(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 424 960**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 17/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.12.2008** **E 11170947 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013** **EP 2404995**

(54) Título: **Enzima asociado a la síntesis de ecuol**

(30) Prioridad:

27.12.2007 JP 2007336227
05.03.2008 JP 2008054874
26.03.2008 JP 2008080570

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2013

(73) Titular/es:

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kanda Tsukasamachi 2-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP

(72) Inventor/es:

SHIMADA, YOSHIKAZU;
YASUDA, SETSUKO;
TAKAHASHI, MASAYUKI;
HAYASHI, TAKASHI;
MIYAZAWA, NORIHIRO y
ABIRU, YASUHIRO

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 424 960 T3

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

DESCRIPCIÓN

Enzima asociado a la síntesis de ecuol.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, así como un polinucleótido que codifica dicho polipéptido. La invención se refiere además a un procedimiento para producir dihidrodaidzeína utilizando el polipéptido anteriormente indicado. La invención proporciona además técnicas referentes a los mismos.

Antecedentes de la técnica

Se cree que los derivados de isoflavona presentan diversas actividades fisiológicas y farmacológicas. Por ello, los derivados de isoflavona se utilizan como material para alimentos y productos farmacéuticos. A medida que los estudios han descubierto nuevas funciones de los derivados de isoflavona, han aparecido informes de que la actividad de tipo estrógeno de los derivados de isoflavona no se debe, tal como se creía convencionalmente, a la acción de los derivados de isoflavona mismo, sino a la fuerte actividad de tipo estrógeno presente en todo el cuerpo mostrada por ecuol, que resulta absorbido en los intestinos tras su liberación por diverso tipos de bacterias intestinales que metabolizan (biosintetizan) los derivados de isoflavona para producir ecuol. En el ser humano, no todos los individuos presentan la capacidad de producir ecuol en los intestinos, y esta capacidad de producir ecuol varía en diferentes individuos. Por ejemplo, algunos individuos pueden no presentar bacterias productoras de ecuol en los intestinos, mientras que otras pueden presentar dichas bacterias aunque sólo una capacidad limitada de producir ecuol.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, resultaría beneficioso en países con poblaciones en proceso de envejecimiento tales como Japón, utilizar efectivamente el ecuol presente en el cuerpo, particularmente tras considerar los trastornos crónicos tales como la osteoporosis que afectan a las personas de edad avanzada. Dado el hecho de que las bacterias productoras de ecuol no se encuentran presentes en todos los individuos, existe una necesidad de encontrar un material de síntesis de ecuol que permita la producción artificial eficiente del mismo.

Bajo estas circunstancias, resulta muy importante en términos de proporcionar un material de síntesis de ecuol, la identificación y utilización de enzimas implicados en la ruta biosintética del ecuol. Sin embargo, no se dispone de información sobre los enzimas que producen o catalizan algunos de los productos intermedios implicados en la ruta biosintética. Por ello se desea identificar enzimas asociados a la síntesis de dichos productos intermedios.

Documento de patente nº 1: JP nº A-2006-296434.

Exposición de la invención

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un enzima asociado a la síntesis de dihidrodaidzeína que puede ser utilizado como material de síntesis de ecuol. Concretamente, la invención presenta el objetivo de proporcionar un polipéptido con una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato. Otro objetivo de la invención es proporcionar un polinucleótido codificante de dicho polipéptido y técnicas referidas a la síntesis del dihidrodaidzeína utilizando dicho polipéptido.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir dihidrodaidzeína a partir de daidzeína.

Solución técnica

Se han llevado a cabo estudios exhaustivos para resolver los problemas anteriormente indicados, y se ha aislado con éxito a partir de bacterias intestinales productoras de ecuol un enzima capaz de sintetizar dihidrodaidzeína, un enzima capaz de sintetizar tetrahidrodaidzeína y un enzima capaz de sintetizar ecuol, utilizados como materiales de partida de la síntesis de ecuol, y han identificado las estructuras de estos enzimas. Además, se han llevado a cabo estudios adicionales y se ha tenido éxito en la producción artificial de dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y ecuol utilizando los enzimas anteriormente indicados. La presente invención se llevó a cabo tras estudios adicionales basándose en estos resultados.

