

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 683**

51 Int. Cl.:

A23K 20/189 (2006.01)

A23K 50/30 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2013 E 13290291 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2735235**

54 Título: **Utilización de un complejo enzimático en pienso para animales de explotación**

30 Prioridad:

26.11.2012 FR 1203171

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

15.01.2020

73 Titular/es:

HOOREMAN, DOMINIQUE (16.7%)

Mas de Bions

30127 Bellegarde, FR;

HOOREMAN, ANNE-SOPHIE (16.7%);

HOOREMAN, CAROLINE (16.7%);

HOOREMAN, MARIE (16.7%);

HOOREMAN, JEAN-NOËL (16.7%) y

HOOREMAN, HERVÉ (16.7%)

72 Inventor/es:

HOOREMAN, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 737 683 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de un complejo enzimático en pienso para animales de explotación

5 El campo técnico de la presente invención es el de la nutrición animal.

Se sabe que la cepa de *Streptomyces fradiae* puede producir al menos cinco tipos de proteasas conocidas como Ia, Ib, II, III, IV y dos peptidasas (patente GB-1133579).

10 La patente FR-2034559, describe el uso de productos enzimáticos que incluyen proteasas obtenidas a partir de *Streptomyces fradiae* y de compuestos alimenticios para animales que incluyen tales productos. Empero, esa patente no prevé un complejo enzimático en el que una de las proteasas de la mezcla presente un pI (punto isoelectrico) del orden de 7.0 y otra presente un pI del orden de 8.0. Por el contrario, no hay caracterización de uso o de separación de distintas proteasas obtenidas de *Streptomyces fradiae* según su pI.

15 En su solicitud de patente WO 87/07905, los solicitantes han descrito un procedimiento de obtención de un complejo proteolítico compuesto exclusivamente de proteasas de tipo II, III y IV con una predominancia de la proteasa de tipo II. Este complejo se obtiene a partir de una cepa de *Streptomyces fradiae* de tipo WAKSMAN 3535 por fermentación, extracción del complejo por filtración, luego ultrafiltración sobre una membrana que tiene un umbral de corte correspondiente a un peso molecular de entre 2.000 y 12.000, y finalmente por atomización. El complejo así obtenido en forma de polvo tiene un título de al menos 2.000 unidades Anson/mg de proteínas.

20 En la presente solicitud, la proteasa de tipo II fue caracterizada por un peso molecular cercano a 18 kDa y un punto isoelectrico cercano a 9,0.

25 Este complejo, usado en la alimentación animal, permite que los animales asimilen eficazmente pienso rico en proteínas brutas, estimulando así su crecimiento. Por otro lado, este complejo, usado en cerdas gestantes, permite obtener un aumento en el peso de las crías al nacer acompañado de una reducción en el consumo de alimentos y una mejora del estado de salud.

30 Sin embargo, este procedimiento no permite eliminar eficazmente productos secundarios contaminantes.

35 En la solicitud de patente WO 97/37681 se aportan mejoras que permiten el uso de un producto que titulan al menos 4.000 unidades Anson/mg de proteínas para aplicaciones terapéuticas. De esta manera, la proteínasa predominante tiene una actividad específica superior a las 100.000 unidades Anson/mg de proteínas con un peso molecular de entre 30 y 36 kDa y un punto isoelectrico cercano a 7,0.

Los análisis posteriores mostraron que el peso molecular de la proteasa era de 18-20 kDa.

40 Las aplicaciones terapéuticas descritas consisten esencialmente en una acción positiva en la reducción de la secreción de moco característica de algunas enfermedades, en una mejora en la absorción intestinal y en la circulación sanguínea y aun en la lucha contra enfermedades infecciosas. Asimismo, las composiciones se describen como capaces de facilitar la regeneración de vellosidades atrofiadas o destruidas en la mucosa intestinal.

45 En vista de las importantes propiedades terapéuticas del complejo enzimático extraído de cultivos de *Streptomyces fradiae*, es importante usar un complejo enzimático más completamente limpio de impurezas biológicas que podrían afectar su actividad.

