(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 480**

(51) Int. CI.:

C12P 19/14 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 29/00 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A61K 31/7034 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C07H 15/203 (2006.01)
C07H 17/065 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008 E 14150736 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2728008**

(54) Título: **Método para la glicosilación de compuestos flavonoides**

(30) Prioridad:

19.01.2007 JP 2007010766

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

(73) Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

(72) Inventor/es:

OCHIAI, MISA;
FUKAMI, HARUKAZU;
NAKAO, MASAHIRO y
NOGUCHI, AKIO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Método para la glicosilación de compuestos flavonoides

Campo técnico

La presente invención se refiere a la glicosilación de compuestos flavonoides. Los glicósidos de compuestos flavonoides obtenidos mediante la presente invención se pueden utilizar con fines alimentarios, farmacéuticos y cosméticos.

Técnica anterior

La proantocianidina (extracto de semilla de uva) se ha estudiado por su utilidad como agente terapéutico para los vasos sanguíneos, y una de las razones de los recientes avances en estos estudios es que la sustancia diana puede servir como marcador para el seguimiento de la absorción y el metabolismo *in vivo*, ya que es estable frente al calor y los ácidos, altamente soluble en agua y altamente absorbible en el organismo. Por el contrario, los compuestos polifenólicos, tales como la catequina son a menudo difíciles de disolver en agua, y también implican el problema de que son menos absorbibles en el organismo.

Se han realizado intentos de desarrollar una técnica para la glicosilación de la catequina y de otros compuestos, con el objetivo de mejorar su solubilidad en agua y aumentar su estabilidad.

A modo de ejemplo, el Documento de Patente 1 describe una α-glucosidasa con un peso molecular de aproximadamente 57.000, que se recogió a partir de una solución de cultivo de Xanthomonas campestris WU-9701. Esta enzima utiliza maltosa o similar como donador (no usa maltotriosa, ciclodextrina o almidón como donador) y transfiere la glucosa a un aceptor específico para sintetizar un glicósido. En este documento, los compuestos enumerados como aceptores son aquellos que tienen un grupo hidroxilo alcohólico (p. ej., mentol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol isobutílico, alcohol 1-amílico, alcohol 2-amílico, alcohol 5-nonílico), así como los que tienen un grupo hidroxilo fenólico (p. ej., capsaicina, dihidrocapsaicina, vainillilamida de ácido nonílico, catequina, epicatequina, vainillina, hidroquinona, catecol, resorcinol, 3,4-dimetoxifenol). Por otra parte, los glicósidos cuya producción fue confirmada realmente son sólo monoglicósidos.

El Documento de Patente 2 describe un método en el que una mezcla de un compuesto de catequina y glucosa-1-fosfato o sacarosa se tratan con sacarosa fosforilasa para preparar un glicósido del compuesto de catequina. Las fuentes de sacarosa fosforilasa enumeradas en el mismo son Leuconostoc mesenteroides, Pseudomonas saccharophila, Pseudomonas putrefaciens, Chlostridium pasteurianum, Acetobacter xylinum y Pullularia pullulans. Del mismo modo, los compuestos de catequina enumerados como aceptores son (+)-catequina, (-)-epicatequina, 3-O-galato de (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina y 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, pero sólo la (+)-catequina se utiliza en realidad como un aceptor para preparar 3'-O-α-D-glucopiranósido de (+)-catequina en la sección de Ejemplos.

El Documento de Patente 3 describe derivados de 3-O-galato de epigalocatequina, en los que un residuo de glucosa o un residuo de maltooligosacárido con un grado de polimerización de 2 a 8 está unido a al menos una de las posiciones 5, 7, 3', 4', 5', 3", 4" y 5". Como en el caso del Documento de Patente 2, la sección de Ejemplos del Documento de Patente 3 describe en realidad solamente un caso en el que una mezcla de galato de (-)-epigalocatequina y glucosa-1-fosfato o sacarosa se trató con sacarosa fosforilasa para preparar (-)-galato de 4'-O-α-D-glucopiranosil-epigalocatequina y (-)-galato de 4',4"-O-α-D-diglucopiranosil-epigalocatequina.

El Documento de Patente 4 describe los extractos de té o bebidas de té cuyo sabor astringente se reduce mediante la glicosilación de los polifenoles contenidos en el mismo. Para reducir el sabor astringente de los extractos de té o las bebidas de té, este documento describe procedimientos detallados en el que los extractos de té o bebidas de té se complementan con dextrina, ciclodextrina, almidón o una mezcla de los mismos, y después se tratan con ciclomaltodextrina glucanotransferasa. En la sección de Ejemplos, se demuestra que un extracto de té verde y α-ciclodextrina fueron tratados con ciclomaltodextrina glucanotransferasa derivada de Bacillus stearothermophilus para proporcionar un producto de reacción con una reducción del sabor astringente, que a su vez indica que los polifenoles tales como 3-O-galato de epigalocatequina y epicatequina se habían glicosilado. Sin embargo, este documento no muestra la estructura detallada del producto de reacción.

El Documento de Patente 5 describe los glicósidos de compuestos de catequina en los que la glicosilación se produce en la posición 3', en las posiciones 3' y 5, o en las posiciones 3' y 7. Para este fin, este documento describe los procedimientos detallados en los que un compuesto de catequina y dextrina, ciclodextrina, almidón o una mezcla de los mismos se tratan con ciclomaltodextrina glucanotransferasa derivada de Bacillus stearothermophilus, como en el caso del Documento de Patente 4. Además, en los ejemplos que utilizan dextrina como donador de glicosilo en los procedimientos anteriores, se considera que algunos de los glicósidos resultantes de (-)-epigalocatequina, 3-O-

galato de (-)-epigalocatequina y 3-O-galato de (-)-epicatequina tienen de 6 a 8 residuos de glucosa de media por molécula de cada polifenol, determinado a partir de sus coeficientes de absorción molar. Además, se confirmó que tras el tratamiento con glucoamilasa derivada de Rhizopus niveus, los glicósidos obtenidos por los procedimientos anteriores generaban 3',7-di-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, 3',5-di-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, 3-O-galato de 3',7-di-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, 3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, (-)-3'-O-α-D-glucopiranosil-galocatequina y 3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epicatequina.

En cuanto a los efectos proporcionados por los glicósidos de catequina, el Documento No de Patente 1 describe la reducción del sabor astringente, el aumento de la solubilidad en agua, la mejora de la estabilidad y la tirosinasa inhibida, mientras que el Documento No de Patente 2 describe la supresión de la mutagenicidad.

Por otra parte, anteriormente se ha descrito un nuevo enfoque enzimático para la síntesis de glicósidos flavonoides y sus ésteres (Documento No Relacionado con Patentes 3).

Por otra parte, el Documento Relacionado con Patentes 6 describe un método para producir un glicósido derivado fenólico en presencia de una alfa-amilasa maltógena.

Adicionalmente, la producción de alfa-amilasa y glicoamilasa por un nuevo producto aislado de Trichoderma sp. utilizando almidón de sorgo como fuente de carbono se ha descrito recientemente (Documento No Relacionado con Patentes 4), mientras que el Documento 5 No Relacionado con Patentes ha descrito recientemente la producción de alfa-amilasa y glicoamilasa de diferentes almidones por un nuevo producto aislado de Trichoderma sp.

Además, la degradación del almidón por el moho Trichoderma viridae y el mecanismo de degradación del almidón se han descrito previamente en el Documento No Relacionado con Patentes 6.

Documento Relacionado con Patentes 1: JP 2001-46096 A
Documento Relacionado con Patentes 2: JP 05-176786 A (Patente japonesa No. 3024848)
Documento Relacionado con Patentes 3: JP 07-10897 A (Patente japonesa No. 3071610)
Documento Relacionado con Patentes 4: JP 08-298930 A (Patente japonesa No. 3579496)
Documento Relacionado con Patentes 5: JP 09-3089 A (Patente japonesa No. 3712285)
Documento Relacionado con Patentes 6: US-A1-2003/082751
Documento No Relacionado con Patentes 1: Biosci. Biotech. Biochem., 57 (10), 1666-1669 (1993)
Documento No Relacionado con Patentes 2: Biosci. Biotech. Biochem., 57 (10), 1290-1293 (1993)
Documento No Relacionado con Patentes 1: Biosci. Biotechnology Biochem., 57(10), 1666-1669 (1993)
Documento No Relacionado con Patentes 2: Biosci. Biotechnology Biochem., 57(10), 1290-1293 (1993)
Documento No Relacionado con Patentes 3: Biotechnology and Bioengineering, 71 (3), 235-243 (2003)
Documento No Relacionado con Patentes 4: Engineering in Life Sciences, 4(4), 369-372 (2004)
Documento No Relacionado con Patentes 5: Annals of Microbiology, 54(2), 169-180 (2004)
Documento No Relacionado con Patentes 6: Antonie van Leeuwenhoek, 42(3), 229-238 (1976)

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Estas técnicas de glicosilación no pueden considerarse suficientes en términos de propiedades de las enzimas utilizadas en las mismas, incluyendo la especificidad de los donadores de glicosilo, la especificidad para los compuestos que pueden estar glicosilados, la eficacia de la glicosilación, etc. Por lo tanto, ha habido una demanda de una técnica de preparación que permita la glicosilación de una variedad más amplia de compuestos flavonoides, y de glicósidos de flavonoides.

Medios para resolver los problemas

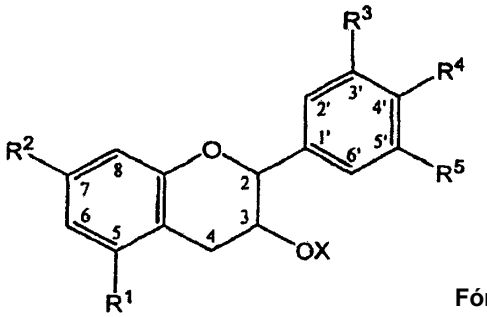
Los autores de la presente invención han realizado esfuerzos extensivos e intensivos para desarrollar una técnica de glicosilación de los compuestos flavonoides incluyendo la catequina. Como resultado, los autores de la presente invención han encontrado que la α-amilasa del género Trichoderma tiene actividad de glicosilación de flavonoides, completando de ese modo la presente invención.

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se relaciona con los siguientes apartados.

1. Un método para preparar un glicósido de un compuesto de flavonoide, que comprende la etapa de tratar el compuesto flavonoide y un donador de glicosilo con una α-amilasa del género Trichoderma, en donde el

compuesto flavonoide es un compuesto de catequina o un derivado metilado del mismo en el que H en al menos un grupo OH se reemplaza por metilo; y
en donde el donador de glicosilo es maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, dextrina, γ-ciclodextrina o almidón soluble; y
en donde el glicósido del compuesto flavonoide se representa mediante la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



Fórmula (I)

en donde

al menos uno de R1 a R4 representa un residuo de glucosa unido a α, y cada uno de los otros representa OH;
R5 representa OH o H; y
X representa H o un grupo galoilo.

2. El método de acuerdo con el apartado 1, en donde el género Trichoderma es Trichoderma viride o Trichoderma reesei.
3. El método de acuerdo con el artículo 1 o 2, en edonde el glicósido del compuesto flavonoide se selecciona del grupo que consiste en:

5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina;
4'O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
4'-O-α-D-glucopiranosil)-catequina;
3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina; 3'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina; y
3-O-galato de 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina.

4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 3, en donde la α-amilasa está inmovilizada.

[Compuestos flavonoides]

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "compuesto flavonoide" incluya flavonoides.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "flavonoide" signifique un compuesto de catequina (flavanol), así como un derivado metilado del mismo. El flavonoide incluye naringenina, quercetina, daidzeína, genisteína y kaempferol. El flavonoide disponible para su uso en la presente invención puede ser de origen natural o sintético.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "compuesto de catequina" se utiliza en un sentido amplio para significar un derivado polioxilado de 3-oxiflavano, a menos que se especifique lo contrario. Este incluye catequina, galocatequina y derivados 3-galoilo de las mismas, así como isómeros ópticos (isómeros (+), (-), (+)-epi y (-)-epi) y racematos de los mismos. Los ejemplos específicos incluyen catequina, galocatequina (GC), galato de catequina (3-O-galato de catequina; CG), galato de galocatequina (3-O-galato de galocatequina; GCG), epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (3-O-galato de epicatequina; ECG) y galato de epigalocatequina (3-O-galato de epigalocatequina; EGCG), así como los isómeros ópticos de los mismos. Los derivados metilados de los compuestos de catequina se refieren a derivados de los compuestos de catequina anteriores, en los que el H de al menos un grupo OH es sustituido por metilo. Los ejemplos de los derivados metilados de los compuestos de

catequina incluyen los que tienen metilo en lugar de H en el grupo OH localizado en cualquiera de las posiciones 3', 4', 3" y 4" de epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina o galato de epigalocatequina. Los compuestos catequina y sus derivados metilados disponibles para uso en la presente invención pueden ser de origen natural o sintético. Los ejemplos de origen natural incluyen extractos de té, productos concentrados y purificados de los mismos (p. ej., extractos de té verde, tales como Teavigo (DSM Nutrition Japón), Polyphenon (Mitsui Norin Co., Ltd., Japón) y Sunphenon (Taiyo Kagaku Co., Ltd., Japón)), así como extractos de un cultivar de té "Benifuki."

En la presente invención, los compuestos flavonoides se pueden utilizar solos o combinados.

[Agentes enzimáticos]

La presente descripción utiliza un agente enzimático que tiene actividad de glicosilación y que es una α-amilasa del género Trichoderma. El género Trichoderma incluye Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma ghanense, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum y Trichoderma polysporum.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "agente enzimático" se puede utilizar para significar o bien una sola enzima o bien una mezcla de múltiples enzimas, a menos que se especifique lo contrario. Aunque un semejante agente enzimático comprende al menos una α-amilasa que tiene actividad de glicosilación, puede comprender, además, otras enzimas glucosidasa, tales como las utilizadas como celulasa o glucanasa (p. ej., β-1,3-glucanasa). Por otra parte, el agente enzimático de la presente invención puede comprender un aditivo apropiado, además del componente enzimático. Los ejemplos incluyen excipientes, aglutinantes, agentes disgregantes, estabilizantes, tampones y conservantes.

Los agentes enzimáticos disponibles para su uso en la presente invención tienen al menos actividad de glicosilación (transglicosilación).

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "actividad de glicosilación" signifique que tiene la capacidad de transferir un residuo de azúcar a un compuesto flavonoide. Para confirmar si una enzima tiene la capacidad de transferir un residuo de azúcar a un compuesto flavonoide, a menos que se especifique lo contrario, se puede poner en contacto una mezcla de flavonoides (p. ej., catequina) y un donador de glicosilo apropiado (p. ej., dextrina) con la enzima diana y hacerla reaccionar durante un período suficiente de tiempo, seguido del análisis de la solución de reacción a través de una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) u otras técnicas, por ejemplo como se muestra en la sección de Ejemplos descrita más adelante.

El agente enzimático descrito en la presente memoria puede tener no sólo la actividad de glicosilación, sino también una actividad adicional, tal como actividad dextrinasa. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "dextrinasa" signifique una enzima capaz de hidrolizar los hidratos de carbono que contienen enlaces α-glicósido (p. ej., almidón, dextrina), a menos que se especifique lo contrario. La dextrinasa es un tipo de amilasa. Para determinar si una diana tiene actividad dextrinasa, se puede tratar una dextrina disponible en el mercado (p. ej., almidón hidrolizado con un ácido, calor o una enzima para que tenga un peso molecular medio de aproximadamente 3500) con la diana en condiciones apropiadas para examinar si la dextrina se hidroliza. Los expertos en la técnica diseñarán condiciones apropiadas para la reacción con una diana y los procedimientos para determinar si la dextrina se hidroliza.

Según se describe en la presente memoria, los agentes enzimáticos que pueden ser preferidos para su uso son aquellos que tienen actividad de glicosilación y que son una α-amilasa del género Trichoderma. En la presente invención, los agentes enzimáticos que pueden ser eficaces para su uso son α-amilasas de Trichoderma viride. De acuerdo con los estudios de los autores de la invención, se ha encontrado que diversas α-amilasas del género Trichoderma tienen actividad de glicosilación, y que tales agentes enzimáticos pueden ser eficaces para su uso en la glicosilación de los compuestos flavonoides. Por ejemplo, en la presente invención, es posible utilizar agentes enzimáticos comercialmente disponibles, tales como los enumerados en la Tabla 1 del Ejemplo 2 descrito más adelante.

Alternativamente, para su uso como agentes enzimáticos, los expertos en la técnica pueden aislar y purificar glicosiltransferasas a partir de cultivos de las especies que pertenecen al género Trichoderma (p. ej., Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma ghanense, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum o Trichoderma polysporum) mediante el uso de técnicas convencionales. Entre tales glicosiltransferasas, es particularmente preferida una glicosiltransferasa obtenida del sobrenadante del cultivo de Trichoderma viride cepa IAM5141 (en la presente memoria también se refiere como "TRa2") o un homólogo de la misma, es decir, una proteína que comprende (i), (j) o (k) mostrada a continuación (preferiblemente una proteína que consiste en (i), (j) o (k) mostrada a continuación):

(i) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10;

(j) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10 y que tiene actividad de glicosilación sobre un compuesto flavonoide; o
(k) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de al menos 60% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 10 y que tiene actividad de glicosilación sobre un compuesto flavonoide.

Otro ejemplo particularmente preferido es una proteína madura de la nueva proteína glicosiltransferasa anterior o un homólogo de la misma, que está modificada para eliminar una supuesta región de secuencia señal de secreción, es decir, una proteína que comprende (p), (q) o (r) mostrada a continuación (preferiblemente una proteína que consiste en (p), (q) o (r) mostrada a continuación):

(p) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 26;
(q) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 26 y que tiene actividad de glicosilación sobre un compuesto flavonoide; o
(r) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de al menos 60% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 26 y que tiene actividad de glicosilación sobre un compuesto flavonoide.

El SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica TRa2 como una proteína madura, es decir, una secuencia de nucleótidos que abarca los nucleótidos 61-1389 del SEC ID NO: 9. Del mismo modo, el SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos de TRa2 como una proteína madura, es decir, una secuencia de aminoácidos que abarca los aminoácidos 21-463 del SEQ ID NO: 10.

Además, la siguiente proteína puede ser presentada como un ejemplo de glicosiltransferasas:

una proteína que tiene actividad de glucosilación sobre un compuesto flavonoide, que está codificada por un polinucleótido que deriva del género Trichoderma (preferiblemente Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma ghanense, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum o Trichoderma polysporum) y que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NO: 11-24.

Un ejemplo preferido de semejante proteína es una proteína que tiene actividad de glucosilación sobre un compuesto flavonoide, que está codificada por un polinucleótido que comprende una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NO: 11 a 24 y que comparte una elevada identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NO: 6, 9 o 25.