Concretamente, se da a conocer lo siguiente:

Ítem A1. Un polipéptido seleccionado de entre:

(Aa) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1,

(Ab) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, y

(Ac) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

Ítem A2. Un polinucleótido seleccionado de entre:

(Ad) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4,

(Ae) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y

(Af) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Ad) o (Ae) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

Ítem A3. Un vector de expresión que incluye el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A4. Una célula recombinante transformada con el vector de expresión del Ítem A3.

Ítem A5. Una célula recombinante según el Ítem A4, en el que la célula recombinante es una célula procariótica bacteriana.

Ítem A6. Una célula recombinante según el Ítem A5, en el que la célula procariótica bacteriana pertenece al género *Lactococcus*.

Ítem A7. Un procedimiento para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula de cualquiera de los Ítems A4 a A6 con el fin de obtener un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

Ítem A8. Un polipéptido obtenido mediante el procedimiento del Ítem A7.

Ítem A9. Un procedimiento para producir dihidrodaidzeína, que comprende hacer que el polipéptido del Ítem A1 o A8 y NADPH y/o NADH actúen sobre la daidzeína.

Ítem A10. Un procedimiento para producir dihidrodaidzeína, que comprende la acción de la célula de cualquiera de los Ítems A4 a A6 sobre la daidzeína.

Ítem A11. Un anticuerpo con afinidad con el polipéptido del Ítem A1, o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A12. Un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido del Ítem A1 o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2, comprendiendo el método poner en contacto el anticuerpo del Ítem A11 con una muestra de ensayo.

Ítem A13. Un método según el Ítem A12, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem A14. Una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem A1, o con el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A15. Un cebador que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem A1 o con el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A16. Un método para detectar o medir un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem A1, o el polinucleótido del Ítem A2, utilizando la sonda del Ítem A14.

Ítem A17. Un método según el Ítem A16, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem A18. Un método según el Ítem A16, que comprende amplificar por PCR la totalidad o una parte de un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem A1, o el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A19. Una composición enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende el polipéptido del Ítem A1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A20. Una composición según el Ítem A19, que comprende además NADPH y/o NADH.

Ítem A21. Una composición de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende:

(Ai) el polipéptido del Ítem A1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2,
(Aii) NADPH y/o NADH, y
(Aiii) daidzeína.

Ítem A22. Una composición de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende:

(Aiv) la célula de cualquiera de los Ítems A4 a A6, y
(Aiii) daidzeína.

Ítem A23. Un kit de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende:

(Ai) el polipéptido del Ítem A1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2,
(Aii) NADPH y/o NADH, y
(Aiii) daidzeína.

Ítem A24. Un kit de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende:

(Aiv) la célula de cualquiera de los Ítems A4 a A6, y
(Aiii) daidzeína.

Ítem A25. Un kit de medición inmunológica para medir el polipéptido del Ítem A1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem A2, comprendiendo el kit por lo menos el anticuerpo del Ítem A11.

Ítem 26. Un kit de PCR para detectar un polinucleótido codificante del polinucleótido del Ítem A1, o el polinucleótido del Ítem A2, comprendiendo el kit de PCR por lo menos el cebador del Ítem A15.

Ítem A27. Un kit según el Ítem A26, en el que el kit está destinado a identificar una célula que contiene un polinucleótido codificante del polipéptido del Ítem A1, o el polinucleótido del Ítem A2.

Ítem A28. Un kit de PCR según el Ítem A27, en el que el kit está destinado a la PCR.

Ítem A29. Un enzima de síntesis de dihidrodaidzeína, que consiste en el polipéptido del Ítem A1.

Ítem B1. Un polipéptido seleccionado de entre:

(Ba) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7,

(Bb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, y

(Bc) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de 60% o más con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Ítem B2. Un polinucleótido seleccionado de entre:

(Bd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10,

(Be) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y

(Bf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Bd) o (Be) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Ítem B3. Un vector de expresión que incluye el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B4. Una célula recombinante transformada con el vector de expresión del Ítem B3.

Ítem B5. Una célula recombinante según el Ítem B4, en la que la célula recombinante es una célula procariótica bacteriana.

