, которые образуют включения непосредственно в клеточной стенке дрожжей, и/или содержащие измененное соотношение структуры глюкан:маннан, что обеспечивает свойства связывания микотоксина, превосходящие таковые свойства обычных композиций. Настоящее изобретение не ограничено каким-либо определенным способом получения экстракта клеточной стенки дрожжей из дрожжей, выращенных в присутствии одного или нескольких видов глины. Действительно, для получения экстрактов клеточной стенки дрожжей может быть использован ряд процедур, включая, но не ограничиваясь, использование стеклянных шариков и битера для шариков, обработку ферментами (например, протеазой (например, папаином)), механический лизис, автолиз и гидролиз и другие способы, известные в данной области техники (См., например, Peppler, H. J. 1979. Production of yeasts and yeast products. Page 157 в: Microbial Technology & Microbial Processes, Vol.1 (2d Ed.), Academic Press). После лизиса и экстракции клеточную стенку дрожжей с встроенной/ интегрированной глиной и/или глиносодержащим компонентом промывают, чтобы удалить внутриклеточные компоненты и очистить и сконцентрировать экстракт. Полученный экстракт может быть высушен любым из многих способов, распространенных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, сублимационную сушку и/или распылительную сушку (например, с получением гигроскопического не растворимого в воде порошка).

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен экстракт клеточной стенки дрожжей, содержащий глину и/или глиносодержащий компонент, образующий сетчатую структуру непосредственно в клеточной стенке дрожжей. Согласно некоторым вариантам реализации, композиция,

включающая экстракт клеточной стенки дрожжей настоящего изобретения, содержащий глину и/или компоненты глины, интегрированные непосредственно в клеточную стенку дрожжей, включает менее чем приблизительно 0,5% глины, 0,5-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 5 10-15%, 15-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70% или более глины и/или глиносодержащего компонента в составе экстракта клеточной стенки дрожжей (на основе вес. %). Согласно некоторым вариантам реализации, увеличение количества глины в 10 культуральной среде увеличивает количество глины и/или содержание глиносодержащего компонента в экстракте клеточной стенки дрожжей.

Согласно некоторым вариантам реализации, глину, которая была добавлена к питательной среде для клеток дрожжей и не была встроена в клетки дрожжей, собирают и 15 используют в последующей процедуре культивирования клеток дрожжей (например, невстроенный материал глины используют повторно). Например, повторное использование материала глины облегчается седиментационными свойствами глины по 20 сравнению с дрожжами. Действительно, эксперименты, проведенные при разработке вариантов реализации изобретения, привели к образованию двух подлежащих сбору слоев, 25 (i) нижнего слоя, содержащего только материал глины (на 99%); и (ii) верхнего слоя, содержащего фракцию глины, включенную в дрожжи. Таким образом, хотя понимание механизма не является необходимым для осуществления настоящего изобретения, и настояще изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено 30 непосредственное включение частиц глины в и/или на клеточную стенку дрожжей (например, во фракцию, которая выдерживает процессы приготовления экстракта клеточной стенки дрожжей (например, путем прямого образования включений глины или 35 глиносодержащего компонента с полимерными цепями глюкана клеточной стенки дрожжей)). Согласно другим вариантам реализации, фракция глины захватывает клетку дрожжей во время роста культуры и при почковании, вместе с дочерними клетками, при 40 этом клетки дрожжей заключены в макроструктуру, включающую глину, до лизиса дрожжей и удаления их внутриклеточных компонентов с помощью промывки. Согласно некоторым вариантам реализации, цепи глюкана растут в промежутках слоистой структуры глины.

Согласно некоторым вариантам реализации, клетка дрожжей или компонент 45 клеточной стенки дрожжей (например, экстракт клеточной стенки дрожжей, полученный и выделенный как описано в настоящей заявке (например, содержащий глину или

50

глиносодержащий компонент встроенный в клеточной стенке дрожжей и/или содержащий измененную структуру глюкана и/или маннана)) объединяют с одним или несколькими другими агентами, включая, но не ограничиваясь, фермент (например, эстеразу, эпоксидазу), бактерии, дрожжи или компонент дрожжей, глину и т.д. (например, перед смешиванием с кормом, встраиванием в гранулированные корма и/или кормлением животных)).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения используют клетки дрожжей, включающие измененную структуру клеточной стенки дрожжей (например, глину и/или глиносодержащий компонент, встроенный в клеточную стенку дрожжей, и/или клеточные стенки, включающие измененную структуру глюкана и/или маннана), содержащие их композиции и/или композиции, полученные из них, которые используются с одним или несколькими способами и/или материалами, описанными в настоящей заявке, для применения в композициях и/или способах для снижения, удаления и/или устранения микотоксинов (например, физические, смешанные, химические, микробиологические способы, описанные в настоящей заявке (например, для того, чтобы адсорбировать и/или связать бактерии и токсины)). Например, согласно некоторым вариантам реализации, клетка дрожжей или компонент клеточной стенки дрожжей (например, экстракт клеточной стенки дрожжей, полученный как описано в настоящей заявке (например, содержащий глину или компонент(ы) глины, встроенный в клеточную стенку дрожжей, и/или содержащий измененную структуру глюкана и/или маннана)) используется с одним или несколькими физическими, смешанными, химическими или микробиологическими способами, описанными в настоящей заявке, для связывания микотоксинов.

Настоящее изобретение не ограничено типом связываемого микотоксина. Действительно, согласно настоящему изобретению, композиции (например, экстракты клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной) можно использовать, чтобы адсорбировать и/или связывать ряд микотоксинов, включая, но не ограничиваясь ими, ацетоксисцирпендиол, ацетилдезоксиниваленол, ацетилниваленол, ацетилнеосоланиол, ацетил Т-2 токсин, распространяется на все афлатоксины, афлатоксин B1, B2, G1 и G2, афлатрем, альтенуевую кислоту, альтернариол, аустдиол, аустамид, аустоцистин, авенацеин +1, боверицин +2, бентенолид, бревианамид, бутенолид, калонектрин, хетоглобозин, цитринин, цитреовиридин, кохлиодинол, цитохалазин Е, циклопиазоновую кислоту, деацетилкалонектрин, деацетилнеосоланиол, диацетат дезоксиниваленола,

50

моноацетат дезоксиваленола, диацетоксисцирпенол, деструксин В, энниатины, распространяется на все токсины спорыньи и эндофитов, фруктигенин +1, фумагиллин, фумонизины, фумонизины В1 и В2 и В3, Фузаренон-Х, Фузарохроманон, фузаровую кислоту, фузарин, глиотоксин, токсин НТ-2, ипомеанин, исландитоксин, латеритин +1, никомаразмин +1, малформин, мальторизин, монилиформин, моноацетоксисцирпенол, неосоланиол, ниваленол, токсин NT-1, токсин NT-2, распространяется на все охратоксины, ооспореин, щавелевую кислоту, патулин, пенициллиновую кислоту, пенитрем, роридин Е, рубратоксин, руброскирин, рубросульфин, ругулозин, самбуцинин +1, сатратоксины F,G,H, сцирпентриол, слафрамин, стеригматоцистин, токсин Т-1, токсин Т-2, триацетоксисцирпендиол, распространяется на все трихотецины, триходермины, трихотецин, триховеррины, триховерролы, триптокивален, веррукарин, веррукулоген, виопурпурин, виомеллеин, виридитоксин, ксантоциллин, яваницин +1, зеараленолы, зеараланоны, зеараленон и их подсемейства и/или производные. Согласно некоторым вариантам реализации, композиции и способы настоящего изобретения используются для адсорбции и/или связывания афлатоксинов, зеараленона, охратоксинов, трихотецина, фумонизина, патулина и/или относящихся к эндофитам токсинов спорыньи и возможных конъюгатов и метаболитов вышеупомянутых микотоксинов. Эксперименты, проведенные при разработке настоящего изобретения, демонстрируют преимущество(а) использования настоящего изобретения по сравнению с традиционными или общепринятыми способами. Например, как описано в настоящей заявке, недостатком использования (1) композиции, включающей только глину, (2) композиции, включающей только экстракт клеточной стенки дрожжей, как и (3) композиции, включающей только экстракт клеточной стенки дрожжей, к которому была добавлена глина, является то, что такие композиции и способы их применения, по сравнению с настоящим изобретением, представляют собой менее эффективные средства снижения отрицательных эффектов микотоксинов и имеют большие недостатков. Однако, согласно настоящему изобретению, экстракты клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной (например, содержащие глину и/или глиносодержащий компонент, встроенный в виде сетчатой структуры в клеточной стенке дрожжей, и/или содержащие измененную структуру глюкана и/или маннана) демонстрируют неожиданную способность связывать ряд микотоксинов, а также демонстрируют удивительным образом повышенную способность адсорбировать микотоксины по сравнению с общепринятыми композициями (например, с композицией, включающей только глину(ы), с композицией, включающей только экстракт клеточной стенки дрожжей,

50

как и с композицией, включающей только экстракт клеточной стенки дрожжей, к которому была добавлена глина(ы), См. Примеры 2-3). Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены композиции и способы, которые демонстрируют неожиданные и превосходящие связывающие и/или адсорбционные свойства в отношении ряда микотоксинов, не обнаруживаемые у общепринятых композиций и способов. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены материалы и способы на основе клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной для их получения и применения с целью обеспечения эффективного способа связывания микотоксинов в пищеварительном трактате животных и человека (например, путем адсорбции микотоксинов, присутствующих в кормах, других органических материалах и/или в воде), при этом обеспечивающие снижение или отсутствие адсорбции полезных питательных веществ и снижение или отсутствие отрицательных эффектов на окружающую среду.

Согласно некоторым вариантам реализации, предпочтительной физической формой настоящего изобретения является сухой сыпучий порошок, подходящий для прямого включения в корма, другие органические материалы (например, подстилку) или непосредственно в качестве кормовой добавки для животных.

Согласно настоящему изобретению, композиции можно добавлять в любой органический материал (например, подстилку, корм для животных, продукты питания человека) и/или воду (например, воду, потребляемую животными и/или человеком, природную воду (например, пруды, озера, водохранилища, садки для рыбы и т.д.)) для удаления из них микотоксинов. При включении непосредственно в корма животных, композицию согласно настоящему изобретению добавляют в количестве приблизительно от 0,0125% до 0,4% по весу корма. При включении в другие органические материалы (например, в подстилку животных), композицию согласно настоящему изобретению добавляют в количестве приблизительно от 0,0125% до 99,9%. При включении в жидкость (например, в воду (например, для фильтрации)), композицию согласно настоящему изобретению добавляют в количестве приблизительно от 0,0125% до 100%. Согласно некоторым вариантам реализации, композицию настоящего изобретения добавляют в корма в количестве приблизительно от 0,025% до 0,2% по весу корма. Альтернативно, согласно настоящему изобретению композиции вводят животным непосредственно с пищей в качестве добавок (например, в количестве приблизительно от 2,5 до 20 грамм на животное в день). Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что количество, вводимое с пищей, варьирует в зависимости от вида животных, размера, типа

50

корма, к которому добавляют композицию настоящего изобретения, материала подстилки, источника воды и т.д.