Cabe señalar que la expresión "secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o varios aminoácidos, según se utiliza en la presente memoria no proporciona ninguna limitación sobre el número de aminoácidos que se van a sustituir, suprimir, insertar y/o añadir, con tal que la proteína que tiene semejante secuencia de aminoácidos tenga las funciones deseadas. El número de tales aminoácidos es de alrededor de 1 a 9 o de alrededor de 1 a 4, o alternativamente, un número mayor de aminoácidos puede ser sustituido, eliminado, insertado y/o añadido, siempre que semejante mutación proporcione un aminoácido funcionalmente similar. Los medios para preparar una proteína que tiene semejante secuencia de aminoácidos son bien conocidos para los expertos en la técnica. La búsqueda y análisis de la identidad entre secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede llevarse a cabo utilizando cualquier algoritmo o programa (p. ej., BLASTN, BLASTX, BLASTP, ClustalW) bien conocidos por los expertos en la técnica. En el caso de la utilización de un programa, los parámetros pueden ser ajustados según se requiera por los expertos en la técnica, o alternativamente, se pueden utilizar los parámetros por defecto específicos para cada programa. Los procedimientos detallados para este tipo de análisis son bien conocidos por los expertos en la técnica. Según se utiliza en la presente memoria para describir una secuencia de nucleótidos, el término "alta identidad" se refiere a una identidad de secuencia de al menos 60% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 90% o más, y lo más preferiblemente 95% o más. Según se utiliza en la presente memoria para describir una secuencia de aminoácidos, el término "alta identidad" se refiere a una identidad de secuencia de al menos 60% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 90% o más, y lo más preferiblemente 95% o más.

Como se describe en la presente memoria, las glicosiltransferasas se pueden utilizar solas o combinadas.

[Donadores de glicosilo]

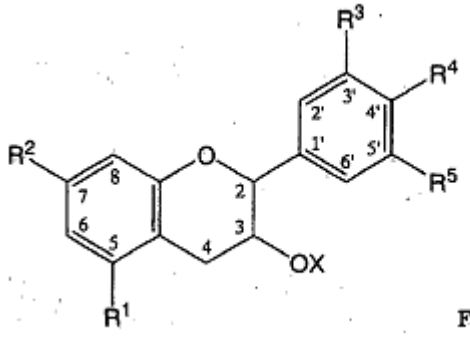
Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "donador de glicosilo" signifique un hidrato de carbono que puede servir como un sustrato para una enzima en el método de la presente invención y puede ser

hidrolizado para proporcionar un residuo de azúcar a un compuesto flavonoide, a menos que se especifique lo contrario. Los donadores de glicosilo disponibles para su uso en la presente invención son los hidratos de carbono seleccionados entre maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, dextrina, γ-ciclodextrina y almidón soluble. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "dextrina" signifique un producto hidrolizado de almidón, a menos que se especifique lo contrario, mientras que se pretende que el término "almidón soluble" signifique un producto hidrolizado de almidón, que es soluble en agua caliente, a menos que se especifique lo contrario. La hidrólisis puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquier medio tal como un ácido, calor o una enzima. En la presente invención, es posible utilizar un producto hidrolizado que tenga un peso molecular medio de aproximadamente 3500 como un ejemplo de dextrina y un producto hidrolizado que tenga un peso molecular medio de aproximadamente 1.000.000 como un ejemplo de almidón soluble.

[Glicósidos]

Los glicósidos de compuestos flavonoides descritos en la presente memoria tienen la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



Fórmula (I)

en donde

al menos uno de R^1 a R^5 representa un residuo de azúcar, y cada uno de los otros representa OH o OCH_3
o
al menos uno de R^1 a R^4 representa un residuo de azúcar y cada uno de los otros representa OH o OCH_3 y R^5 representa H; y
X representa H, CH_3, un grupo galoilo o un grupo galoilo metilado.

La presente invención abarca la preparación de compuestos flavonoides de Fórmula (I), en donde
al menos uno de R^1 a R^4 representa un residuo de glucosa unido a α, y cada uno de los otros representa OH;
R^5 representa OH o H; y
X representa H o un grupo galoilo.

La presente invención abarca los glicósidos de compuestos flavonoides enumerados a continuación:

5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-a-D-glucopiranosil)-(-)epigalocatequina;
4'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina; y
3-O-galato de 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina.

Los glicósidos de compuestos flavonoides obtenidos mediante la presente invención pueden tener mayor solubilidad en agua en comparación con sus correspondientes compuestos flavonoides. Por ejemplo, la 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina muestra una solubilidad al menos 40 veces mayor o más que la (+)-catequina, y también se confirmó que el 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina tenía una solubilidad significativamente mayor si se comparaba con el 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (véase la sección de Ejemplos). Por otra parte, la glicosilación de los compuestos flavonoides también puede contribuir a la modificación del sabor de compuestos flavonoides. Por ejemplo, tras la glicosilación de un extracto de té verde rico en 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, se ha confirmado

que el producto glicosilado y los componentes de glicósido individuales purificados de manera uniforme (es decir, 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, 3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina y 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina) muestran cada uno un nivel significativamente menor de sabor astringente que el producto no glicosilado. Del mismo modo, los análisis sensoriales realizados por panelistas también han proporcionado los resultados de la evaluación que indican una reducción sabores amargos y astringentes y por lo tanto, un aumento de potabilidad. Además, los estudios de los autores de la invención han demostrado que la 4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina es más estable frente al calor que la catequina. Por lo tanto, los glicósidos de compuestos flavonoides obtenidos mediante la presente invención pueden tener una mayor estabilidad térmica en comparación con sus correspondientes compuestos flavonoides.

Por lo tanto, se describe un método para modificar un compuesto flavonoide, que comprende la etapa de tratar el compuesto flavonoide y un donador de glicosilo con un agente enzimático que tiene actividad de glicosilación y que es una deriva del género Trichoderma (preferiblemente Trichoderma viride o Trichoderma reesei). Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "modificar (modificando)" o "modificación" signifique al menos uno de los siguientes: aumento de la solubilidad en agua, mejor sabor y mayor estabilidad.

También en el método de modificación descrito en la presente memoria, los ejemplos de compuestos flavonoides incluyen compuestos de catequina o derivados metilados de los mismos, mientras que ejemplos de donadores de glicosilo incluyen hidratos de carbono que contienen un residuo de maltotriosa (preferiblemente maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, dextrina, γ-ciclodextrina o almidón soluble). Con el objetivo de aumentar la solubilidad en agua de los compuestos flavonoides, se utilizan agentes enzimáticos que tienen actividad de glicosilación y que son una α-amilasa del género Trichoderma, o alternativamente, pueden ser eficaces para su uso los de Trichoderma viride y utilizados como celulasa o β-1,3-glucanasa. La explicación para cada término se ha descrito anteriormente.

[Propiedades enzimológicas de la glicosiltransferasa de la presente invención]

Entre las glicosiltransferasas contenidas en agentes enzimáticos disponibles para su uso en la presente invención, es particularmente preferido una glicosiltransferasa derivada de Trichoderma viride o Trichoderma reesei. Esta enzima tiene las siguientes características enzimológicas en la reacción entre el flavonoide y el donador de glicosilo.

Selectividad del donador de glicosilo:

En las condiciones que se muestran en la sección de Ejemplos, esta enzima utiliza, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, almidón soluble, dextrina, y γ-ciclodextrina como donador de glicosilo, pero no elige como diana celobiosa, dextrano, monohidrato de maltosa, sal de sodio de carboximetilcelulosa, Isomaltooligosacárido, α-ciclodextrina, β-ciclodextrina o similares como donador de glicosilo. Por otra parte, esta enzima es una glicosiltransferasa capaz de producir no sólo azúcares constituidos por una o dos moléculas de glucosa, si no también glicósidos cuya longitud de la cadena de azúcar es de tres (G3) o más moléculas de glucosa.

Especificidad de sustrato:

Esta enzima puede actuar sobre, y glicosilar, una amplia gama de polifenoles incluyendo miembros principales de los flavonoides tales como catequina, galato de epigalocatequina, naringenina, quercetina, daidzeína, genisteína y kaempferol, así como esculetina.

pH y temperatura óptimos de la reacción:

Esta enzima permite una reacción satisfactoria a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0, particularmente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5, o a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 55°C, particularmente de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, bajo las condiciones que se muestran en la sección de Ejemplos.

[Usos de los glicósidos]

Los glicósidos obtenidos mediante la presente invención se pueden utilizar como composiciones alimenticias, composiciones farmacéuticas o composiciones cosméticas. Más específicamente, por ejemplo, semejante composición que incorpora un glicósido de un compuesto de catequina se puede utilizar como un agente para los siguientes fines, como en el caso de catequina: anti-alérgico, anti-oxidante, anti-canceroso, anti-inflamatorio, anti-bacterias/anticaries, anti-virus, desintoxicante, mejora de la flora intestinal, eliminación del olor, anti-hipercolesterolemia, anti-hipertensión, anti-hiperglucemia, anti-trombosis, prevención de la demencia, quema de grasa corporal, inhibición de la acumulación de grasa corporal, mejora de la resistencia, anti-fatiga o mejora de la función renal, o alternativamente, también se puede utilizar como una composición alimenticia, una composición farmacéutica o una composición cosmética.

Las composiciones alimenticias incluyen alimentos nutritivos suplementarios, alimentos saludables, alimentos dietéticos terapéuticos, alimentos para la salud general, suplementos y bebidas. Las bebidas incluyen bebidas de té, zumos, refrescos y preparaciones bebibles. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar como fármacos o cuasi fármacos, preferiblemente formulaciones orales o preparaciones externas dermatológicas, y pueden ser proporcionadas en forma de soluciones, comprimidos, gránulos, píldoras, jarabes, lociones, pulverizaciones, emplastos o pomadas. Las composiciones cosméticas se pueden proporcionar en forma de cremas, lociones líquidas, lociones en emulsión o aerosoles.

La cantidad de glicósido o glicósidos incorporada en la composición alimenticia, farmacéutica o cosmética descrita en la presente memoria no está limitada en modo alguno y puede ser diseñada según se requiera por los expertos en la técnica en la consideración, por ejemplo, de la solubilidad y el sabor haciendo referencia a ingestas diarias preferidas del compuesto o los compuestos flavonoides correspondientes. Por ejemplo, la cantidad de glicósido o glicósidos incorporada a una composición se puede ajustar de 0,01% a 99,9% en peso o se puede determinar de manera que el glicósido o los glicósidos se puedan proporcionar de 100 mg a 20 g por día en una sola dosis o en dosis divididas (p. ej., tres dosis).

La composición alimenticia, farmacéutica o cosmética descrita en la presente memoria puede comprender además diversos ingredientes aceptables para fines alimenticios, farmacéuticos o cosméticos. Los ejemplos de estos aditivos y/o ingredientes incluyen vitaminas, sacáridos, excipientes, agentes disgregantes, aglutinantes, lubricantes, emulsionantes, agentes de isotonicidad, tampones, solubilizantes, antisépticos, estabilizadores, antioxidantes, agentes colorantes, correctivos, aromas, agentes coagulantes, ajustadores del pH, espesantes, extractos de té, extractos de hierbas y minerales.

Otras realizaciones

En la presente invención, una proteína enzimática contenida en un agente enzimático se puede inmovilizar sobre un portador apropiado para su uso como enzima inmovilizada. En cuanto al portador; se puede utilizar cualquier resina convencional utilizada para el mismo propósito, incluyendo resinas alcalinas (p. ej., MARATHON WBA (Dow Chemical), serie SA, serie WA o serie FP (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón), y Amberlite IRA904 (Organo)), así como resinas hidrófobas (p. ej., Diaion FPHA13 (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón), serie HP (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón), y Amberlite XAD7 (Organo)). Además, se pueden preferir otras resinas tales como Express-Ion D (Whatman), DEAE-Toyopearl 650M (Tosoh Corporation, Japón) y DEAE-Sefarosa CL4B (Amersham Biosciences) para su uso. Se puede utilizar cualquier técnica convencional para la inmovilización de enzimas, como se ilustra por medio de adsorción física, el método de unión que utiliza la unión iónica o covalente para la inmovilización, el método de entrecruzamiento que utiliza un reactivo que tiene un grupo funcional divalente para la inmovilización a través del entrecruzamiento, y el método de atrapamiento covalente que incluye una enzima dentro de un gel o de una membrana semipermeable de la estructura de red. Por ejemplo, la inmovilización puede llevarse a cabo permitiendo que una enzima (20 a 2000 mg, p. ej., 50 a 400 mg) en agua destilada sea adsorbida en 5 ml de cada resina, seguido de la eliminación del sobrenadante y secado.

También se describe un agente enzimático para la glicosilación de un compuesto flavonoide, que comprende una α-amilasa que tiene actividad de glicosilación del género Trichoderma (p.ej. Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma ghanense, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum o Trichoderma polysporum, preferiblemente Trichoderma viride). Semejante agente enzimático comprende una o más glicosidasas derivadas de hongos filamentosos ascomicetos, y puede comprender adicionalmente otros aditivos (p. ej., componentes estabilizadores de enzimas, componentes donadores de glicosilo, otras enzimas).

Ventajas de la invención

La presente invención permite la glicosilación eficaz de los compuestos flavonoides. En particular, la presente invención permite la glicosilación eficaz en las posiciones 5, 7, 3' y/o 4' de compuestos de catequina.

La presente invención permite la glicosilación de los compuestos flavonoides para mejorar así su solubilidad en agua. Esto sugiere que la presente invención puede mejorar la absorción oral de los compuestos flavonoides. Por otra parte, la mejora de la solubilidad en agua contribuirá no sólo a la mejora de la velocidad de disolución en agua, sino también a la mejora de la tasa de absorción en el organismo. Por lo tanto, la presente invención permite que los compuestos flavonoides ejerzan su actividad útil (p. ej., la actividad antioxidante) in vivo con una alta eficacia.

La presente invención también puede modificar el sabor de los compuestos flavonoides a través de la glicosilación. En particular, cuando un compuesto flavonoide que tiene sabores amargos y astringentes, como un compuesto de catequina, es glicosilado de acuerdo con la presente invención, tales sabores pueden ser reducidos.

La presente invención también puede mejorar la estabilidad térmica de los flavonoides a través de la glicosilación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gráfico de análisis de HPLC de catequina cuando se trata con una solución de enzima bruta de Trichoderma viride IAM5141.

La Figura 2 muestra un dendrograma preparado por un programa de preparación de dendrogramas, vista de árbol, con respecto a las secuencias de aminoácidos de los supuestos ORF que tienen el motivo del dominio catalítico de alfa-amilasa (Núm. de acceso PF00128) extraído de las bases de datos de información genómica de Aspergillus nidulans, Neurospora crassa, Magnaporthe grisea y Fusarium graminearum.

La Figura 3 muestra un alineamiento de 4 secuencias de aminoácidos en el Grupo 1 de la Figura 2, junto con sus regiones altamente conservadas (subrayadas).

La Figura 4 muestra una comparación entre la secuencia de ADN genómico (SEQ ID NO: 6) y la secuencia de ADNc (SEQ ID NO: 9) de TRa2.

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de ADNc de TRa2 y su secuencia de aminoácidos deducida correspondiente. La parte de doble subrayado representa una supuesta secuencia señal de secreción.

La Figura 6 muestra una comparación de la estructura primaria entre la secuencia de aminoácidos deducida de TRa2 y la secuencia de aminoácidos precursora de Taka-amilasa (GB Núm. BAA00336). Subrayado: supuesta señal de secreción de TRa2; subrayado discontinuo: señal de secreción de Taka-amilasa; doble subrayado: 4 regiones altamente conservadas entre las enzimas de la familia de la α-amilasa; y residuos de aminoácidos indicados con *: residuos de aminoácidos situados en sitios catalíticos.

La Figura 7 muestra gráficos de análisis HPLC de la solución de reacción cuando se añadieron (+)-catequina o 3-O-galato de (-)-epigalocatequina y dextrina y se hicieron reaccionar en una provisión de partida de sobrenadante de cultivo de un transformante (cepa TRa2-1) o un producto concentrado del mismo.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la actividad de glicosilación de una solución de enzima TRa2 bruta preparada a partir del sobrenadante de cultivo de un transformante (cepa TRa2-1), cuando se utilizaron cuatro reacciones entre cada compuesto aceptor de glicosilo ((+)-catequina, 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, esculetina, naringenina, quercetina, daidzeína, genisteína o kaempferol) y dextrina.

La Figura 9 son gráficos que muestran el pH óptimo y la temperatura óptima durante la reacción de glicosilación con un agente enzimático.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el % restante de (+)-catequina o 4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina después de que una solución que contenía las contenía fuera tratada a diferentes temperaturas que variaban de 4°C a 100°C durante 0 a 4 horas.

La Figura 11 es un gráfico que muestra la solubilidad en agua de (+)-catequina y un glicósido de la misma, o 3-O-galato de (-)-epigalocatequina y un glicósido de la misma.

La figura 12 muestra un diagrama de análisis HPLC de la solución de reacción cuando se mezclaron 3-(3"-O-metil)galato de (-)-epigalocatequina, dextrina y un agente enzimático y se hicieron reaccionar.

La Figura 13 muestra un gráfico de radar de la calidad del sabor obtenido con un sensor de sabor para un extracto de té verde rico en 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (TVG-1), una fracción de glicósido del mismo (BR-1), y productos purificados de manera uniforme de glicósidos individuales contenidos en BR-1 (es decir, 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina (5G-1), 3-O-galato de 5-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina (5GG-1), y 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina (7G-1)).

Ejemplos

[Ejemplo 1: Actividad de glicosilación de catequina en cultivo de Trichoderma]

Se inoculó Trichoderma viride cepa IAM5141 a partir de un cultivo inclinado en un medio líquido (10 ml) que contenía extracto de levadura al 1% (Difco), polipeptona al 1% (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Japón) y dextrina al 2% (Nacalai Tesque, Inc., Japón), seguido de cultivo con sacudimiento a 30°C durante 1 día para dar una solución pre-cultivada. Además, todo el volumen de la solución pre-cultivada se inoculó en 900 ml del mismo medio líquido y se cultivó a 30°C durante 3 días, seguido de filtración a través de un filtro para preparar una solución de sobrenadante de cultivo. Después de la adición de sulfato de amonio (387 g, saturación de 80%) al sobrenadante de cultivo (690 ml), la mezcla se agitó y se centrifugó para recoger un producto precipitado. El producto precipitado resultante se diluyó con 10 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0) para su uso como una solución de enzima bruta.

A la solución de enzima bruta (100 µl), se le añadieron catequina (3 mg) y dextrina (10 mg) y se agitaron a 50°C durante 24 horas para provocar una reacción enzimática. La solución de reacción se diluyó 10 veces con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, de los cuales 10 µl se analizaron a continuación por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Condiciones del análisis

Columna: Develosil C30-UG-5 (4,6 x 150 mm)
Condiciones de gradiente: Eluyente B al 5% → Eluyente B al 50%/20 min
Eluyente A: TFA al 0,1%/agua destilada

Eluyente B: acetonitrilo al 90%/TFA al 0,08%
Velocidad de flujo: 1 ml/min
Longitud de onda de detección: 280 nm

Como se muestra en la Figura 1, los resultados confirmaron la generación de un glicósido de catequina a través de la reacción anterior. Además, también se confirmó que se generaba un glicósido similar en el caso de la utilización de γ-ciclodextrina como donador de glicosilo. Estos resultados sugieren que T. viride cepa IAM5141 produce y secreta una enzima que glicosila la catequina utilizando dextrina o γ-ciclodextrina como donador de glicosilo.