Ítem B6. Una célula recombinante según el Ítem B5, en la que la célula procariótica bacteriana pertenece al género *Lactococcus*.

Ítem B7. Un procedimiento para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula de cualquiera de los Ítems B4 a B6 para obtener un polipéptido que presenta una actividad de formación de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Ítem B8. Un polipéptido obtenido mediante el procedimiento del Ítem B7.

Ítem B9. Un procedimiento para producir tetrahidrodaidzeína, que comprende hacer que el polipéptido del Ítem B1 o B8, y NADPH y/o NADH actúe sobre la dihidrodaidzeína.

Ítem B10. Un procedimiento para producir tetrahidrodaidzeína, que comprende hacer que la célula de cualquiera de los Ítems B4 a B6 actúe sobre la dihidrodaidzeína.

Ítem B11. Un anticuerpo que presenta afinidad con el polipéptido del Ítem B1, o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B12. Un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido del Ítem B1 o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2, comprendiendo el método hacer que el anticuerpo del Ítem B11 entre en contacto con una muestra de ensayo.

Ítem B13. Un método según el Ítem B12, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem B14. Una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem B1, o con el polipéptido del Ítem B2.

Ítem B15. Un cebador que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem B1, o con el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B16. Un método para detectar o medir un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem B1, o el polinucleótido del Ítem B2, utilizando la sonda del Ítem B14.

Ítem B17. Un método según el Ítem B16, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem B18. Un método según el Ítem B16, que comprende amplificar por PCR la totalidad o parte de un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem B1, o el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B19. Una composición enzimática de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que comprende el polipéptido del Ítem B1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B20. Una composición según el Ítem B19, que comprende además NADPH y/o NADH.

Ítem B21. Una composición de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que comprende:

(Bi) el polipéptido del Ítem B1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2,
(Bii) NADPH y/o NADH, y
(Biii) dihidrodaidzeína.

Ítem B22. Una composición de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que comprende:

(Biv) la célula de cualquiera de los ítems B4 a B6, y
(Biii) dihidrodaidzeína.

Ítem B23. Un kit de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que comprende:

(Bi) el polipéptido del Ítem B1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2,
(Bii) NADPH y/o NADH, y
(Biii) dihidrodaidzeína.

Ítem B24. Un kit de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que comprende:

(Biv) la célula de cualquiera de los Ítems B4 a B6, y
(Biii) dihidrodaidzeína.

Ítem B25. Un kit de medición inmunológica para medir el polipéptido del Ítem B1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem B2, comprendiendo el kit por lo menos el anticuerpo del Ítem B11.

Ítem B26. Un kit de PCR para detectar un polinucleótido codificante del polipéptido del Ítem B1, o el polinucleótido del Ítem B2, comprendiendo el kit de PCR por lo menos el cebador del Ítem B15.

Ítem B27. Un kit según el Ítem B26, en el que el kit está destinado a la identificación de una célula que contiene el polinucleótido codificante del polipéptido del Ítem B1, o el polinucleótido del Ítem B2.

Ítem B28. Un kit de PCR según el Ítem B27, en el que el kit está destinado a la realización de PCR.

Ítem B29. Un enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína, que consiste en el polipéptido del Ítem B1.

Ítem C1. Un polipéptido seleccionado de entre:

(Ca) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13,

(Cb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato, y

(Cc) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

Ítem C2. Un polinucleótido seleccionado de entre:

(Cd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16,

(Ce) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y

(Cf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Cd) o (Ce), y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

Ítem C3. Un vector de expresión que incluye el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C4. Una célula recombinante transformada con el vector de expresión del Ítem C3.

Ítem C5. Una célula recombinante según el Ítem C4, en la que la célula recombinante es una célula procariótica bacteriana.

Ítem C6. Una célula recombinante según el Ítem C5, en la que la célula procariótica bacteriana pertenece al género *Lactococcus*.

Ítem C7. Un procedimiento para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula de cualquiera de los Ítems C4 a C6 con el fin de obtener un polipéptido que presenta una actividad de formación de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

Ítem C8. Un polipéptido obtenido mediante el procedimiento del Ítem C7.

Ítem C9. Un procedimiento para producir ecuol, que comprende hacer que el polipéptido del Ítem C1 o C8 actúa sobre la tetrahidrodaidzeína.