Согласно настоящему изобретению композиции можно вводить с пищей любым животным и человеку. При смешивании с кормами или использовании в качестве кормовой добавки композиции согласно настоящему изобретению снижают биодоступность микотоксинов, абсорбцию или поглощение микотоксинов животным, улучшают продуктивность и/или здоровье и снижают частоту возникновения заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации, в которых композиции настоящего изобретения добавляют в органический материал, с которым контактируют животные и люди (например, в подстилку), композиции настоящего изобретения снижают биодоступность микотоксина (например, снижают абсорбцию и/или поглощение микотоксинов животным), тем самым улучшая продуктивность и здоровье и снижая частоту возникновения заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации, композиции настоящего изобретения добавляют в воду, которая предназначена для использования животными или человеком (например, для потребления или другой цели), тем самым снижая биодоступность микотоксина (например, снижая абсорбцию и/или поглощение микотоксинов субъектом, являющимся животным или человеком), улучшая продуктивность и здоровье и снижая частоту возникновения заболевания (например, композиции настоящего изобретения снижают биодоступность, абсорбцию или поглощение микотоксинов). Согласно некоторым вариантам реализации, композицию настоящего изобретения добавляют в воду, используемую для потребления человеком (например, в воду, используемую для изготовления сока, вина, бутылок с водой, кофе, чая, молока или других видов потребляемой жидкости). Согласно некоторым вариантам реализации, композицию настоящего изобретения добавляют в природную воду (например, пруды, озера, водохранилища, реки, ручьи, ирригационные каналы, резервуары, используемые для содержания рыбы или другого вида водных организмов и т.д.). Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации, композицию настоящего изобретения (например, экстракт клеточной стенки дрожжей, содержащий глину или глиносодержащий компонент, включенный в клеточную стенку) применяют для фильтрации жидкостей (например, потребляемых жидкостей (например, воды, используемой в производстве напитков, самих напитков)). Например, согласно некоторым вариантам реализации, композицию настоящего изобретения применяют в качестве или в составе фильтра, причем жидкость (например, потребляемая жидкость (например,

50

апельсиновый сок, яблочный сок, сливовый сок, грейпфрутовый сок, клюквенный сок или другой тип сока, пиво, вино, дистиллированная жидкость и т.д.)) пропускают через фильтр, включающий композицию настоящего изобретения, при этом композиция удаляет из жидкости один или несколько типов микотоксина.

Как описано в Примерах 1-4, культивирование дрожжей в присутствии глины обеспечивает значительное увеличение адсорбции микотоксина клеточной стенкой дрожжей (например, с 6,917% в случае, когда дрожжи не культивируют в присутствии глины, до значения, достигающего 73,553% и 79,337% в случае, когда соответственно 1,0 и 2,0% глины включено в среду без специфической экстракции глюкана внутреннего слоя клеточной стенки дрожжей (См., например, Пример 2)). Кроме того, соотношение глюкан:маннан увеличивается при добавлении глины с 1,066 до 1,366. Несмотря на уменьшение количества маннана, концентрация белков клеточной стенки увеличивается. Кроме того, остаточная фракция (например, соответствующая потерям глюканов, маннана, белков, глины, N-ацетилглюкозамина и/или хитина, присутствующего в клеточной стенке дрожжей во время процесса экстракции) увеличивается в присутствии и площади поверхности глины. Хотя механизм не является необходимым для осуществления настоящего изобретения, и настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным механизмом действия, согласно некоторым вариантам реализации это повышение происходит из-за увеличения доли хитина, принимающего участие в работе компенсаторных механизмов дрожжей в ответ на изменение окружающей среды и условий роста. Кроме того, согласно настоящему изобретению, композиции (включая экстракт клеточной стенки дрожжей из измененных клеток дрожжей (например, клеток дрожжей, содержащих глину и/или глиносодержащий компонент, включенный в клеточные стенки дрожжей, и/или клеточные стенки, содержащие измененную структуру глюкана и/или маннана)) обеспечивают существенную и неожиданную способность адсорбировать и/или связывать микотоксины (например, зеараленон (например, демонстрируя эффективность на 79,33% по сравнению с эффективностью лишь на 44,7% общепринятой композиции, включающей комбинацию экстракта клеточной стенки дрожжей, к которому позже добавлена глина на основе сухой смеси, См. Примеры 1-4)).

Было исследовано применение альтернативного способа выделения клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной из клеток дрожжей с встроенной глиной, с использованием гидролиза протеазами (См. Пример 3). Специфическая экстракция внутреннего слоя (глюкана) клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной привела к

50

повышению связывающих и адсорбционных свойств клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной в отношении микотоксинов (например, зеараленона). Кроме того, культивация клеток дрожжей в среде для культивирования клеток, содержащей 1,0% и 5 2,0% глины, значительно повышала связывающую и адсорбционную активность клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной в отношении микотоксинов (например, зеараленона). Например, общепринятая композиция, включающая комбинацию экстракта 10 клеточной стенки дрожжей, к которому позже добавлена глина на основе сухой смеси, демонстрировала 44,7% уровень эффективности связывания микотоксинов по сравнению 15 с 85,89% уровнем эффективности связывания микотоксинов, полученным для композиции настоящего изобретения, и увеличение адсорбции афлатоксина В1 с 2,65 до 53,70% (См., например, Пример 3).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы получения клеток дрожжей, содержащих клеточную стенку дрожжей с 20 встроенной глиной. Согласно некоторым вариантам реализации, клетки дрожжей, содержащие клеточную стенку дрожжей с встроенной глиной, производят в различных масштабах (например, в тестовом масштабе, в масштабе партии, в пробном масштабе, в 25 предпроизводственном масштабе, в производственном масштабе, в коммерческом масштабе, в промышленном масштабе). Согласно некоторым вариантам реализации, дрожжи выращивают в ферментере. Ферментер может иметь любой подходящий размер (например, 5 литров... 10 литров... 25 литров... 50 литров... 100... 500 литров... 1 30 килолитр... 5 килолитров... 10 килолитров... 50 килолитров... 100 килолитров... 500 килолитров... 1 миллион литров и т.д.) для производства дрожжей в желаемом масштабе 35 для использования в соответствии с настоящим изобретением (например, в тестовом масштабе, в пробном масштабе, в промышленном масштабе и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации, среда для выращивания дрожжей может иметь любой подходящий состав для выращивания дрожжей в соответствии с настоящим изобретением. 40 Подходящие питательные вещества представляют собой источники углерода, азота, фосфора, магния, серы, калия и следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации, питательные вещества добавляют к культуре в концентрациях (вес. % соединения-источника) в пределах диапазонов (проценты по весу): Источник углерода 45 0,01 - 20% (например, 0,05 - 10%), Источник азота 0,001 - 10% (например, 0,001 - 3%), Источник фосфора 0,001 - 5% (например, 0,01 - 0,5%), Источник магния 0,001 - 0,2% (например, 0,001 - 0,2%), Источник серы 0,01 - 0,25% (например, 0,01 - 0,25%), Источник 50

калия 0,001 – 0,5% (например, 0,01 – 0,25%), Органический источник азота 0,001 - 5% (например, 0,01 - 5%), и следовые элементы добавлены в избыток. Согласно некоторым вариантам реализации, дрожжевая культуральная среда включает воду, источник углерода (например, сахар, глюкозу, декстрозу, тростниковый сахар, патоку и т.д.), подходящий источник азота (например, аммиак, мочевину и т.д.), источник аминокислот (например, пептон и т.д.), соли (например, хлорид натрия, гипохлорит кальция, хлорид магния, сульфат магния, сульфат цинка и т.д.) и источник глины или глиносодержащего компонента (например, цеолит, бентонит, алюмосиликат, монтмориллонит, смектит, каолинит, органоглина, их смеси и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации, компоненты дрожжевой культуральной среды могут присутствовать в любых количествах, подходящих для роста клеток дрожжей (См. например, Пример 5). Согласно некоторым вариантам реализации, присутствие глины в дрожжевой культуральной среде вызывает непредвиденные осложнения по сравнению со стандартными протоколами выращивания дрожжей. Согласно некоторым вариантам реализации, присутствие глины в дрожжевой культуральной среде приводит к необычно высокой степени пенообразования в ферментере. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены пеногасители в составе среды для культивирования клеток (например, несиликоновые молекулярные пеногасители, масляные пеногасители (например, минеральное масло, растительное масло, вазелиновое масло и т.д.), поропластовые пеногасители (например, диоксид кремния), пеногасители на водной основе, пеногасители на основе кремния, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, полиакрилаты алкила и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации, пеногасители необходимы для увеличения масштаба настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам реализации, использование пеногасителя связано с повышением способности увеличивать производство композиции настоящего изобретения.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Описанные ниже примеры представлены с целью демонстрации и призваны дополнительно проиллюстрировать некоторые предпочтительные варианты реализации и аспекты настоящего изобретения и не должны рассматриваться в качестве ограничений объема настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1**Материалы и методы**

Культура дрожжей. Нижеприведенный протокол использовали во всех ферментерах Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) для выращивания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (активные сухие дрожжи (АСД) от Fermin, Alltech Inc., Партия №689, Количество дрожжей: $2,38 \times 10^{10}$ клеток/г, Жизнеспособность: 92,6%). Дрожжевой инокулом готовили путем добавления 28 г свежих АСД от Fermin в предварительно нагретую колбу с 250 мл стерильной десионизированной воды. Затем раствор инкубировали при 30°C (в водяной бане) в течение 20 минут и несколько раз перемешивали круговым вращением. Среда, использованная в BioFlow, состояла из 66 г дрожжевого экстракта, 10 г пептона, 4 г декстрозы, 4 г основы азотного агара для дрожжей и 1750 мл десионизированной воды. Контрольный образец получали, выращивая только дрожжи, что требовало добавления дополнительных 250 мл десионизированной воды в объем биореактора. Три образца, содержащих дрожжи и бентонит K10 (Fluka), получали путем добавления в биореактор 8, 16 и 32 г бентонита. Среду для биореактора Bioflow нагревали до 30°C и в течение 10 минут перед инокуляцией нагнетали в биореактор воздух со скоростью 1 л/мин. Интенсивность перемешивания устанавливали на уровне 300 об/мин и проводили наблюдение и поддержание pH среды на уровне минимум 5,0 на протяжении всего периода выращивания. Добавляли пеногаситель (Antifoam AES, 1:10, по необходимости). Затем стерильным образом вводили диаммоний фосфат (ДАФ) (4 г на 10 мл при pH 4,0). Предварительно разведенные дрожжи добавляли в ферментер. Во время роста культуры с помощью диабетических тест-полосок (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) определяли уровень глюкозы и вносили дополнительные порции при падении содержания глюкозы ниже 0,8 мг/мл. Интенсивность перемешивания последовательно увеличивали до 500 об/мин в течение 2 ч инкубации, так же, как и поступление воздуха (до 4 л/мин в течение 3 ч). После того, как была потреблена половина добавленного глюкозного субстрата, в биореактор вносили дополнительное количество бентонита (8, 16, 32 г в 250 мл десионизированной воды) до конечной концентрации глины в финальной среде соответственно 0,5%, 1,0% и 2,0%.