[Ejemplo 2: Propiedades de diversos agentes enzimáticos derivados del género Trichoderma]

Se disolvió (+)-catequina (3 mg) en 100 µl de tampón de acetato 0,1 M (pH 5) y se mezcló con cada agente enzimático (10 mg o 10 µl) y el almidón soluble (10 mg, Nacalai Tesque, Inc., Japón) o dextrina (10 mg), seguido de agitación a 50°C durante 1 día. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por HPLC. Las condiciones de análisis se establecieron como se muestra en el Ejemplo 1.

Los agentes enzimáticos utilizados se muestran en la siguiente tabla, junto con sus resultados experimentales.

[Tabla 1]

Proveedor	Agente enzimático	Donador de glicosilo	Producto (% de área)	
			7-Glc	5-Glc
Industria Farmacéutica Yakult	Celulasa "Onozuka" derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,86	8,79
		Dex	2,93	8,97
ídem	Celulasa "Onozuka" RS derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,21	9,21
		Dex	1,70	7,95
ídem	Celulasa "Onozuka" R-10 derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	-	7,68
		Dex	-	5,98
ídem	Celulasa "Onozuka" FA derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,92	8,78
		Dex	2,82	9,14
ídem	Pancellase derivado de β-1,3-glucanasa de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	-	2,51
		Dex	-	1,70
ídem	Funcelase SS derivado de celulasa de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,18	8,17
		Dex	1,94	7,05
ídem	Pancellase BR derivado de celulasa al 5% + lactosa al 95% de Trichoderma	ninguno		-
		SS	2,86	8,30
		Dex	3,19	9,94
ídem	Celulasa 3S "Onozuka" derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	3,04	9,85
		Dex	2,51	9,28
Enzima Amano	Celulasa T "Amano" 4 derivada de Trichoderma viride 16% celulasa +	ninguno	0,94	2,86
		SS	1,98	6,00

Proveedor	Agente enzimático	Donador de glicosilo	Producto (% de área)	
			7-Glc	5-Glc
	dextrina	Dex	1,41	4,19
ídem	Celulasa XP-425	ninguno	1,71	5,82
		SS	3,27	9,54
		Dex	3,09	8,47
SIGMA	Celulasa derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	2,07
		SS	2,57	10,99
		Dex	1,36	6,17
Ninguno: ausencia, SS: almidón soluble, Dex: dextrina 7-Glc: 7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina 5-Glc: 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina				

Se encontró que la actividad de glicosilación sobre compuestos de catequina se observaba para una amplia gama de agentes enzimáticos derivada del género Trichoderma, que están disponibles comercialmente como celulasa de diferentes proveedores.

[Ejemplo 3: Preparación de glicósidos de flavonoides (1)]

a. Preparación de 5-O-α-D-Glucopiranosil-(+)-catequina y 7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina:

Se mezcló (+)-catequina (60 mg) con almidón soluble (200 mg, Nacalai Tesque, Inc., Japón), celulasa T "Amano" 4 (200 mg, Amano Enzyme Inc., Japón) y tampón de acetato 0,1 M (2 ml, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 3 días. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se fraccionó y se purificó bajo las siguientes condiciones: columna: Develosil C30-UG-5 (20 × 250 mm, Nomura Chemical Co., Ltd., Japón), Eluyente A: TFA al 0,1%/agua destilada, Eluyente B: acetonitrilo al 90%/TFA al 0,08%, condiciones de elución: Eluyente B al 20%, velocidad de flujo: 4 ml/min, longitud de onda de detección: 280 nm. Se recogió la fracción del pico principal generado y se liofilizó para preparar un patrón.

7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 450,9, RMN: δ ppm (D_2O); 2,48 (1H, dd), 2,80 (1H, dd), 3,42 (1H, t), 3,4-3,7 (4H, m), 3,80 (1H, t), 4,14 (1H, q), 4,69 (1H, d) , 5,47 (1H, d), 6,23 (1H, d), 6,27 (1H, d), 6,78 (1H, dd), 6,84 (1H, d), 6,86 (1H, d).

5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 450,8, RMN δ ppm (D_2O); 2,62 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,45-3,55 (1H, m), 3,6-3,7 (3H, m), 3,83 (1H, t), 4,18 (1H, dd), 4,76 (1H, d), 5,61 (1H, d), 6,09 (1H, d), 6,31 (1H, d), 6,77 (1H, d), 6,8-6,9 (2H, m).

b. Preparación de 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina:

Se mezcló 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (120 mg) con dextrina (400 mg, Nacalai Tesque, Inc., Japón), celulasa "Onozuka" RS (400 mg, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Japón) y tampón de acetato 0,1 M (3 ml, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 3 días. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se fraccionó y se purificó bajo las siguientes condiciones: columna: Develosil C30-UG-5 (20 x 250 mm), condiciones de elución: metanol al 40%, velocidad de flujo: 3 ml/min, longitud de onda de detección: 280 nm. La fracción del pico principal fue 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina.

3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina: m/z 621,0, RMN δ ppm (D_2O); 2,8-3,1 (2H, m), 3,52 (1H, t), 3,7-3,8 (4H, m), 3,91 (1H, t), 5,01 (1H, s), 5,54 (1H, s), 5,6 (1H, s ancho), 6,35 (1H, s), 6,43 (1H, s), 6,57 (2H, s), 6,95 (2H, s).

c. Preparación de 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina y 3-O-galato de 7-O-(4-O-δ-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina:

Se mezcló galato de epigalocatequina (3 g) con Pancellase BR (5 g, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Japón), dextrina (10 g) y tampón de acetato 0,1 M (100 ml, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 4 horas. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se adsorbió sobre una columna de Sefarosa LH20 (100 ml, Amersham Biosciences). Después de la elución por etapas con agua destilada (200 ml), etanol del 30% (200 ml) y etanol del 40% (200 ml), se recogieron las fracciones de glicósidos para preparar un producto liofilizado, de los

cuales 50 mg se disolvieron adicionalmente en agua destilada (5 ml) y después se fraccionaron y se purificaron bajo las siguientes condiciones: columna: Develosil C30-UG-5 (20 x 250 mm), Eluyente A: TFA al 0,1%/agua destilada, Eluyente B: metanol del 90%/TFA al 0,1%, condiciones de elución: B al 30%, velocidad de flujo: 3 ml/min, longitud de onda de detección: 280 nm. Como componentes principales, se obtuvieron 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina y 3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina.

3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina: m/z 621,1, RMN δ ppm (D_2O); 2,98 (1H, d), 3,08 (1H, d), 3,53 (1H, t), 3,68 (1H, s), 3,7-3,9 (3H, m), 3,92 (1H, t), 5,14 (1H, s), 5,62 (2H, s ancho), 6,40 (1H, s), 6,48 (1H, s), 6,61 (2H, s), 6,99 (2H, s).

3-O-galato de 7-O- (4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)- (-)-epigalocatequina: m/z 783,1, RMN δ ppm (D_2O); '2,93 (1H, dd), 3,00 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,60 (1H, dd), 3-7-3,9 (9H, m), 4,18 (1H, t), 4,96 (1H, s), 5,21 (1H, d), 5,51 (1H, s ancho), 5,59 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,43 (1H, d), 6,57 (2H, s), 6,96 (2H, s).

(Ejemplo 4: Preparación de glicósidos de flavonoides (2)]

1. Clonación por PCR de secuencias de homólogas de α-amilasa parciales:

En vista de los hechos de que la dextrina y la γ-ciclodextrina son polímeros en los que los residuos de glucosa están unidos a través de enlaces α-1,4 y de que la enzima pretendida tiene la capacidad de degradar estos polímeros, se sugiere que la enzima puede ser una enzima del tipo de las de la familia de la α- amilasa.

Para un estudio adicional, con respecto a un supuesto ORF que tiene el motivo del dominio catalítico de alfa-amilasa (Núm. de acceso PF00128) en la base de datos de la familia de proteínas (PFAM), se extrajeron secuencias de 9, 6, 8 y 6 aminoácidos de las bases de datos de información genómica de Aspergillus nidulans, Neurospora crassa, Magnaporthe grisea y Fusarium graminearum, respectivamente, entre los microorganismos pertenecientes a los mismos hongos filamentosos ascomicetos que Trichoderma y ya identificados por sus secuencias del genoma. Para estas secuencias, se preparó un alineamiento mediante el programa de búsqueda de homología ClustalW y se preparó un dendrograma por medio de la vista de árbol del programa de preparación de dendrogramas, por medio de lo cual las secuencias se agruparon basándose en su homología. Cuatro secuencias de aminoácidos en el Grupo 1 de la figura 2, es decir, MG02772.4 (EAA47529), MG10209.4 (EAA48146), AN3388.2 (EAA63356) y FG03842.1 (EAA71544) (los números entre paréntesis son los Núms. de Acceso Genebank) fueron alineadas para sintetizar oligoADN correspondientes a las secuencias de aminoácidos de sus regiones altamente conservadas (Figura 3, subrayado).

AMY-12f: 5'-TAYTGYGGNGGNACNTTYAARGGNYT-3' (SEQ ID NO: 1)
AMY-15R: 5'-TTYTCNACRTGYTTNACNGTRTCDAT-3' (SEQ ID NO: 2)
AMY-17R: 5'-GGTNAYRTCYTCNCKRTTNGCNGGRTC-3' (SEQ ID NO: 3)

A partir de las células húmedas (aproximadamente 1 g) de T. viride IAM5141 cultivadas como se ha descrito anteriormente, se extrajo el ADN genómico con un DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN). Este ADN genómico (50 ng) se utilizó como molde para llevar a cabo la reacción de PCR con cebadores AMY-12f y AMY-15r o cebadores AMY-12f y AMY-17r. Es decir, la PCR se llevó a cabo mediante el uso de ExTaq (Takara Bio Inc., Japón) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, (94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) x 30 ciclos, y 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa, confirmando un fragmento de aproximadamente 0,6 kpb para la combinación de cebadores de AMY-12f y AMY-15r y un fragmento de aproximadamente 1,0 kpb para la combinación de cebadores de AMY-12f y AMY-17r. A continuación, estos fragmentos de ADN se extrajeron del gel de agarosa y se purificaron con un GFX PCR DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Cada ADN fue clonado con un kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen) y analizado para determinar su secuencia de nucleótidos utilizando ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). La secuencia de nucleótidos obtenida para el primer fragmento se incluye dentro de la secuencia de nucleótidos obtenida para el último fragmento. Se llevó a cabo una búsqueda de homología con Blastx para esta secuencia de nucleótidos frente a las secuencias de aminoácidos registradas en GenBank, indicando que la homología más alta se observaba con MG10209.4 (EAA48146).

2. Determinación de la secuencia del genoma del homólogo de amilasa:

Basándose en la secuencia de nucleótidos resultante de aproximadamente 1,0 kpb, se diseñaron los siguientes cebadores y se utilizaron para llevar a cabo la PCR inversa.

TRa2-2: 5'-CCAACCTGGTATCTACATAC-3' (SEQ ID NO: 4)
TRa2-3: 5'-AGATGGCATCAAATCCCAT-3' (SEQ ID NO: 5)

En primer lugar, el ADN genómico preparado a partir de T. viride IAM5141 se digirió completamente con HindIII o

PstI, y a continuación se cerró por auto-ligación a través de la incubación durante la noche a 16°C con una ligación elevada (Toyobo Co., Ltd., Japón). Estos ADN (0,1 µg cada uno) fueron utilizados cada uno como molde para llevar a cabo la reacción de PCR con los cebadores anteriores TRa2-2 y TRa2-3. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de LA Taq (Takara Bio Inc., Japón) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, (95°C durante 30 segundos, 66°C durante 15 minutos) x 30 ciclos, y 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, lo que confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 2 kb para el caso de la utilización de ADN genómico digerido con HindIII como molde, y un fragmento de ADN de aproximadamente 4,5 kb para el caso de la utilización del genoma digerido PstI como molde. Estos fragmentos de ADN fueron escindidos cada uno del gel de agarosa y clonados de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Las secuencias de nucleótidos se determinaron a partir de ambos extremos de los fragmentos insertados. Se encontró que las secuencias de nucleótidos del genoma digerido con HindIII y el genoma digerido con PstI se solapaban entre sí hasta llegar a los sitios de las enzimas de restricción. Las secuencias de nucleótidos obtenidas de este modo se ligaron a la secuencia parcial obtenida previamente. Esta secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 4 (TRa2-gDNA) y el SEQ ID NO: 6. La región codificante del homólogo de α-amilasa se dedujo por comparación con las 4 secuencias del Grupo 1 de la Figura 2, la aparición de un codón de iniciación y un codón de terminación, etc. Se consideró que el codón de iniciación era ATG en los nucleótidos 423-425, mientras que se consideró que el codón de terminación era TAA en los nucleótidos 1926-1928.

3. Clonación de ADNc del homólogo de α-amilasa:

A partir de las células de T. viride cepa IAM5141 (aproximadamente 0,1 g) cultivadas como se describió anteriormente, se extrajo el ARN total con un kit RNeasy Plant Mini. El ARN total (1 µg) se utilizó para la síntesis de ADNc en un sistema SuperScript First-Strand para RT-PCR (Invitrogen) utilizando hexámeros aleatorios.

Basándose en la secuencia del genoma obtenido anteriormente, se diseñaron los siguientes cebadores.

TRa2EcoRI-F2: 5'-GGAATTCATGAAGCTTCGATCCGCCGTCCC-3' (SEQ ID NO: 7)
TRa2XhoI-r2: 5'-CCGCTCGAGTTATGAAGACAGCAGCACAAT-3' (SEQ ID NO: 8)

El ADNc sintetizado se utilizó como molde para llevar a cabo la reacción PCR con los cebadores anteriores TRa2EcoRI-f2 y TRa2XhoI-r2. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de Ex Taq (Takara Bio Inc., Japón) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos) × 30 ciclos, y 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, lo que confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb. Este fragmento de ADN se escindió del gel de agarosa y se purificó por GFX. El fragmento de ADN resultante se clonó con un kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen) para construir el plásmido pCRTRa2-cDNA, y la secuencia de nucleótidos del ADNc se determinó (Figura 4, Figura 5 y SEQ ID NO: 9). La secuencia del ADN genómico obtenido anteriormente se comparó con la secuencia de ADNc así obtenido, lo que indicó que la secuencia del genoma contenía dos intrones (Figura 4). Se encontró que la secuencia de ADNc contenía un ORF de 1392 pb que codificaba una proteína compuesta de 463 residuos de aminoácidos (Figura 5 y SEQ ID NO: 10). Este gen fue denominado TRa2. Cuando la secuencia de aminoácidos deducida codificada por este gen fue analizada por la Signal P (Nielsen H. et. al., Protein Eng., 10, 1-6, 1997), los residuos de los 20 aminoácidos N-terminales parecían constituir una secuencia señal de secreción. Además, se llevó a cabo una búsqueda de homología para la secuencia de aminoácidos deducida codificada por TRa2 de la misma manera que se describió anteriormente, lo que indica que la homología más alta se observaba con AN3388.2 (EAA63356). La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína TRa2 se comparó con la secuencia de aminoácidos de la amilasa Taka, que es una α-amilasa conocida. El resultado indicó que 4 regiones conservadas entre las enzimas de la familia de las α-amilasas también se conservaban en esta enzima (Figura 6, doble subrayado), y que el residuo de ácido aspártico, el residuo de ácido glutámico y el residuo de ácido aspártico, que servía cada uno como un centro activo, estaban todos conservados (Figura 6, residuos de aminoácidos indicados con *).

4. Construcción del sistema de expresión de secreción para la proteína TRa2 en levadura:

Se digirió el plásmido pCRTRa2-cDNA con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para dar un fragmento de aproximadamente 1,5 kb, que después se ligó a un fragmento digerido con EcoRI y SalI del plásmido pYE22m (Biosci. Biotech. Biochem., 59 (7), 1221-1228, 1995) utilizando una alta ligación (Toyobo Co., Ltd., Japón) para obtener de ese modo el plásmido pYETRa2.

El plásmido pYETRa2 se utilizó para transformar la levadura S. cerevisiae cepa EH1315 por el método de acetato de litio. La cepa transformada resultante se denominó cepa TRa2-1. Se inoculó la cantidad de un asa de siembra de la cepa TRa2-1 en 10 ml de medio líquido YPD (Difco) y se cultivó con agitación a 30°C durante 2 días. Dado que la proteína TRa2 tiene una secuencia señal de secreción compuesta por 20 residuos de aminoácidos en su extremo N-terminal, se consideró que la proteína iba a ser secretada en una solución de cultivo. A continuación, las células de levadura se hicieron precipitar mediante centrifugación para recoger el sobrenadante de cultivo.

5. Medición de la actividad glucosidasa de TRa2:

El sobrenadante del cultivo (500 µl) se concentró aproximadamente 5 veces utilizando Microcon YM-30 (Amicon). Se añadió el producto concentrado anterior (10 µl) a 100 µl de tampón de acetato 20 mM (pH 5,0) que contiene maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, dextrina, α-ciclodextrina, β-ciclodextrina o γ-ciclodextrina al 0,5%, y se hicieron reaccionar a 50°C durante 1 hora.

Una vez completada la reacción, cada muestra se analizó por medio de TLC como sigue. La placa utilizada fue una placa de gel de sílice G-60 (Merck & Co., Inc.), y la solución de desarrollo utilizada fue 2-propanol:acetona:ácido láctico 0,5 M = 2:2:1. Para la detección, la placa se pulverizó con ácido sulfúrico:etanol = 1:9, se secó al aire y después se calentó sobre una placa caliente. Como resultado, ninguno de los azúcares se degradó en una solución de cultivo de la cepa control (cepa C-1) transformada con el vector pYE22m. En contraste, en una solución de cultivo de la cepa TRa2-1, maltotriosa, maltotetraosa, dextrina y γ-ciclodextrina fueron degradadas para generar principalmente maltosa y glucosa, pero no hubo degradación de maltosa, α-ciclodextrina y β-ciclodextrina.

6. Medición de la actividad de glicosilación de TRa2:

A 100 µl de una provisión de partida de sobrenadante de cultivo o un producto concentrado del mismo concentrado aproximadamente 5 veces con un VIVASPIN 10.000 MWCO/PES (VIVASCIENCE), se le añadieron (+)-catequina, o 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (3 mg) y dextrina (10 mg) y se hicieron reaccionar con agitación a 50°C durante 1 día. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se diluyó 10 veces con una solución de ácido trifluoroacético al 0,1% y se analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las mismas condiciones que las utilizadas en el Ejemplo 1. Como resultado, no se observó producto de reacción en la solución de reacción que se había hecho reaccionar con el sobrenadante del cultivo de la cepa de control (cepa C-1) transformada con el vector pYE22m, mientras que se confirmó la generación de glicósidos de catequina y glicósidos de 3-O-galato de epigalocatequina en el caso de la cepa TRa2-1 (Figura 7).