Ítem C10. Un procedimiento para producir ecuol, que comprende hacer que la célula de cualquiera de los Ítems C4 a C6 actúe sobre la tetrahidrodaidzeína.

Ítem C11. Un anticuerpo con afinidad con el polipéptido del Ítem C1, o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C12. Un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido del Ítem C1 o el polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2, comprendiendo el método hacer que el anticuerpo del Ítem C11 entre en contacto con una muestra de ensayo.

Ítem C13. Un método según el Ítem C12, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem C14. Una sonda que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem C1, o con el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C15. Un cebador que presenta una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem C1, o con el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C16. Un método para detectar o medir un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem C1, o el polinucleótido del Ítem C2, utilizando la sonda del Ítem C14.

Ítem C17. Un método según el Ítem C16, en el que el polipéptido que debe detectarse o medirse existe en una célula procariótica bacteriana.

Ítem C18. Un método según el Ítem C16, que comprende amplificar por PCR la totalidad o una parte de un polinucleótido que codifica el polipéptido del Ítem C1, o el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C19. Una composición enzimática de síntesis de ecuol, que comprende el polipéptido del Ítem C1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C20. Una composición de síntesis de ecuol, que comprende:

(Ci) el polipéptido del Ítem C1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2, y
(Cii) tetrahidrodaidzeína.

Ítem C21. Una composición de síntesis de ecuol, que comprende:

(Ciii) la célula de cualquiera de los Ítems C4 a C6, y
(Cii) tetrahidrodaidzeína.

Ítem C22. Un kit de síntesis de ecuol, que comprende:

(Ci) el polipéptido del Ítem C1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2, y
(Cii) tetrahidrodaidzeína.

Ítem C23. Un kit de síntesis de ecuol, que comprende:

(Ciii) la célula de cualquiera de los Ítems C4 a C6, y
(Cii) tetrahidrodaidzeína.

Ítem C24. Un kit de medición inmunológica para medir el polipéptido del Ítem C1, o un polipéptido codificado por el polinucleótido del Ítem C2, comprendiendo el kit por lo menos el anticuerpo del Ítem C11.

Ítem C25. Un kit de PCR para detectar un polinucleótido codificante del polipéptido del Ítem C1, o el polinucleótido del Ítem C2, comprendiendo el kit de PCR por lo menos el cebador del Ítem C15.

Ítem C26. Un kit según el Ítem C25, en el que el kit está destinado a la identificación de una célula que contiene un polinucleótido codificante del polipéptido del Ítem C1, o el polinucleótido del Ítem C2.

Ítem C27. Un kit según el Ítem C26, en el que el kit está destinado a la realización de PCR.

Ítem C28. Un enzima de síntesis de ecuol, que consiste en el polipéptido del Ítem C1.

Ítem D1. Un procedimiento para producir tetrahidrodaidzeína que comprende las primera y segunda etapas siguientes, comprendiendo la primera etapa hacer que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos siguientes (Aa) a (Ac), y NADPH y/o NADH, actúe sobre la daidzeína, produciendo de esta manera dihidrodaidzeína,

(Aa) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1,

(Ab) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 con la sustitución, deleción,

inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando la daidzeína como sustrato, y

(Ac) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato; comprendiendo la segunda etapa hacer que un enzima que consiste en los polipéptidos (Ba) a (Bc) siguientes y NADPH y/o NADH actúen sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína,

(Ba) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7,

(B) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando la dihidrodaidzeína como sustrato, y

(Bc) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Ítem D2. Un producto que contiene tetrahidrodaidzeína, producido mediante el procedimiento según el Ítem D1.

Ítem D3. Un procedimiento para producir ecuol que comprende la segunda y tercera etapas, comprendiendo la segunda etapa hacer que un enzima que consiste en los polipéptidos (Ba) a (Bc) siguientes y NADP y/o NADH actúen sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína,

(Ba) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7,

(Bb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, y

(Bc) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato,

comprendiendo la tercera etapa hacer que un enzima que consiste en los polipéptidos (Ca) a (Cc) siguientes actúe sobre la tetrahidrodaidzeína, produciendo de esta manera ecuol,

(Ca) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13,

(Cb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato, y

(Cc) un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

Ítem D4. Un producto que contiene ecuol, producido mediante el procedimiento según el Ítem D3.