50 La presente invención tiene como objetivo aportar una mejora al complejo enzimático previamente descrito, para favorecer particularmente buenas condiciones de cría y la salud de los animales en el marco de explotaciones industriales.

55 Así, la invención tiene como objetivo el uso de un complejo enzimático que comprende una mezcla de proteasas obtenida por cultura de una cepa de *Streptomyces fradiae* como suplemento en la alimentación para animales de explotación, caracterizada porque entre esas proteasas una de ellas tiene un punto isoelectrico cercano a 7,0 y una actividad específica de aproximadamente 150 000 unidades Anson/mg de proteínas y otra proteasa tiene un punto isoelectrico cercano a 8,0 y una actividad específica cercana a 38 000 unidades Anson/mg de proteínas. Tal complejo conteniendo muy mayoritariamente esos dos tipos de proteasas, es decir una proporción de esos dos tipos de proteasas superando el 80% de la actividad de dicha mezcla, con eliminación de sustancias de carga desprovistas de actividad proteolítica de dicha mezcla.

60 Según una característica de la invención, el complejo enzimático es utilizado como complemento alimenticio en forma de polvo, de líquido o de toda otra forma adaptada para su mezcla a compuestos alimenticios para mejorar el estado general de los animales de explotaciones industriales.

65 Según otra característica de la invención, el complejo enzimático en forma de polvo se mezcla en seco con una

composición de pienso en un tambor giratorio hasta obtener su homogeneización.

Según una característica de la invención, el complejo enzimático en forma líquida se pulveriza en un lecho fluidizado sobre un compuesto alimenticio, y luego se granula.

5 Según otra característica de la invención, el complejo enzimático se usa en pienso para aves de corral.

Según otra característica de la invención, el complejo enzimático se usa en pienso para cerdos.

10 Según otra característica de la invención, el complejo enzimático se usa en pienso para peces.

La invención finalmente tiene por objetivo un procedimiento de fabricación del complejo enzimático según la invención, caracterizado por el hecho que se cultiva una cepa de *Streptomyces fradiae*, que el caldo de fermentación se filtra, en el hecho que el complejo enzimático se extrae después por ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico, seguido de un isoelectroenfoque, y finalmente el complejo así obtenido se liofiliza.

15 La presente invención permite proporcionar un suplemento para pienso cuyas características están rigurosamente definidas.

20 La invención permite en primer lugar adaptar con precisión las dosis que van a administrarse en las composiciones de pienso de manera que se obtengan los efectos terapéuticos deseados.

La invención también tiene la ventaja de mejorar el estado de salud de animales en las explotaciones industriales.

25 Además, la invención también aporta una mejora en la condición general de los animales en las explotaciones industriales aumentando así la rentabilidad de la explotación.

La invención permite adicionalmente un aumento del crecimiento de los animales induciendo además una reducción del consumo de comida.

30 Otras características, datos y ventajas de la invención quedarán más claros a la lectura del complemento descriptivo facilitado a continuación, de los modos de realización dados a modo de ejemplo, relacionadas con imágenes que ilustran las vellosidades intestinales.

35 Se sabe que la mezcla de enzimas comercializada bajo la marca registrada Panstimase® (PANcreatic STIMulating diastASE) es un complejo enzimático obtenido por fermentación de *Streptomyces fradiae*. Este complejo se describe como conteniendo principalmente tres proteasas, algunas de las cuales actúan específicamente sobre escleroproteínas (colágeno, elastina y queratina), pero también sobre ciertas toxinas de naturaleza proteica liberadas por *Vibrio cholerae* o algunas cepas de *Escherichia coli* patógenas.

40 En el dominio de la cría de animales es importante disponer de un producto que esté técnicamente definido, que sea perfectamente constante y cuyas propiedades estén así claramente definidas.

45 Para obtener el complejo enzimático según la invención, se cultiva una cepa de *Streptomyces fradiae* y se filtra el caldo de fermentación resultante. Después, se procede a una extracción y a una caracterización del complejo por ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico e isoelectroenfoque. Finalmente, se liofiliza el complejo obtenido.