Сбор культуры дрожжей проводили, когда весь сахар был использован. Содержимое BioFlow собирали в стерильные колбы и центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок промывали 0,125% NaCl в H₂O. Осадок

50

разделяли на 2 фракции благодаря происходившему после центрифугирования отчетливому образованию 2 слоев: (*i*) слоя, содержащего глину, и (*ii*) слоя, содержащего дрожжи и глину. Затем дрожжи три раза промывали 0,125% раствором NaCl.

⁵ *Способ экстракции клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной.* Применили два различных способа для выделения фракций клеточной клетки дрожжей из дрожжей, выращенных, как описано выше.

¹⁰ Согласно первому способу применяли ‘микро-способ’ с использованием стеклянных шариков и битера для минишариков. (Bead-Beater, Модель №1107900, Biospcc Products, Inc., Hamilton Beach/Proctor-Silex, Inc., Southern Pines, North Carolina, U.S.A.).
¹⁵ Осадок ресуспенсировали в двойном объеме 10mM Tris-Cl, pH 7,4, с фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ) и взбивали стеклянными шариками (50 : 50, суспензия дрожжей : шарики) в общем объеме 5 мл в течение 30 секунд с интервалом 1 мин, выдерживая все это время на льду. Взбивание повторяли 10 раз или до тех пор, пока ²⁰ доля разрушенных клеток не достигала 95%. Шарики собирали и промывали. Фракции объединяли и центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Затем осадки собирали, высушивали сублимацией и измельчали.

²⁵ Согласно второму способу дрожжевой осадок ресуспенсировали в стерильной деионизированной воде до концентрации от 13 до 15% сухого веса. Суспензию дрожжей перемешивали при 60°C. Перед добавлением фермента (0,3 мл/л) pH доводили до 8,0 с помощью 10% NaOH. Перемешивание при указанной температуре продолжали в течение ³⁰ 8 часов. В течении первых двух часов измеряли и корректировали pH каждые 15 минут (с использованием 10% NaOH), а затем в течение следующих шести часов измеряли и корректировали pH каждый час. Суспензию переносили в центрифужные пробирки и ³⁵ центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок промывали тройным объемом холодной стерильной воды и снова центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Этап промывки повторяли два раза перед замораживанием, сублимационной сушкой и измельчением осадка.

⁴⁰ 45

⁵⁰

ПРИМЕР 2

Характеристика экстрактов клеточных стенок дрожжей, выделенных с использованием стеклянных шариков и битера для минишариков из клеток дрожжей, выращенных в отсутствие и в присутствии глины

После реуспенсирования в буфере Tris-HCl, pH 7,4, с ФМСФ, клетки дрожжей разрушали с помощью микро-метода с использованием битера для шариков и стеклянных шариков, как описано выше (см. Пример 1). Затем лизаты клеточных стенок дрожжей анализировали с целью выявления характеристик клеточных стенок дрожжей и их способности адсорбировать микотоксины (выраженной в проценте эффективности по сравнению с общим количеством присутствующих микотоксинов) при pH, соответствующих физиологическим условиям, для каждого рассматриваемого микотоксина. Общую адсорбционную/связывающую активность оценивали кинетически. Испытываемые образцы включали от, как минимум, 5 до 10 уровней концентрации микотоксина, которые тестировали с различными препаратами клеточных стенок дрожжей с концентрациями от 0,25 до 4 г/л, диспергированными в водной среде с фиксированным значением pH 4, которое соответствует значению pH при пищеварении в желудочно-кишечном тракте животных. Оценку адсорбции проводили с использованием Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с флуорометрическим детектором и детектором на диодной матрице (например, для определения количества микотоксина и адсорбированного/связанного микотоксина).

Данные представлены на Фигуре 3. Экстракт клеточных стенок дрожжей, полученный из клеток дрожжей, выращенных в присутствии глины (клетки дрожжей с встроенной глиной), показал значительную неожиданную способность связывать и адсорбировать зеараленон (например, демонстрируя 79,33% эффективность для клеточных стенок дрожжей, которые были выделены из клеток дрожжей, выращенных в присутствии 2% глины, по сравнению со всего лишь 6,91% эффективностью для клеточных стенок дрожжей, которые были выделены из клеток дрожжей, выращенных в отсутствие глины). Эффективность 79,33% для композиций клеточных стенок дрожжей, выделенных из клеток дрожжей, которые были выращены в присутствии 2% глины, была также значительно выше, чем показанная ранее эффективность 44,7% для стандартной композиции, содержащей комбинацию экстракта клеточных стенок дрожжей с последующим добавлением глины на основе сухой смеси. Уровень включения продуктов

50

связывания для АФВ1 и ЗЕА составили, соответственно, 0,1 и 0,4% в реакционной среде, в которой поддерживали постоянный pH 4,0. Анализ проводили при круговом перемешивании в течение 90 мин при 37°C, и количество связанного токсина оценивали с помощью ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентным детектором.

Кроме того, дрожжи, выращенные в присутствии глины, демонстрировали значительные изменения в компонентах/структуре клеточной стенки. Например, при увеличении количества глины, соотношение маниан:глюкан увеличивалось (например, при увеличении содержания глины с нуля, 0,5%, 1,0% до 2,0%, соотношение маниан:глюкан возрастало соответственно с 1,01 до 1,2, 1,35 и 1,45). Общее количество белка также увеличивалось с возрастанием количества глины, добавленного в среду для культивирования клеток.

ПРИМЕР 3

Характеристика экстрактов клеточных стенок дрожжей, выделенных с использованием протеазного гидролиза из дрожжей, выращенных/культуривированных в отсутствие и в присутствии глины

Клетки дрожжей обрабатывали протеазами, как описано в Примере 1. Лизаты клеточных стенок дрожжей анализировали с целью выявления характеристик клеточных стенок дрожжей и их способности адсорбировать микотоксины (выраженной в проценте эффективности по сравнению с общим количеством присутствующих микотоксинов) при pH, соответствующем физиологическим условиям, для каждого рассматриваемого микотоксина. Общую адсорбционную активность оценивали кинетически. Испытываемые образцы включали от как минимум 5 до 10 уровней концентрации микотоксина, которые тестировали с различными препаратами клеточных стенок дрожжей с концентрациями от 0,25 до 4 г/л, диспергированными в водной среде с фиксированным значением pH 4, которое соответствует значению pH при пищеварении в желудочно-кишечном тракте животных. Оценку адсорбции проводили с использованием Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с флуорометрическим детектором и детектором на диодной матрице (например, для определения количества микотоксина и адсорбированного/связанного микотоксина).

Данные представлены на Фигуре 4. Экстракт клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной, полученный из клеток дрожжей, выращенных в присутствии глины, показал значительную неожиданную способность к связывать и/или адсорбировать

зеараленон и афлатоксин B1. Например, экстракты клеточной стенки дрожжей, полученные из дрожжей, которые были выращены в присутствии 2,0% глины, показали эффективность 85,89% для зеараленона, в то время как экстракты клеточных стенок дрожжей, полученные из дрожжей, которые были выращены в отсутствие глины, показали степень эффективности адсорбции только 69%. Экстракты клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной, полученные из дрожжей, которые были выращены в присутствии 2,0% глины, показали эффективность 53,7% для афлатоксина B1, в то время как экстракты клеточных стенок дрожжей, полученных из дрожжей, которые были выращены в отсутствие глины, показали степень эффективности адсорбции только 2,65%. Кроме того, дрожжи с встроенной глиной, выращенными/культивированными в присутствии глины, демонстрировали значительные изменения в компонентах/структуре клеточной стенки. Уровень включения продуктов связывания для АФВ1 и ЗЕА составил, соответственно, 0,1 и 0,4% в реакционной среде, в которой поддерживали постоянный pH 4,0. Анализ проводили при круговом перемешивании в течение 90 мин при 37°C, а количество связанного токсина оценивали с помощью ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентным детектором.

Способ, описанный в Примере 1, применяли с дрожжами из альтернативных источников для оценки влияния смектитной глины (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, USA), добавленной в питательную среду в концентрации 1,0%, на состав материала клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной. Исследовали три типа дрожжей, принадлежащих *Saccharomyces cerevisiae*: АСД Fermin (08-032/460-89), пекарские дрожжи от Levapan (Партия №7169281, Levapan S.A., Bogota, Columbia) и активные сухие дрожжи от DCL (партия №1390, DCL Yeast Ltd., Alloa, Great Britain).

Наблюдались следующие вариации состава клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной: 19,9, 17,0 и 10,3% глюкана; 10,6, 10,4 и 8,4% маннана; и 1,5, 1,4, 0,9% хитина (N-ацетилглюкозамина) присутствуют до гидролиза в составе клеточной стенки дрожжей (выраженные по отношению ко всей клетке) для АСД Fermin, Levapan, DCL КСДВГ.

Эффективность связывания у полученных материалов также различалась в зависимости от типа выбранных клеток дрожжей (См. Фиг. 9). Наблюдаемые вариации эффективности были связаны также с типом исследуемого микотоксина.

ПРИМЕР 4

Электронная микроскопия экстрактов клеточной стенки дрожжей, полученных из клеток дрожжей, которые были выращены/культуривированы в отсутствие и в присутствии глины

При разработке вариантов реализации настоящего изобретения проводили эксперименты по выявлению характеристик и наблюдению нескольких образцов дрожжей (См., например, Фигура 2). Образцы готовили путем фильтрации регидратированного раствора дрожжей в 2,5% глютаральдегиде (ГА) в 0,85% растворе NaCl. Раствор затем фильтровали через нейлоновую нуклеопоровую мембрану диаметром 13 мм с размером пор 0,1 мкм, которую предварительно смачивали 0,85% раствором NaCl. После этого фильтр переносили в чашку Петри и покрывали каплями фиксатора ГА/какодилат (Как) при комнатной температуре в течение 90 минут. Затем фильтры промывали 0,1 М раствором NaCac pH 7,2. Вторичную фиксацию проводили путем помещения фильтров в пробирки, содержащие 100 мкл 2% тетраоксида осмия в 0,1 М растворе NaCac pH 7,2 на 60 минут. После этого образцы промывали 0,1 М раствором NaCac pH 7,2 и 3 раза дезионизированной водой. Дегидратацию образца проводили с помощью серии растворов этанола (25% - 100%). Затем образцы высушивали сублимацией, помещали на подложку, изготовленную из углеродной пленки для обеспечения проводимости, и покрывали сплавом Au/P. Наблюдения проводили при 3,0 кэВ на АЭСЭМ S-4300 (Hitachi, Japan). Для удаления любых неспецифичных взаимодействий между дрожжами и глиной каждый образец перед покрытием Au/P продували струей азота под высоким давлением.