Ítem D5. Un procedimiento para producir ecuol que comprende la primera a tercera etapas.

Ítem D6. Un producto que contiene ecuol, producido mediante el procedimiento según el Ítem D5.

Ítem D7. Un vector de expresión que presenta por lo menos un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), (Bd) a (Bf) y (Cd) a (Cf) siguientes,

(Ad) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4,

(Ae) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1,

(Af) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Ad) o (Ae), y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato,

(Bd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10,

(Be) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7,

(Bf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Bd) o (Be) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato,

(Cd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16,

(Ce) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y

(Cf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Cd) o (Ce) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

Ítem D8. Una célula recombinante transformada con el vector de expresión del Ítem 7.

Ítem D9. Una célula recombinante según el Ítem 8, en la que la célula recombinante es una célula procariótica bacteriana.

Ítem D10. Una célula recombinante según el Ítem 9, en la que la célula procariótica bacteriana pertenece al género *Lactococcus*.

Ítem D11. Un procedimiento para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos dos de las etapas cuarta a sexta siguientes, comprendiendo hacer que uno de los polinucleótidos (Ad) a (Af) siguientes actúe sobre la daidzeína, produciendo de esta manera dihidrodaidzeína.

(Ad) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4,

(Ae) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y

(Af) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Ad) o (Ae), y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, comprendiendo la quinta etapa hacer que una célula recombinante que comprende uno de los polinucleótidos (Bd) a (Bf) siguientes actúe sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína,

(Bd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10,

(Be) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y

(Bf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Bd) o (Be) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, comprendiendo la sexta etapa hacer que una célula recombinante que comprende uno de los polipéptidos (Cd) a (Cf) siguientes actúe sobre la tetrahidrodaidzeína, produciendo de esta manera ecuol.

(Cd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16,

(Ce) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y

(Cf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Cd) o (Ce) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato, en el que por lo menos dos polinucleótidos seleccionados de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), (Bd) a (Bf) y (Cd) a (Cf) pueden encontrarse presentes en una única célula recombinante.

Ítem D12. Una célula recombinante según el Ítem 11, en la que la célula recombinante es una célula procariótica bacteriana.

Ítem D13. Una célula recombinante según el Ítem D12, en la que la célula procariótica bacteriana pertenece al género *Lactococcus*.

Ítem D14. Un producto que contiene dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, producido mediante cualquiera de los procedimientos según los Ítems D11 a D13.

Ítem D15. Un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos uno de los primer a tercer recipientes de reacción,

presentando el primer recipiente de reacción unos medios de reacción en los que se inmoviliza un enzima que consiste en los polipéptidos (Aa) a (Ac), utilizando el recipiente de reacción para la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína utilizando el enzima, disponiendo los medios de reacción en una posición que permita el contacto con la daidzeína,

presentando el segundo recipiente de reacción unos medios de reacción en los que se inmoviliza un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ba) a (Bc), utilizando el recipiente de reacción para la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína utilizando el enzima, disponiendo los medios de reacción en una posición que permita el contacto con la dihidrodaidzeína, y

presentando el tercer recipiente de reacción medios en los que se inmoviliza un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ca) a (Cc), utilizando el recipiente de reacción para la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína utilizando el enzima, disponiendo los medios de reacción en una posición que permita el contacto con la tetrahidrodaidzeína.

Ítem D16. Un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, comprendiendo por lo menos uno de entre el cuarto a sexto recipientes de reacción,

presentando el cuarto recipiente de reacción unos medios de reacción en los que se inmoviliza una célula recombinante que comprende uno de los polipéptidos (Ad) a (Af), utilizando el recipiente de reacción para la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína utilizando los medios de reacción, disponiendo los medios de reacción en una posición que permita el contacto con la daidzeína,

presentando el quinto recipiente de reacción unos medios de reacción en los que se inmoviliza una célula recombinante que comprende los polinucleótidos (Bd) a (Bf), utilizando el recipiente de reacción para la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína utilizando los medios de reacción, disponiendo los medios de reacción en una posición que permite el contacto con la dihidrodaidzeína, y

presentando el sexto recipiente de reacción unos medios de reacción en los que se inmoviliza una célula recombinante que comprende uno de los polinucleótidos (Cd) a (Cf), utilizando el recipiente de reacción para la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína utilizando los medios de reacción, disponiendo los medios de reacción en una posición que permite el contacto con la tetrahidrodaidzeína.

