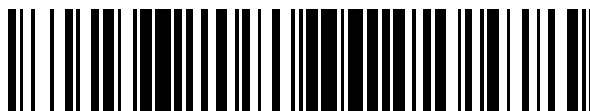


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 995**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/00** (2006.01)

**C12P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008** **E 08836912 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015** **EP 2201127**

54 Título: **Aumento de la hidrólisis de fibras por adición de proteasa**

30 Prioridad:

**12.10.2007 US 998818 P**

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

**25.06.2015**

73 Titular/es:

**ARCHER-DANIELS-MIDLAND COMPANY (100.0%)  
4666 FARIES PARKWAY  
DECATUR, IL 62526, US**

72 Inventor/es:

**ABBAS, CHARLES A. y  
BAO, WU-LI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 538 995 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

Aumento de la hidrólisis de fibras por adición de proteasa

## 5 1. Campo de la invención

[0001] Las enseñanzas de la presente se refieren, pero no exclusivamente, al campo de la producción de productos agrícolas. Las realizaciones se refieren, por ejemplo, a métodos para aumentar la glucosa libre y otras materias orgánicas disponibles a partir de una materia prima de fibra para fermentación y otras aplicaciones.

10

## 2. Antecedentes de la técnica relacionada

[0002] Se dispone de una gran cantidad y variedad de materias primas de fibra para las operaciones de procesamiento agrícolas. Estas materias primas de fibra (también denominadas materias primas celulósicas, biomasa o lignocelulósicas) se pueden utilizar, por ejemplo, para producir combustible, para producir productos químicos industriales, o como otros alimentos y piensos con valor agregado. La materia prima celulósica se compone en gran parte de paredes de células vegetales con celulosa, hemicelulosa, lignina y polímeros de proteínas como los constituyentes primarios. La hidrólisis o la descomposición de estas materias primas utiliza individualmente o una combinación de métodos enzimáticos y termoquímicos que resultan en la producción de monómeros y oligómeros de carbohidratos. La mezcla hidrolizada puede servir como materia prima para producir combustible, productos químicos y otros productos. Se emplean esquemas de hidrólisis similares con la mayoría de las fibras vegetales que facilitan la liberación de glucosa y otros carbohidratos de las materias primas de fibra.

[0003] Aunque se ha prestado atención al aumento de la cantidad de glucosa disponible de composiciones como el almidón granular crudo (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2006/0154354 A1, para Duan, et al.), últimamente se ha prestado más atención a los métodos para aumentar la cantidad de carbohidratos utilizables obtenidos de materias primas de fibra fácilmente accesibles y económicas que no contienen almidón o contienen cantidades mínimas.

[0004] XP 002673412 (Resumen Ejecutivo / CRADA; 1999) da a conocer pasos de procesamiento que incluyen la producción de enzima celulasa, la sacarificación y fermentación simultáneas de carbohidratos hexosa, y una fermentación de pentosa por separado para convertir xilosa o arabinosa en etanol.

[0005] WO 03/105889 A1 da a conocer un proceso para recuperar los componentes del grano del destilador, como por ej., los componentes del grano seco de destilería (DDG), para utilizar en diversas aplicaciones, por ejemplo en la producción de etanol.

Breve resumen de la invención

[0006] Las realizaciones de la invención apuntan en general a proporcionar un método para aumentar la cantidad de glucosa y otros carbohidratos obtenidos de la hidrólisis de una corriente de fibra con bajo contenido de almidón o sin almidón, mediante hidrólisis de la corriente de fibra en presencia de proteasa y una o más de celulasas y hemicelulasas.

[0007] Las realizaciones incluyen un método para aumentar la cantidad de glucosa y otras materias orgánicas liberadas de una materia prima de fibra, que comprende hacer reaccionar una materia prima de fibra con una mezcla de reactivos que contenga al menos una proteasa y al menos un elemento del grupo formado por celulasa y hemicelulasa; donde la proteasa se elige del grupo que consiste en proteasas aspárticas de mohos que son miembros de los géneros de los hongos Ascomycetes, representados por el género *Aspergillus* y que tiene una secuencia de aminoácidos al menos más de 70% idéntica a SEQ ID NO: 1 y se retiene una actividad de proteasa y es adicional a cualquier proteasa endógena con la celulasa o hemicelulasa; y obtener un producto de reacción de la materia prima de fibra y la mezcla de reactivos que contiene glucosa. La cantidad de glucosa en el producto de reacción (medida como porcentaje de la masa de la materia prima de fibra) es mayor que la cantidad de glucosa obtenida de la reacción de la materia prima de fibra en las mismas condiciones que la reacción que incluye proteasa, pero con al menos un elemento elegido del grupo que consiste en celulasa y hemicelulasa y excluida la proteasa. En algunas realizaciones, la mezcla de reactivos utilizada para aumentar la cantidad de glucosa y otras materias orgánicas liberadas de la corriente de fibra no incluye amilasas.

[0008] Las proteasas son enzimas que han encontrado un gran número de aplicaciones en la producción industrial de detergentes, el procesamiento de pieles animales, el ablandamiento de la carne, así como en otras aplicaciones alimentarias que involucran materiales animales y vegetales. Como grupo representan una de las más grandes clases de enzimas hidrolíticas que posee una amplia gama de especificidades frente a las secuencias de aminoácidos, diferente pH y temperatura óptima, y diferentes aminoácidos en los sitios activos, algunas de las cuales (por ejemplo, metaloproteasas) requieren cationes como cinc o hierro para una actividad óptima. Aunque

diversas proteasas pueden ser adecuadas para usar en las realizaciones de la invención, según se define en la reivindicación 1, habitualmente se prefiere una proteasa fúngica ácida. En una realización, la proteasa fúngica ácida tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, la proteasa se elige del grupo que consiste en proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi*, o proteasas aspárticas de mohos que son miembros de los géneros de los hongos Ascomycetes representados por el género *Aspergillus*. En una realización típica, la proteasa es proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi*, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0009] Una gran variedad materias primas de fibra son adecuadas para utilizar en las realizaciones de la invención. Las materias primas de fibra incluyen, pero no exclusivamente, rastrojo de maíz, pienso de gluten de maíz (CGF), granos secos de destilería (DDG), granos secos de destilería con solubles (DDGS), pasto varilla, miscanthus, cascarilla de soja, paja de trigo desmenuzada y paja de trigo. En una realización típica, la materia prima de fibra contiene menos de 20% en peso de almidón, menos de 10% en peso de almidón, menos de 5% en peso de almidón, o menos de 1% en peso de almidón. En otra realización, la materia prima de fibra no contiene almidón.

[0010] Varias celulasas son adecuadas para usar en las realizaciones típicas de la invención. Éstas incluyen, por ejemplo, pero no exclusivamente CELLUCLAST® (un producto de Novozyme), que es una 1,4-(1,3:1,4)-β-D-glucan 4-glucano-hidrolasa producida por fermentación sumergida del hongo *Trichoderma reesei*, depositado como ATCC N° 26921; o GC-220 (un producto de Genencor). Otras celulasas útiles incluyen las de *T. reesei*, otras especies de *Trichoderma*, especies de *Aspergillus*, especies de *Cryosporium*, especies de clostridio o celulasas de otras especies bacterianas y fúngicas.