ПРИМЕР 5

Полупроизводственное увеличение производства клеточных стенок дрожжей, культуривируемых в присутствии глины

Увеличенная культура дрожжей. Ферментер объемом 150 л (ML-4100, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) использовали для выращивания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (активных сухих дрожжей (АСД) от Fermin, Alltech Inc., Партия №609, Количество дрожжей: $2,38 \times 10^{10}$ клеток/г, Жизнеспособность: 92,6%). Дрожжевой инокулум (затравку) готовили путем добавления 0,84 кг свежих АСД от Fermin в предварительно автоклавированный (121°C в течение 40 минут) баллон объемом 19 литров, оснащенный системой труб, покрытый BioShield, содержащий 7,5 л воды, который после автоклавирования на ночь поместили в инкубатор при 30°C.

50

Подготавливали два “Питательных” баллона объемом 19 л, покрытых BioShield, путем добавления 9 л воды, 6 кг декстрозы и магнитной мешалки. После перемешивания и растворения источника углерода питательную среду автоклавировали (121°C в течение 40 минут). Раствор азота готовили в стерильной колбе с крышкой объемом 1 л, содержащей 250 мл дистиллированной воды, 120 г диаммонийфосфата, с pH, доведенным до 4,0-4,1 при помощи концентрированной HCl. Две стерильные колбы с крышкой объемом 1 л с “Азотным Питанием” готовили путем добавления 700 мл дистиллированной воды, 192 г диаммонийфосфата, с pH, доведенным до 4,0-4,1 с помощью концентрированной HCl. Раствор основания готовили в баллоне объемом 19 л, оснащенном системой труб, покрытом BioShield и содержащем 13,5 л воды и 1,5 л KOH.

Затем трубку присоединяли к перистальтическому насосу. Раствор пеногасителя (Antifoam AES, 1:10) готовили в баллоне объемом 19 л, оснащенном системой труб, покрытым BioShield и содержащем перемешанные 12 л воды и 3 л пеногасителя (Antifoam AES, 3 кг). Затем трубку присоединяли к перистальтическому насосу. Питательная среда для ферментера объемом 150 л состояла из 1,98 кг дрожжевого экстракта, 0,3 кг пептона, 0,12 кг декстрозы, 0,12 кг основы азотного агара для дрожжей, 0,516 г смектитовой глины (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, USA) и 60 л воды, среду выдерживали при температуре 121°C при давлении 15 фунт/дюйм² с перемешиванием в течение 1 ч. Среду охлаждали до 30°C и поддерживали эту температуру на протяжении всего времени выращивания культуры.

Выращивание культуры осуществляли в ферментере объемом 150 л, при температуре 30 °C, с умеренным перемешиванием (70% мощности) и аэрированием (давление 5 фунт/дюйм²) до инокуляции и в течение всего периода культивирования. Инокуллюм, состоящий из 0,84 кг АСД и 7,5 л воды, размешивали в течение 20-30 мин. перед добавлением в ферментер объемом 150 л. По одной колбе с “Азотным Питанием” вносили в каждый “Питательный” баллон при постоянном перемешивании. Азотный раствор закачивали в ферментер объемом 150 л и оставляли для перемешивания как минимум на 10 минут перед инокуляцией. К системе присоединяли баллон с пеногасителем и по необходимости по трубкам подавали пеногаситель в ферментер объемом 150 л. Ферментер был оснащен датчиком пены для мониторинга пенообразования и обеспечения правильного поступления пеногасителя. Раствор основания присоединяли к системе и по необходимости подавали по трубкам в ферментер объемом 150 л. Проводили мониторинг изменения pH в среде ферментера объемом 150 л

50

и поддерживали на уровне минимум 5,0 в течение всего роста. Инокуляцию осуществляли путем присоединения баллона с инокулумом к системе и закачивания содержимого в ферментер объемом 150 л. Перед первым отбором проб перемешивание инокулума в 5 ферментере осуществляли на протяжении как минимум 20-30 минут. Мониторинг пенообразования осуществляли во время выращивания культуры с почасовым корректированием условий аэрации и перемешивания. Мониторинг рН осуществляли 10 внутренним и внешним способом и проводили корректировку по мере необходимости для поддержания рН 5,0 или выше. Уровень глюкозы измеряли в ходе культивирования с помощью диабетических тест-полосок (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) и вносили дополнительные порции глюкозы при падении содержания 15 глюкозы ниже 0,8 мг/мл путем медленной закачки "Питательного" раствора или постепенного увеличения скорости поступления. Если уровень сахара поднимался выше 0,8 мг/мл, уровень поступления снижали или полностью останавливали в зависимости от 20 необходимости.

Сбор культуры дрожжей осуществляли, когда весь сахар был потреблен. Содержимое ферментера объемом 150 л собирали в стерильные колбы и 25 центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли и измеряли процент сухой массы промытых дрожжей. Материал переносили обратно в ферментер объемом 150 л и добавляли воду для снижения концентрации сухого вещества в суспензии с 9-11% до 13-15%. Перемешивание продолжали все это время.

30 *Экстракция клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной с помощью ферментативного гидролиза.* Суспензию дрожжей с содержанием сухого вещества 13-15% перемешивали при 60°C. Перед введением фермента в количестве 0,3 мл/л, доводили 35 рН до значения 8,0 при помощи 10% NaOH. Температуру и условия перемешивания поддерживали в течение 8 часов. Мониторинг и корректировку рН проводили каждые 15 минут в течение первых двух часов (используя 10% NaOH), а затем мониторинг и корректировку рН проводили каждый час в течение следующих шести часов. Суспензию 40 переносили в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок промывали трехкратным объемом холодной стерильной воды, а затем снова центрифугировали при 4000 g в течение 20 45 минут. Этап промывки повторяли два раза перед заморозкой, сублимационной сушкой и измельчением осадка. Увеличение температуры в ходе фазы распылительной сушки

50

приводило к небольшому увеличению выходного продукта и меньшему накоплению продукта в распылительной сушилке.

Включение материала глины может сопровождаться изменениями в концентрации 5 пепла образца, которая может достигать приблизительно 20% для клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной по сравнению с 5% концентрацией в экстракте клеточной стенки дрожжей, который не содержит каких-либо материалов глины (См. Фиг.6). Была 10 выявлена значимая разница в составах клеточной линии дрожжей АСД Fermin, ранее полученной в фернентах Bioflow, по сравнению с полученной в ферментере объемом 150 л, заключающаяся в уменьшении состава глюкана и маннана при крупномасштабном производстве, а также в увеличении содержания хитина в клеточной стенке дрожжей (с 15 1,5% до 3%), объясняемая ответами клеточной стенки дрожжей на возмущающие агенты и затрагивающая сигнальные пути клеточной стенки.

Проводили оценку эффективности связывания микотоксинов продуктами КСДВГ, 20 полученными в полупромышленных масштабах (См. например, Фигуру 7), результаты которой подтвердили увеличение способности КСДВГ адсорбировать микотоксины.

25 ПРИМЕР 6

Производство клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной при использовании промышленных источников сахара

Культура дрожжей. *Saccharomyces cerevisiae* (активные сухие дрожжи (АСД) от 30 Fermin, Alltech Inc., Количество дрожжей: $2,38 \times 10^{10}$ клеток/г, Жизнеспособность: 92,6%) выращивали в ферментере Bioflow (BioFlow III, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, 35 New Jersey, U.S.A.). Дрожжевой инокулум готовили путем добавления 29 г свежих АСД от Fermin в предварительно нагретую колбу, содержащую 87 мл стерильной дисионизированной воды. Далее раствор инкубировали при 30°C (в водяной бане) в течение 20 минут и несколько раз перемешивали круговым вращением. Среда для BioFlow 40 состояла из 0,048 г гипохлорита кальция, 0,24 г сульфата магния, 0,168 г сульфата цинка, 0,24 г хлорида магния, 2,4 г (2,5 мл готового к потреблению) сусла тростникового сахара, 7,5 г смектитовой глины (0,5% в конечной среде, (American Colloid Company, Arlighton Height, IL, USA)) и 1440 мл десионизированной воды. Сусло тростникового сахара 45 представляло собой раствор мелассы в воде с общим содержанием восстановливающих сахаров (ОСВС) 30%. Для приготовления сусла использовали 669 г мелассы (62,8% ОСВС)

50

и 731 мл дейонизированной воды. Для приготовления источника азота использовали 54,5 г мочевины и 163,5 мл дейонизированной воды.

Среду в реакторе Bioflow нагревали до 30°C и в течение 10 минут перед инокуляцией вводили в реактор воздух со скоростью 1 л/мин. Интенсивность перемешивания устанавливали на уровне 300 об/мин и проводили мониторинг среды, поддерживая значение pH на уровне минимум 5,0 на протяжении всего периода роста, используя 85% фосфорную кислоту. Добавляли пеногаситель (Antifoam AES, 1:10, по необходимости). Предварительно разведенные дрожжи вводили в ферментер. С помощью диабетических тест-полосок (OneTouch, UltraMini, LifeScan, Inc., Milpitas, California, U.S.A.) определяли уровень глюкозы и добавляли дополнительные порции (из сусла тростникового сахара), когда содержание глюкозы падало ниже 0,8 мг/мл. Интенсивность перемешивания последовательно увеличивали до 500 об/мин в течение двух часов инкубации, как и поступление воздуха (до 4 л/мин в течение 3 часов). Итоговая концентрация глины в биореакторе в конечной среде составляла 0,5%.

Количество мелассы, которую вводили в ферментер, зависело от эффективности потребления сахара дрожжами и составляло от 400 до 600 г. Избыток вводимой мелассы приводил к ситуации, когда было невозможно накопление биомассы дрожжей в ходе культивации. Сбор культуры дрожжей проводили, когда не наблюдался её дальнейший рост. Содержимое BioFlow переносили в стерильные колбы и центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок промывали 0,125% раствором NaCl в H₂O. При использовании мелассы для выращивания дрожжей не наблюдали разделения на фракции. Затем дрожжи три раза промывали 0,125% раствором NaCl.

Способ экстракции клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной. Дрожжевой осадок ресуспендировали в стерильной дейонизированной воде до концентрации от 13 до 15% сухого вещества. Суспензию дрожжей перемешивали при 60°C. Перед добавлением фермента (0,3 мл/л) pH доводили до 8,0 при помощи 10% NaOH. Перемешивание при указанной температуре продолжали в течение 8 часов. В течение первых двух часов проводили измерение значения и корректировку pH каждые 15 минут (с использованием 10% NaOH), а затем в течение следующих шести часов проводили измерение значения и корректировку pH каждый час. Суспензию переносили в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали при 4000 g в течение 20 минут. Супернатант удаляли, а осадок промывали тройным объемом холодной стерильной воды и снова

центрифugировали при 4000 g в течение 20 минут. Этап промывки повторяли 2 раза перед заморзкой, сублимационной сушкой и измельчением осадка.