Efectos de la invención

La presente exposición proporciona polipéptidos capaces de: (1) sintetizar dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, (2) sintetizar tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, y (3) sintetizar ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato. De esta manera, la presente invención resulta útil para la síntesis industrial de dihidrodaidzeína, que es un producto intermedio generado en la producción de ecuol a partir de daidzeína, así como la síntesis industrial de ecuol. La presente invención permitirá la producción industrial de ecuol sin utilizar cepas bacterianas anaeróbicas utilizadas tradicionalmente para la producción de ecuol, las cuales resultan difícil de manipular.

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación, todas las abreviaturas utilizadas representan los nombres de sustancias, incluyendo aminoácidos, polipéptidos, secuencias de bases y ácidos nucleicos, según la nomenclatura especificada por la IUPAC-IUB (IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem. 138:9, 1984), en las Directrices para la redacción de especificaciones que contienen secuencias de bases o secuencias de aminoácidos (oficina de patentes japonesa) y según otros símbolos convencionales utilizados comúnmente en este campo.

A continuación se describe en detalle la presente invención.

A: enzima de síntesis de dihidrodaidzeína

La presente sección describe en detalle un enzima de síntesis de dihidrodaidzeína (en adelante también denominada enzima E1). Salvo por lo descrito, la explicación general del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína se aplica a un enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína y a un enzima de síntesis de ecuol, descrito posteriormente.

A-1. Polipéptido

La presente invención proporciona un polipéptido (en adelante también denominado "polipéptido E1") para la síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato. Concretamente, la invención proporciona:

(Aa) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, por ejemplo es de entre 1 y 250, preferentemente de entre 1 y 200, más preferentemente de entre 1 y 150, más preferentemente de entre 1 y 100, más preferentemente de entre 1 y 50, más preferentemente de entre 1 y 30, más preferentemente de entre 1 y 15, más preferentemente de entre 1 y 5, todavía más preferentemente de entre 1 y 4, todavía más preferentemente de entre 1 y 3, y con particular preferencia, 1 o 2.

(Ab) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, y

(Ac) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

En el polipéptido (Ab), el intervalo "uno o más aminoácidos" no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que el polipéptido presente la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato. Entre los ejemplos de polipéptido (Ab) se incluyen un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 y un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 contiene tres aminoácidos sustituidos. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3 contiene diez aminoácidos sustituidos. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 corresponde al polipéptido enzima E1 de *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15 (nº FERM BP-6435). La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº corresponde al polipéptido enzima E1 de *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-6437).

Además, el tipo de sustitución de aminoácido en el polipéptido (Ab) no se encuentra particularmente limitado. Sin embargo, desde el punto de vista de la prevención del cambio fenotípico en el polipéptido, resulta preferible que la sustitución se produzca entre aminoácidos análogos. Los aminoácidos análogos pueden clasificarse de la manera siguiente:

Aminoácidos aromáticos: Phe, Trp y Tyr.
Aminoácidos alifáticos: Ala, Leu, Ile y Val.
Aminoácidos polares: Gln y Asn.
Aminoácidos básicos: Lys, Arg e His.
Aminoácidos ácidos: Glu y Asp.
Aminoácidos con un grupo hidroxilo: Ser y Thr.
Aminoácidos con una cadena lateral corta: Gly, Ala, Ser, Thr y Met.