7. Preparación catalizada con TRa2 de glicósidos de catequina:

La cepa TRa2-1 se inoculó en 200 ml de medio líquido YPD y se cultivó con agitación a 30°C durante 3 días. Las células se recogieron por centrifugación para obtener el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante de cultivo (100 ml) se concentró hasta 50 ml utilizando un disco ultrafiltración NMWL 30000/celulosa regenerada mientras se añadían 100 ml de tampón de acetato 0,01 M (pH 5), y se utilizó como una solución de enzima TRa2. La solución de enzima TRa2 anterior (50 ml) se mezcló con (+)-catequina (1,5 g) y dextrina (5 g), seguido de agitación a 45°C durante 18 hr. La solución de reacción se centrifugó, y el sobrenadante se adsorbió sobre una columna de resina LH20 (Amersham Biosciences) de 60 ml/φ de 2,5 x 20 cm. Después de la elución con agua destilada (120 ml) y etanol del 10% (240 ml), se recogieron y se liofilizaron las fracciones de glicósido para dar 530 mg de polvo liofilizado, 50 mg de los cuales se disolvieron a continuación en 5 ml de agua destilada y se separaron sobre una columna Develosil C30-UG-5 de 20 x 250 mm, A: TFA al 0,1%/agua destilada, B: metanol del 90%/TFA al 0,1%, B al 30%, 3 ml/min, 280 nm. Los picos 1 a 6 se recogieron, y se liofilizaron en el orden en el que había eluido de la columna de HPLC. Los análisis de MS y RMN sugieren que el Pico 1 era 5-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)- (+)-catequina, el Pico 2 era 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina, el Pico 3 era 4'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina, el Pico 4 era 4'-O-α-D- glucopiranosil-(+)-catequina, el Pico 5 era 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina, y el Pico 6 era 3'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina.

5-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D_2O); 2,71 (1H, dd), 2,85 (1H, dd), 3,42 (1H, t), 3,56-3,85 (9H, m), 4,19 (1H, t), 4,26 (1H, dd), 4,87 (1H, d) , 5,70 (1H, d), 6,19 (1H, d), 6,39 (1H, d), 6,83 (1H, dd), 6,90-6,93 (2H, m).

5-O-A-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN δ ppm (D_2O): 2,62 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,45-3,55 (1H, m), 3,6-3,7 (3H, m), 3,83 (1H, t), 4,18 (1H, dd), 4,76 (1H, d), 5,61 (1H, d), 6,09 (1H, d), 6,31 (1H, d), 6,77 (1H, d), 6,8-6,9 (2H, m).

4'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D_2O); 2,54 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,60 (1H, dd), 3,68-3,94 (9H, m), 4,19-4,28 (2H, m), 4,82 (1H, d), 5,44 (1H, d), 5,62 (1H, d), 6,04 (1H, d), 6,11 (1H, d), 6,91 (1H, dd), 7,00 (1H, d), 7,22 (1H, d).

4'-O-A-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN, δ ppm (D_2O); 2,45 (1H, dd), 2,73 (1H, dd), 3,45 (1H, t), 3,65-3,75 (4H, m), 4,11 (1H, dd), 4,7-4,75 (2H, m), 5,53 (1H, d), 5,95 (1H, d), 6,02 (1H, d), 6,83 (1H, dd), 6,91 (1H, d), 7,15 (1H, d).

3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D_2O); 2,54 (1H, dd), 2,80 (1H, dd), 3,44 (1H, t), 3,59 (1H, dd), 3,67-3,90 (9H, m), 4,17-4,24 (2H, m), 4,83 (1H, d), 5,41 (1H, d), 5,55 (1H, d), 6,03 (1H, d), 6,10 (1H, d), 7,10 (1H, d), 7,06 (1H, d), 7,26 (1H, d).

3'-O-A-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN δ ppm (D_2O); 2,43 (1H, dd), 2,73 (1H, dd), 3,27 (1H, s), 3,44 (1H, t), 3.6 a 3.7 (4H, m), 3,88 (1H, t), 4,10 (1H, dd) , 4,69 (1H, d), 5,46 (1H, d), 5,93 (1H, s), 6,01 (1H, s), 6,89 (1H, d), 6,94 (1H, dd), 7,18 (1H, d).

8. Preparación catalizada por TRa2 de glicósidos de 3-O-galato de epigalocatequina:

La cepa TRa2-1 se inoculó en 100 ml de medio líquido YPD y se cultivó con agitación a 30°C durante 3 días. Las células se recogieron por centrifugación para obtener el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante de cultivo (45 ml) se concentró hasta 20 ml usando un disco de ultrafiltración NMWL 30000/celulosa regenerada mientras se añadían 50 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 5), y se utilizó como una solución de enzima TRa2. Esta solución de enzima TRa (20 ml) se mezcló con 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (600 mg) y dextrina (2 g), seguido de agitación a 50°C durante 1 día. La solución de reacción se centrifugó, y el sobrenadante se adsorbió sobre una columna de resina LH20 25 ml/φ de 1,5 x 30 cm. Después de la elución con agua destilada (100 ml), etanol del 10% (100 ml), etanol del 20% (100 ml) y etanol del 30% (200 ml), se recogió y se liofilizó la fracción de etanol del 30%. El polvo liofilizado (120 mg) se disolvió en 12 ml de agua destilada y se separó en una columna Develosil C30-UG-5 de 20 x 250 mm, A: TFA al 0,1%/agua destilada, B: metanol del 90%/TFA al 0,1%, B al 40%, 3 ml/min, 280 nm. Los análisis de MS y RMN sugieren que el Pico 2 era 3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina, el Pico 5 era 3-O-galato de 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)epigalocatequina, y el Pico 6 era (-)-3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-epigalocatequina. En contraste, se sugirió que el Pico 3 era una mezcla de glicósido y maltotetraósido, a juzgar por sus datos de MS (m/z 621,2, 1107,3), y el glicósido se consideró que era 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina, a juzgar por su tiempo de retención.
3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina: m/z 783,2, RMN δ ppm (CD_3OD); 2,88 (1H, dd), 2,01 (1H, dd), 3,26 (1H, t), 3,46 (1H, dd), 3,6-3,9 (9H, m), 4,08 (1H, t), 5,00 (1H, s), 5,20 (1H, d), 5,43 (1H, d), 5,54 (1H, s), 6,27 (1H, d), 6,34 (1H, d), 6,51 (2H, d), 6,94 (2H, d).
3-O-galato de 3'-O-A-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina: m/z 621,1, δ ppm (CD_3OD); 2,88 (1H, dd), 2,99 (1H, dd), 3,42 (1H, dd), 3,51 (1H, t), 3,69 (1H, m), 3,8-3,9 (3H, m), 4,88 (1H, d) , 4,98 (1H, s), 5,49 (1H, s ancho), 5,95 (1H, d), 5,96 (1H, d), 6,65 (1H, d), 7,01 (2H, s), 7,11 (1H, d) .
3-O-galato de 3'-O- (4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina: m/z 783,2, δ ppm (CD_3OD); 2,87 (1H, d ancho), 2,99 (1H, dd), 3,27 (1H, t), 3,44-3,48 (2H, m), 3,6-3,8 (4H, m), 3,85 (2H, d), 3,98 (1H , dd), 4,06 (H, t), 4,85 (1H, d), 4,99 (1H, s), 5,28 (1H, d), 5,49 (1H, s ancho), 5,94 (1H, d), 5,96 (1H , d), 6,64 (1H, d), 7,01 (2H, s), 7,09 (1H, d)

9. Expresión de la proteína TRa2 etiquetada con His (TRa2-His): Construcción del plásmido de expresión TRa2-His y obtención de levadura transformada

Para expresar una proteína TRa2 etiquetada con His en el extremo C en células de levadura, se diseñó el siguiente cebador. TRa2HisXhoI-r2: Gctcgagttagtggtggtggtggtgtgaagacagcagcaa (SEQ ID NO: 27)

Se utilizó el plásmido pCRTRa2-cDNA como molde para llevar a cabo la reacción de PCR con los cebadores TraEcoRI-f2 y TRa2HisXhoI-r2. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de Ex Taq (Takara Bio Inc., Japón) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, (94°C durante 1 minuto, 58°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos) x 25 ciclos, y 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, lo que confirma un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb. Este fragmento de ADN se escindió del gel de agarosa y se purificó por GFX. El fragmento de ADN resultante se clonó con un kit de clonación TOPO-TA (Invitrogen), confirmado por su secuencia de nucleótidos, y se denominó plásmido pCRTRa2-cDNA-His. Se digirió pCRTRa2-cDNA-His con EcoRI y XhoI para dar un fragmento de ADN de aproximadamente 1,5 kb, que después se ligó a un fragmento digerido con EcoRI y SalI del plásmido pYE22m utilizando una alta ligación (Toyobo Co., Ltd., Japón) para obtener de esta manera el plásmido pYE-TRa2-His. El plásmido pYE-TRa2-His se usó para transformar la levadura S. cerevisiae cepa EH1315. La cepa transformada resultante se denominó cepa TRa2-3.

Cultivo

La cepa TRa2-3 se cultivó en 20 ml de SD (-Trp) a 30°C durante 16 hr. La solución pre-cultivada se inoculó en 1 L de SD(-Trp) + KH_2PO_4-KOH 100 mM (pH 6,0) y se cultivó a 30°C durante 3 días, seguido de centrifugación para recoger el sobrenadante de cultivo.

Purificación

El sobrenadante de cultivo se aplicó sobre una columna Chelating Sepharose Fast Flow quelada con Ni^{2+} (5 ml, Pharmacia Biotech) equilibrada con Tampón S1 [NaH_2PO_4-NaOH 20 mM (pH 7,4), imidazol 10 mM, NaCl 0,5 M, 2-mercaptoetanol 15 mM], seguido de lavado con el mismo tampón (40 ml). Con posterioridad, las proteínas unidas a la columna se hicieron eluir con Tampón E1 [NaH_2PO_4-NaOH 20 mM (pH 7,4), imidazol 200 mM, NaCl 0,5 M, 2-mercaptoetanol 15 mM]. Se recogieron las fracciones activas, y luego se eliminaron las sales utilizando VIVASPIN (30.000 MWCO, VIVASCIENCE).
Posteriormente, se aplicó la solución de enzima (1,5 ml/min) sobre una columna Resource Q (1 ml, Pharmacia Biotech) equilibrada con Tampón S2 [KH_2PO_4-KOH 20 mM_2 (pH 7,4), 2-mercaptoetanol 15 mM, CHAPS al 0,1%], seguido de lavado con el mismo tampón (10 ml). Posteriormente, las proteínas unidas a la columna se hicieron eluir con un gradiente lineal de 0-100% de tampón E2 [KH_2PO_4-KOH 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,6 M, 2-mercaptoetanol 15

mM, CHAPS al 0,1%] (60 ml). Se recogieron las fracciones activas, y luego se sometieron a eliminación de las sales y se concentraron usando VIVASPIN (30.000 MWCO, VIVASCIENCE).

El mismo procedimiento se repitió de nuevo para llevar a cabo la cromatografía en columna Resource Q. Se recogieron las fracciones activas que mostraban una sola banda en SDS-PAGE, y luego se sometieron a eliminación de las sales y se concentraron usando VIVASPIN (30.000 MWCO, VIVASCIENCE).

Medición de la actividad de la enzima:

Actividad de glicosilación

Una solución de reacción (100 µl, 3-O-galato de epigalocatequina 10 mM, 10 mg de dextrina, Acetato-NaOH 100 mM (pH 5,3), solución de enzima) se agitó a 45°C durante 24 h, seguido de la adición de TFA al 0,5% (100 µl) para detener la reacción. Después de detener la reacción, la muestra se centrifugó para recoger el sobrenadante. El producto se analizó por HPLC en las condiciones mostradas a continuación, confirmando de ese modo la generación de glicósidos de 3-O-galato de epigalocatequina. Condiciones de HPLC: Eluyente A, TFA al 0,1%; Eluyente B, acetonitrilo al 90%, TFA al 0,08%; columna analítica, Devolosil C30-UG-5 (4,6 x 150 mm, NOMURA CHEMICAL); velocidad de flujo, 1 ml/min; modo de separación, 0 min B al 5%, 20 min B al 50%, 20,5 min B al 5%, 25 min B al 5%.

[Ejemplo 5: Selectividad del azúcar y especificidad de la longitud de la cadena del azúcar]

Selectividad del donador de glicosilo 1:

Se mezcló (+)-catequina (6 mg) con Celulasa "Onozuka" RS (20 mg), cada uno de los donadores de glicosilo (20 mg) y tampón de acetato 0,1 M (200 µl, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 1 día. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por HPLC. Los donadores de glicosilo utilizados fueron celobiosa (Sigma), dextrano (Sigma), maltosa (Nacalai Tesque, Inc., Japón), sal de sodio de carboximetilcelulosa (Nacalai Tesque, Inc., Japón), almidón soluble (Nacalai Tesque, Inc., Japón), dextrina (Nacalai Tesque, Inc., Japón), isomaltooligosacárido (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón), α-ciclodextrina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón), γ-ciclodextrina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. , Japón) y dihidrato de trehalosa (Nacalai Tesque, Inc., Japón).

[Tabla 2]

Donador de glicosilo	Producto (% de área)	
	7-Glc	5-Glc
Maltosa	-	-
Celobiosa	-	-
Isomaltosa	-	-
CM-celulosa	-	-
Almidón soluble	1,11	6,09
Trehalosa	-	-
Dextrina	3,14	9,47
α-Ciclodextrina	-	-
γ-Ciclodextrina	5,91	14,69
Dextrano	-	-
Ninguno	-	-

Se encontró que esta enzima actuaba sobre el almidón soluble, la dextrina y la γ-ciclodextrina para generar glicósidos de catequina, pero no actuaba sobre los otros azúcares.

Selectividad del donador de glicosilo 2:

Se mezcló (+)-Catequina (3 mg) con celulasa "Onozuka" RS (10 mg), cada uno de los donadores de glicosilo (10 mg) y tampón de acetato 0,1 M (100 µl, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 1 día. Los donadores de glicosilo utilizados fueron maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa y dextrina (Nacalai Tesque, Inc., Japón), así como γ-ciclodextrina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón). Después de la

reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por HPLC.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 3]

Donador de glicosilo	Producto (% de área)	
	7-Glc	5-Glc
Maltosa	-	-
Maltotriosa	0,51	2,54
Maltotetraosa	1,60	7,15
Maltopentaosa	1,98	7,87
Maltohexaosa	2,06	7,89
Maltoheptaosa	1,97	7,39
Dextrina	2,15	8,80
γ-Ciclodextrina	4,73	14,53

[Ejemplo 6: Especificidad de sustrato]

La cepa TRa2-1 se cultivó durante la noche a 30°C con agitación en 10 ml de medio YPD. Después de alcanzar la fase de reposo, la solución de cultivo se inoculó en el mismo medio (2% (v/v)) y se cultivó con agitación a 30°C durante 3 días. Después del cultivo, el sobrenadante se recogió por centrifugación y se concentró 5 veces para dar una solución de enzima bruta TRa2. La reacción se realizó a 45°C durante 24 horas en 100 µl de solución de reacción de enzima que contenía compuesto aceptor de glicosilo (3-O-galato de (+)-catequina, 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, esculetina, naringenina, quercetina, daidzeína, genisteína o kaempferol) 0,5 mM o 10 mM, 10 mg de dextrina, tampón de acetato 100 mM (pH 5,2) y la solución de enzima bruta, seguido de análisis mediante HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

La razón de área (%) entre el compuesto aceptor y producto glicósido fue de 10% para (+)-catequina, 17,7% para 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, 3,5% para esculetina, 4,4% para naringenina, 9,4% para quercetina, 10,7% para daidzeína, 6,8% para genisteína, y 3,1% para kaempferol.

[Ejemplo 7: Estudio del pH y la temperatura óptimos]

Se mezcló (+)-catequina (6 mg) con Pancellase BR (20 mg, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Japón), dextrina (20 mg, Nacalai Tesque, Inc., Japón) y cada tampón (200 µl), seguido de agitación a 50°C durante 6 horas. Los tampones utilizados fueron tampón de acetato 0,1 M (pH 4-5,5), tampón de fosfato 0,1 M (pH 6-7), y tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6 a 9). Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9 (a la izquierda).

Se disolvieron (+)-catequina (6 mg) y dextrina (20 mg, Nacalai Tesque, Inc., Japón) a 50°C en 200 µl de tampón de acetato 0,1 M (pH 5). Después de enfriar, esta solución se mezcló con Pancellase BR (20 mg, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Japón) y se agitó de 20°C a 60°C durante 6 horas. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9 (a la derecha).

[Ejemplo 8: Estabilidad térmica del glicósido]

Después de que el tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 7,0, 30 µl) que contenía (+)-catequina o 4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina 100 mM obtenido en el Ejemplo 4 se tratara a diferentes temperaturas que variaban de 4°C a 100°C durante 0 a 4 horas, cada muestra se transfirió a hielo y se mezcló con TFA al 0,1% (60 µl), seguido de análisis mediante HPLC de la misma manera que se muestra en el Ejemplo 1. La Figura 10 muestra el % restante de (+)-catequina o 4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina cuando se trató a diferentes temperaturas. Los resultados indicaron que la 4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina era más estable frente al calor que la catequina.

[Ejemplo 9: Solubilidad de los glicósidos]

Se añadieron la (+)-catequina o la 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina obtenidas en el Ejemplo 3 a agua a

diferentes concentraciones que variaban de 10 a 450 mg/ml y se disolvieron mediante agitación vigorosa, seguido de centrifugación para eliminar los productos precipitados. El sobrenadante se analizó por medio de HPLC para cuantificar las cantidades de (+)-catequina y 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina. También se repitió el mismo procedimiento para estudiar la solubilidad de 3-O-galato de (-)-epigalocatequina o 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

Los resultados indicaron que la (+)-catequina era sustancialmente insoluble en agua, mientras que la 5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina mostró una solubilidad al menos 40 veces mayor o más. Del mismo modo, también se confirmó que el (-)-3-O-galato de epigalocatequina tenía una solubilidad significativamente mayor tras la glicosilación.