Эффективность связывания у полученных материалов демонстрировала различия, связанные с источником углерода, используемым для выращивания дрожжей (см Фиг. 8). Наблюдаемые различия в эффективности были также с типом исследуемых микотоксинов. Состав полученных материалов также отличался от состава материалов, полученных ранее с использованием декстрозы в качестве единственного источника углерода. Были обнаружены присутствующие в клеточных стенках дрожжей уровни 13,4% глюкана; 17,8% маннана; и 2,7% хитина (N-ацетилглюкозамина) (выраженные по отношению ко всей клетке).

ПРИМЕР 7

Эффективность по отношению к Микотоксикозам *Fusarium* *in vivo*

Однодневных птенцов Гибридных индеек (Hybrid Turkeys, Kitchener, ON, Canada) индивидуально взвешивали, помечали крыловыми кольцами и случайным образом распределяли по группам на Птицеводческой Научно-Исследовательской Станции Arkell Университета Guelph. Птенцов случайнym образом помещали на каждую из 5 диет. Птенцов первоначально содержали в 32°C и последовательно снижали температуру на 3°C в неделю до достижения температуры 21°C к концу 4 нед. Эту температуру поддерживали на протяжении эксперимента. Птенцов индеек помещали на начальную (0-3 нед.) и ростовую (4-6 нед.) диеты на основе кукурузы, пшеницы и соевой муки, включавшие контрольное зерно, контрольное зерно + 0,2% клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной, загрязненное зерно и загрязненное зерно + 0,2% клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной. Контрольная диета была составлена с тем, чтобы удовлетворить или превысить минимальные питательные требования индеек, согласно ННИС (1994). Диеты, загрязненные микотоксинами, были составлены путем замены соответственно 25 и 10%, а также 26 и 5% контрольной кукурузы и пшеницы на кукурузу и пшеницу, загрязненную естественным путем микотоксинами *Fusarium*, на время начальной и ростовой фаз. Степени замещения контрольного зерна на загрязненное зерно были вычислены с тем, чтобы достигнуть уровня заражения микотоксинами около 4 мг ДОН/кг диеты во время начальной и ростовой фаз. Диеты с добавлением полимерного глюкоманнанового адсорбента составляли путем замены контрольной кукурузы в диетах на 0,2% клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной (КСДВГ). Пища и вода были предоставлены *ad*

libitum. Характерные образцы корма отбирали в начале каждой фазы для приближенного анализа и анализа микотоксинов. Диетическое содержание белка, сухого вещества и пепла определяли согласно нормам Ассоциации химиков-аналитиков, состоящих на государственной службе (1980). Составы диет и содержание питательных веществ представлены в Таблице 1. Экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по Уходу за Животными Университета Guelph в соответствии с руководством Канадского Совета по Уходу за Животными.

Таблица 1. Состав экспериментальных диет (%).

Компоненты	Начальная диета (0-3 нед.)			
	Контроль	Контроль + КСДВГ	+ Загрязненная	Загрязненная + КСДВГ
Кукуруза	36,00	35,80	11,02	10,82
Загрязненная кукуруза			24,98	24,98
Пшеница	10,00	10,00		
Загрязненная пшеница	0,00	0,00	10,00	10,00
Соевая мука	45,00	45,00	45,00	45,00
Дигидрофосфат кальция	2,30	2,30	2,30	2,30
Карбонат кальция	1,84	1,84	1,84	1,84
Жир/Сало	3,00	3,00	3,00	3,00
Соль	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-метионин	0,22	0,22	0,22	0,22
HCl-лизин	0,15	0,15	0,15	0,15
Витаминно- минеральный премикс ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Антиоксидиальное средство ²	0,10	0,10	0,10	0,10
КСДВГ ³		0,20		0,20
<u>Вычисленные значения</u>				
МЭ, ккал/кг		2800		
Сырой Белок		26,50		
Лизин		1,60		
Метионин		0,62		
Кальций		1,20		
Доступный фосфор		0,60		
<u>Анализируемые значения</u>				
Сырой белок	26,41	24,97	27,75	26,70
СВ	88,70	89,03	88,99	89,14
Зола	8,10	6,97	7,12	7,00

Компоненты	Ростовая диета (4-6 нед.)			
	Контроль	Контроль КСДВГ	+	Загрязненная + КСДВГ
5 Кукуруза	42,68	42,48	16,86	16,66
Загрязненная кукуруза			25,82	25,82
Пшеница	5,00	5,00		
Загрязненная пшеница			5,00	5,00
Соевая мука	42,00	42,00	42,00	42,00
Дигидрофосфат	2,20	2,20	2,20	2,20
10 кальция				
Карбонат кальция	1,40	1,40	1,40	1,40
Жир/Сало	5,00	5,00	5,00	5,00
Соль	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-метионин	0,16	0,16	0,16	0,16
15 HCl-лизин	0,06	0,06	0,06	0,06
Витаминно-	1,00	1,00	1,00	1,00
минеральный премикс ¹				
Антиоккцидиальное	0,10	0,10	0,10	0,10
средство ²				
20 КСДВГ ³		0,20		0,20
<u>Вычисленные</u>				
<u>значения</u>				
25 МЭ, ккал/кг			3050	
Сырой Белок			23	
Лизин			1,36	
Метионин			0,5	
Кальций			1,1	
Доступный фосфор			0,52	
<u>Анализируемые</u>				
<u>значения</u>				
30 Сырой белок	23,31	24,29	24,27	27,70
СВ	89,30	88,99	88,54	88,38
Зола	6,33	6,39	6,73	6,75

35 ¹ Витаминно-минеральная смесь на килограмм рациона: витамин А (полностью-транс-ретинилпальмитат), 8800 МЕ; холекальциферол, 3300 МЕ; витамин Е (полностью-рац- α -токоферилацетат), 40 МЕ; менадион, 3,3 мг; тиамин, 4,0 мг; рибофлавин, 8,0 мг; пантотеновая кислота, 15,0 мг; ниацин, 50 мг; пиридоксин, 3,3 мг; холин, 600 мг; фолисовая кислота, 1,0 мг; биотин, 220 мкг; витамин В₁₂, 12 мкг; этоксихин, 120 мг; марганец, 70 мг; цинк, 70 мг; железо, 60 мг; медь, 10 мг; иод, 1,0 мг; селен, 0,3 мг.

40 ² Монензин патрия, 10%.

45 ³ Клеточная стенка дрожжей с встроенной глиной.

Концентрации ДОН, 15-ацетил-ДОН, ЗЕН, фумонизина и охратоксина А в рационе представлены в Таблице 2. Концентрации других микотоксинов находились за пределами чувствительности метода, которые составляли 0,12 мг/кг для ниваленола, 0,05 мг/кг для 3-ацетил-ДОН, 0,07 мг/кг для неосоланиола, 0,06 для диацетоксисцирпенола и токсина Т-2 и 0,04 мг/кг для токсина НТ-2, и 0,001 мг/кг для афлатоксинов. Пределы чувствительности для ДОН, 15-ацетил-ДОН, ЗЕН, фумонизина и охратоксина А составляли соответственно 0,06, 0,05, 0,025, 0,05 и 0,0003 мг/кг.

Таблица 2. Концентрации микотоксина (мкг/г) в экспериментальных диетах.

Диета	Микотоксин ¹				
	Дезоксии валенол	15-ацетил- дезоксиви- аленол	Зеараленон	Фумонизи- н	Охратокси- н
Начальная (0-3 нед.)					
Контроль	0,44	0,055	<0,025	НПЧ ⁴	0,46
Контроль + КСДВГ ²	0,53	0,087	<0,025	НПЧ	0,79
Загрязненная	3,3	0,17	0,35	56	НПЧ
Загрязненная + КСДВГ	4,1	0,17	0,47	НПЧ	НПЧ
Ростовая (4-6 нед.)					
Контроль	0,44	0,12	НПЧ	НПЧ	0,62
Контроль + КСДВГ	0,37	0,12	НПЧ	НПЧ	0,71
Загрязненная	3,7	0,29	0,34	61	1,0
Загрязненная + КСДВГ	3,2	0,28	0,27	63	0,35

¹ Другие микотоксины, включая диацетоксисцирпенол, токсин Т-2, ниваленол, 3-ацетил-ДОН, неосоланиол, токсин НТ-2 и афлатоксины, также измеряли в экспериментальных диетах, но они не были обнаружены.

² Клеточная стенка дрожжей с встроенной глиной.

⁴ Ниже предела чувствительности.

Введение загрязненного зерна с пищей не оказывало существенного влияния на прибавление веса тела, потребление пищи и эффективность использования пищи к концу начальной фазы (Таблица 3). Помещение на загрязненную диету значительно увеличивало прибавление веса тела и улучшало эффективность питания по сравнению с контролем в конце ростовой фазы. Эффект диеты на потребление пищи во время ростовой фазы отсутствовал (Таблица 3). К концу ростовой фазы, добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной к загрязненным диетам увеличивало прибавление веса тела, потребление пищи и улучшало эффективность использования пищи по сравнению с контролем. Прибавление веса тела и эффективность питания в течение экспериментального периода длиной в 6 нед. были значительно выше у птиц, помещенных на загрязненные диеты и загрязненные диеты с добавлением клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной.

Таблица 3. Эффект микотоксинов *Fusarium* в диете на продуктивность индейки¹

Диста	0-3 нед.	4-6 нед.	0-6 нед.
Прибавление веса тела (г/птица)			
Конт ²	474,50	1420,81	1895,32
Конт + КСДВГ ³	501,45	1461,74	1963,19
МИКО ⁴	511,93	1572,97	2084,90
МИКО + КСДВГ	502,00	1627,63	2129,64
СОС	15,35	29,48	37,59
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ ⁶	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	0,0023	0,002
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	0,0002	0,0004
МИКО по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ	НЗ
Потребление пищи (г/птица/день)			
Конт	32,44	117,85	75,14
Конт + КСДВГ	33,54	116,87	75,20
МИКО	33,75	119,86	76,81
МИКО + КСДВГ	33,87	124,40	79,13
СОС	0,91	2,21	1,40
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	0,05	НЗ
МИКО по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ	НЗ
Эффективность питания (прибавление веса тела/потребление пищи)			
Конт	0,69	0,57	0,60
Конт + КСДВГ	0,71	0,59	0,62
МИКО	0,71	0,61	0,63
МИКО + КСДВГ	0,71	0,62	0,64
СОС	0,01	0,008	0,008
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	0,0027	0,004
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	0,0007	0,001
МИКО по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ	НЗ

¹ Значения представляют собой наименьшие среднеквадратичные ошибки; n=4 загона для прибавления веса тела, потребления пищи и эффективности питания (7-8 птиц/загон/фаза).