50 Para el cultivo de la cepa de *Streptomyces fradiae* se usa, por ejemplo, una cepa del tipo WAKSMAN 353, pudiendo ser genéticamente mejorada para obtener particularmente un aumento en la actividad proteolítica o la supresión de toda secreción de antibióticos.

55 El cultivo tiene lugar en un fermentador de producción industrial en un medio de cultivo adaptado. Este medio de cultivo puede por ejemplo estar basado en harina de soja: 15 g/l; glucosa: 30 g/l; fosfato bipotásico: 1 g/l; carbonato de calcio: 10 g/l.

La reacción tiene lugar a un pH de entre 7,0 y 7,5, a una temperatura de fermentación de aproximadamente 28 °C con una aireación de 0,3 volúmenes de aire estéril por volumen de medio y por minuto.

60 Una vez terminado el cultivo, el micelio se elimina por filtración del caldo de fermentación mediante un agente clarificante.

La extracción del complejo enzimático requiere la implementación de varias técnicas que incluyen ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico y el isoelectroenfoque.

65 Ultrafiltración

La ultrafiltración del filtrado se realiza mediante una membrana con un umbral de corte de 50 kDa.

Después de 3 h de filtración, el filtrado obtenido (71 % del volumen inicial) presenta una actividad proteolítica revelada por la prueba de la película de gelatina. Esta prueba consiste en la degradación de una película de gelatina pigmentada con plata depositada sobre un medio sólido.

5 Cromatografía de intercambio iónico
Se usa una cromatografía de intercambio catiónico hecha con columnas de gel de carboximetilo Cellufine C-500 (Amicon) de dimensiones adecuadas.

10 El tampón cromatográfico es un tampón citrato 10 mM a pH 5,5 y la elución se realiza por un gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M. El débito de elución está adaptado en función del tamaño de las columnas, por ejemplo, es de 10 a 15 ml/min para una columna de 2,5 cm de diámetro y 27 cm de altura.

15 Isoelectroenfoque
El isoelectroenfoque analítico se realiza usando geles listos para su uso hechos por la empresa Pharmacia para pH de 3 a 9 en Phast-system. El revelado se realiza usando azul de Coomassie.

20 En el caso de isoelectroenfoque preparativo en un medio sólido, la solución enzimática se dializa contra agua destilada (95 ml) y se mezcla con 5 ml de 3-9 anfolitos con 4,7 g de gel Ultradex y 0,5 g de glicina. El gel se seca durante 6 h a 40 °C. La migración tiene lugar durante la noche, o periodo equivalente, a una potencia constante de 3 W. Se realiza revelado usando azul de Coomassie.

25 Se toman las diferentes tiras de gel, se enjuagan con 3 ml de agua, se filtran y a continuación se enjuagan con 3 ml de tampón Tris-HCl.

Las fracciones así obtenidas se analizan entonces para determinar su contenido proteolítico y su contenido de proteína. Las muestras se dializan entonces contra el tampón Tris-HCl 0,3 M a pH 8,0.

30 En el caso del isoelectroenfoque preparativo en un medio líquido, la solución enzimática dializada contra el agua destilada se mezcla con los anfolitos (3,5 ml). La migración se efectúa a una potencia constante de 8 W durante 4 h.

Las fracciones obtenidas se analizan y luego se dializan contra el tampón Tris-HCl 0,3 M a pH 8,0.

35 Las condiciones experimentales indicadas anteriormente deben adaptarse según las cantidades de producto que se deseen obtener y a su uso en condiciones industriales.

Así se obtiene una proteasa predominante en la mezcla que tiene un punto isoelectrónico (pI) cercano a 7,0 y en una menor proporción una proteasa cuyo pI es de aproximadamente 8,0.

40 La proteasa predominante cercana a 7,0 de pI se obtiene en un volumen de 9 ml con una concentración proteica de 0,49 mg/ml. Pueden requerirse precauciones especiales de purificación debido a la precipitación de esta proteasa en su punto isoelectrónico. La solución obtenida tiene un título de aproximadamente 75.000 unidades Anson (U.A.)/ml.

45 Esta proteasa se purifica después de la homogeneización a una escala de 4 mg con una actividad específica de 150.000 U.A. /mg de proteína.