[0011] Diversas hemicelulasas son adecuadas para usar en las realizaciones típicas de la invención, incluidas, por ejemplo, pero no exclusivamente, Ultraflo L (Novozyme), Multifect Xylanase (Genencor), Viscozyme L (Novozyme) y Viscostar L (Dyadic). Los productos de reacción también pueden incluir una o más de arabinosa, xilosa, galactosa, manosa, celobiosa, xilobiosa, grupos acetilo, fitoesteres, compuestos fenólicos y oligómeros de estos compuestos.

[0012] La cantidad de glucosa en el producto de reacción (medida como porcentaje de la masa de la materia prima de fibra) después de la adición de la proteasa es mayor que la cantidad de glucosa obtenida de la reacción de la materia prima de fibra sin proteasa, en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% , al menos 90%, o al menos 100%.

[0013] Otra realización incluye un método para obtener un residuo sólido de la fibra tratada con enzima para la producción de bioaceite, que comprende preparar un producto de reacción de materia prima de fibra enriquecido con glucosa como se describe en otras realizaciones de la invención, y separar dicho producto de reacción en una fracción de fibra hidrolizada sólida y una fracción líquida. Esta fracción sólida se puede utilizar después como combustible para la producción de bioaceite. El proceso empleado en el tratamiento mencionado se denomina a menudo hidrotratamiento o HT. Se puede usar con corrientes de fibra que contengan un nivel bastante elevado de humedad generalmente superior a 50% en base peso/peso .

Descripción detallada de la invención

[0014] La presente instrucción describe varias características y aspectos diferentes de la invención en relación con diversas realizaciones ejemplares.

[0015] Los métodos de procesamiento según se describen en este documento pueden ofrecer muchas ventajas con respecto al estado anterior de la técnica. Por supuesto, el alcance de la invención es definido por las reivindicaciones, y si una realización está comprendida por el alcance no debe ser limitado por si el método proporciona una o más de estas ventajas.

[0016] Los métodos actuales de procesamiento de maíz, soja, trigo, cebada, mijo, canola, girasol y otros productos agrícolas para obtener productos básicos útiles como etanol, piensos para animales, harinas integrales y harinas, también pueden dar como resultado la producción de una cantidad de subproductos de la fibra. Los métodos de procesamiento incluyen, pero no exclusivamente, molienda húmeda, molienda en seco y molienda húmeda modificada. Véase Singh, et al. "Modified Dry Grind Ethanol Process," Ag. Eng. Dept., U. of III UILU No. 2001-7021 (18 de julio de 2001).

[0017] Estos subproductos, también conocidos como materias primas de fibra, pueden incluir, por ejemplo, pero no exclusivamente, rastrojo de maíz, pienso de gluten de maíz, granos secos de destilería (DDG), granos secos de destilería con solubles (DDGS), pasto varilla, cascarilla de soja, paja de trigo desmenuzada y paja de trigo, fibra de palma, pasto bermuda, miscanthus y babasú. Las materias primas de fibra no necesitan necesariamente ser subproductos de ningún proceso particular para obtener algún beneficio del tratamiento de acuerdo con las realizaciones presentadas en este documento. Las materias primas de fibra se pueden pretratar químicamente, térmicamente y/o mecánicamente. Más detalles sobre las materias primas de fibra, particularmente las materia

primas de fibra de maíz, se encuentran en la publicación de la solicitud de patente de Estados N° 20060216396A1, para Abbas, et al., entitled "Corn Fiber Hulls as a Food Additive or Animal Feed."

- 5 [0018] Las materias primas de fibra se benefician a menudo del procesamiento adicional para producir productos básicos más útiles, como productos alimentarios más fácilmente digeribles, precursores de bioaceite o productos químicos industriales. Debido a que los subproductos habituales están compuestos en gran parte de paredes de células vegetales hechas de celulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas, su tratamiento incluye generalmente la hidrólisis enzimática y/o termoquímica, que genera monómeros y oligómeros de carbohidratos.
- 10 [0019] En algunas realizaciones, la hidrólisis no incluye ninguna amilasa. Las amilasas son enzimas glucósido hidrolasas que descomponen el almidón en moléculas de glucosa. Generalmente la amilasa no es necesaria porque las materias primas tienen poco o ningún almidón. El tratamiento alcalino de la materia prima de fibra si bien es útil para extraer la lignina y romper las uniones éster no siempre es necesario en una realización típica.
- 15 [0020] Encontramos que el tratamiento de las materias primas de fibra con proteasa, antes o conjuntamente con la hidrólisis enzimática y/o termoquímica, aumenta la cantidad de monómeros y oligómeros de carbohidratos que se pueden obtener de las materias primas de fibra, lo que aumenta por lo tanto el valor comercial de las materias primas de fibra. Generalmente, las materias primas de fibra no contendrán almidón antes del tratamiento con proteasa o tendrán sólo una pequeña cantidad de almidón. Por ejemplo, el contenido de almidón de las materias primas de fibra, en peso, puede ser menos de 10%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, menos de 1% o menos de 0.5%.
- 20 [0021] Un proceso típico de la invención incluye la hidrólisis termoquímica de la materia prima de fibra. Esto libera algunas pentosas del constituyente hemicelulosa de la fibra y afloja las estructuras de la fibra, especialmente la de cualquier componente remanente de la pared celular. Luego de la hidrólisis termoquímica, la materia prima de fibra se trata enzimáticamente para liberar glucosa y otras hexosas, así como para liberar pentosas como D-xilosa y L-arabinosa. Un tratamiento enzimático típico se realiza utilizando una mezcla de enzimas que contenga una o más celulasas y una o más hemicelulasas, aunque un experto en el área reconocerá que esta mezcla se puede modificar dependiendo del contenido inicial de la materia prima de fibra y de los resultados de la hidrólisis termoquímica.
- 25 [0022] Además de incluir celulasas y hemicelulasas, un tratamiento enzimático incluye una o más proteasas. Aunque los solicitantes no desean quedar restringidos por la teoría, se cree que las proteasas degradan principalmente las proteínas estructurales que están reticuladas a otros componentes de la materia prima de fibra. En muchos casos los polímeros de carbohidratos están unidos predominantemente mediante uniones tipo N o O a los aminoácidos: asparragina, glutamina, serina, hidroxiprolina o treonina que están presentes en el esqueleto del polipéptido. Esto aumenta la cantidad de glucosa y otras hexosas que son liberadas durante el tratamiento enzimático. Esto también reduce la cantidad de celulasa necesaria en una hidrólisis típica.
- 30 [0023] Según se usa en este documento, "celulasa" o "mezcla de celulasas" incluye una enzima o una mezcla de enzimas que degradan la celulosa. Las celulasas típicas incluyen endocelulasa o endoglucanasa, exocelulasa, exocelo-biohidrolasa y celobiasa. "Hemicelulasa" o "mezcla de hemicelulasas" incluye una enzima o una mezcla de enzimas que hidrolizan la hemicelulosa. Las hemicelulasas típicas incluyen, pero no exclusivamente,  $\beta$ -xilanasas,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas, ferúlico y acetil esterases,  $\alpha$  y  $\beta$ -manasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas y  $\beta$ -galactomananasas.
- 35 [0024] La cantidad eficaz de celulasa, hemicelulosa y proteasa utilizada en las realizaciones de la invención variará según el tipo de enzimas utilizadas en el proceso, la ultraestructura y la composición de la pared celular (que varía según el tipo de planta), el paso de pretratamiento o preprocesamiento, así como del rendimiento deseado. Se pueden utilizar enzimas comerciales según las instrucciones del fabricante.
- 40 [0025] Las proteasas típicas para utilizar en la invención incluyen, por ejemplo, la proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi* que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1. Las proteasas adecuadas para utilizar en las realizaciones tienen una identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 superior a 70%, superior a 80%, superior a 90%, superior a 95%, o superior a 98%, en tanto se retenga la actividad de proteasa.
- 45 [0026] La secuencia de la proteína proteasa de *Aspergillus saitoi* se usó para aplicar blast a la colección de secuencias NCBI e identificar las proteasas con 47% o más de identidad de secuencia. La proteasa de *T. reesei* no fue identificada debido a que había muchos huecos entre las dos secuencias de proteasa. Los porcentajes de identidad de secuencia se basan en el porcentaje de identidad con SEQ ID NO: 1. Los porcentajes de identidad de secuencia se determinaron por BLAST en los paquetes informáticos de CGC Wisconsin Genetics, versión 10 (que se puede adquirir a Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, EE:UU.). Las alineaciones utilizando programas BLAST se pueden llevar a cabo utilizando los parámetros por defecto.
- 50
- 55
- 60