² Контроль;

³ Новый полимерный глюкоманнановый адсорбент микотоксина;

⁴ Загрязненная диета;

⁵ Старый полимерный глюкоманнановый адсорбент микотоксина; ⁶ Р > 0,05

Введение загрязненного зерна с пищей увеличивало ($P < 0,05$) количество эозинофилов на 6 нед. (Таблица 4). Добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной к загрязненным диетам предотвращало этот эффект. Добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной к контрольной диете значительно увеличивало гематокрит по сравнению с контролем без добавления клеточной стенки. На 3 нед. у птиц, помещенных на загрязненную диету, по сравнению с контролем наблюдалось значительное снижение концентрации глюкозы и активности γ -глутамилтрансферазы (Таблица 5). Добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной предотвращало этот эффект. Добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной к загрязненным диетам значительно увеличивало концентрации мочевой кислоты по сравнению с контролем на 3 и 6 нед. На 3 нед. у птиц, помещенных на загрязненную диету + клеточная стенка дрожжей встроенной глиной, наблюдалось существенное снижение активности лактатдегидрогеназы по сравнению с контролем.

Таблица 4. Гематологический эффект микотоксинов *Fusarium* в диете¹

Диета	3 нед.	6 нед.
Гемоглобин (г/л)		
Конт ²	93,50	105,88
Конт + КСДВГ ³	98,12	107,88
МИКО ⁴	93,50	109,75
МИКО + КСДВГ	95,87	106,38
СОС	2,27	1,80
Конт поср. с Конт + Новый ГАМ	H3 ⁶	H3
Конт поср. с МИКО	H3	H3
Конт поср. с МИКО + Новый ГАМ	H3	H3
Конт поср. с МИКО + Старый ГАМ	H3	H3
Гематокрит (л/л)		
Конт	0,30	0,31
Конт + Новый ГАМ	0,32	0,31
МИКО	0,30	0,32
МИКО + Новый ГАМ	0,30	0,32
МИКО + Старый ГАМ	0,31	0,31
СОС	0,005	0,007
Конт поср. с Конт + Новый ГАМ	0,05	H3
Конт поср. с МИКО	H3	H3
Конт поср. с МИКО + Новый ГАМ	H3	H3
СКГЭ (г/л)		
Конт	302,80	335,38
Конт + Новый ГАМ	300,88	345,25
МИКО	303,13	336,13
МИКО + Новый ГАМ	310,88	331,63
МИКО + Старый ГАМ	301,00	335,63
СОС	5,44	5,52
Конт поср. с Конт + Новый ГАМ	H3	H3
Конт поср. с МИКО	H3	H3
Конт поср. с МИКО + Новый ГАМ	H3	H3
Конт поср. с МИКО + Старый ГАМ	H3	H3

Диета	3 нед.	6 нед.
	БКК ($10^9/\text{л}$)	
Конт	15,37	16,75
Конт + КСДВГ	18,71	16,75
МИКО	17,96	16,07
МИКО + КСДВГ	18,93	19,96
СОС	1,93	2,26
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ
	Гетерофилы ($10^9/\text{л}$)	
Конт	6,20	9,37
Конт + КСДВГ	8,36	9,19
МИКО	7,98	8,71
МИКО + КСДВГ	7,86	10,36
СОС	0,93	1,26
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ
	Лимфоциты ($10^9/\text{л}$)	
Конт	7,37	5,54
Конт + КСДВГ	8,00	5,61
МИКО	8,60	5,48
МИКО + КСДВГ	8,92	8,54
СОС	1,22	1,29
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
Моноциты ($10^9/\text{л}$)		
Конт	0,71	0,52
Конт + КСДВГ	1,30	0,65
МИКО	0,56	0,75
МИКО + КСДВГ	0,93	0,25
СОС	0,29	0,22
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ
Эозинофилы ($10^9/\text{л}$)		
Конт	0,27	0,15
Конт + КСДВГ	0,38	0,34
МИКО	0,34	0,38
МИКО + КСДВГ	0,33	0,06
СОС	0,11	0,079
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	0,04
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ
Базофилы ($10^9/\text{л}$)		
Конт	0,79	0,61
Конт + КСДВГ	0,65	0,89
МИКО	0,47	0,74
МИКО + КСДВГ	0,87	0,71
СОС	0,19	0,18
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ

³⁰ ¹ Значения представляют собой наименьшие среднеквадратичные ошибки; для каждой диеты и фазы $n = 4$ загона и 2 птицы на загон.

² Контроль; ³ Клеточная стенка дрожжей с встроенной глиной; ⁴ Загрязненная диета; ⁶ $P > 0,05$.

⁴⁰

⁴⁵

⁵⁰

Таблица 5. Эффект микотоксинов *Fusarium* в диете на химический состав плазмы¹

Диета	3 нед.	6 нед.
	Кальций (ммоль/л)	
5 Конт ²	3,05	2,94
Конт + КСДВГ ³	3,15	2,97
МИКО ⁴	3,05	3,03
МИКО + КСДВГ	3,13	3,14
СОС	0,04	0,04
10 Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3 ⁶	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	0,002
	Фосфор (ммоль/л)	
15 Конт	2,57	2,46
Конт + КСДВГ	2,59	2,44
МИКО	2,67	2,47
МИКО + КСДВГ	2,64	2,64
СОС	0,08	0,06
20 Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	0,05
	Общий белок (г/л)	
25 Конт	29,12	31,25
Конт + КСДВГ	30,12	31,12
МИКО	29,62	32,62
МИКО + КСДВГ	29,75	34,25
СОС	0,52	0,68
30 Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	0,003

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
	Альбумин (г/л)	
Конт	8,37	8,37
Конт + КСДВГ	8,12	8,62
МИКО	8,25	8,50
МИКО + КСДВГ	8,75	9,00
СОС	0,29	0,25
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3
	Глобулин (г/л)	
Конт	20,75	22,87
Конт + КСДВГ	22,00	22,50
МИКО	21,37	24,12
МИКО + КСДВГ	21,00	25,25
СОС	0,55	0,57
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	0,006
	Соотношение Альбумин:Глобулин	
Конт	0,40	0,36
Конт + КСДВГ	0,37	0,38
МИКО	0,38	0,35
МИКО + КСДВГ	0,42	0,35
СОС	0,01	0,01
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
	Глюкоза (ммоль/л)	
Конт	18,35	17,82
Конт + КСДВГ	18,13	17,45
МИКО	17,31	17,52
МИКО + КСДВГ	17,63	17,23
СОС	0,37	0,34
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	0,05	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ
	Холестерин (ммоль/л)	
Конт	4,12	4,17
Конт + КСДВГ	3,99	4,23
МИКО	4,10	4,04
МИКО + КСДВГ	4,03	3,73
СОС	0,12	0,13
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	0,02
	Общий Билирубин (мкмоль/л)	
Конт	5,37	2,37
Конт + КСДВГ	5,87	2,37
МИКО	4,87	2,12
МИКО + КСДВГ	5,12	2,62
СОС	0,70	0,38
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
	γ-глутамилтрансфераза (ед./л)	
Конт	1,75	1,75
Конт + КСДВГ	2,00	1,50
МИКО	0,75	1,87
МИКО + КСДВГ	0,87	1,00
СОС	0,33	0,18
Конт поср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт поср. с МИКО	0,04	H3
Конт поср. с МИКО + КСДВГ	H3	0,008
	Аспартатамиотрансфераза (ед./л)	
Конт	211,38	212,63
Конт + КСДВГ	226,25	207,75
МИКО	226,75	211,63
МИКО + КСДВГ	205,00	203,75
СОС	8,15	6,42
Конт поср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт поср. с МИКО	H3	H3
Конт поср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3
	Креатинкиназа (ед./л)	
Конт	1352,63	1047,13
Конт + КСДВГ	1309,38	907,63
МИКО	1649,25	953,38
МИКО + КСДВГ	1147,00	1086,63
СОС	173,46	145,41
Конт поср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт поср. с МИКО	H3	H3
Конт поср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
Амилаза (ед./л)		
Конт	809,63	877,38
Конт + КСДВГ	821,63	764,88
МИКО	872,50	913,25
МИКО + КСДВГ	891,38	902,88
СОС	57,27	54,54
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3
Липаза (ед./л)		
Конт	5,37	2,87
Конт + КСДВГ	4,37	4,50
МИКО	4,75	3,62
МИКО + КСДВГ	5,87	4,25
СОС	0,94	0,72
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	H3	H3
Мочевая кислота (ед./л)		
Конт	247,75	167,13
Конт + КСДВГ	221,50	144,38
МИКО	292,50	164,75
МИКО + КСДВГ	334,50	279,00
СОС	28,23	24,77
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	H3	H3
Конт по ср. с МИКО	H3	H3
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	0,03	0,003

30

35

40

45

50

Диета	3 нед.	6 нед.
	Лактатдегидрогеназа (ед./л)	
Конт	664,88	531,00
Конт + КСДВГ	661,75	542,13
МИКО	646,63	469,25
МИКО + КСДВГ	566,13	497,63
СОС	30,24	20,84
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	0,04
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	0,02	НЗ
	Глутаматдегидрогеназа (ед./л)	
Конт	4,62	2,87
Конт + КСДВГ	3,25	2,62
МИКО	4,25	2,37
МИКО + КСДВГ	3,50	2,50
СОС	0,70	0,36
Конт по ср. с Конт + КСДВГ	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО	НЗ	НЗ
Конт по ср. с МИКО + КСДВГ	НЗ	НЗ

¹ Значения представляют собой наименьшие среднеквадратичные ошибки; для каждой диеты и фазы $n = 4$ загона и 2 птицы на загон.

² Контроль; ³ Клеточная стенка дрожжей с встроенной глиной; ⁴ Загрязненная диета; ⁶ $P > 0,05$.

³⁰

³⁵

⁴⁰

⁴⁵

⁵⁰

Введение загрязненного зерна с пищей значительно снижало активность лактатдегидрогеназы по сравнению с контролем на 6 нед. (Таблица 5). Добавление клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной предотвращало этот эффект. На 6 нед. у птиц, помещенных на загрязненную диету с добавлением клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной, по сравнению с контролем наблюдалось значительное повышение концентраций кальция и фосфора. Эта же диета также значительно снижала активность γ -глутамилтрансферазы по сравнению с контролем на 6 нед. При добавлении клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной к загрязненной диете у птиц наблюдалось существенное повышение концентраций общего белка и глобулина и снижение уровня холестерина.

Введение зерна, загрязненного естественным путем микотоксинами *Fusarium*, с пищей индейкам приводило к горяческому ответу в отношении прибавления веса тела и эффективности питания. Попавшие с пищей микотоксины *Fusarium* оказывали некоторые эффекты на параметры крови, включая повышение количества эозинофилов и понижение активности лактатдегидрогеназы на 6 нед., а также снижение концентрации глюкозы и активности гамма-глутамилтрансферазы на 3 нед. по сравнению с контролями. Введение с пищей клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной предотвращало все эти эффекты. Введение с пищей клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной приводило к количественным повышениям ($P>0,05$) роста по сравнению с дистами, содержащими загрязненное зерно без добавок.

Все публикации и патенты, упомянутые в приведенном выше описании, включены в настоящую заявку посредством ссылок. Специалистам в данной области техники будут очевидны различные изменения и дополнения описанных в настоящем изобретении композиций и способов, не выходящие за пределы сущности и объема настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами реализации, следует понимать, что настоящее изобретение в соответствии с формулой изобретения не должно излишне ограничиваться этими конкретными вариантами реализации. Действительно, в объем настоящего изобретения входят различные модификации описанных способов реализации изобретения, которые очевидны специалистам в соответствующих областях техники.