50 Una unidad Anson (UA) se define aquí como la cantidad de enzima que, incubada durante 10 minutos a 25 °C y a pH 7,5 en presencia de hemoglobina desnaturalizada, libera de este sustrato el equivalente de 1 microgramo de tirosina, determinado por absorción espectrofotométrica a 280 nm sobre el filtrado no precipitable con ácido tricloroacético.

55 La proteasa, cuyo pI es cercano a 8,0, se recupera junto con la previa, pero en un volumen mayor, de 35 ml por ejemplo, y presenta una concentración en proteína de 1,48 mg/ml. Esta solución es del orden de aproximadamente 56.000 U.A. /ml.

Esta proteasa se purifica después de una homogeneización a una escala de 50 mg con una actividad específica de aproximadamente 38.000 U.A. /mg de proteínas.

60 El complejo enzimático purificado previamente descrito contenía esencialmente proteasas y otras proteínas. Las purificaciones realizadas y la técnica de electroforesis usada aportan la prueba de una purificación suplementaria y de la eliminación de sustancias de carga desprovistas de actividad proteolítica.

65 Las diferentes proteasas producidas pueden ser mejor caracterizadas determinando sus actividades sobre proteínas tales como el colágeno, la queratina, la elastina o la hemoglobina.

Desafortunadamente, estas determinaciones son complejas debido a su falta de sensibilidad y especificidad. Por

tanto, debe recurrirse a varias pruebas de actividad, constituyendo métodos de detección, y principalmente la prueba de Anson.

Pruebas de actividades:

5 Prueba de Anson:
Esta prueba permite dosificar una actividad proteolítica, sin especificidad. Consiste en dosificar la hidrólisis de la hemoglobina desnaturalizada por determinación espectrofotométrica de la tirosina contenida en los oligopéptidos liberados.

10 Prueba de azocaseína:
Esta prueba consiste en determinar mediante espectrofotometría a 440 nm la hidrólisis de la caseína teñida por un colorante naranja. Esta prueba no es específica. Después de la incubación con la enzima, la azocaseína restante se precipita usando ácido tricloroacético. La medida de la densidad óptica refleja la presencia de los péptidos liberados, y así la actividad enzimática.

Prueba de actividad elastolítica:

20 Prueba de elastina-rojo Congo:
Esta prueba consiste en dosificar espectrofotométricamente a 495 nm los péptidos teñidos liberados por la hidrólisis de la elastina teñida por un colorante rojo.

25 El problema eventual de esta dosificación se origina en la insolubilidad del sustrato y así su sensibilidad depende de la precisión de la muestra extraída, la agitación del medio de incubación y la adherencia del sustrato a las paredes del recipiente de incubación.

Las pruebas muestran una ausencia de linealidad entre la actividad y la cantidad de enzima. Se puede constatar linealidad entre la actividad y el tiempo de incubación, pero la línea recta que lo representa no pasa por el origen.

30 Así, puede medirse una diferencia en la absorbancia entre dos tiempos de incubación (20 y 40 minutos). Con 10 pl de complejo diluido 10 veces, se mide una variación de 0,049 pDO/min. Así, el complejo enzimático de la invención presenta una actividad proteolítica con respecto a la elastina.

Prueba de NBA:

35 (Éster N-Bloc-L-alaninato-para-nitrofenílico):
Esta prueba consiste en dosificar espectrofotométricamente a 347,5 nm la actividad de esterasa presente en la elastasa determinando el para-nitrofenol liberado (*Vissier L. y col. Biochim, Biophys Acta 268 (1972) 207.260*).

40 Esta dosificación no es específica de una actividad elastolítica, pero es muy rápida (cinética de 3 min) y presenta una buena sensibilidad.

45 De hecho, con 50 pl de complejo diluido 100 veces, se mide una variación de 0,235 pDO/min. Así, el complejo enzimático presenta una actividad que permite la liberación de para- nitrofenol.

Prueba de actividad colagenolítica

50 Prueba de azocoll
Esta prueba consiste en dosificar espectrofotométricamente a 520 nm los péptidos liberados por la hidrólisis de azocoll (colágeno molido sobre el que se fija un colorante rojo de Burdeos) (*Chavira, Analytical Biochemistry 136 (1984) 446450*).