[Ejemplo 10: Preparación de enzima inmovilizada]

Se estudiaron las siguientes resinas como resinas de inmovilización: Express-Ion D (Whatman), Diaion FPHA13 (Mitsubishi Chemical Corporation, Japón), DEAE-Toyopearl 650M (Tosoh Corporation, Japón), DEAE-Sepharose CL4B (Amersham Biosciences) y Amberlite IRA904 (Organo). En primer lugar, se disolvió celulasa RS (240 mg) en agua destilada (8 ml) y a esto se le añadió cada una de las resinas (5 ml). Después de agitar durante 30 minutos, la resina se lavó dos veces con agua destilada y después se liofilizó para su uso como una enzima inmovilizada. Cada una de las enzimas inmovilizadas (5 ml) se cargó en una columna (12 x 150 mm) y se hizo circular con catequina (450 mg), dextrina (1500 mg) y tampón de acetato 0,1 M (15 ml, pH 5) para causar una reacción a 50°C durante 4 días. Después de la reacción, la solución de reacción se diluyó 10 veces y se analizó por medio de HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Resina de inmovilización	Rendimiento de glicósido (% de área)
Express-Ion D	15,3
FPHA13	25,4
DEAE650M	18,0
DEAECL4B	18,3
IRA904	11,2

[Ejemplo 11: Glicosilación de catequina metilada]

Se mezcló 3-(3"-O-metil)galato de (-)-epigalocatequina (2,7 mg) con Pancellase BR (9 mg), dextrina (9 mg) y tampón de acetato 0,1 M (90 µl, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 18 horas. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se diluyó 10 veces y se analizó por medio de HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

[Ejemplo 12: Glicosilación mediante el uso conjunto de agentes enzimáticos]

Un extracto de té verde rico en 3-O-galato de (-)-epigalocatequina (30 g, nombre comercial: Teavigo, DSM Nutrition Japón) se mezcló con Pancellase BR (100 g), Dextrina Clúster (100 g, Ezaki Glico Co., Ltd., Japón), α-ciclodextrina (100 g) y ciclodextrina glucanotransferasa (100 ml, Amano Enzyme Inc., Japón) en tampón de acetato 0,1 M (1000 ml, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 3,5 horas. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se adsorbió sobre una columna de Sefarosa LH20 (1000 ml, Amersham Biosciences). La columna se lavó con agua destilada (6000 ml) y después se hizo eluir por etapas con etanol del 30% (6000 ml), seguido de concentración y liofilización para preparar una fracción de glicósido (13,9 g).

[Ejemplo 13: Evaluación del sabor de los glicósidos]

El glicósido preparado en el Ejemplo 12 (BR-1), los componentes de glicósido individuales uniformemente purificados (es decir, 3-O-galato de 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina (5G-1), 5-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina (5GG-1) y 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina (7G-1)) y el extracto de té verde (TVG-1) utilizado como material de partida se disolvieron cada uno en 200 ppm en agua destilada y se evaluaron para determinar la calidad del sabor mediante el uso de un sensor de sabor (Taste and Aroma Strategic Research Institute Co., Ltd., Japón) que detecta la intensidad de cada sabor como una diferencia de potencial en un electrodo de "membrana lipídica artificial" que imita la lengua humana. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. Los glicósidos sometidos a ensayo mostraron cada uno un nivel significativamente menor de sabor astringente que el extracto de té verde (TVG-1) que sirve como control, lo que indica que la calidad del

sabor se mejoraba a través de la glicosilación. Del mismo modo, las pruebas sensoriales realizadas por los panelistas también proporcionan los resultados de la evaluación que indican una reducción de sabores amargos y astringentes y por lo tanto, el aumento de potabilidad.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Suntory Holdings Limited

<120> MÉTODO PARA LA GLICOSILACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOIDES

<130> R2272. EP S3

<140>
<141> 2008-01-18

<150> JP 2007-010766
<151> 2007-01-19

<160> 27

<170> PatentIn Versión 3.1

<210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Ascomycetes

<220>

<223> Inventor: Ochiai, Misa Inventor: Fukami, Harukazu Inventor: Nakao, Masahiro Inventor: Noguchi, Akio

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (9) .. (9)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (24) .. (24)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (15) .. (15)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (12) .. (12)
<223> n representa cualquier base

<400> 1
taytgyggng gnacnttyaa rggnyt 26

<210> 2
<211> 26
<212> ADN
<213> Ascomycetes

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (6) .. (6)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (15) .. (15)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (18) .. (18)
<223> n representa cualquier base

<400> 2
ttytcnacrt gyttnacngt rtcdat 26

<210> 3
<211> 27
<212> ADN
<213> Ascomycetes

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (4) .. (4)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (13) .. (13)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (19) .. (19)
<223> n representa cualquier base

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (22) .. (22)
<223> n representa cualquier base

<400> 3
ggtnayrtcy tcnckrttng cnggrtc 27

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 4
atctacatac ccaacctggt 20

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 5
agatggcatc aaatcccat 19

<210> 6
<211> 2633
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 1

tcatacaaag ctatttcgaa gaccaatatt ctacccccct ctccgacgat agagccctat 60

ggtaatgggc cgatgggttg cttattcggc cctttgtcgg ccggggcatg cgtgtttgac 120

atgttgaagc ttgggcagat ctgggatcgg cgtcacggga tgcctataac aggaggtctg 180

taagtggctg tttggccgcg gcaagtttta ttgccggagc gaatatggcg tctcaatgcg 240

ctacgggatc ttgtttttgg tctgtttggt gtcgtttggg caaaggggggc atatgcgata 300

tctatgccct tggggatata tatatatggc ttgccgctct ctcttccttg gatcagcttg 360

ctgaccacag acctcttgca gacgcagcct gaactcgagc atcccacagc tgaaagaaga 420

agatgaagct tcgatccgcc gtcccgctgc tgttgcagct ttctctcccg gccgtccttg 480

gcgccgacac ggcagactgg aggtctcgta ccatctactt tgccctgaca gaccgaattg 540

ctcgcagctc aagcgacacg ggaggctctg cgtgtacaaa tctgaatgac tactgtggtg 600

gcacgttcca gggcttggag agcaagctgg actacatcaa gggcatggga tttgatgcca 660

tctggatcaa ccccgtcgta accagtgagt tgcccatcta tccccatcct cttgattggt 720

ggctaacatc tcttgaaaga cagtgatttc ggcttccatg gctactgggc actggatcta 780

aacactatca attctcacta tggcactgcg gatgatttaa agagtctcgt tgatgctgca 840

catggcaagg tatattcaca ccattctccc aactgctgag tgtcagtgct agaaataacc 900

aaaaacaggg cttctacatg atggtcgacg ttgtagccaa ccacatggga aacgcaaaca 960

tcacagacga ctcccccctcc cctctgaacc aacaatcctc ataccacaca aaatgtgaca 1020

ttgacttcaa caaccagacc agcgtcgaaa actgttggct tgctggcctc ccagacgttg 1080

acacccagga ccctaccatc aggagcctct accaggactg ggtgtccaac ctggtatcta 1140

catacggctt cgacggcgtc cgcatcgaca ccgtcaggca cgtcgagcag gactactggc 1200

ccggcttcgt caatgccagc ggcgtgtact gcatcggcga agtcttcaac ggagacccag 1260

actttatgca gccctaccaa tcgctcatgc ccggcctcct caactacgcc atcttctacc 1320

ccctcaacgc cttttatcag cagacgggct cctcccaagc cctggtcgac atgcatgacc 1380

gtctcagctc gttcccagac ccgacggcgc tgggcacctt tgtcgataac cacgacaacc 1440

cccgcttcct cagcgtcaag aacgacacgt ctctcttcaa gaatgccctg acctacacca 1500

ttctcggccg aggcatcccc attgtctact acggctccga gcaagccttt tcgggaagca 1560

acgaccccgc caacagagag gacctctggc gcagcggcta caacaccgag acggacatgt 1620

acaatgccat ctccaagctc acctttgcca agcacacggc cggcggcctc gccgacaacg 1680

accacaagca cctgtacgtc gagcccacgg catacgcctg gagccgcgcc ggcggcaagc 1740

tggtggcctt taccaccaac agcggcggcg gcagctcggc ccagttctgc ttcggcacgc 1800

aggtccccaa cgggagctgg acgaatgtgt ttgatggcgg caatggcccg acgtacactg 1860

ctgatggcaa tggacagctc tgcttgacca cgacgaatgg tgagccgatt gtgctgctgt 1920

cttcataaaa caatatggcg acatataata tacatgtata tcacctagta catacttgga 1980

taggtacgtg ttacttaccc ggatagagct tcatgttgtt accttcaagc tgttgtttct 2040

ttcttctctc ttttgtggac atactgtacg atcatgaagg gtacatattt tagtcgtaac 2100

aaaattaggc atttactact acctagacta aactgtttgt tgttgatcat gtacctagag 2160

caagcaatga accatgccat gatttccttc atctcccaga cccgtatttg aattgcctgt 2220

ggatagatgt gcttgaaaga cctgccatgc gctcaaagta attgttattg aatagtccgt 2280

cccaaaatat taactgcagt gccgagatat ctgttgttcc gtcaggcctg ttcaacctgc 2340

ggggatagaa aatctccatg tgctcatgag tgcataaatt ccgcaccgaa tcctccgctt 2400

ccaaaaaaaa aaaagaagca atattataaa aagcaaagtc gtcatgccgt caaatagcct 2460

ttatagtccc gtgtatgctc gcaagtcttg tccgtcgtcg ttagcctgta ttattcacat 2520

gcgtgtgtca tcgatagcct tgtgtttctc gtgtcgcacg atttgctctt gatattgacc 2580

acattccttc ggtacaatga gcaaatatat ataccgttgt ggtgggtaat gag 2633

<210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 7
ggaattcatg aagcttcgat ccgccgtccc 30

<210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 8
tatgaagaca ccgctcgagt gcagcacaat 30

<210> 9

<211> 1392
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 9
atgaagcttc gatccgccgt cccgctgctg ttgcagcttt ctctcccggc cgtccttggc 60

gccgacacgg cagactggag gtctcgtacc atctactttg ccctgacaga ccgaattgct 120

cgcagctcaa gcgacacggg aggctctgcg tgtacaaatc tgaatgacta ctgtggtggc 180

acgttccagg gcttggagag caagctggac tacatcaagg gcatgggatt tgatgccatc 240

tggatcaacc ccgtcgtaac caacagtgat ttcggcttcc atggctactg ggcactggat 300

ctaaacacta tcaattctca ctatggcact gcggatgatt taaagagtct cgttgatgct 360

gcacatggca agggcttcta catgatggtc gacgttgtag ccaaccacat gggaaacgca 420

aacatcacag acgactcccc ctccctctg aaccaacaat cctcatacca cacaaaatgt 480

gacattgact tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggcttgctgg cctcccagac 540

gttgacaccc aggaccctac catcaggagc ctctaccagg actgggtgtc caacctggta 600

tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcatc gacaccgtca ggcacgtcga gcaggactac 660

tggcccggct tcgtcaatgc cagcggcgtg tactgcatcg gcgaagtctt caacggagac 720

ccagacttta tgcagcccta ccaatcgctc atgcccggcc tcctcaacta cgccatcttc 780

taccccctca acgcctttta tcagcagacg ggctcctccc aagccctggt cgacatgcat 840

gaccgtctca gctcgttccc agacccgacg gcgctgggca cctttgtcga taaccacgac 900

aacccccgct tcctcagcgt caagaacgac acgtctctct tcaagaatgc cctgacctac 960

accattctcg gccgaggcat ccccattgtc tactacggct ccgagcaagc cttttcggga 1020

agcaacgacc ccgccaacag agaggacctc tggcgcagcg gctacaacac cgagacggac 1080

atgtacaatg ccatctccaa gctcaccttt gccaagcaca cggccggcgg cctcgccgac 1140

aacgaccaca agcacctgta cgtcgagccc acggcatacg cctggagccg cgccggcggc 1200

aagctggtgg cctttaccac caacagcggc ggcggcagct cggcccagtt ctgcttcggc 1260

acgcaggtcc ccaacgggag ctggacgaat gtgtttgatg gcggcaatgg cccgacgtac 1320

actgctgatg gcaatggaca gctctgcttg accacgacga atggtgagcc gattgtgctg 1380

ctgtcttcat aa 1392

<210> 10
<211> 463
<212> PRT
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 10

```
Met Lys Leu Arg Ser Ala Val Pro Leu Leu Leu Gln Leu Ser Leu Pro
1               5                  10                  15

Ala Val Leu Gly Ala Asp Thr Ala Asp Trp Arg Ser Arg Thr Ile Tyr
            20                  25                  30

Phe Ala Leu Thr Asp Arg Ile Ala Arg Ser Ser Ser Asp Thr Gly Gly
        35                  40                  45

Ser Ala Cys Thr Asn Leu Asn Asp Tyr Cys Gly Gly Thr Phe Gln Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Ser Lys Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Ile Asn Pro Val Val Thr Asn Ser Asp Phe Gly Phe His Gly Tyr
                85                  90                  95

Trp Ala Leu Asp Leu Asn Thr Ile Asn Ser His Tyr Gly Thr Ala Asp
            100                 105                 110

Asp Leu Lys Ser Leu Val Asp Ala Ala His Gly Lys Gly Phe Tyr Met
        115                 120                 125

Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly Asn Ala Asn Ile Thr Asp
    130                 135                 140

Asp Ser Pro Ser Pro Leu Asn Gln Gln Ser Ser Tyr His Thr Lys Cys
145                 150                 155                 160

Asp Ile Asp Phe Asn Asn Gln Thr Ser Val Glu Asn Cys Trp Leu Ala
                165                 170                 175

Gly Leu Pro Asp Val Asp Thr Gln Asp Pro Thr Ile Arg Ser Leu Tyr
            180                 185                 190

Gln Asp Trp Val Ser Asn Leu Val Ser Thr Tyr Gly Phe Asp Gly Val
        195                 200                 205
```

```
Arg Ile Asp Thr Val Arg His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe
    210                 215                 220

Val Asn Ala Ser Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp
225                 230                 235                 240

Pro Asp Phe Met Gln Pro Tyr Gln Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn
                245                 250                 255

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

Ser Gln Ala Leu Val Asp Met His Asp Arg Leu Ser Ser Phe Pro Asp
        275                 280                 285

Pro Thr Ala Leu Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe
    290                 295                 300

Leu Ser Val Lys Asn Asp Thr Ser Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Thr Ile Leu Gly Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln
                325                 330                 335

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg
            340                 345                 350

Ser Gly Tyr Asn Thr Glu Thr Asp Met Tyr Asn Ala Ile Ser Lys Leu
        355                 360                 365

Thr Phe Ala Lys His Thr Ala Gly Gly Leu Ala Asp Asn Asp His Lys
    370                 375                 380

His Leu Tyr Val Glu Pro Thr Ala Tyr Ala Trp Ser Arg Ala Gly Gly
385                 390                 395                 400

Lys Leu Val Ala Phe Thr Thr Asn Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Gln
                405                 410                 415

Phe Cys Phe Gly Thr Gln Val Pro Asn Gly Ser Trp Thr Asn Val Phe
            420                 425                 430

Asp Gly Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Thr Ala Asp Gly Asn Gly Gln Leu
        435                 440                 445

Cys Leu Thr Thr Thr Asn Gly Glu Pro Ile Val Leu Leu Ser Ser
    450                 455                 460
```

<210> 11
<211> 583
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei IF031328

<400> 11
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatttga tgcaatctgg attacgcctg 60

ttgtgacgag tgagtttcac cttgccttgc cttgcgtcgc acaaagcctt cgggagggaa 120

taggtagctg actctgtgat acccatgggt agacagtgat ggcggctatc atggctactg 180

ggcggaggac attgactcca tcaattccca ttatggctct gcggacgact tgaagagtct 240

tgtcaatgcc gcgcatagca aggtactttc ttcccatcat cacatggctt tacccttttg 300

cgttgttcta aagcgagaga aactagggct tctatatgat ggtggatgtc gtcgccaacc 360

acatgggcta cgccaacatc accgacgata gtcctactcc tctgaaccaa gcctcttcgt 420

atcacccgga gtgtgacatc gactacaaca accagaccag cgtccaggaa tgctggatca 480

gtggtctccc ggatctcgac accgagagcc cgatgatccg cagcctctac caggactggg 540

tctccaacct cgtgtccacg tacggcttcg acggcgtccg cat 583

<210> 12
<211> 592
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IF031327

<400> 12
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatccga tgccatctgg atcacacctg 60

ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctcgcctcgc cttgcatgtg 120

tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180

gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240

ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300

cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360

tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420

cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacag ccaaaccagc gtcgagaact 480

gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540

aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 13
<211> 583
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IFO5720

<400> 13

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60

ttgtgacgag tgagtctttg ccctgtcccg ccttgcctcg ggtcgtacat gggctgctag 120

agtgaacagc tgacactgat acctctgaac agacagtgat gggggctacc atggctattg 180

ggcggaggat ctcgattcca tcaactctca ctacggctct gcggatgact tgaagagtct 240

cgtcaacgcc gcacatagca aggtacttct tcctggcatg atatgacctt cgcctattct 300

cctggttcta atgcgagaca aaccagggct tctatatgat ggtagacgtc gtggccaacc 360

acatgggcta cgccaacatc tccgatgaca gccccccccc tctgaaccag gcctcttcgt 420

atcacgccga gtgtgacatt gactacaaca accagaccag cgtccagaac tgctggatca 480

gcggcctccc tgatctcgac acgcagagcc cgaccatccg cagcctctac caggactggg 540

tctccgacct cgtgtccacg tacggcttcg acggcgtccg cat 583

<210> 14
<211> 569
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IFO30498

<400> 14
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacccccg 60

tcgttaccag tgagttgccg acctatcccc agccaatgat atcaattcat cctcttgatt 120

aatagctaac atgccttgaa tagacagcga tttcggatac cacggttact gggctcagga 180

tattaattcc atcaattctc actatggttc ctcggatgat ttaaagagtc ttgttgatgc 240

tgctcatagc aaggtatata tttacacgac actttcaatt ttatgggtct gtgctaaacc 300

aatcaacaac agggcttcta catgatggtc gatgtcgtcg ccaaccatat gggaaacgca 360

aacatcacag acgactctcc ctctcctctg aaccaagact cctcatacca cacaaagtgt 420

gacatcgacy tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggctcgccgg cctcccggat 480

cttgacactc aaagccctac catcaggagc ttgtaccagg actgggtgtc caaccttgta 540

tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcat 569

<210> 15
<211> 592
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei IF031329

<400> 15

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60

ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctcgcctcgc cttgcatgtg 120

tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180

gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240

ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300

cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360

tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420

cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480

gctggatcag cggccycccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540

aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 16
<211> 592
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei IF031328

<400> 16
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60

ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctcgcctcgc cttgcatgtg 120

tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180

gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240

ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300

cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360

tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420

cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480

gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540

aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 17
<211> 592
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei IF031326

<400> 17
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60

ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctcgcctcgc cttgcatgtg 120

tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctytggacag acagtgatgg 180

gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240

ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300

cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360

tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420

cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480

gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540

aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 18
<211> 583
<212> ADN
<213> Trichoderma koningii IAM12534