TABLA 1

Comparación de la identidad de secuencia de la proteasa de <i>Aspergillus saitoi</i> con proteasa de otros organismos			
Fuente	% de identidad de secuencia	Valor E	ID de secuencia
precursor de aspergiloepsina A [ <i>Aspergillus niger</i> ]	99%	2e-180	SEQ ID NO: 2
preproproctasa B [ <i>Aspergillus niger</i> ]	97%	3e-147	SEQ ID NO: 3
proteína aspártica aspergiloepsina I pepA- <i>Aspergillus niger</i>	97%	5e-141	SEQ ID NO: 4
precursor de aspergiloepsina A	96%	9e-140	SEQ ID NO: 5
endopeptidasa aspártica Pep1/aspergiloepsina F [ <i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]	71%	1e-134	SEQ ID NO: 6
<i>Aspergillus oryzae</i> proteína aspártica	71%	4e-103	SEQ ID NO: 7
precursor de propeniclopepsina-JT2 [ <i>Penicillium janthinellum</i> ]	67%	1e-109	SEQ ID NO: 8
proteína ácida [ <i>Monascus purpureus</i> ]	63%	4e-124	SEQ ID NO: 9
proteína aspártica [ <i>Penicillium roquefortii</i> ]	64%	5e-119	SEQ ID NO: 10
proteína aspártica [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	53%	1e-94	SEQ ID NO: 11
aspartil proteasa [ <i>Trichoderma asperellum</i> ]	47%	5e-60	SEQ. ID. NO: 12

[0027] Las condiciones de reacción para la hidrólisis que incluye proteasa no necesitan variar de las empleadas habitualmente para la hidrólisis usando celulasas o hemicelulasas sin proteasas. Por ejemplo, las temperaturas de reacción pueden ser, entre otras, de 25 a 80 °C, 40 a 70 °C o 50 a 60 °C. Los tiempos de reacción pueden ser, por ejemplo, pero no exclusivamente entre 30 minutos y 48 horas, habitualmente entre 60 minutos y 24 horas. El pH de la reacción puede ser, por ejemplo, entre 2.0 y 7.0, más generalmente entre 4.0 y 5.5. Basándose en los resultados obtenidos previamente y el conocimiento actual de las proteasas ácidas algunas de las reacciones pueden a un pH menor (< 5.0) y a una temperatura mayor (>55 °C). Con diferentes materiales de fibra, el desempeño enzimático óptimo se puede dar en un amplio rango de temperaturas y pH.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

[0028] El ejemplo 1 muestra la hidrólisis de diversas materias primas de fibra con y sin una proteasa. Los porcentajes se calculan en base v/v. Una mezcla de 250 mg de materia prima de fibra en 5 ml de tampón de citrato 100 mM pH 5.0, una solución de enzimas de 0.2% de mezcla de celulasas (que incluye 0.2% de GC-220, una mezcla de celulasas de Genencor; 0.2% de Celluclast L, una mezcla de celulasas de Novozymes y 0.1% de Novozyme 28074), 0.2% de mezcla de hemicelulasas (ULTRAPLO L, una mezcla de hemicelulasas de Novozymes) y una proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi* que tiene SEQ ID NO: 1 se colocaron en una mezcladora a 55 °C durante 48 horas. Las materias primas de fibra se prepararon moliendo con un molino Wiley y tamizando a través de un tamiz de malla 40. Las materias primas de fibra utilizadas en el experimento fueron fibra de maíz, rastrojo de maíz, pienso de gluten de maíz, granos secos de destilería, granos secos de destilería con solubles, pasto varilla, cascarilla de soja, paja de trigo desmenuzada y paja de trigo.

[0029] También se llevó a cabo un experimento de control para cada una de las materias primas de fibra. El control no incluyó la proteasa pero por lo demás las condiciones y cantidades fueron las mismas.

[0030] Se centrifugaron las muestras de cada reacción y el sobrenadante se usó para el análisis de glucosa. La concentración de glucosa se obtuvo usando un analizador de YSI, Incorporated. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La cantidad de glucosa disponible aumentó con respecto al control hasta en 130%. La fibra de maíz mostró una mejora insignificante, con un aumento de sólo 0.5%. Se cree que este aumento insignificante se debe a la presencia de una cantidad relativamente alta de almidón en la fibra de maíz.

TABLA 2 Porcentaje de glucosa liberada de diferentes materias primas por celulasa y hemicelulasas con y sin proteasa

Glucosa liberada (% del peso seco total)			
Corrientes de fibra	Sin proteasa	Proteasa	Porcentaje de mejora
Fibra de maíz	19.8	19.9	0.5

## ES 2 538 995 T3

Glucosa liberada (% del peso seco total)			
Corrientes de fibra	Sin proteasa	Proteasa	Porcentaje de mejora
Rastrojo de maíz	15.2	17.4	14.5
Pienso de gluten de maíz	6.0	13.8	130.0
DDG	14	20.4	45.7
DDGS	6.8	12.2	79.4
Pasto varilla	II	14	27.3
Cascarilla de soja	22.0	32.4	47.3
Paja de trigo desmenuzada	10.8	13.8	27.7
Paja de trigo	12.6	17	34.9

### LISTADO DE SECUENCIAS

#### **[0031]**

- 5           <110> Archer-Daniels-Midland Company
- <120> Aumento de la hidrólisis de fibras por adición de proteasa
- <130> CP.0094.PC01 (080687)
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.3
- 10          <210> 1
- < 211> 394
- < 212> PRT
- < 213> Aspergillus saitoi
- <400> 1

# ES 2 538 995 T3

Met	Val	Val	Phe	Ser	Lys	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr
1				5					10					15	
Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Arg	Lys	Gly	Phe	Thr	Ile	Asn
			20					25						30	
Gln	Ile	Ala	Arg	Pro	Ala	Asn	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Asn	Leu	Pro	Gly
		35					40					45			
Leu	Tyr	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Lys	Phe	Gly	Gly	Thr	Val	Pro	Gln	Ser
	50					55					60				
Val	Lys	Glu	Ala	Ala	Ser	Lys	Gly	Ser	Ala	Val	Thr	Thr	Pro	Gln	Asn
65					70					75					80
Asn	Asp	Glu	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu
				85					90						95
His	Leu	Asp	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Trp	Val	Phe	Ser	Asp
			100					105						110	
Glu	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Thr	Gly	His	Asp	Leu	Tyr	Thr	Pro	Ser
		115					120					125			
Ser	Ser	Ala	Thr	Lys	Leu	Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Asp	Ile	Ser	Tyr	Gly
		130				135					140				
Asp	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Arg	Asp	Thr	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Gly	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Gln	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Ser	Lys	Ile
				165					170					175	