Формула изобретения

1. Клетка дрожжей, включающая клеточную стенку дрожжей, содержащую по меньшей мере 0,5% глины или глиносодержащего компонента, встроенных в указанную клеточную стенку дрожжей, для снижения или устранения отрицательных эффектов микотоксинов.

2. Клетка дрожжей по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка дрожжей выращена в среде для культивирования клеток, содержащей глину.

3. Клетка дрожжей по п.2, отличающаяся тем, что указанная глина представляет собой минеральную глину или синтетическую глину, принадлежащую к силикатной группе.

4. Клетка дрожжей по п.3, отличающаяся тем, что указанная глина выбрана из группы, состоящей из цеолита, бентонита, алюмосиликата, монтмориллонита, смектита, каолинита, органоглины и их смесей.

10 5. Клетка дрожжей по п.4, отличающаяся тем, что указанная глина представляет собой алюмосиликатную глину.

6. Клетка дрожжей по п.2, отличающаяся тем, что количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет приблизительно от 0,125 до 4,0%.

15 7. Клетка дрожжей по п.6, отличающаяся тем, что количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет приблизительно от 0,5 до 2,0%.

8. Клетка дрожжей по п.1, отличающаяся тем, что указанные дрожжи выбраны из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* и их комбинаций.

20 9. Клетка дрожжей по п.8, отличающаяся тем, что указанные дрожжи представляют собой *Saccharomyces cerevisiae*.

10 25 Композиция для снижения биодоступности микотоксинов, содержащая экстракт клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, причем указанный экстракт клеточной стенки дрожжей содержит по меньшей мере 0,5% глины или глиносодержащего компонента.

11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом получен из клеток дрожжей, выращенных в питательной среде, содержащей глину.

30 12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что для приготовления указанного экстракта клеточной стенки дрожжей используют стеклянные шарики и битер для шариков.

13. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что для приготовления указанного экстракта клеточной стенки дрожжей используют ферментативную обработку.

35 14. Композиция по п.10, в которой экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом введен в корм.

40 15. Композиция по п.14, отличающаяся тем, что указанный корм выбран из группы, состоящей из полного смешанного рациона (ПСР), фураж, кормовых гранул, концентрата, премикса, побочного продукта, зерна, барды, патоки, волокна, кормовых растений, травы, сена, косточек, листьев, муки, растворимых веществ и кормовых добавок.

45 16. Композиция по п.10, в которой экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом введен в органический материал.

17. Композиция по п.10, в которой экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом введен в жидкость.

18. Композиция по п.10, предназначенная для фильтрации жидкости.

50 19. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что указанная жидкость представляет собой сок, воду, пиво или вино.

20. Композиция по п.10, приготовленная для введения с пищей любому члену царства животных.

21. Композиция по п.20, отличающаяся тем, что указанный член выбран из группы, состоящей из видов птиц, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, овец и коз, рыб, моллюсков, верблюдовых, кошачьих, собачьих и грызунов.

5 22. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом связывает один или несколько микотоксинов.

10 23. Композиция по п.22, отличающаяся тем, что указанный микотоксин выбран из группы, состоящей из афлатоксинов и зеараленона, трихотецинов, фумонизинов и охратоксинов.

15 24. Композиция по п.22, отличающаяся тем, что указанный микотоксин выбран из группы, состоящей из ацетоксисцирпендиола, ацетилдезоксииваленола, ацетилниваленола, ацетилнеосоланиола, ацетил Т-2 токсина, охватывает все афлатоксины, афлатокеин В1, В2, G1 и G2, афлатрем, альтенуевую кислоту, альтернариол, аустдиол, аустамид, аустоцистин, авепацеин +1, боверицин +2, бентенолид, бревианамид, бутенолид, калоиектрин, хетоглобозин, цитринин, цитреовиридин, кохлиодинол, цитохалазин Е, циклопиазоновую кислоту, деацетилкалонектрин, деацетилнеосоланиол, диацетат дезоксииваленола, моноацетат дезоксииваленола, диацетоксисцирпенол, деструксин В, энниатины, распространяется на все токсины спорыньи и эндофитов, фруктигенин+1, фумагиллин, фумонизины, фумонизины В1 и В2 и В3, фузаренок-Х, фузарохроманон, фузаровую кислоту, фузарин, глиотоксин, токсин НТ-2, ипомеанин, исландитоксин, латеритин +1, ликомаразмин+1, малформин, мальторизин, монилиформин, 25monoацетоксисцирпенол, неосолапиол, ниваленол, токсин NT-1, токсин NT-2, распространяется на все охратоксины, ооспореин, щавелевую кислоту, патулин, пенициллиновую кислоту, пенитрем, роридин Е, рубратоксин, руброскирин, рубросульфин, ругулозин, самбуцинин+1, сатратоксины F, G, H, сцирпентриол, 30слафрамин, стеригматоцистин, токсин T-1, токсин T-2, триацетоксисцирпендиол, распространяется на все трихотецины, триходермии, трихотецин, триховеррины, триховерролы, триптокивален, веррукарин, веррукулоген, виопурпурин, виомеллеин, виридитоксин, ксантоциллин, яваницин+1, зеараленолы и зеараленон.

35 25. Корм для животных для снижения биодоступности микотоксинов, содержащий экстракт клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, причем указанный экстракт клеточной стенки дрожжей содержит по меньшей мере 0,5% глины или глиносодержащего компонента и при этом указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим 40компонентом присутствует в количестве, эффективном для связывания микотоксинов.

45 26. Корм для животных по п.25, отличающийся тем, что указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом присутствует в количестве приблизительно от 0,0125 до 10% по весу корма.

50 27. Корм для животных по п.25, отличающийся тем, что указанный экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом присутствует в количестве приблизительно от 0,0125 до 4,0% по весу корма.

28. Способ снижения биодоступности микотоксинов для животного или человека, включающий:

а) обеспечение:

1) композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, причем указанный экстракт клеточной стенки дрожжей содержит по меньшей мере 0,5% глины или глиносодержащего компонента; и

5 ii) материала, потребляемого животным или человеком;

б) введение в указанный материал указанного экстракта клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом с получением материала, который содержит экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной

10 глиной или глиносодержащим компонентом; и

в) предоставление возможности потребления указанным животным или человеком указанного материала, содержащего экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом.

15 29. Способ по п.28, отличающийся тем, что указанный материал представляет собой корм.

30 30. Способ по п.29, отличающийся тем, что в указанный корм добавляют приблизительно от 0,0125 до 0,4% по весу указанной композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом.

20 31. Способ по п.28, отличающийся тем, что указанный материал представляет собой подстилку.

25 32. Способ по п.31, отличающийся тем, что в указанную подстилку добавляют приблизительно от 0,0125 до 99,0% по весу указанной композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом.

33. Способ по п.28, отличающийся тем, что указанный материал представляет собой жидкость.

30 34. Способ по п.33, отличающийся тем, что в указанную жидкость добавляют приблизительно от 0,0125 до 99,0% по весу указанной композиции, содержащей экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом.

35 35. Способ по п.28, отличающийся тем, что указанное животное выбрано из группы состоящей из видов птиц, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, овец и коз, рыб, моллюсков, верблюдовых, кошачьих, собачьих и грызунов.

40 36. Способ по п.28, отличающийся тем, что указанная композиция, содержащая экстракт клеточной стенки дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, связывает один или несколько типов микотоксинов.

37. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанные микотоксины выбраны из группы, состоящей из афлатоксинов, зеараленона, трихотецинов, фумонизинов, охратоксинов и их комбинаций.

45 38. Способ по п.28, также включающий введение дополнительного агента в указанный материал, содержащий введенный в него экстракт клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом, причем указанный агент выбран из группы, состоящей из эстеразы, эпоксидазы, дрожжевого и бактериальною штамма.

50 39. Способ получения экстракта клеточной стенки дрожжей со встроенной глиной или глиносодержащим компонентом для снижения биодоступности микотоксина в промышленном масштабе, причем указанный экстракт клеточной стенки дрожжей содержит по меньшей мере 0,5% глины или глиносодержащего компонента,

включающий:

- а) обеспечение:
 - и) стартовой культуры дрожжей и
 - ii) среды для культивирования клеток дрожжей, причем указанная среда для

⁵ культивирования клеток дрожжей включает питательные вещества, необходимые для роста дрожжей, а также глину или глиносодержащий компонент;

б) внесение указанной стартовой культуры дрожжей в указанную среду для культивирования клеток дрожжей;

¹⁰ в) инкубацию указанных дрожжей в промышленном ферментере и условиях, оптимизированных для роста дрожжей, причем во время роста происходит встраивание указанных глины или глиносодержащего компонента в клеточную стенку указанных дрожжей;

г) добавление пеногасителя в указанный ферментер;

¹⁵ д) лизис клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом и

е) отделение указанных клеточных стенок дрожжей с встроенной глиной или глиносодержащим компонентом от других компонентов дрожжей.

²⁰ 40. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанные дрожжи выбраны из группы, состоящей из *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* и их комбинаций.

41. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанная глина представляет собой минеральную глину или синтетическую глину, принадлежащую к силикатной группе.

²⁵ 42. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанная глина выбрана из группы, состоящей из цеолита, бентонита, алюмосиликата, монтмориллонита, смектита, каолинита, органоглины и их смесей.

³⁰ 43. Способ по п.42, отличающийся тем, что указанная глина представляет собой алюмосиликатную глину.

44. Способ по п.39, отличающийся тем, что количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет приблизительно от 0,125 до 4,0%.

45. Способ по п.44, отличающийся тем, что количество глины в указанной среде для культивирования клеток составляет приблизительно от 0,5 до 2,0%.