<400> 18
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60

ttgtgacgag tgagtctttg ccctgtcccg ccttgcctcg ggtcgtacat gggctgctag 120

agtgaacagc tgacactgat acctctgaac agacagtgat gggggctacc atggctattg 180

ggcggaggat ctcgattcca tcaactctca ctacggctct gcggatgact tgaagagtct 240

cgtcaacgcc gcacatagca aggtacttct tcctggcatg atatgacctt cgcctattct 300

cctggttcta acgcgagaca aaccagggct tctatatgat ggtagacgtc gtggccaacc 360

acatgggcta cgccaacatc tccgatgaca gccctccccc tctgaaccag gcctcttcgt 420

atcacgccga gtgtgacatt gactacaaca accagaccag cgtccagaac tgctggatca 480

gcggcctccc tgatctcgac acgcagagcc cgaccatccg cagcctctac caggactggg 540

tctccaacct cgtgtccacg tacggcttcg acggcgtccg cat 583

<210> 19
<211> 584
<212> ADN
<213> Trichoderma viride SAM1427

<400> 19
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatttga tgccatctgg atcactcctg 60

ttgtgacgag tgagtttcac cttgccttgc cttgcgtcgc acaaagcctt cgagagggaa 120

taggtagctg actctgtgat acccatgggt agacagtgat ggcggctatc atggctactg 180

ggcggaggac attgactcca tcaattccca ttatggctct gcagacgact tgaagagtct 240

tgtcaatgcc gcgcatagca aggtattttc ttcccagcat tggtttgatg tttgcccctt 300

tggcattatt ctcaagcaag aaaccagggc ttctatatga tggtggatgt cgtcgccaac 360

catatgggct acgccaacat caccgacgat agtcctactc ctctgaacca agcctcttcg 420

tatcacccgg agtgtgacat cgactacagc aaccagacca gcgtccagga atgctggatc 480

agcggcctcc cggatctcga caccgagagc ccgacgatcc gcagcctcta ccaggactgg 540

gtctccaatc tcgtgtccac gtacggcttc gacggcgtcc gcat 584

<210> 20
<211> 614
<212> ADN
<213> Trichoderma ghanense IAM13109

<400> 20
tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacccctg 60

ttgtgacgag tgagtctttt gccttgcctt gccttgcctt gccttgcctt gccttgcctt 120

rccttgcctt gtgtcgcaca caggctcctg gaggaaatgg ctgatgctga taccttggaa 180

tagacagtga tgggggttat catggctatt gggcggagga cattgattcc atcaactctc 240

attacggctc tgcggacgac ctgaagagtc tcgtcaatgc cgcgcatagc aaggtacatc 300

tccccatcat tgacataggt ttacccttt gcatgattct gacgtgagac aaaccagggc 360

ttctatatga tggtggacgt cgtggccaac cacatgggct acgccaacat ctccgacgac 420

agtccttctc ctctgaacca agcgtcgtcc tatcacccag agtgtgacat tgactacaac 480

aaccagacca gcgtccagaa ctgctggatc agcggcctcc cggatctcaa cacgcagagc 540

tcgacgatcc gcagcctcta ccagggctgg gtctccgacc tcgtgtccac ctacggcttc 600

gacggcgtcc gcat 614

<210> 21
<211> 572
<212> ADN
<213> Trichoderma saturnisporum IAM12535

<220>
<221> rasgo_misc
<222> (445)..(445)
<223> n representa cualquier base

<400> 21
tggagagcaa gctggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60

ttgtgacgag tgagtctttg attaccttgt gtcgcacaca gtcttataga ggagatggat 120

cacactgaca tgtccggata gacagtcagg ggggctacca wggctactgg gcagaggaca 180

ttgactccat caattctcat tacggctctg cggacgacct gaagagtctc gtcaatgccg 240

cgcatagcaa ggtacttctt cctctcattg acatgccttt attcctttcg cgttgtccta 300

aaccgagatt tacagggctt ctatatgatg gtggatgtcg tcgccaacca catgggcaac 360

gccaacatct ccgacgatag tcctcctcct ctgaacgaag cctcttcgta tcacccccag 420

tgtgacattg actacaacaa ccamnccagc gtccagaact gctggatcag cggcctcccg 480

gatctcaaca cccagagctc gacgatccgc agcctctacc aggactgggt ccacaacctc 540

gtgtcgacgt acggcttcga cggcgtccgc at 572

<210> 22
<211> 572
<212> ADN
<213> Trichoderma polysporum SAM357

<400> 22

tggagggcaa gttggattac atcaagggga tgggatttga tgctatttgg atcacgcctg 60

ttgtaacgag taagttattc ataacagcct cagatatcat ctcctgggtc aatagctaat 120

atatcttgat agatagcgat caggggtatc atggctactg ggcagaggat ctcgattcta 180

tcaattctca ctatggttct tcggatgatt tgaagagtct tgtcgatgct gcacacagca 240

aggtacgtca tatcacctca ccccccctaca ttctgctaat cctcatggat cgtgctaaac 300

cgaatgttaa aatagggctt ctatatgatg gtcgatgttg ttgccaatca catgggatat 360

gcaaacatca ccgacgacct tcccactcct ctaaaccaaa actcgtctta ccacgcagag 420

tgtaacatcg actataacaa tcagaccagc gtcgaaaact gctggatcga tggtctccca 480

gaccttgaca cacagagcga gactatccgc acccctttaca aggactgggt ttccaacctc 540

gtctccacat acggcttcga cggcgtccgc at 572

<210> 23
<211> 571
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei IF031329

<400> 23
tggagggcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga cgccatctgg atcacgcccg 60

tcgttacgag tgagttacac acagcctcag gcattacctc ttgaatgcgc ttctaatgtt 120

aatatttaaa tagatagcga cgggggggtac cacggttact gggctgagtc tctggattcg 180

atcaattctc attatggttc tgcggatgat ttaaagagtc tcgttgatgc tgcgcatagc 240

aaggtacgtg atactccaca ccccatctta tatgcctcta ttttcgaagt acggtgctaa 300

aaaggtgaaa acagggtttc tatatgatgg tagatgttgt tgccaatcat atgggttatg 360

ccaacatttc tgacgacctc ccaactcccc tgaacgaaaa ctcgtcgtat catccagaat 420

gcgacattga ctacaacaac cagaccagcg tcgaaaactg ctggatcgat ggccttccgg 480

atctcgacac tcagagccct accatccgca gcctctacca ggactgggtc tccaacctcg 540

tatcgaccta cggcttcgac ggcgtccgca t 571

<210> 24
<211> 572
<212> ADN
<213> Trichoderma hamatum IAM12505

<400> 24

tggagagcaa gttggactat atcaagggca tgggatttga cgccatctgg atcacgcccg 60

tcgttacgag tgagttatat acagcctcac acattatccc ttcaaagagc atctaatatt 120

tatatttaaa tagacagtga taagggctat cacggctact gggcagaaga tatcgattct 180

attaattctc actatggttc tgcggacgat ttaaagagtc tcgtcgatgc tgcgcatagc 240

aaggtacatc atacgcaaca ccccatctta tatgcctcta ctctcgaaat gtcctgctaa 300

aacaagtgaa aacagggctt ctacatgatg gtagatgttg tcgccaatca tatgggctat 360

gccaatattc ctgacgacct tccaaccccc ctgaacgaga actcgtcgta tcacccggaa 420

tgcgacattg actacaacaa cgagaccagc gtcgaaaact gctggatcag cggtctcccc 480

gatctcgaca cccagagccc taccatccgc agtctctacc aggactgggt ctccaacctc 540

gtctcgacct acggcttcga cggcgtccgc at 572

<210> 25
<211> 1329
<212> ADN
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 25
gccgacacgg cagactggag gtctcgtacc atctactttg ccctgacaga ccgaattgct 60

cgcagctcaa gcgacacggg aggctctgcg tgtacaaatc tgaatgacta ctgtggtggc 120

acgttccagg gcttggagag caagctggac tacatcaagg gcatgggatt tgatgccatc 180

tggatcaacc ccgtcgtaac caacagtgat ttcggcttcc atggctactg ggcactggat 240

ctaaacacta tcaattctca ctatggcact gcggatgatt taaagagtct cgttgatgct 300

gcacatggca agggcttcta catgatggtc gacgttgtag ccaaccacat gggaaacgca 360

aacatcacag acgactcccc ctcccctctg aaccaacaat cctcatacca cacaaaatgt 420

gacattgact tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggcttgctgg cctcccagac 480

gttgacaccc aggaccctac catcaggagc ctctaccagg actgggtgtc caacctggta 540

tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcatc gacaccgtca ggcacgtcga gcaggactac 600

tggcccggct tcgtcaatgc cagcggcgtg tactgcatcg gcgaagtctt caacggagac 660

ccagacttta tgcagcccta ccaatcgctc atgcccggcc tcctcaacta cgccatcttc 720

taccccctca acgcctttta tcagcagacg ggctcctccc aagccctggt cgacatgcat 780

gaccgtctca gctcgttccc agacccgacg gcgctgggca cctttgtcga taaccacgac 840

aacccccgct tcctcagcgt caagaacgac acgtctctct tcaagaatgc cctgacctac 900

accattctcg gccgaggcat ccccattgtc tactacggct ccgagcaagc cttttcggga 960

agcaacgacc ccgccaacag agaggacctc tggcgcagcg gctacaacac cgagacggac 1020

atgtacaatg ccatctccaa gctcaccttt gccaagcaca cggccggcgg cctcgccgac 1080

aacgaccaca agcacctgta cgtcgagccc acggcatacg cctggagccg cgccggcggc 1140

aagctggtgg cctttaccac caacagcggc ggcggcagct cggcccagtt ctgcttcggc 1200

acgcaggtcc ccaacgggag ctggacgaat gtgtttgatg gcggcaatgg cccgacgtac 1260

actgctgatg gcaatggaca gctctgcttg accacgacga atggtgagcc gattgtgctg 1320

ctgtcttca 1329

<210> 26
<211> 443
<212> PRT
<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 26

```
Ala Asp Thr Ala Asp Trp Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Phe Ala Leu Thr
1               5                  10                  15

Asp Arg Ile Ala Arg Ser Ser Ser Asp Thr Gly Gly Ser Ala Cys Thr
            20                  25                  30

Asn Leu Asn Asp Tyr Cys Gly Gly Thr Phe Gln Gly Leu Glu Ser Lys
        35                  40                  45

Leu Asp Tyr Ile Lys Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro
    50                  55                  60

Val Val Thr Asn Ser Asp Phe Gly Phe His Gly Tyr Trp Ala Leu Asp
65                  70                  75                  80

Leu Asn Thr Ile Asn Ser His Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ser
                85                  90                  95

Leu Val Asp Ala Ala His Gly Lys Gly Phe Tyr Met Met Val Asp Val
            100                 105                 110
```

```
Val Ala Asn His Met Gly Asn Ala Asn Ile Thr Asp Asp Ser Pro Ser
        115                 120                 125

Pro Leu Asn Gln Gln Ser Ser Tyr His Thr Lys Cys Asp Ile Asp Phe
    130                 135                 140

Asn Asn Gln Thr Ser Val Glu Asn Cys Trp Leu Ala Gly Leu Pro Asp
145                 150                 155                 160

Val Asp Thr Gln Asp Pro Thr Ile Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Trp Val
                165                 170                 175

Ser Asn Leu Val Ser Thr Tyr Gly Phe Asp Gly Val Arg Ile Asp Thr
            180                 185                 190

Val Arg His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe Val Asn Ala Ser
        195                 200                 205

Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Asp Phe Met
    210                 215                 220

Gln Pro Tyr Gln Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn Tyr Ala Ile Phe
225                 230                 235                 240

Tyr Pro Leu Asn Ala Phe Tyr Gln Gln Thr Gly Ser Ser Gln Ala Leu
                245                 250                 255

Val Asp Met His Asp Arg Leu Ser Ser Phe Pro Asp Pro Thr Ala Leu
            260                 265                 270

Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Ser Val Lys
        275                 280                 285

Asn Asp Thr Ser Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Thr Ile Leu Gly
    290                 295                 300

Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Ala Phe Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg Ser Gly Tyr Asn
                325                 330                 335

Thr Glu Thr Asp Met Tyr Asn Ala Ile Ser Lys Leu Thr Phe Ala Lys
            340                 345                 350
```

```
His Thr Ala Gly Gly Leu Ala Asp Asn Asp His Lys His Leu Tyr Val
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Ala Tyr Ala Trp Ser Arg Ala Gly Gly Lys Leu Val Ala
    370                 375                 380

Phe Thr Thr Asn Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Gln Phe Cys Phe Gly
385                 390                 395                 400

Thr Gln Val Pro Asn Gly Ser Trp Thr Asn Val Phe Asp Gly Gly Asn
                405                 410                 415

Gly Pro Thr Tyr Thr Ala Asp Gly Asn Gly Gln Leu Cys Leu Thr Thr
            420                 425                 430

Thr Asn Gly Glu Pro Ile Val Leu Leu Ser Ser
        435                 440
```

<210> 27
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

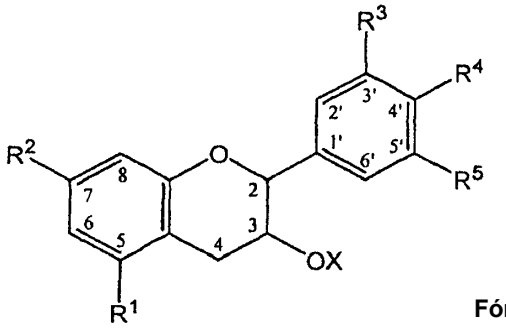
<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador TRa2HisXhoI-R2"

<400> 27
gctcgagtta gtggtggtgg tggtggtgtg aagacagcag caa 43

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un glicósido de un compuesto flavonoide, que comprende la etapa de tratar el compuesto flavonoide y un donador de glicosilo con una α-amilasa del género Tricoderma, en el que el compuesto flavonoide es un compuesto de catequina o un derivado metilado del mismo en el que H en al menos un grupo OH se reemplaza por metilo; y
en donde el donador de glicosilo es maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa, dextrina, γ-ciclodextrina o almidón soluble; y en donde el glicósido del compuesto flavonoide está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



Fórmula (I)

en donde
al menos uno de R^1 a R^4 representa un residuo de glucosa unido a α, y cada uno de los otros representa OH;
R^5 representa OH o H; y
X representa H o un grupo galoilo.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el género *Tricoderma* es *Trichoderma viride* o *Trichoderma reesei.*

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el glicósido del compuesto flavonoide se selecciona del grupo que consiste en:

5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3-O-galato 5-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina;
3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina;
4'O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
4'-O-α-D-glucopiranosil)-catequina;
3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
3'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina;
3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigalocatequina; y
3-O-galato de 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigalocatequina.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la α-amilasa está inmovilizada.