55 Esta prueba tiene los mismos inconvenientes que el de elastina-rojo Congo (sustrato insoluble), pero presenta una buena sensibilidad: con 50 pl de complejo diluido 50 veces, se mide una DO de 0,398 después de 10 minutos de incubación. Así, el complejo enzimático de la invención presenta una actividad proteolítica con respecto al azocoll.

Así se puede constatar la actividad proteolítica del complejo enzimático según la invención. La purificación de dicho complejo no ha alterado su actividad.

60 El complejo proteico así obtenido y caracterizado puede emplearse en agentes terapéuticos para animales, en particular a modo de un agente inmunoestimulante y como agente de regeneración para los parches de Peyer, especialmente para los animales más viejos.

65 Además, el complejo enzimático permite la regeneración de vellosidades intestinales en animales viejos (ratas, pollos, etc.) y mejora así enormemente la absorción intestinal de nutrientes esenciales.

El complejo enzimático según la presente invención está destinado principalmente para la cría de animales y más particularmente para la mejora del pienso para ganado (bovino, porcino, ovino) y pienso para aves de corral, conejos y peces, además de pienso para cualquier otro animal no rumiante.

5 Incorporado en dosis de 0,025 a 1 g/kg a las composiciones de pienso, este complejo enzimático mejora el metabolismo de esos animales y contribuye a asegurarles una mejor salud general. Preferentemente, las dosis del complejo introducidas en las composiciones de pienso son de 0,05 a 0,2 g/kg.

10 En el caso de la explotación en batería, el mantenimiento de la buena salud general desempeña un rol importante ya que evita la propagación de enfermedades producidas por promiscuidad o confinamiento. Así se reduce sustancialmente la tasa de morbilidad y en particular la tasa de mortalidad por contaminación bacteriana de animales de explotación.

15 Los compuestos de pienso basados en esta mezcla enzimática contienen uno o varios excipientes o vehículos con objetivos nutritivos, tales como, por ejemplo, harina de cereales (trigo, maíz, centeno, arroz, mijo y sorgo), soja, carbohidratos (lactosa, manosa), elementos de carga (caseína, salvado, celulosa, derivados de celulosa) y/o elementos minerales (tiza, arcilla, bentonita, silicio) y todos los otros elementos usados en la nutrición animal.

20 Estas composiciones se mezclan minuciosamente en seco con el complejo en un tambor giratorio hasta so homogeneización, o bien el complejo enzimático, en una forma líquida y particularmente acuosa, se pulveriza como lecho fluidizado sobre una composición de pienso y a continuación se granula. Tales operaciones pueden realizarse a temperaturas variables de 15 °C a 60 °C.

25 El uso de un complejo enzimático más puro y más activo permite así dosificar mejor la actividad biológica de las composiciones nutritivas según la invención y obtener una homogeneidad satisfactoria de los resultados obtenidos.

Por este motivo, las composiciones de pienso según la invención tienen un contenido de complejo enzimático muy constante y claramente determinado.

30 Así, a continuación se presenta una lista no exhaustiva de los ejemplos de composiciones de pienso previstas para animales de explotación que contienen el complejo enzimático según la invención mezclado con excipientes o vehículos de nutrición apropiados.

Composición de pienso para aves de corral

35 Se prepara una composición para un lote de 10 kg añadiendo el complejo enzimático:

Harina de trigo	2,5 kg
Lactosa	4,5 kg
Salvado	3 kg
Complejo enzimático según la invención	0,2 g/kg.

Una composición tal se incorpora a una proporción de 0,5 kg por tonelada métrica de pienso para aves de corral.