ES 2 538 995 T3

Ser Ser Glu Phe Val Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu  
 180 185 190

Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe  
 195 200 205

Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln  
 210 215 220

Leu Lys His Asp Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asp  
 225 230 235 240

Ser Lys Tyr Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Ala Asp Ser Ser Gln  
 245 250 255

Gly Tyr Trp Gly Phe Ser Thr Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Asp Gly Ser  
 260 265 270

Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ser Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu  
 275 280 285

Ile Leu Leu Asp Asp Glu Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Ser  
 290 295 300

Gly Ala Gln Glu Ser Tyr Glu Ala Gly Gly Tyr Val Phe Ser Cys Ser  
 305 310 315 320

Thr Asp Leu Pro Asp Phe Thr Val Val Ile Gly Asp Tyr Lys Ala Val  
 325 330 335

Val Pro Gly Lys Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Val Ser Thr Gly Ser Ser  
 340 345 350

Thr Cys Tyr Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Ser Ile  
 355 360 365

Leu Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asn Ser Glu  
 370 375 380

Gly Pro Lys Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
 385 390

<210> 2  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger  
 <400> 2



# ES 2 538 995 T3

Met Val Val Phe Ser Lys Thr Ala Ala Leu Val Leu Gly Leu Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Val Ser Ala Ala Pro Ala Pro Thr Arg Lys Gly Phe Thr Ile Asn  
 20 25 30  
 Gln Ile Ala Arg Pro Ala Asn Lys Thr Arg Thr Val Asn Leu Pro Gly  
 35 40 45  
 Leu Tyr Ala Arg Ser Leu Ala Lys Phe Gly Gly Thr Val Pro Gln Ser  
 50 55 60  
 Val Lys Glu Ala Ala Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Asp Glu Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu  
 85 90 95  
 His Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Gly Phe Ser Asp  
 100 105 110  
 Glu Leu Pro Ser Ser Glu Gln Thr Gly His Asp Leu Tyr Thr Pro Ser  
 115 120 125  
 Ser Ser Ala Thr Lys Leu Ser Gly Tyr Ser Trp Asp Ile Ser Tyr Gly  
 130 135 140  
 Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Arg Asp Thr Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Val Thr Thr Asn Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser Lys Ile  
 165 170 175  
 Ser Ser Glu Phe Val Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu  
 180 185 190  
 Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe  
 195 200 205  
 Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln  
 210 215 220  
 Leu Lys His Asp Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asp

# ES 2 538 995 T3

225	230	235	240
Ser Lys Tyr Thr	Gly Ser Ile Thr Tyr Thr	Asp Ala Asp Ser Ser	Gln
	245	250	255
Gly Tyr Trp	Gly Phe Ser Thr Asp	Gly Tyr Ser Ile Gly	Asp Gly Ser
	260	265	270
Ser Ser Ser Ser	Gly Phe Ser Ala Ile Ala	Asp Thr Gly Thr Thr	Leu
	275	280	285
Ile Leu Leu Asp Asp	Glu Ile Val Ser Ala His	Tyr Glu Gln Val Ser	
	290	295	300
Gly Ala Gln Glu Ser	Tyr Glu Ala Gly Gly Tyr	Val Phe Ser Cys Ser	
	305	310	315
Thr Asp Leu Pro	Asp Phe Thr Val Val Ile	Gly Asp Tyr Lys Ala Val	
	325	330	335
Val Pro Gly Lys Tyr	Ile Asn Tyr Ala Pro Val Ser	Thr Gly Ser Ser	
	340	345	350
Thr Cys Tyr Gly Gly	Ile Gln Ser Asn Ser Gly	Leu Gly Leu Ser Ile	
	355	360	365
Leu Gly Asp Val Phe	Leu Lys Ser Gln Tyr Val	Val Phe Asn Ser Glu	
	370	375	380
Gly Pro Lys Leu Gly	Phe Ala Ala Gln Ala		
	385	390	
<210> 3			
< 211> 394			
< 212> PRT			
< 213> Aspergillus niger			
<400> 3			
Met Val Val Phe	Ser Lys Thr Ala Ala Leu Val	Leu Gly Leu Ser Ser	
	1	5	10
Ala Val Ser Ala	Ala Pro Ala Pro Thr Arg Lys Gly	Phe Thr Ile Asn	
	20	25	30
Gln Ile Ala Arg	Pro Ala Asn Lys Thr Arg Thr Ile	Asn Leu Pro Gly	
	35	40	45

5

# ES 2 538 995 T3

Met Tyr Ala Arg Ser Leu Ala Lys Phe Gly Gly Thr Val Pro Gln Ser  
50 55 60

Val Lys Glu Ala Ala Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn  
65 70 75 80

Asn Asp Glu Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu  
85 90 95

His Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp  
100 105 110

Glu Leu Pro Ser Ser Glu Gln Thr Gly His Asp Leu Tyr Thr Pro Ser  
115 120 125

Ser Ser Ala Thr Lys Leu Ser Gly Tyr Thr Trp Asp Ile Ser Tyr Gly  
130 135 140

Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Arg Asp Thr Val Thr Val  
145 150 155 160

Gly Gly Val Thr Thr Asn Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser Lys Ile  
165 170 175

Ser Ser Glu Phe Val Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu  
180 185 190

Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe  
195 200 205

Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln  
210 215 220

Leu Lys His Asp Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asp  
225 230 235 240

Ser Lys Tyr Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Ala Asp Ser Ser Gln  
245 250 255

Gly Tyr Trp Gly Phe Ser Thr Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Asp Gly Ser  
260 265 270

Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ser Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu  
275 280 285

ES 2 538 995 T3

Ile Leu Leu Asp Asp Glu Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Ser  
 290 295 300

Gly Ala Gln Glu Ser Glu Glu Ala Gly Gly Tyr Val Phe Ser Cys Ser  
 305 310 315 320

Thr Asn Pro Pro Asp Phe Thr Val Val Ile Gly Asp Tyr Lys Ala Val  
 325 330 335

Val Pro Gly Arg Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Ile Ser Thr Gly Ser Ser  
 340 345 350

Thr Cys Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Ser Ile  
 355 360 365

Leu Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asn Ser Glu  
 370 375 380

Gly Pro Lys Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
 385 390

<210> 4

< 211> 394

< 212> PRT

< 213> Aspergillus niger

<400> 4

Met Val Val Phe Ser Lys Thr Ala Ala Leu Val Leu Gly Leu Ser Ser  
 1 5 10 15

Ala Val Ser Ala Ala Pro Ala Pro Thr Arg Lys Gly Phe Thr Ile Asn  
 20 25 30

Gln Ile Ala Arg Pro Ala Asn Lys Thr Arg Thr Ile Asn Leu Pro Gly  
 35 40 45

Met Tyr Ala Arg Ser Leu Ala Lys Phe Gly Gly Thr Val Pro Gln Ser  
 50 55 60

Val Lys Glu Ala Ala Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn  
 65 70 75 80