Figura 1

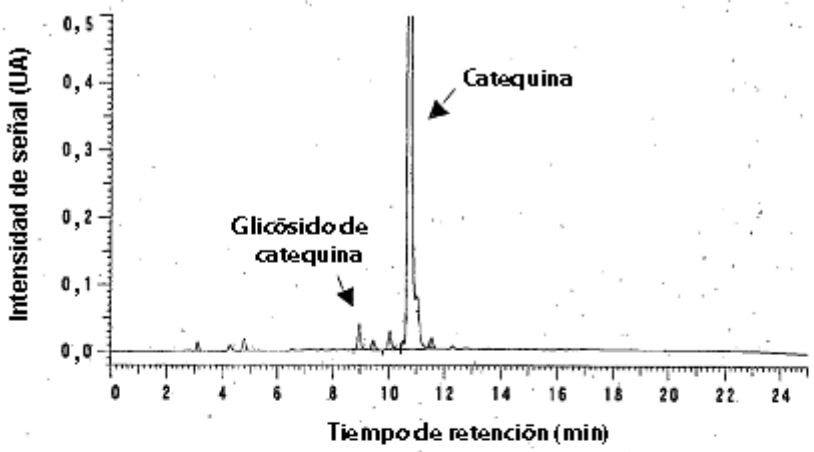


Figura 2

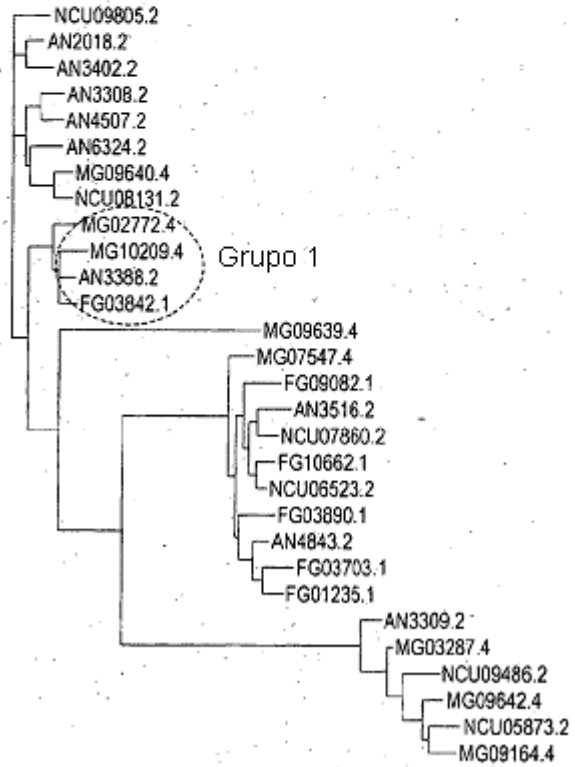


Figura 3

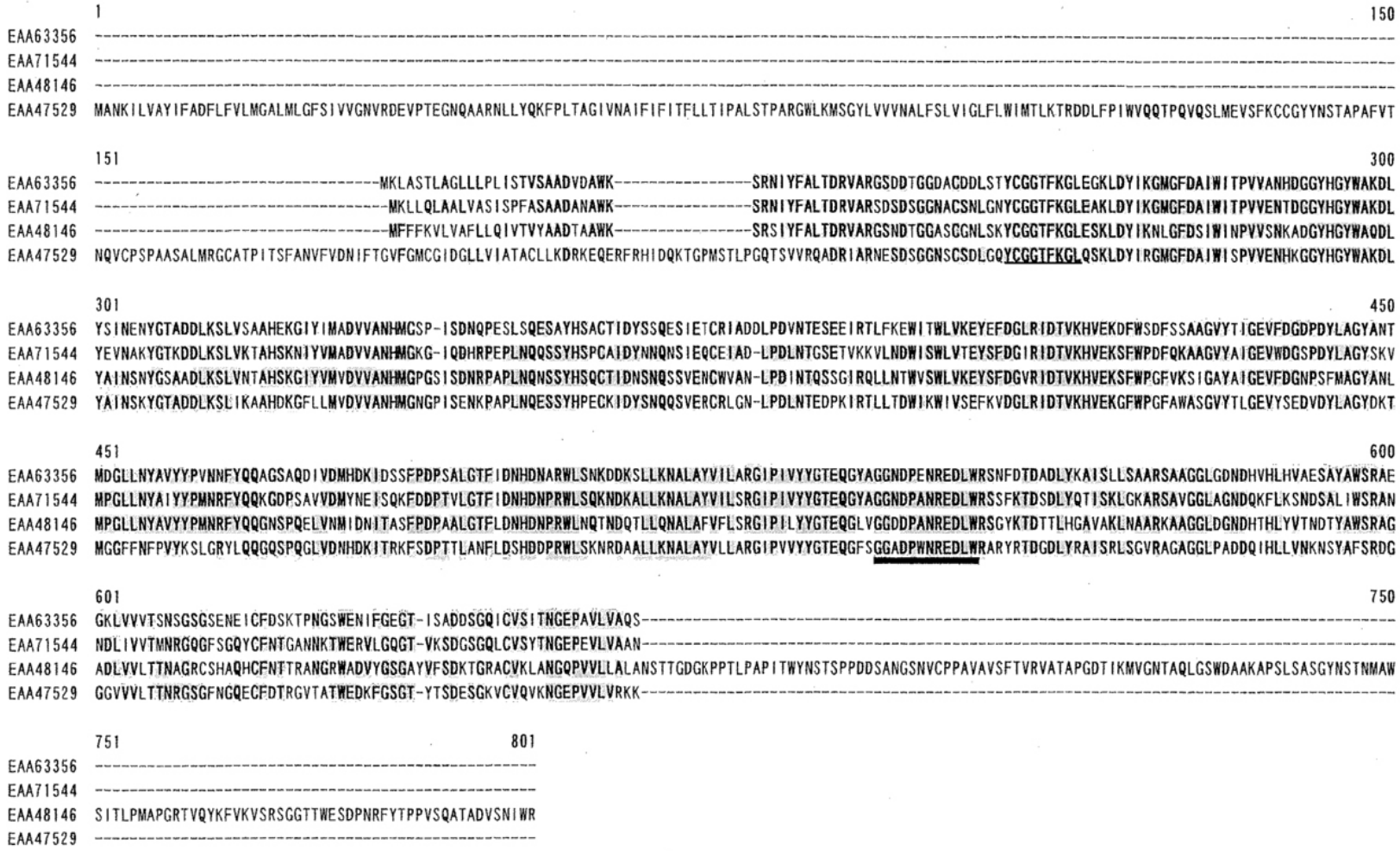

1
150
EAA63356
EAA71544
EAA48146
EAA47529 MANKILVAYIFADFLFVLMGALMLGFSIVVGNVRDEVPTEGNQAARNLLYQKFPLTAGIVNAIFIFITFLLTIPALSTPARGWLKMSGYLVVVNALFSLVIGLFLWIMTLKTRDDLFPIWVQQTPQVQSLMEVSFKCCGYYNSTAPAFVT
151
300
EAA63356 ----------MKLASTLAGLLLPLISTVSAADVDAWK----------SRNIYFALTDRVARGSDDTGGDACDDLSTYCGGTFKGLEGKLDYIKGMGFDAIWITPVVANHDGGYHGYWAKDL
EAA71544 ----------MKLLQLAALVASISPFASAADANAWK----------SRNIYFALTDRVARSDSDSGGNACSNLGNYCGGTFKGLEAKLDYIKGMGFDAIWITPVVENTDGGYHGYWAKDL
EAA48146 ----------MFFFKVLVAFLLQIVTVYAADTAAWK----------SRSIYFALTDRVARGSNDTGGASCGNLSKYCGGTFKGLESKLDYIKNLGFDSIWINPVVSNKADGYHGYWAQDL
EAA47529 NQVCPSPAASALMRGCATPITSFANVFVDNIFTGVFGMCGIDGLLVIATACLLKDRKEQERFRHIDQKTGPMSTLPGQTSVVRQADRIARNESDSGGNSCSDLGQYCGGTFKGLQSKLDYIRGMGFDAIWISPVVENHKGGYHGYWAKDL
301
450
EAA63356 YSINENYGTADDLKSLVSAAHEKGIYIMADVVANHMCSP-ISDNQPESLSQESAYHSACTIDYSSQESIETCRIADDLPDVNTESEEIRTLFKEWITWLVKEYEFDGLRIDTVKHVEKDFWSDFSSAAGVYTIGEVFDGDPDYLAGYANT
EAA71544 YEVNAKYGTKDDLKSLVKTAHSKNIYVMADVVANHMGKG-IQDHRPEPLNQQSSYHSPCAIDYNNQNSIEQCEIAD-LPDLNTGSETVKKVLNDWISWLVTEYSFDGIRIDTVKHVEKSFWPDFQKAAGVYAIGEVWDGSPDYLAGYSKV
EAA48146 YAINSNYGSAADLKSLVNTAHSKGIYVMVDVVANHMGPGSISDNRPAPLNQNSSYHSQCTIDNSNQSSVENCWVAN-LPDINTQSSGIRQLLNTWVSWLVKEYSFDGVRIDTVKHVEKSFWPGFVKSIGAYAIGEVFDGNPSFMAGYANL
EAA47529 YAINSKYGTADDLKSLIKAAHDKGFLLMVDVVANHMGNGPISENKPAPLNQESSYHPECKIDYSNQQSVERCRLGN-LPDLNTEDPKIRTLLTDWIKWIVSEFKVDGLRIDTVKHVEKGFWPGFAWASGVYTLGEVYSEDVDYLAGYDKT
451
600
EAA63356 MDGLLNYAVYYPVNNFYQQAGSAQDIVDMHDKIDSSFPDPSALGTFIDNHDNARWLSNKDDKSLLKNALAYVILARGIPIVYYGTEQGYAGGNDPENREDLWRSNFDTDADLYKAISLLSAARSAAGGLGDNDHVHLHVAESAYAWSRAE
EAA71544 MPGLLNYAIYYPMNRFYQQKGDPSAVVDMYNEISQKFDDPTVLGTFIDNHDNPRWLSQKNDKALLKNALAYVILSRGIPIVYYGTEQGYAGGNDPANREDLWRSSFKTDSDLYQTISKLGKARSAVGGLAGNDQKFLKSNDSALIWSRAN
EAA48146 MPGLLNYAVYYPMNRFYQQGNSPQELVNMIDNITASFPDPAALGTFLDNHDNPRWLNQTNDQTLLQNALAFVFLSRGIPILYYGTEQGLVGGDDPANREDLWRSGYKTDTTLHGAVAKLNAARKAAGGLDGNDHTHLYVTNDTYAWSRAG
EAA47529 MGGFFNFPVYKSLGRYLQQGQSPQGLVDNHDKITRKFSDPTTLANFLDSHDDPRWLSKNRDAALLKNALAYVLLARGIPVVYYGTEQGFSGGADPWNREDLWRARYRTDGDLYRAISRLSGVRAGAGGLPADDQIHLLVNKNSYAFSRDG
601
750
EAA63356 GKLVVVTSNSGSGSENEICFDSKTPNGSWENIFGEGT-ISADDSGQICVSITNGEPAVLVAQS----------
EAA71544 NDLIVVTMNRGQGFSGQYCFNTGANNKTWERVLGQGT-VKSDGSGQLCVSYTNGEPEVLVAAN----------
EAA48146 ADLVVLTTNAGRCSHAQHCFNTTRANGRWADVYGSGAYVFSDKTGRACVKLANGQPVVLLALANSTTGDGKPPTLPAPITWYNSTSPPDDSANGSNVCPPAVAVSFTVRVATAPGDTIKMVGNTAQLGSWDAAKAPSLSASGYNSTNMAW
EAA47529 GGVVVLTTNRGSGFNGQECFDTRGVTATWEDKFGSGT-YTSDESGKVCVQVKNGEPVVLVRKK----------
751
801
EAA63356 ----------
EAA71544 ----------
EAA48146 SITLPMAPGRTVQYKFVKVSRSGGTTWESDPNRFYTPPVSQATADVSNIWR
EAA47529 ----------

Figura 4

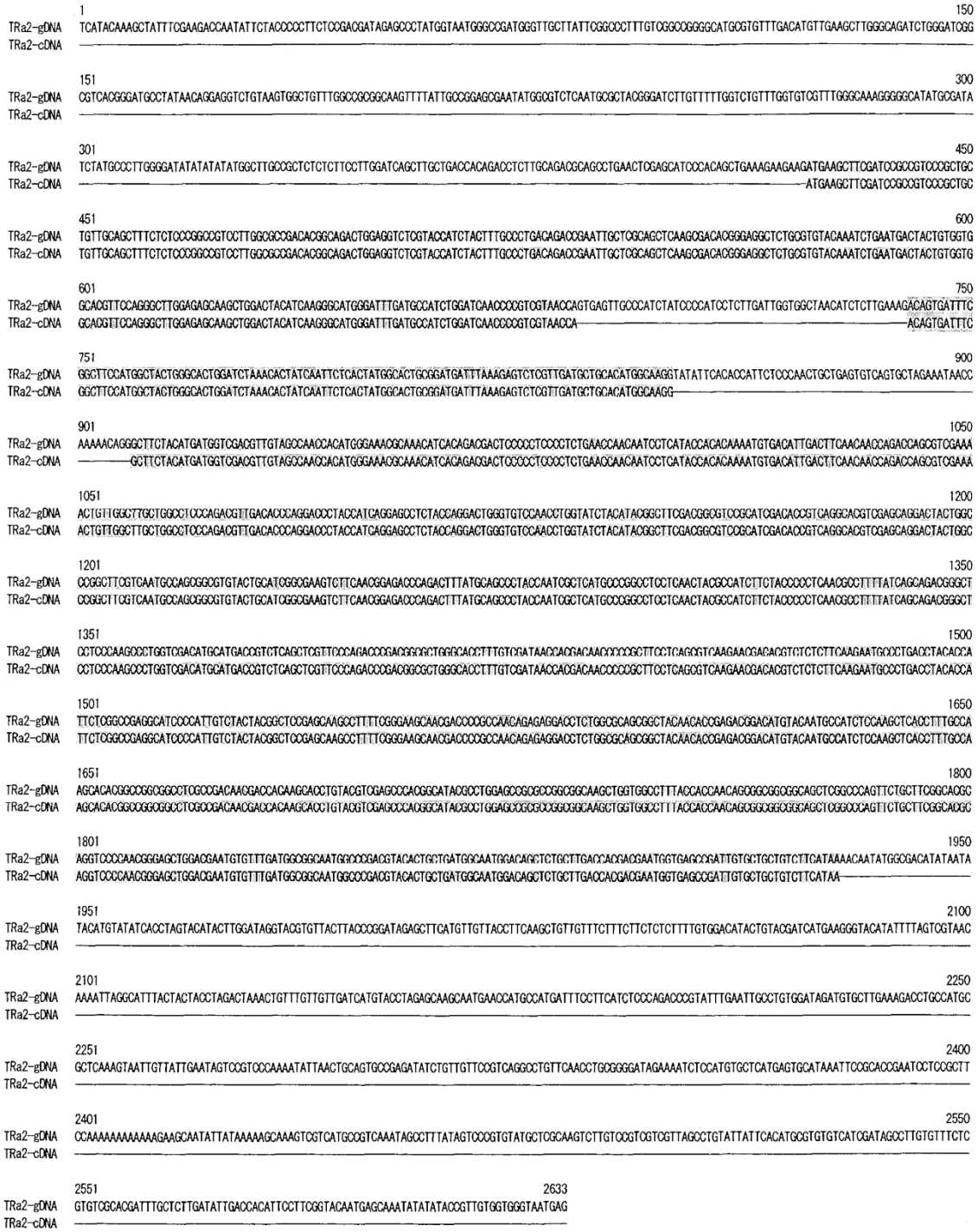

1 150
TRa2-gDNA TCATACAAAGCTATTTCGAAGACCAATATTCTACCCCCTTCTCCGACGATAGAGCCCTATGGTAATGGGCCGATGGGTTGCTTATTCGGCCCTTTGTCGGCCGGGGCATGCGTGTTTGACATGTTGAAGCTTGGGCAGATCTGGGATCGG
TRa2-cDNA ——
151 300
TRa2-gDNA CGTCACGGGATGCCTATAACAGGAGGTCTGTAAGTGGCTGTTTGGCCGCGGCAAGTTTTATTGCCGGAGCGAATATGGCGTCTCAATGCGCTACGGGATCTTGTTTTTGGTCTGTTTGGTGTCGTTTGGGCAAAGGGGGCATATGCGATA
TRa2-cDNA ——
301 450
TRa2-gDNA TCTATGCCCTTGGGGATATATATATATGGCTTGCCGCTCTCTCTTCCTTGGATCAGCTTGCTGACCACAGACCTCTTGCAGACGCAGCCTGAACTCGAGCATCCCACAGCTGAAAGAAGAAGATGAAGCTTCGATCCGCCGTCCCGCTGC
TRa2-cDNA ——ATGAAGCTTCGATCCGCCGTCCCGCTGC
451 600
TRa2-gDNA TGTTGCAGCTTTCTCTCCCGGCCGTCCTTGGCGCCGACACGGCAGACTGGAGGTCTCGTACCATCTACTTTGCCCTGACAGACCGAATTGCTCGCAGCTCAAGCGACACGGGAGGCTCTGCGTGTACAAATCTGAATGACTACTGTGGTG
TRa2-cDNA TGTTGCAGCTTTCTCTCCCGGCCGTCCTTGGCGCCGACACGGCAGACTGGAGGTCTCGTACCATCTACTTTGCCCTGACAGACCGAATTGCTCGCAGCTCAAGCGACACGGGAGGCTCTGCGTGTACAAATCTGAATGACTACTGTGGTG
601 750
TRa2-gDNA GCACGTTCCAGGGCTTGGAGAGCAAGCTGGACTACATCAAGGGCATGGGATTTGATGCCATCTGGATCAACCCCGTCGTAACCAGTGAGTTGCCCATCTATCCCCATCCTCTTGATTGGTGGCTAACATCTCTTGAAAGACAGTGATTTC
TRa2-cDNA GCACGTTCCAGGGCTTGGAGAGCAAGCTGGACTACATCAAGGGCATGGGATTTGATGCCATCTGGATCAACCCCGTCGTAACCA————————————————————————————————————ACAGTGATTTC
751 900
TRa2-gDNA GGCTTCCATGGCTACTGGGCACTGGATCTAAACACTATCAATTCTCACTATGGCACTGCGGATGATTTAAAGAGTCTCGTTGATGCTGCACATGGCAAGGTATATTCACACCATTCTCCCAACTGCTGAGTGTCAGTGCTAGAAATAACC
TRa2-cDNA GGCTTCCATGGCTACTGGGCACTGGATCTAAACACTATCAATTCTCACTATGGCACTGCGGATGATTTAAAGAGTCTCGTTGATGCTGCACATGGCAAGG——
901 1050
TRa2-gDNA AAAAACAGGGCTTCTACATGATGGTCGACGTTGTAGCCAACCACATGGGAAACGCAAACATCACAGACGACTCCCCCTCCCCTCTGAACCAACAATCCTCATACCACACAAAATGTGACATTGACTTCAACAACCAGACCAGCGTCGAAA
TRa2-cDNA ————————GCTTCTACATGATGGTCGACGTTGTAGCCAACCACATGGGAAACGCAAACATCACAGACGACTCCCCCTCCCCTCTGAACCAACAATCCTCATACCACACAAAATGTGACATTGACTTCAACAACCAGACCAGCGTCGAAA
1051 1200
TRa2-gDNA ACTGTTGGCTTGCTGGCCTCCCAGACGTTGACACCCAGGACCCTACCATCAGGAGCCTCTACCAGGACTGGGTGTCCAACCTGGTATCTACATACGGCTTCGACGGCGTCCGCATCGACACCGTCAGGCACGTCGAGCAGGACTACTGGC
TRa2-cDNA ACTGTTGGCTTGCTGGCCTCCCAGACGTTGACACCCAGGACCCTACCATCAGGAGCCTCTACCAGGACTGGGTGTCCAACCTGGTATCTACATACGGCTTCGACGGCGTCCGCATCGACACCGTCAGGCACGTCGAGCAGGACTACTGGC
1201 1350
TRa2-gDNA CCGGCTTCGTCAATGCCAGCGGCGTGTACTGCATCGGGCGAAGTCTTCAACGGAGACCCAGACTTTATGCAGCCCTACCAATCGCTCATGCCCGGCCTCCTCAACTACGCCATCTTCTACCCCCTCAACGCCTTTTATCAGCAGACGGGCT
TRa2-cDNA CCGGCTTCGTCAATGCCAGCGGCGTGTACTGCATCGGCGAAGTCTTCAACGGAGACCCAGACTTTATGCAGCCCTACCAATCGCTCATGCCCGGCCTCCTCAACTACGCCATCTTCTACCCCCTCAACGCCTTTTATCAGCAGACGGGCT
1351 1500
TRa2-gDNA CCTCCCAAGCCCTGGTCGACATGCATGACCGTCTCAGCTCGTTCCCAGACCCGACGGGCGCTGGGCACCTTTGTCGATAACCACGACAACCCCCGCTTCCTCAGCGTCAAGAACGACACGTCTCTCTTCAAGAATGCCCTGACCTACACCA
TRa2-cDNA CCTCCCAAGCCCTGGTCGACATGCATGACCGTCTCAGCTCGTTCCCAGACCCGACGGCGCTGGGCACCTTTGTCGATAACCACGACAACCCCCGCTTCCTCAGCGTCAAGAACGACACGTCTCTCTTCAAGAATGCCCTGACCTACACCA
1501 1650
TRa2-gDNA TTCTCGGCCGAGGCATCCCCATTGTCTACTACGGCTCCGAGCAAGCCTTTTCGGGAAGCAACGACCCCGCCAACAGAGAGGACCTCTGGCGCAGCGGCTACAACACCGAGACGGACATGTACAATGCCATCTCCAAGCTCACCTTTGCCA
TRa2-cDNA TTCTCGGCCGAGGCATCCCCATTGTCTACTACGGCTCCGAGCAAGCCTTTTCGGGAAGCAACGACCCCGCCAACAGAGAGGACCTCTGGCGCAGCGGCTACAACACCGAGACGGACATGTACAATGCCATCTCCAAGCTCACCTTTGCCA
1651 1800
TRa2-gDNA AGCACACGGCCGGCGGCCTCGCCGACAACGACCACAAGCACCTGTACGTCGAGCCCACGGCATACGCCTGGAGCCGCCCGGCGGCAAGCTGGTGGCCTTTACCACCAACAGCGGCGGCGGCAGCTCGGCCCAGTTCTGCTTCGGCACGC
TRa2-cDNA AGCACACGGCCGGCGGCCTCGCCGACAACGACCACAAGCACCTGTACGTCGAGCCCACGGCATACGCCTGGAGCCGCCCGGCGGCAAGCTGGTGGCCTTTACCACCAACAGCGGCGGCGGCAGCTCGGCCCAGTTCTGCTTCGGCACGC
1801 1950
TRa2-gDNA AGGTCCCCAACGGGAGCTGGACGAATGTGTTTGATGGCGGCAATGGCCCGACGTACACTGCTGATGGCAATGGACAGCTCTGCTTGACCACGACGAATGGTGAGCCGATTGTGCTGCTGTCTTCATAAAACAATATGGCGACATATAATA
TRa2-cDNA AGGTCCCCAACGGGAGCTGGACGAATGTGTTTGATGGCGGCAATGGCCCGACGTACACTGCTGATGGCAATGGACAGCTCTGCTTGACCACGACGAATGGTGAGCCGATTGTGCTGCTGTCTTCATAA————————————————
1951 2100
TRa2-gDNA TACATGTATATCACCTAGTACATACTTGGATAGGTACGTGTTACTTACCCGGATAGAGCTTCATGTTGTTACCTTCAAGCTGTTGTTTCTTTCTTCTCTCTTTTGTGGACATACTGTACGATCATGAAGGGTACATATTTTAGTCGTAAC
TRa2-cDNA ——
2101 2250
TRa2-gDNA AAAATTAGGCATTTACTACTACCTAGACTAAACTGTTTGTTGTTGATCATGTACCTAGAGCAAGCAATGAACCATGCCATGATTTCCTTCATCTCCCAGACCCGTATTTGAATTGCCTGTGGATAGATGTGCTTGAAAGACCTGCCATGC
TRa2-cDNA ——
2251 2400
TRa2-gDNA GCTCAAAGTAATTGTTATTGAATAGTCCGTCCCAAAATATTAACTGCAGTGCCGAGATATCTGTTGTTCCGTCAGGCCTGTTCAACCTGCGGGGGATAGAAAATCTCCATGTGCTCATGAGTGCATAAATTCCGCACCGAATCCTCCGCTT
TRa2-cDNA ——
2401 2550
TRa2-gDNA CCAAAAAAAAAAAAGAAGCAATATTATAAAAAGCAAAGTCGTCATGCCGTCAAATAGCCTTTATAGTCCCGTGTATGCTCGCAAGTCTTGTCCGTCGTCGTTAGCCTGTATTATTCACATGCGTGTGTCATCGATAGCCTTGTGTTTCTC
TRa2-cDNA ——
2551 2633
TRa2-gDNA GTGTCGCACGATTTGCTCTTGATATTGACCACATTCCTTCGGTACAATGAGCAAATATATATACCGTTGTGGTGGGTAATGAG
TRa2-cDNA ——