Composición de pienso para aves de corral

45 Se prepara una composición para un lote de 20,1 kg al que se añade el complejo enzimático y que entonces se incorpora en el pienso para aves de corral:

Harina de trigo	1,5 kg
Harina de avena	4,5 kg
Celulosa	14 kg
Sílice coloidal	0,100 kg
Complejo enzimático según la invención	0,1 g/kg

Composición de pienso para cerdos

55 Se prepara una composición para un lote de 10 kg al que se añade el complejo enzimático y que entonces se incorpora en el pienso para cerdos:

Harina de trigo	4 kg
Salvado	2 kg
Caseína	3 kg
Almidón de patata	1 kg
Complejo enzimático según la invención	0,2 g/kg

Composición de pienso para ganado vacuno

65 Se prepara una composición de la misma forma usando:

Almidón de arroz	0,5 kg
Almidón de patata	2,5 kg
Complejo enzimático según la invención	0,2 g/kg

5

La premezcla así formada se añade poco a poco a una mezcla de 6 kg de proteína en polvo de oveja y 14 kg de caseína. La preparación homogeneizada está destinada a incorporarse en el pienso para ganado vacuno en una proporción de 0,5 kg por tonelada métrica de pienso.

10

Composición de pienso para aves de corral

La composición se prepara para un lote de 10 kg al que se añade el complejo enzimático:

15	Maíz	5,65 kg
	Harina de soja	3,23 kg
	Harina de semilla de algodón	0,3 kg
	Harina de germen de trigo	0,4 kg
20	Tiza	0,13 kg
	Fosfato de dicalcio	0,16 kg
	NaCl	0,03 kg
	Complejo de aminoácido	0,1 kg
	Complejo enzimático según la invención	0,2 g/kg.

25

El complejo enzimático según la invención también puede añadirse a composiciones comerciales de pienso para aves de corral existentes con el fin de suplementar esas preparaciones.

30

Composición de pienso para peces

Se prepara el siguiente compuesto y se incorpora en el pienso para peces siguiendo las prácticas habituales.

35

Harina de pescado	50,8 %
Grasas y aceites animales	28 %
Harina de soja	9,9 %
Harina de trigo	10 %
Complejo vitamínico (A, D, E, C ₁)	1 %
Complejo enzimático según la invención	0,3 %

40

Parte experimental:

Para determinar la acción del complejo según la invención sobre las vellosidades intestinales, se realizan ensayos sobre ratas relativamente viejas (más de siete meses de edad).

45

Estas ratas reciben una alimentación basada en proteínas exclusivamente vegetales del tipo harina de trigo, soja o maíz. A esta alimentación se añade el complejo enzimático según la invención como se describe previamente a razón de 0,1 o 0,2 g/kg.

50

Los resultados se explicitan en las figuras 1 a 4. Estas figuras son vistas de microscopio fotónico (aumentos x120) de las vellosidades del duodeno y del yeyuno.

La figura 1 muestra las vellosidades duodenales de las ratas que no han recibido el complejo enzimático según la invención en su pienso.

55

La figura 2 muestra las vellosidades duodenales de las ratas que han recibido pienso que incorpora el complejo enzimático según la invención.

La figura 3 muestra las vellosidades del yeyuno de las ratas que no han recibido el complejo enzimático según la invención en su pienso.

60

La figura 4 muestra las vellosidades del yeyuno de las ratas que han recibido pienso que incorpora el complejo enzimático según la invención.

65

Se puede constatar que la adición del complejo enzimático en el pienso de animales viejos (ratas, pollo, etc.) aumenta el tamaño y número de las vellosidades en tanto en el duodeno como en el yeyuno. Se han observado aumentos de hasta el 70 %.

Estos resultados son transferibles a microvellosidades intestinales. Se obtienen igualmente resultados similares con pollos, cerdos y peces.

- 5 El aumento de la superficie desarrollada permite una absorción más rápida de nutrientes o aun de medicamentos.

- 10 Esta mejora en la absorción se observa en truchas que reciben pienso que contiene un antibiótico. En la prueba, el pienso contiene 4 g/kg de oxitetraciclina y los resultados se leen después de 48 horas. Así se observa un aumento en la concentración de tejido del antibiótico de una magnitud del 100 % en el hígado (5,75 en lugar de 2,5 microgramos/g), 400 % en los músculos (1,75 en lugar de 0,32 microgramos/g) y 1000 % en los riñones (5,75 en lugar de 0,5 microgramos/g).

Se obtienen resultados similares con pollos y cerdos.

- 15 Este aumento en la densidad puede igualmente originar un aumento en la producción local de compuestos fisiológicamente activos tales como hormonas intestinales.