Asn Asp Glu Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu  
 85 90 95

His Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp  
 100 105 110

5

ES 2 538 995 T3

Glu Leu Pro Ser Ser Glu Gln Thr Gly His Asp Leu Tyr Thr Pro Ser  
 115 120 125

Ser Ser Ala Thr Lys Leu Ser Gly Tyr Thr Trp Asp Ile Ser Tyr Gly  
 130 135 140

Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Arg Asp Thr Val Thr Val  
 145 150 155 160

Gly Gly Val Thr Thr Asn Lys Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser Lys Ile  
 165 170 175

Ser Ser Glu Phe Val Gln Asn Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu  
 180 185 190

Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe  
 195 200 205

Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln  
 210 215 220

Leu Lys His Asp Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp Asp  
 225 230 235 240

Ser Lys Tyr Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Ala Asp Ser Ser Gln  
 245 250 255

Gly Tyr Trp Gly Phe Ser Thr Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Asp Gly Ser  
 260 265 270

Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ser Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu  
 275 280 285

Ile Leu Leu Asp Asp Glu Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Ser  
 290 295 300

Gly Ala Gln Glu Ser Glu Glu Ala Gly Gly Tyr Val Phe Ser Cys Ser  
 305 310 315 320

Thr Asn Pro Pro Asp Phe Thr Val Val Ile Gly Asp Tyr Lys Ala Val  
 325 330 335

Val Pro Gly Lys Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Ile Ser Thr Gly Ser Ser  
 340 345 350

Thr Cys Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Leu Ser Ile  
 355 360 365

Leu Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asn Ser Glu  
 370 375 380

Gly Pro Lys Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
 385 390  
 <210> 5  
 <211> 320  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus awamori

ES 2 538 995 T3

5

<220>

< 221> misc\_feature

< 222> (257)..(257)

< 223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 5

```

Ser Lys Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Gln Asn Asn Asp Glu Glu Tyr
1          5          10          15

Leu Thr Pro Val Thr Val Gly Lys Ser Thr Leu His Leu Asp Phe Asp
20          25          30

Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp Glu Leu Pro Ser Ser
35          40          45

Glu Arg Thr Gly His Asn Val Tyr Thr Pro Ser Ser Ser Ala Thr Lys
50          55          60

Leu Ser Gly Tyr Thr Trp Asn Ile Ser Tyr Gly Asn Gly Ser Ser Ala
65          70          75          80

Ser Gly Asp Val Tyr Arg Asp Thr Val Thr Val Gly Gly Val Thr Asn
85          90          95

Thr Lys Glu Ala Val Gln Ala Ala Ser Lys Ile Ser Ser Glu Phe Glx
100         105         110

Glx Val Asx Gly Gly Glx Asx Ser Gly Ala Glx Ala Tyr Ser Ser Ile
115         120         125

Asn Thr Val Gln Pro Lys Ala Gln Thr Thr Phe Phe Asp Thr Val Lys
130         135         140
    
```

ES 2 538 995 T3

Ser Gln Leu Asn Ser Pro Leu Phe Ala Val Gln Leu Lys His Asp Ala  
 145 150 155 160

Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asx Asx Ser Lys Tyr Thr Gly  
 165 170 175

Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Ala Asp Ser Ser Glu Gly Tyr Trp Gly Phe  
 180 185 190

Asn Pro Asn Gly Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Ser Ser Ser Gly Phe Ser  
 195 200 205

Ala Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Ile Leu Leu Asp Asp Glu Ile  
 210 215 220

Val Leu Asn Gly Ser Glx Val Ser Gly Gln Ala Asn Gln Glu Ala Asp  
 225 230 235 240

Gly Gly Tyr Val Phe Asx Cys Ser Thr Thr Pro Pro Asp Phe Thr Gly  
 245 250 255

Xaa Ile Gly Asp Tyr Lys Ala Val Gly Pro Lys Tyr Ile Asn Tyr Ala  
 260 265 270

Pro Ser Asx Thr Pro Ser Thr Cys Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser  
 275 280 285

Gly Leu Gly Leu Ser Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu Lys Ser Gln Tyr  
 290 295 300

Val Val Phe Asp Ser Gln Gly Pro Lys Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
 305 310 315 320

<210> 6  
 <211> 395  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus fumigatus  
 <400> 6

Met Val Val Phe Ser Lys Val Thr Ala Val Val Val Gly Leu Ser Thr  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Ala Val Pro Val Val Gln Pro Arg Lys Gly Phe Thr Ile  
 20 25 30

Asn Gln Val Ala Arg Pro Val Thr Asn Lys Lys Thr Val Asn Leu Pro

5

# ES 2 538 995 T3

35	40	45																
Ala Val Tyr	Ala Asn Ala	Leu Thr Lys Tyr Gly Gly Thr Val Pro Asp	50	55	60													
Ser Val Lys	Ala Ala Ala	Ser Ser Gly Ser Ala Val Thr Thr Pro Glu	65	70	75	80												
Gln Tyr Asp	Ser Glu Tyr Leu Thr Pro Val Lys Val Gly Gly Thr Thr	85	90	95														
Leu Asn Leu	Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser	100	105	110														
Ser Glu Leu	Ser Ala Ser Gln Ser Ser Gly His Ala Ile Tyr Lys Pro	115	120	125														
Ser Ala Asn	Ala Gln Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Trp Lys Ile Gln Tyr	130	135	140														
Gly Asp Gly	Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val Thr	145	150	155	160													
Val Gly Gly	Val Thr Ala Gln Ser Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser His	165	170	175														
Ile Ser Ser	Gln Phe Val Gln Asp Lys Asp Asn Asp Gly Leu Leu Gly	180	185	190														
Leu Ala Phe	Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Arg Pro Gln Thr Thr	195	200	205														
Phe Phe Asp	Thr Val Lys Ser Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala Val	210	215	220														
Thr Leu Lys	Tyr His Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Tyr Ile Asp	225	230	235	240													
Asn Ser Lys	Phe Gln Gly Glu Leu Thr Tyr Thr Asp Val Asp Ser Ser	245	250	255														
Gln Gly Phe	Trp Met Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Gly Val Gly Asn Gly	260	265	270														
Ala Pro Asn	Ser Asn Ser Ile Ser Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr	275	280	285														



ES 2 538 995 T3

Leu Leu Leu Leu Asp Asp Ser Val Val Ala Asp Tyr Tyr Arg Gln Val  
290 295 300

Ser Gly Ala Lys Asn Ser Asn Gln Tyr Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys  
305 310 315 320

Ser Thr Lys Leu Pro Ser Phe Thr Thr Val Ile Gly Gly Tyr Asn Ala  
325 330 335

Val Val Pro Gly Glu Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro Val Thr Asp Gly Ser  
340 345 350

Ser Thr Cys Tyr Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser  
355 360 365

Ile Phe Gly Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ser  
370 375 380

Gln Gly Pro Arg Leu Gly Phe Ala Pro Gln Ala  
385 390 395

<210> 7

< 211> 390

< 212> PRT

< 213> Aspergillus oryzae

<400> 7

Met Val Asn Thr Ser Leu Leu Ala Ala Leu Thr Ala Tyr Ala Val Ala  
1 5 10 15

Val Ser Ala Ala Pro Thr Ala Pro Gln Val Lys Gly Phe Ser Val Asn  
20 25 30

Gln Val Ala Val Pro Lys Gly Val Tyr Arg His Pro Ala Ala Gln Leu  
35 40 45

Ala Lys Ala Tyr Gly Lys Tyr His Ala Thr Val Pro Thr Gln Val Ala  
50 55 60

Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ser Val Thr Thr Asn Pro Thr Ser Asn  
65 70 75 80