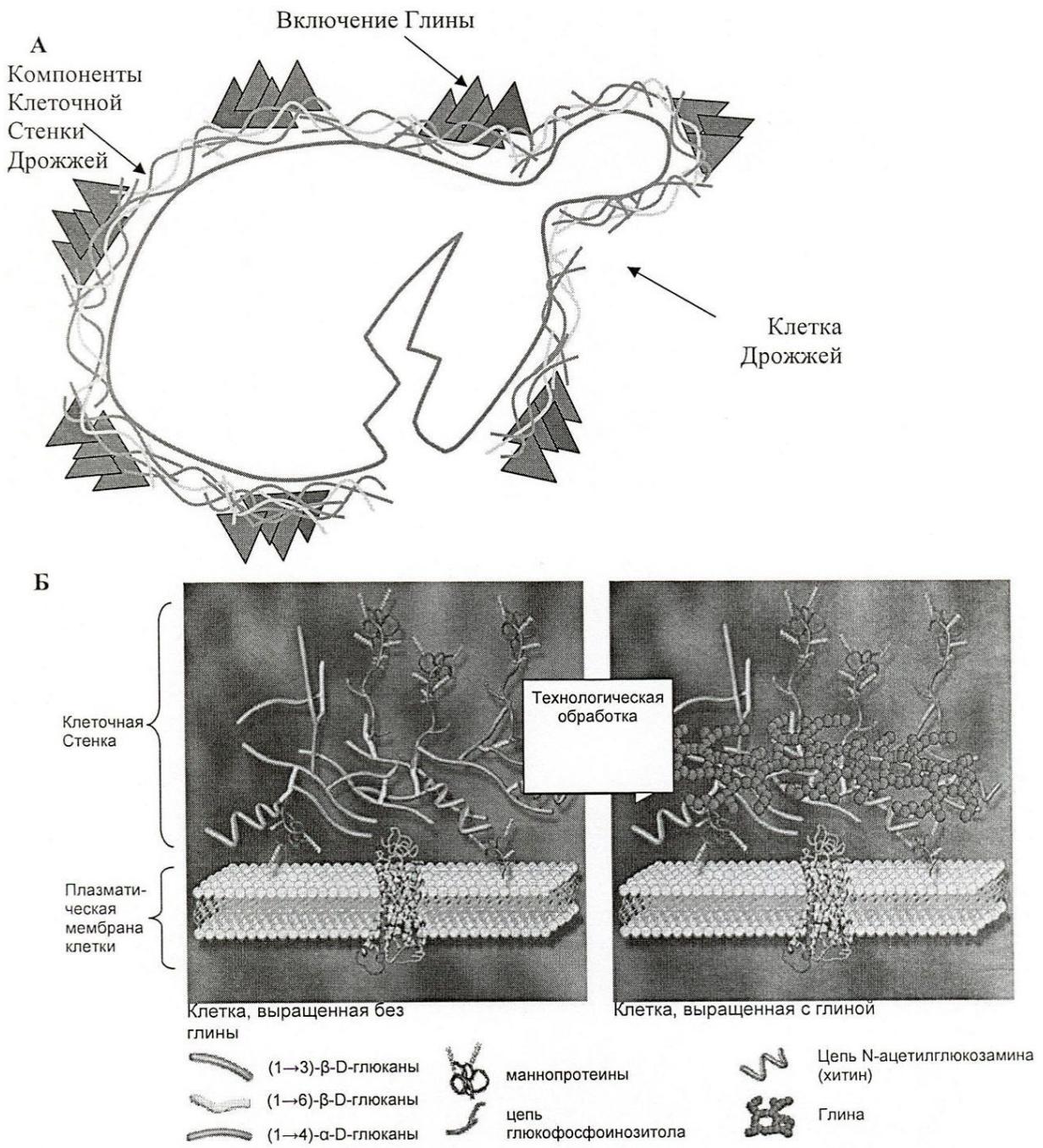
³⁵ 46. Способ по п.39, отличающийся тем, что объем указанного промышленного ферментера составляет от одной тысячи до пяти миллионов литров.

47. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный пеногаситель добавляют для ослабления влияния указанной глины на процесс инкубации.

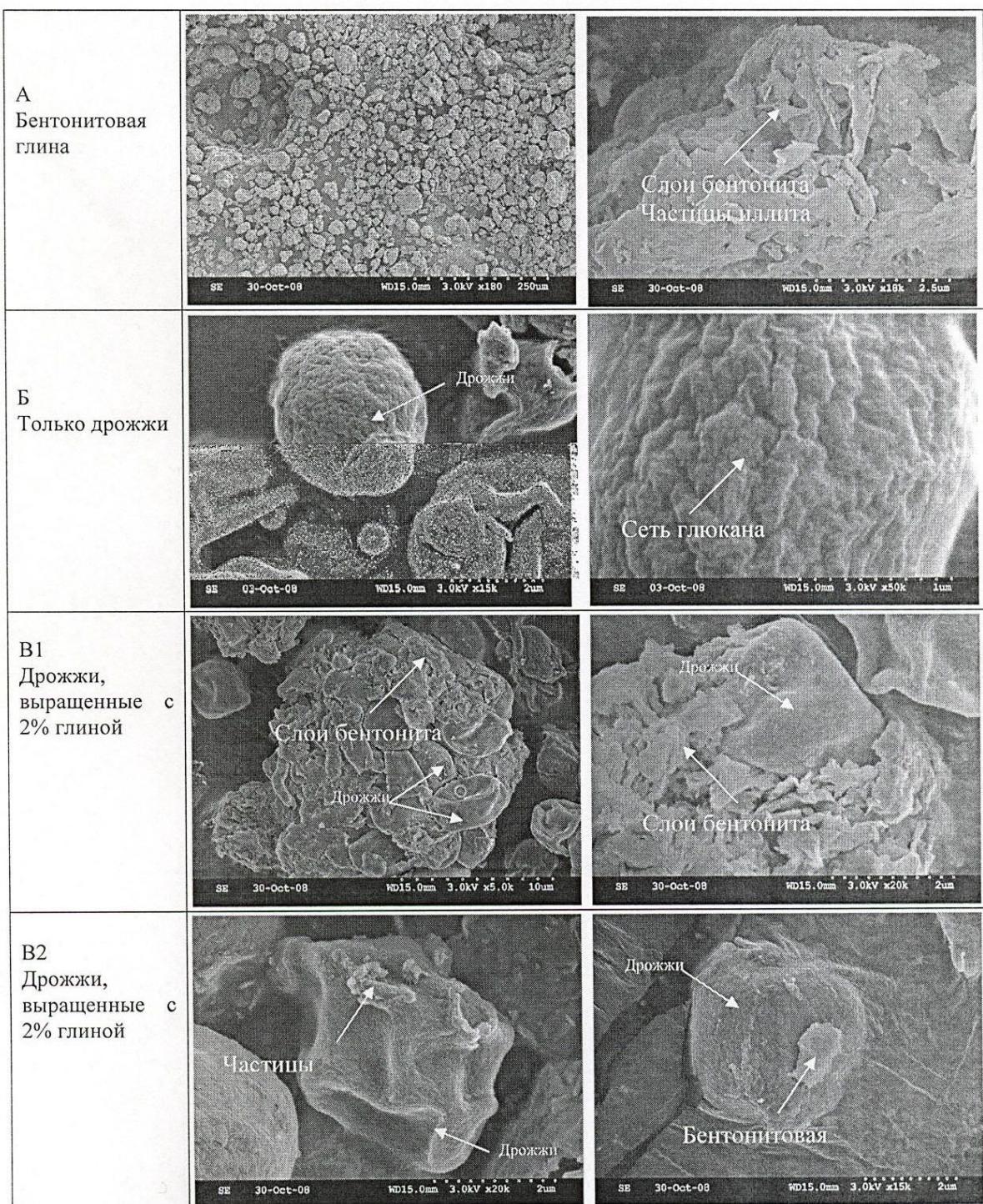
⁴⁰ 48. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный пеногаситель выбран из группы, состоящей из несиликонового молекулярного пеногасителя, масляного пеногасителя, порошкового пеногасителя, пеногасителя на водной основе, пеногасителя на основе кремния, пеногасителя на основе полиэтиленгликоля, пеногасителя на основе полипропиленгликоля или полиакрилатов алкила.

⁴⁵ 49. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный пеногазитель включает несиликоновый молекулярный пеногаситель.

50. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный лизис включает использование стеклянных шариков, битера для шариков и/или ферментативной обработки.



Фиг.1



Фиг.2

Образец	Глюкан (%)	Маннан (%)	Отношение Г/М	Белок (%)	Остаток (%)	Адсорбция ЗЕАРАЛЕНОНА (%)
Только КСД	$45,52 \pm 0,54$	$41,29 \pm 0,62$	1,01	12,38	0,81	$6,91 \pm 2,19$
КСД + 0,5%	$42,68 \pm 0,49$	$35,70 \pm 0,20$	1,20	14,34	7,28	$45,64 \pm 5,30$
КСД + 1,0%	$42,69 \pm 0,39$	$31,67 \pm 0,37$	1,35	15,83	9,81	$73,55 \pm 2,98$
КСД + 2,0%	$38,24 \pm 0,28$	$26,34 \pm 0,17$	1,45	19,89	15,53	$79,33 \pm 2,24$

Фиг.3

Образец	Глюкан (%)	Маннан (%)	Отношение Г/М	Адсорбция ЗЕАРАЛЕНОНА (%)	Адсорбция АФЛАТОКСИНА В1 (%)	Содержание Пепла (%)
Только КСД	$32,457 \pm 0,19$	$25,92 \pm 0,28$	1,25	$69,34 \pm 0,58$	$2,65 \pm 0,55$	2,76
КСД + 1,0%	$39,93 \pm 0,26$	$22,29 \pm 0,23$	1,79	$80,33 \pm 0,28$	$40,73 \pm 3,30$	7,58
КСД + 2,0%	$36,14 \pm 0,20$	$20,97 \pm 0,12$	1,72	$85,89 \pm 1,02$	$53,70 \pm 1,97$	10,33

Фиг.4



Фиг.5

Эксп/Партия №	08-036	09-002
Материал	0,5% Смектит КСДВГ Расп. Суш.	0,5% Смектит КСДВГ Расп. Суш.
% пепла	21,59	20,26%
%C	37,82	37,43
%H	5,3	5,1745
%N	3,75	5,15
%Белка	23,46	32,14
Общее Количество на Чашке (КОЕ/г)	$9,35 \times 10^4$	-
	1,79 (5ч)	0,14 (0ч)
	4,07 (9ч)	0,60 (3ч)
% алкоголя	4,72 (11ч)	1,64 (6ч)
	-	2,90 (9ч)
	-	4,82
% глюкозы	27,5	28,2
% маннозы	19,4	16,1

Фиг.6

Дрожжи	Глина (1%, смектит)	Ферментативный гидролиз	Адсорбция (%)	
			АФВ1	ЗЕА
АСД (только КСД)	-	+	$6,9 \pm 4,5$	$39,3 \pm 2,4$
АСД (№08-036)	+	+	$85,3 \pm 5,3$	$57,9 \pm 1,1$
(№09-002)			$99,8 \pm ,02$	$55,1 \pm 1,1$

Фиг.7

Дрожжи	Глина (0,5%, смектит)	Ферментативный гидролиз	Адсорбция (%)	
			АФВ1	ЗЕА
АСД	+	+	$75,4 \pm 13,2$	$69,2 \pm 1,2$

Фиг.8

Дрожжи	Глина (1%, МВВ02)	Ферментативный гидролиз	Адсорбция (%)	
			АФВ1	ЗЕА
Levapan	+	+	$93,8 \pm 6,9$	$56,7 \pm 0,7$
Levapan	-	-	$6,7 \pm 2,7$	$40,3 \pm 0,7$
DCL	+	+	$89,3 \pm 4,5$	$51,3 \pm 1,6$
DCL	-	-	$4,7 \pm 5,4$	$48,6 \pm 1,4$
АСД	+	+	$91,6 \pm 5,0$	$68,7 \pm 0,4$
АСД	-	+	$6,1 \pm 2,8$	$58,7 \pm 0,9$
АСД	-	-	$5,8 \pm 3,7$	$39,5 \pm 0,9$

Фиг.9