REIVINDICACIONES

- 5 **1 .** Utilización de un complejo enzimático que comprende una mezcla de proteasas obtenidas mediante cultivo de una cepa de *Streptomyces fradiae* para la suplementación de pienso para animales de explotación, **caracterizado por que** entre las proteasas de la mezcla una de ellas tiene un punto isoeléctrico cercano a 7,0 una actividad específica de 150 000 unidades Anson/mg de proteínas y otra tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 8,0 y una actividad específica de 38 000 unidades Anson/mg de proteínas. Dicho complejo contiene muy mayoritariamente esos dos tipos de proteasas, sobrepasando el 80% de la actividad de dicha mezcla, con la
- 10 eliminación de sustancias de carga desprovistas de actividad proteolítica de dicha mezcla.
- 15 **2 .** Utilización según la reivindicación 1 del complejo enzimático como complemento alimenticio en forma de polvo, de líquido o de toda otra forma adecuada para su mezcla con compuestos de pienso para mejorar el estado general de los animales de explotación industrial.
- 20 **3 .** Utilización según la reivindicación 2, en la cual el complejo enzimático en forma de polvo se mezcla en seco con una composición de pienso en un tambor giratorio hasta alcanzar la homogeneización.
- 25 **4 .** Utilización según la reivindicación 2, en la cual el complejo enzimático en forma líquida se pulveriza en un lecho fluidizado sobre una composición de pienso, y a continuación se granula.
- 30 **5 .** Utilización según una de las reivindicaciones anteriores en pienso para aves de corral.
- 6 .** Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4 en pienso para cerdos.
- 7 .** Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4 en pienso para peces.
- 8 .** Procedimiento de fabricación del complejo enzimático según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** se cultiva una cepa de *Streptomyces fradiae*, porque se filtra el caldo de fermentación, porque enseguida se procede a una extracción del complejo enzimático por ultrafiltración cromatografía de intercambio iónico, seguido de isoelectroenfoque, y finalmente se liofiliza el complejo obtenido.

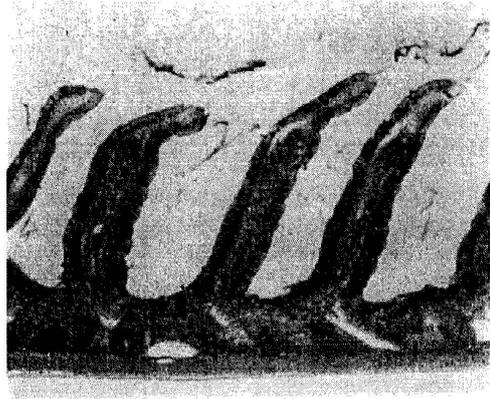


Figura 1

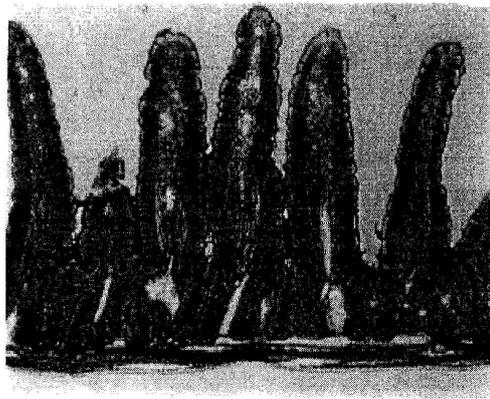


Figura 2

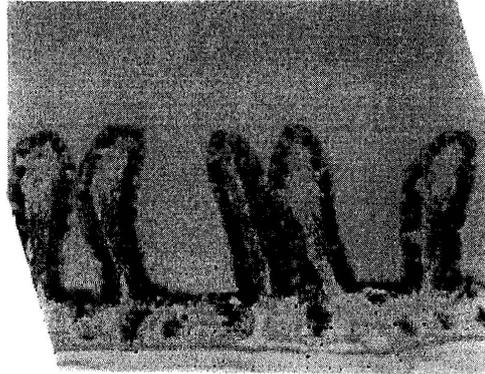


Figura 3



Figura 4