Asp Glu Glu Tyr Ile Thr Gln Val Thr Val Gly Asp Asp Thr Leu Gly  
85 90 95

5

ES 2 538 995 T3

Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Gln  
 100 105 110

Thr Pro Ser Ser Glu Arg Ser Gly His Asp Tyr Tyr Thr Pro Gly Ser  
 115 120 125

Ser Ala Gln Lys Ile Asp Gly Ala Thr Trp Ser Ile Ser Tyr Gly Asp  
 130 135 140

Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Lys Val Thr Val Gly  
 145 150 155 160

Gly Val Ser Tyr Asp Ser Gln Ala Val Glu Ser Ala Glu Lys Val Ser  
 165 170 175

Ser Glu Phe Thr Gln Asp Thr Ala Asn Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala  
 180 185 190

Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Gln Pro Thr Pro Gln Lys Thr Phe Phe  
 195 200 205

Asp Asn Val Lys Ser Ser Leu Ser Glu Pro Ile Phe Ala Val Ala Leu  
 210 215 220

Lys His Asn Ala Pro Gly Val Tyr Asp Phe Gly Tyr Thr Asp Ser Ser  
 225 230 235 240

Lys Tyr Thr Gly Ser Ile Thr Tyr Thr Asp Val Asp Asn Ser Gln Gly  
 245 250 255

Phe Trp Gly Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Ser Ile Gly Ser Asp Ser Ser  
 260 265 270

Ser Asp Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu  
 275 280 285

Leu Asp Asp Ser Ile Val Asp Ala Tyr Tyr Glu Gln Val Asn Gly Ala  
 290 295 300

Ser Tyr Asp Ser Ser Gln Gly Gly Tyr Val Phe Pro Ser Ser Ala Ser  
 305 310 315 320

Leu Pro Asp Phe Ser Val Thr Ile Gly Asp Tyr Thr Ala Thr Val Pro  
 325 330 335

Gly Glu Tyr Ile Ser Phe Ala Asp Val Gly Asn Gly Gln Thr Phe Gly

ES 2 538 995 T3

5

340 345 350  
 Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly Phe Ser Ile Phe Gly Asp Val  
 355 360 365  
 Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Ser Gly Pro Arg Leu  
 370 375 380  
 Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
 385 390  
 <210> 8  
 < 211> 394  
 < 212> PRT  
 < 213> Penicillium janthinellum  
 <400> 8  
 Met Val Val Phe Ser Lys Ile Thr Val Val Leu Ala Gly Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Val Ala Ser Ala Val Pro Thr Gly Thr Ser Arg Lys Ser Thr Phe Thr  
 20 25 30  
 Val Asn Gln Lys Ala Arg Pro Val Ala Gln Ala Lys Ala Ile Asn Leu  
 35 40 45  
 Pro Gly Met Tyr Ala Ser Ala Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Ala Val Pro  
 50 55 60  
 Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala Glu Ser Gly Thr Ala Val Thr Thr Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Ala Asn Asp Val Glu Tyr Leu Thr Pro Val Asn Val Gly Gly Thr  
 85 90 95  
 Thr Leu Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe  
 100 105 110  
 Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly His Ser Leu Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Ser Ser Asn Ala Thr Lys Leu Ala Gly Tyr Ser Trp Ser Ile Thr  
 130 135 140  
 Tyr Gly Asp Gln Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Phe Val  
 145 150 155 160

ES 2 538 995 T3

Val Val Gly Gly Val Lys Ala Ser Pro Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser  
 165 170 175

Gln Ile Ser Gln Gln Phe Val Asn Asp Lys Asn Asn Asp Gly Leu Leu  
 180 185 190

Gly Leu Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Lys Pro Lys Ser Gln Thr  
 195 200 205

Thr Phe Phe Asp Thr Val Lys Gly Gln Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala  
 210 215 220

Val Thr Leu Lys His Asn Ala Pro Gly Thr Tyr Asp Phe Gly Phe Val  
 225 230 235 240

Asp Lys Asn Lys Tyr Thr Gly Ser Leu Thr Tyr Ala Gln Val Asp Ser  
 245 250 255

Ser Gln Gly Phe Trp Ser Phe Thr Ala Asp Gly Tyr Lys Ile Gly Ser  
 260 265 270

Lys Ser Gly Gly Ser Ile Gln Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu  
 275 280 285

Leu Leu Leu Pro Asp Asn Val Val Ser Asp Tyr Tyr Gly Gln Val Ser  
 290 295 300

Gly Ala Gln Gln Asp Ser Ser Ala Gly Gly Tyr Thr Val Pro Cys Ser  
 305 310 315 320

Ala Gln Leu Pro Asp Phe Thr Val Thr Ile Gly Ser Tyr Asn Ala Val  
 325 330 335

Val Pro Gly Ser Leu Ile Asn Tyr Ala Pro Leu Gln Ser Gly Ser Ser  
 340 345 350

Thr Cys Phe Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile  
 355 360 365

Phe Gly Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala Asn  
 370 375 380

Gly Pro Arg Leu Gly Phe Ala Pro Gln Ala  
 385 390

<210> 9  
 < 211> 395  
 < 212> PRT  
 < 213> Monascus purpureus  
 <400> 9

# ES 2 538 995 T3

Met Val Val Phe Ser Lys Ile Thr Ala Val Ala Ala Gly Phe Ser Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Ala Ala Met Pro Thr Leu Asn Arg Pro Asn Val Lys Ser Phe  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Gln Ser Ala Ile Pro Arg Gln Gln Lys Asn Phe Asn Phe  
 35 40 45  
 Ala Ala Thr Tyr Ala Lys Thr Leu Ala Lys Tyr Gly Gly Gln Ile Pro  
 50 55 60  
 Ala Ser Leu Lys Ala Ala Ala Glu Lys Gly Ser Val Asn Thr Tyr Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Pro Gln Asp Ala Glu Tyr Leu Thr Ala Val Asp Val Gly Gly Thr  
 85 90 95  
 Thr Leu Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe  
 100 105 110  
 Ser Ala Glu Leu Pro Ser Ser Glu Gln Ser Gly His Ala Ile Tyr Lys  
 115 120 125  
 Pro Ser Gly Asn Ala Thr Lys Met Ser Gly Tyr Ser Trp Ser Ile Ser  
 130 135 140  
 Tyr Gly Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ala Gly Ile Thr Ala Pro Arg Gln Ala Val Glu Ala Ala Ser  
 165 170 175  
 Thr Ile Ser Ser Glu Phe Thr Gln Asp Lys Asn Asn Asp Gly Leu Leu  
 180 185 190  
 Gly Leu Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val His Pro Lys Ala Gln Thr  
 195 200 205  
 Thr Trp Phe Asp Thr Val Lys Glu Asp Leu Asp Ser Pro Leu Phe Ala  
 210 215 220

ES 2 538 995 T3

Val Ala Leu Lys His Asn Ala Pro Gly Thr Phe Asp Phe Gly Tyr Val  
225 230 235 240

Asp Lys Ser Lys Tyr Thr Gly Ser Leu Thr Tyr Ala Asp Val Asp Asn  
245 250 255

Ser Gln Gly Phe Trp Gln Phe Thr Ala Asp Ser Tyr Ser Val Gly Ser  
260 265 270

Gln Ser Gly Ser Lys Ser Ile Val Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr  
275 280 285