Figura 5

```
1     ATGAAGCTTC GATCCGCCGT CCCGCTGCTG TTGCAGCTTT CTCTCCCGGC CGTCCTTGGC GCCGACACGG CAGACTGGAG GTCTCGTACC ATCTACTTTG CCCTGACAGA CCGAATTGCT
      M K L R S A V P L L L Q L S L P A V L G A D T A D W R S R T I Y F A L T D R I A

121   CGCAGCTCAA GCGACACGGG AGGCTCTGCG TGTACAAATC TGAATGACTA CTGTGGTGGC ACGTTCCAGG GCTTGGAGAG CAAGCTGGAC TACATCAAGG GCATGGGATT TGATGCCATC
      R S S S D T G G S A C T N L N D Y C G G T F Q G L E S K L D Y I K G M G F D A I

241   TGGATCAACC CCGTCGTAAC CAACAGTGAT TTCGGCTTCC ATGGCTACTG GGCACTGGAT CTAAACACTA TCAATTCTCA CTATGGCACT GCGGATGATT TAAAGAGTCT CGTTGATGCT
      W I N P V V T N S D F G F H G Y W A L D L N T I N S H Y G T A D D L K S L V D A

361   GCACATGGCA AGGGCTTCTA CATGATGGTC GACGTTGTAG CCAACCACAT GGGAAACGCA AACATCACAG ACGACTCCCC CTCCCCTCTG AACCAACAAT CCTCATACCA CACAAAATGT
      A H G K G F Y M M V D V V A N H M G N A N I T D D S P S P L N Q Q S S Y H T K C

481   GACATTGACT TCAACAACCA GACCAGCGTC GAAAACTGTT GGCTTGCTGG CCTCCCAGAC GTTGACACCC AGGACCCTAC CATCAGGAGC CTCTACCAGG ACTGGGTGTC CAACCTGGTA
      D I D F N N Q T S V E N C W L A G L P D V D T Q D P T I R S L Y Q D W V S N L V

601   TCTACATACG GCTTCGACGG CGTCCGCATC GACACCGTCA GGCACGTCGA GCAGGACTAC TGGCCCGGCT TCGTCAATGC CAGCGGCGTG TACTGCATCG GCGAAGTCTT CAACGGAGAC
      S T Y G F D G V R I D T V R H V E Q D Y W P G F V N A S G V Y C I G E V F N G D

721   CCAGACTTTA TGCAGCCCTA CCAATCGCTC ATGCCCGGCC TCCTCAACTA CGCCATCTTC TACCCCCTCA ACGCCTTTTA TCAGCAGACG GGCTCCTCCC AAGCCCTGGT CGACATGCAT
      P D F M Q P Y Q S L M P G L L N Y A I F Y P L N A F Y Q Q T G S S Q A L V D M H

841   GACCGTCTCA GCTCGTTCCC AGACCCGACG GCGCTGGGCA CCTTTGTCGA TAACCACGAC AACCCCCGCT TCCTCAGCGT CAAGAACGAC ACGTCTCTCT TCAAGAATGC CCTGACCTAC
      D R L S S F P D P T A L G T F V D N H D N P R F L S V K N D T S L F K N A L T Y

961   ACCATTCTCG GCCGAGGCAT CCCCATTGTC TACTACGGCT CCGAGCAAGC CTTTTCGGGA AGCAACGACC CCGCCAACAG AGAGGACCTC TGGCGCAGCG GCTACAACAC CGAGACGGAC
      T I L G R G I P I V Y Y G S E Q A F S G S N D P A N R E D L W R S G Y N T E T D

1081  ATGTACAATG CCATCTCCAA GCTCACCTTT GCCAAGCACA CGGCCGGCGG CCTCGCCGAC AACGACCACA AGCACCTGTA CGTCGAGCCC ACGGCATACG CCTGGAGCCG CGCCGGCGGC
      M Y N A I S K L T F A K H T A G G L A D N D H K H L Y V E P T A Y A W S R A G G

1201  AAGCTGGTGG CCTTTACCAC CAACAGCGGC GGCGGCAGCT CGGCCCAGTT CTGCTTCGGC ACGCAGGTCC CCAACGGGAG CTGGACGAAT GTGTTTGATG GCGGCAATGG CCCGACGTAC
      K L V A F T T N S G G G S S A Q F C F G T Q V P N G S W T N V F D G G N G P T Y

1321  ACTGCTGATG GCAATGGACA GCTCTGCTTG ACCACGACGA ATGGTGAGCC GATTGTGCTG CTGTCTTCAT AA
      T A D G N G Q L C L T T T N G E P I V L L S S
```

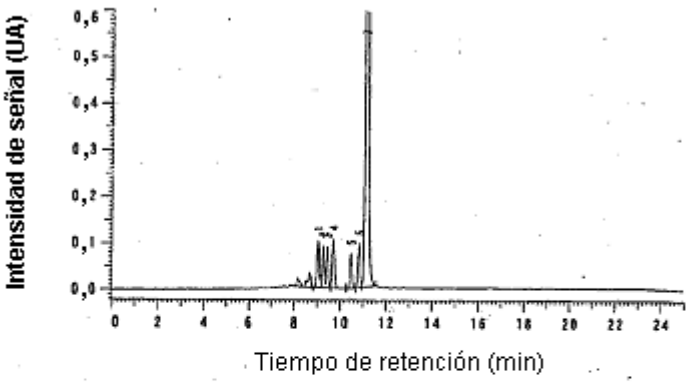
Figura 6

```
                1                                                                                                   100
TRa2            -MKLRSAVPLLLQLSLPAVLGADTADWRSRTIYFALTDRIARSSSDTGGSACTNLNDYCGGTFQGLESKLDYIKGMGFDAIWINPVVTNS-------DFGF
BAA00336        MMVAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWRSQSIYFLLTDRFARTDGSTTATCNTADQKYCGGTWQGIIDKLDYIQGMGFTAIWITPVTAQLPQTTAYGDAY

              101                                                                                                   200
TRa2            HGYWALDLNTINSHYGTADDLKSLVDAAHGKGFYMMVDVVANHMGNANITDDSPS-------PLNQQSSYHTKCDID-FNNQTSVENCWLAG-------LPDVDTQ
BAA00336        HGYWQQDIYSLNENYGTADDLKALSSALHERGMYLMVDVVANHMGYDGAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQTQVEYCWLGDNTVSLLDLDTT

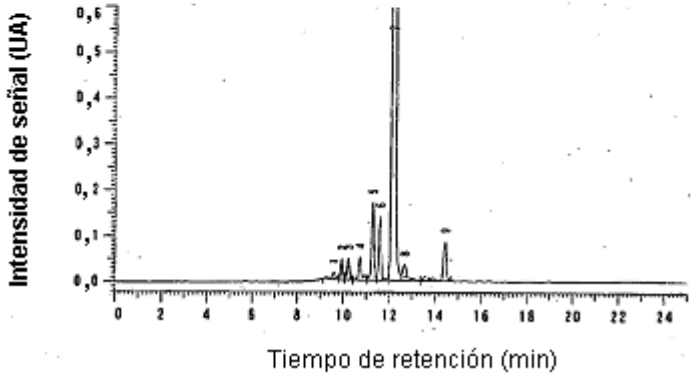
              201                                                                                                   300
TRa2            DPTIRSLYQDWVSNLVSTYGFDGVRIDTVRHVEQDYWPGFVNASGVYCIGEVFNGDPDFMQPYQSLMPGLLNYAIFYPLN-AFYQQTGSSQALVDMHDRL
BAA00336        KDVVKNEWYDWVGSLVSNYSIDGLRIDTVKHVQKDFWPGYNKAAGVYCIGEVLDVDPAYTCPYQNVMDGVLNYPIYYPLLNAFKSTSGSMDDLYNMINTV
                                          *                   *
              301                                                                                                   400
TRa2            SS-FPDPTALGTFVDNHDNPRFLSVKNDTSLFKNALTYTILGRGIPIVYYGSEQAFSGSNDPANREDLWRSGYNTETDMYNAISKLTFAKHTAG-------GL
BAA00336        KSDCPDSTLLGTFVENHDNPRFASYTNDIALAKNVAAFIILNDGIPIIYAGQEQHYAGGNDPANREATWLSGYPTDSELYKLIASANAIRNYAISKDTGF
                                      *
              401                                                                                                   499
TRa2            ADNDHKHLYVEPTAYAWSR--AGGKLVAFTTNSGGGSSAQFCFGTQVPNGSWTNVFDGGNGPTYTADGNGQLCLTTTNGEPIVLLSS----------
BAA00336        VTYKNWPIYKDDTTIAMRKGTDGSQIVTILSNKGASGDSYTLSLSGAGYTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPVPMAGGLPRVLYPTEKLAGSKICSSS
```

Figura 7



CATEQUINA

1. 5-Maltósido
2. 5-Glucósido
3. 4-Maltósido
4. 4-Glucósido
5. 3'-Maltósido
6. 3'-Glucósido



EGCG

2. 7-Maltósido
3. 7-Glucósido
5. 3'-Maltósido
6. 3'-Glucósido

Figura 8

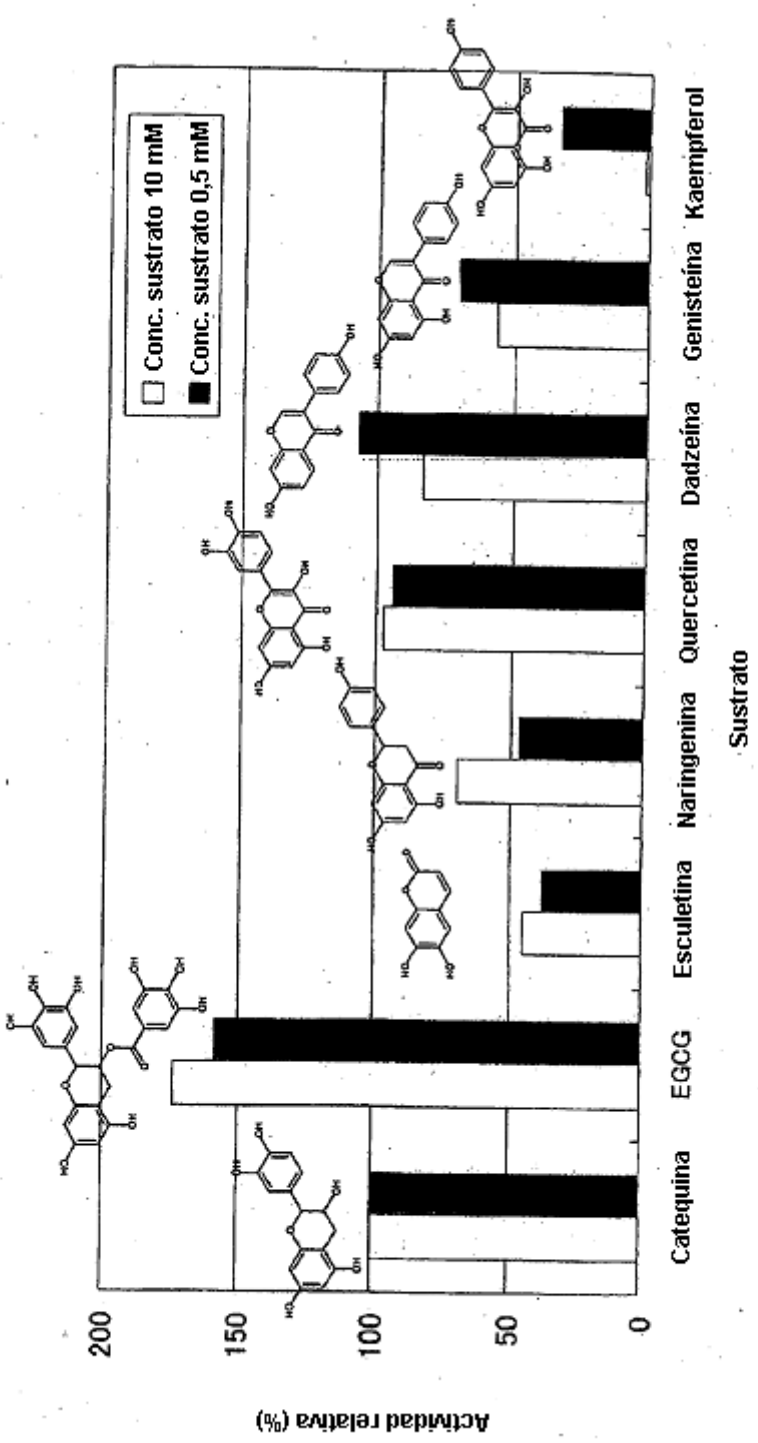

Conc. sustrato 10 mM
Conc. sustrato 0,5 mM
Actividad relativa (%)
200
150
100
50
0
Catequina
EGCG
Esculetina
Naringenina
Quercetina
Dadzeína
Genisteína
Kaempferol
Sustrato

Figura 9

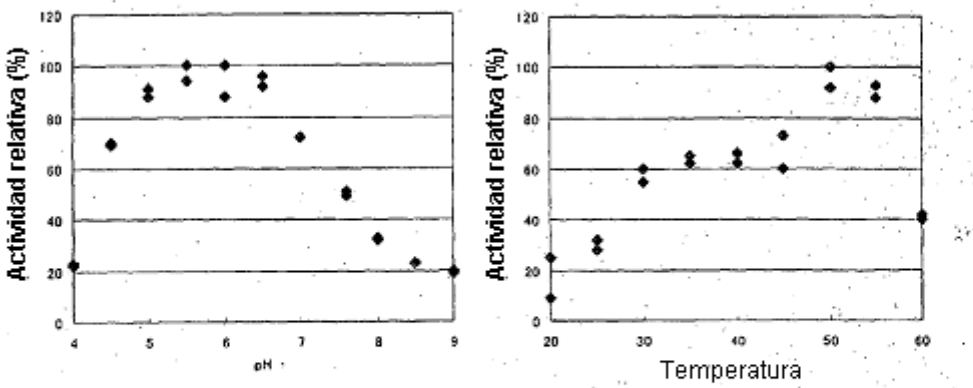


Figura 10

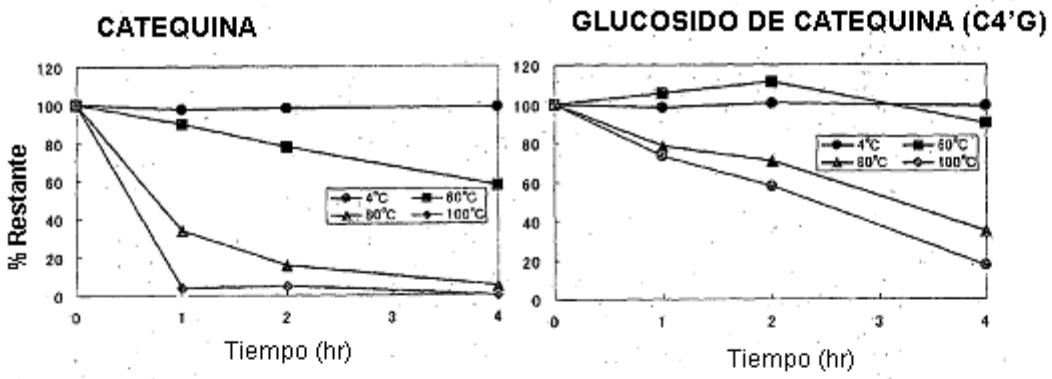


Figura 11

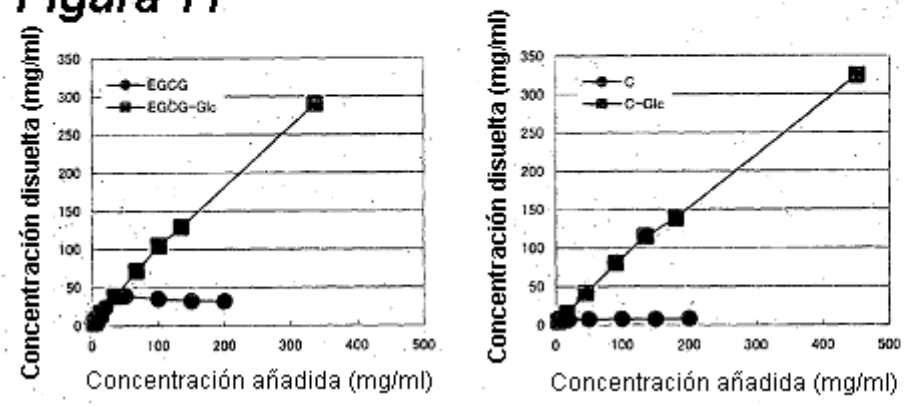


Figura 12

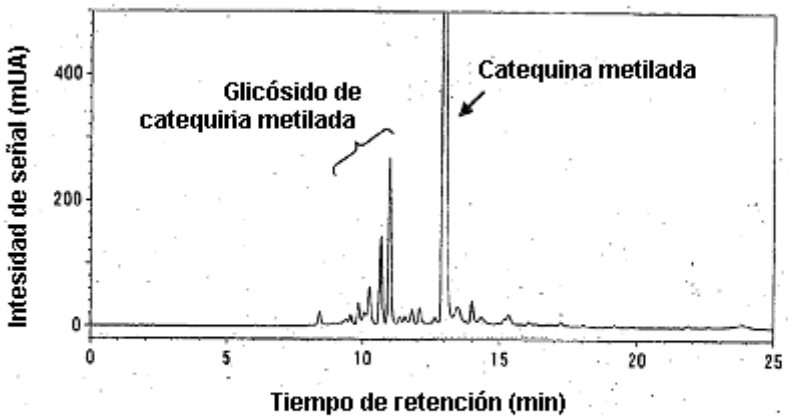


Figura 13