Leu Leu Leu Leu Pro Asp Asp Val Val Glu Ala Tyr Tyr Lys Gln Val  
290 295 300

Glu Gly Ala Glu Asn Asp Ser Gln Ala Gly Gly Tyr Val Phe Pro Cys  
305 310 315 320

Asp Ser Gln Leu Pro Ser Phe Thr Ala Val Ile Asn Gly Tyr Ser Ala  
325 330 335

Val Val Pro Gly Ser Leu Ile Asn Tyr Ala Ser Ala Gly Asp Gly Ser  
340 345 350

Asn Asn Cys Leu Gly Gly Ile Gln Ser Asp Gln Gly Ile Gly Gln Ala  
355 360 365

Ile Phe Gly Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe Asp Ala  
370 375 380

Asp Gly Pro Arg Leu Gly Phe Ala Pro Gln Ala  
385 390 395

<210> 10

< 211> 397

< 212> PRT

< 213> Penicillium roqueforti

<400> 10

Met Val Val Phe Ser Gln Val Thr Val Ala Leu Thr Cys Phe Ser Ala  
1 5 10 15

Ile Ala Ser Ala Ala Ala Val Arg Gln Glu Pro Pro Gln Gly Phe Thr  
20 25 30

5

# ES 2 538 995 T3

Val Asn Gln Val Gln Lys Ala Val Pro Gly Thr Arg Thr Val Asn Leu  
 35 40 45

Pro Gly Leu Tyr Ala Asn Ala Leu Val Lys Tyr Gly Ala Thr Val Pro  
 50 55 60

Ala Thr Val His Ala Ala Ala Val Ser Gly Ser Ala Ile Thr Thr Pro  
 65 70 75 80

Glu Ala Asp Asp Val Glu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ile Gly Ser Ser  
 85 90 95

Thr Leu Asn Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala Asp Leu Trp Val Phe  
 100 105 110

Ser Ser Glu Leu Thr Ser Ser Gln Gln Ser Gly His Asp Val Tyr Asn  
 115 120 125

Val Gly Ser Leu Gly Thr Lys Leu Ser Gly Ala Ser Trp Ser Ile Ser  
 130 135 140

Tyr Gly Asp Gly Ser Ser Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Asp Thr Val  
 145 150 155 160

Thr Val Gly Gly Val Lys Ala Thr Gly Gln Ala Val Glu Ala Ala Lys  
 165 170 175

Lys Ile Ser Ser Gln Phe Leu Gln Asp Lys Asn Asn Asp Gly Leu Leu  
 180 185 190

Gly Met Ala Phe Ser Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Thr Pro Gln Lys  
 195 200 205

Thr Phe Phe Asp Thr Val Lys Ser Ser Leu Gly Glu Pro Leu Phe Ala  
 210 215 220

Val Thr Leu Gln Gly Thr Gly Arg Pro Trp His Leu Arg Phe Gly Tyr  
 225 230 235 240

Ile Asp Ser Asp Lys Tyr Thr Gly Thr Leu Ala Tyr Ala Asp Val Asp  
 245 250 255

Asp Ser Asp Gly Phe Trp Ser Phe Thr Ala Asp Ser Tyr Lys Ile Gly  
 260 265 270

Thr Gly Ala Ala Gly Lys Ser Ile Thr Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr

ES 2 538 995 T3

275

280

285

Thr Leu Leu Leu Leu Asp Ser Ser Ile Val Thr Gly Leu Leu Gln Glu  
290 295 300

Gly Tyr Pro Gly Ser Gln Asn Ser Ser Ser Ala Gly Gly Tyr Ile Phe  
305 310 315 320

Pro Cys Ser Ala Thr Leu Pro Asp Phe Thr Val Thr Ile Asn Gly Tyr  
325 330 335

Asp Ala Val Val Pro Gly Lys Tyr Ile Asn Phe Ala Pro Val Ser Thr  
340 345 350

Gly Ser Ser Ser Cys Tyr Gly Gly Ile Gln Ser Asn Ser Gly Ile Gly  
355 360 365

Phe Ser Ile Phe Gly Asp Ile Phe Leu Lys Ser Gln Tyr Val Val Phe  
370 375 380

Asp Ser Glu Gly Pro Arg Leu Gly Phe Ala Ala Gln Ala  
385 390 395

<210> 11

< 211> 406

< 212> PRT

< 213> Phaeosphaeria nodorum

<400> 11

Met Pro Ser Phe Thr Tyr Leu Thr Ala Ala Leu Ala Leu Thr Ser Ser  
1 5 10 15

Val Val Ala Ser Pro Val Glu Lys Arg Asp Ala Phe Glu Val Lys Gln  
20 25 30

Val Ala His Gly Leu His Arg Lys Asn Gly Pro Ala Gln Ile Ala Lys  
35 40 45

Thr Leu Arg Lys Tyr Gly Lys Ala Val Pro Ala His Ile Gln Ala Ala  
50 55 60

Ala Asp Asn Asn Ala Val Val Gln Ala Asp Ala Asn Thr Gly Ser Asp  
65 70 75 80

Pro Ala Val Pro Ser Asp Gln Tyr Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Pro Val  
85 90 95

5



ES 2 538 995 T3

Thr Val Gly Thr Ser Thr Val His Leu Asp Phe Asp Thr Gly Ser Ala  
 100 105 110

Asp Leu Trp Val Phe Ser Asp Leu Gln Ala Lys Ser Ser Leu Ser Gly  
 115 120 125

His Asp Tyr Tyr Lys Thr Asp Ala Ser Lys Arg Lys Ser Gly Tyr Thr  
 130 135 140

Trp Lys Ile Ser Tyr Gly Asp Gly Ser Gly Ala Ser Gly Gln Val Tyr  
 145 150 155 160

Thr Asp Lys Val Thr Val Gly Gln Val Thr Ala Thr Ala Gln Ala Val  
 165 170 175

Glu Ala Ala Thr Ser Val Ser Ala Gln Phe Ser Gln Asp Val Asp Thr  
 180 185 190

Asp Gly Leu Leu Gly Leu Ala Met Ser Ser Ile Asn Thr Val Lys Pro  
 195 200 205

Gln Gln Gln Thr Thr Trp Phe Asp Thr Val Lys Ser Gln Leu Ala Lys  
 210 215 220

Pro Leu Phe Ala Val Thr Leu Lys Tyr His Ala Ala Gly Thr Tyr Asp  
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr Ile Asp Ser Ala Lys Tyr Thr Gly Ala Ile Thr Tyr Val  
 245 250 255

Asn Ala Asp Ala Ser Gln Gly Phe Trp Gly Phe Thr Ala Ser Gly Tyr  
 260 265 270

Ser Val Gly Thr Gly Ala Thr Val Ser Ser Ser Ile Ser Gly Ile Leu  
 275 280 285

Asp Thr Gly Thr Thr Leu Met Tyr Val Pro Ala Ala Thr Ala Lys Ala  
 290 295 300

Tyr Tyr Ala Lys Val Ser Gly Ala Lys Leu Asp Ser Thr Gln Gly Gly  
 305 310 315 320

Tyr Val Phe Pro Cys Ser Ala Thr Leu Pro Asn Phe Ser Ile Thr Val  
 325 330 335

ES 2 538 995 T3

Ala Gly Val Lys Gln Thr Val Pro Gly Lys Tyr Ile Asn Tyr Ala Pro  
340 345 350

Ile Thr Asp Gly Ser Ser Thr Cys Phe Gly Gly Met Gln Pro Asp Thr  
355 360 365

Asp Ile Gly Gln Ser Ile Phe Gly Asp Ile Phe Leu Lys Ser Lys Tyr  
370 375 380

Ile Val His Asp Met Ser Asn Gly Thr Pro Arg Leu Gly Phe Ala Gln  
385 390 395 400

Gln Ala Gly Val Ser Ser  
405

<210> 12

< 211> 405

< 212> PRT

< 213> Trichoderma asperellum

<400> 12

Met Gln Thr Phe Gly Ala Phe Leu Val Ser Phe Leu Ala Ala Ser Gly  
1 5 10 15

Met Ala Ala Ala Leu Pro Ala Glu Gly Gln Gln Lys Thr Ile Ser Val  
20 25 30

Pro Val Ile Tyr Asn Ala Asn His Ala Pro His Gly Pro Ser Ala Leu  
35 40 45

Tyr Lys Ala Lys Lys Lys Phe Gly Ala Pro Ile Ser Glu Ser Leu Lys  
50 55 60

Asn Asn Val Ala Gln His Lys Ala Ala Lys Leu Ala Arg Arg Gln Thr  
65 70 75 80

Gly Ser Ala Pro Asn His Pro Ser Asp Ser Glu Asp Asp Glu Tyr Ile  
85 90 95

Thr Asn Val Ser Ile Gly Thr Pro Ala Gln Val Leu Pro Leu Asp Phe  
100 105 110

Asp Thr Gly Ser Ser Asp Leu Trp Val Phe Ser Ser Glu Thr Pro Ser  
115 120 125

Ser Gln Ala Lys Gly His Thr Leu Tyr Asn Pro Thr Lys Ser Ser Thr  
130 135 140

5

ES 2 538 995 T3

Ser Lys Lys Leu Ser Gly Tyr Ser Trp Thr Ile Ser Tyr Gly Asp Gly  
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Gly Asp Val Tyr Thr Asp Thr Val Ser Val Gly Gly  
 165 170 175

Phe Ser Val Thr Gly Gln Ala Val Glu Ser Ala Thr Lys Val Ser Ser  
 180 185 190

Glu Phe Val Ser Asp Thr Ser Asn Ser Gly Leu Leu Gly Leu Ala Leu  
 195 200 205

Asp Ser Ile Asn Thr Val Ser Pro Lys Gln Gln Lys Thr Trp Phe Ser  
 210 215 220

Asn Ala Ser Ser Lys Leu Ala Gln Pro Val Phe Thr Ala Asp Leu\*Asn  
 225 230 235 240

His Gln Ala Ser Gly Ser Tyr Asn Phe Gly Tyr Ile Asp Thr Ser Leu  
 245 250 255

Ala Ser Gly Pro Ile Ser Tyr Val Pro Ile Ser Thr Ala Asn Gly Phe  
 260 265 270

Trp Glu Phe Thr Ser Ala Ser Tyr Ala Ile Gly Ser Gly Ser Thr Lys  
 275 280 285

Lys His Ser Thr Asp Gly Ile Ala Asp Thr Gly Thr Thr Leu Leu Leu  
 290 295 300

Leu Asp Asp Thr Ile Val Asp Ala His Tyr Gly Gln Val Ser Ser Ala  
 305 310 315 320

Gln Tyr Asp Asn Ser Gln Glu Gly Tyr Thr Phe Asp Cys Asp Glu Asn  
 325 330 335

Leu Pro Ser Phe Thr Phe Ala Val Gly Ser Ser Lys Ile Thr Val Pro  
 340 345 350

Gly Ser Leu Ile Asn Phe Ala Pro Val Ser Gly Asn Thr Cys Phe Gly  
 355 360 365

Gly Leu Gln Ser Asn Asp Gly Ile Gly Ile Asn Ile Phe Gly Asp Val  
 370 375 380

Ala Ile Lys Ala Ala Leu Val Val Phe Asp Leu Gly Asn Lys Arg Leu  
 385 390 395 400

Gly Trp Ala Gln Lys  
 405

## REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la cantidad de glucosa y otros azúcares y péptidos liberados de una materia prima de fibra que comprende:
- 5 (a) hacer reaccionar una materia prima de fibra con una mezcla de reactivos que contenga al menos una proteasa y al menos un elemento del grupo que consiste en celulasa y hemicelulasa, donde la proteasa se elige del grupo que consiste en proteasas aspárticas de mohos que son miembros de los géneros de los hongos Ascomycetes representados por el género *Aspergillus* y tiene una secuencia de aminoácidos al menos más de 70% idéntica a SEQ ID NO: 1 y se retiene una actividad de proteasa y es adicional a cualquier proteasa endógena con la celulasa o hemicelulasa; y
- 10 (b) obtener un producto de reacción de dicha materia prima de fibra y dicha mezcla de reactivos que contiene glucosa, donde la cantidad de glucosa en el producto de reacción (medida como porcentaje de la masa de la materia prima de fibra) es mayor que la cantidad de glucosa obtenida de la reacción de la materia prima de fibra en las mismas condiciones que la reacción del paso (a), pero con al menos un elemento elegido del grupo que consiste en celulasa y hemicelulasa y excluida la proteasa.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde dicha mezcla no incluye amilasa.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, donde dicha proteasa tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, donde dicha proteasa se elige del grupo que consiste en proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi*.
5. El método de la reivindicación 4, donde dicha proteasa es la proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi*, dicha proteasa aspártica de *Aspergillus saitoi* tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, donde dicha materia prima de fibra se elige del grupo que consiste en rastrojo de maíz, pienso de gluten de maíz (CGF), granos secos de destilería (DDG), granos secos de destilería con solubles (DDGS), pasto varilla, cascarilla de soja, paja de trigo desmenuzada y paja de trigo.
7. El método de la reivindicación 1, donde dicha materia prima de fibra contiene menos de 20% en peso de almidón.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, donde dicha mezcla de reactivos comprende celulasa, y donde dicha celulasa comprende una o más de endo- $\beta$ -1,4 glucanasas, exocelobiohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasa (celobiasa) y exoglucanasas.
9. El método de la reivindicación 1, donde dicha mezcla de reactivos comprende hemicelulasa, y dicha hemicelulasa comprende una o más de endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -endomananasa,  $\beta$ -manosidasa, pectina liasa, pectato liasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasas,  $\alpha$ / $\beta$ -galactosidasas y varias esterases.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, donde dicho producto de reacción comprende además arabinosa, xilosa, galactosa, manosa, celulobiosa, maltosa y maltotriosa.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad de glucosa en el producto de reacción (medida como porcentaje de la masa de la materia prima de fibra) es mayor que la cantidad de glucosa obtenida de la reacción de la materia prima de fibra en al menos 100%.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad de glucosa en el producto de reacción (medida como porcentaje de la masa de la materia prima de fibra) es mayor que la cantidad de glucosa obtenida de la reacción de la materia prima de fibra en al menos 20%.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, donde dicha proteasa tiene una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 60 14. Un método para obtener una fibra hidrolizada sólida para la producción de bioaceite, que comprende:
- (a) preparar un producto de reacción de acuerdo con la reivindicación 1; y
- (b) separar dicho producto de reacción en una fracción de fibra hidrolizada sólida y una fracción líquida; y usar la fibra hidrolizada sólida en un proceso para la producción de bioaceite.