En el polipéptido (Ab), resulta preferible que la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácido se produzca en regiones en las que el cambio de aminoácido no presenta efectos importantes sobre las estructuras de orden superior del polipéptido, o en donde el cambio no afecte negativamente el centro activo del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína. Entre los ejemplos de dichas regiones se incluyen regiones de baja conservación entre las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, nº 2 y nº 3, y regiones próximas de las mismas, y la región N-terminal o la región C-terminal. Entre los ejemplos concretos se incluyen leucina en la posición 45, asparagina en la posición 80, valina en la posición 167, ácido aspártico en la posición 231, isoleucina en la posición 233, arginina en la posición 435, ácido aspártico en la posición 459, valina en la posición 462, arginina en la posición 528, serina en la posición 540, isoleucina en la posición 639, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y regiones contiguas de dichos aminoácidos. La "región contigua" se refiere a regiones en las que la actividad enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína no resulta afectada. Entre los ejemplos se incluyen aquellas regiones a cinco o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, preferentemente aquéllas a cuatro o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, más preferentemente aquéllas a tres o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, todavía más preferentemente aquéllas a dos o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, con particular preferencia aquellos a un aminoácido o contiguos a uno de los aminoácidos ejemplificados.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de los aminoácidos en las posiciones 112 a 116 se considera que corresponde al dominio de unión de NADPH. Con la condición de que las funciones del dominio NADPH no resulten inhibidas, puede producirse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido en la secuencia de los cinco aminoácidos. En dicha secuencia, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a tres, más preferentemente no es superior a dos, y todavía más preferentemente a uno. Resulta más preferente ninguna mutación de la secuencia de aminoácidos. En particular, preferentemente no se produce ninguna

sustitución, deleción, inserción o adición de los aminoácidos en las posiciones 112, 115 y 116.

La histidina en la posición 260 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 también se considera asociada con el sitio de relevo de protones. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que las funciones del sitio de relevo de protones no resulten inhibidas, dicha histidina puede sustituirse por otro aminoácido, aunque preferentemente no se sustituye.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de los aminoácidos en las posiciones 343 a 363 se considera que corresponde al motivo grupo Fe-S. Con la condición de que las funciones del motivo no resultan inhibidas, puede producirse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Sin embargo, resulta preferente que las cisteínas en las posiciones 343, 346, 350 y 363 no muten. En el caso de que la secuencia presente una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones diferentes de dichos tres aminoácidos, resulta preferente que el número de aminoácidos sustituidos preferentemente no sea superior a cuatro, más preferentemente no sea superior a tres, todavía más preferentemente no sea superior a dos, y con particular preferencia a uno. Resulta más preferente que no se haya producido ninguna sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácidos en la secuencia.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 390 a 413 es considerada que corresponde al dominio de unión FAD. Por lo tanto, en tanto que las funciones del dominio no sean inhibidas, puede producirse sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Resulta sin embargo preferido que las glicinas en las posiciones 390, 392 y 395 no estén mutadas. Cuando la secuencia presenta una o más sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, el número de aminoácidos mutados es preferentemente no superior a cuatro, más preferentemente no superior a tres, todavía más preferentemente no superior a 2, y preferentemente de manera particular uno. Todavía más preferentemente no existe ninguna mutación en la secuencia de aminoácidos.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, la secuencia de los aminoácidos en las posiciones 512 a 540 también se considera que corresponde al dominio de unión FAD. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que las funciones del dominio no resulten inhibidas, puede producirse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Sin embargo, resulta preferente que no muten las glicinas en las posiciones 512, 514 y 517. En el caso de que la secuencia presente una o más sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a cuatro, más preferentemente no es superior a tres, todavía más preferentemente no es superior a dos y con particular preferencia es de uno. Resulta más preferente que no se produzca ninguna mutación en la secuencia de aminoácidos.

Una alineación, que indica las regiones de las secuencias de aminoácidos con posibles funciones tales como las indicadas anteriormente, se muestra en la figura 27.

La sustitución, deleción, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una secuencia específica de aminoácidos resulta posible mediante técnicas conocidas.

En el polipéptido (Ac), la secuencia de aminoácidos presenta una identidad, por ejemplo, de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1. Sin embargo, preferentemente la secuencia de aminoácidos presenta generalmente una identidad de 80% o superior, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, todavía más preferentemente de 98% o superior, y con particular preferencia de 99% o superior, respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1.

Concretamente, el polipéptido (Ac) puede ser un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3. La identidad de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 es de 99,5% (Blast2). La identidad de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3 es de 98,6% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una forma de realización preferida de la invención, el polipéptido (Ac) comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 98,6% o superior, o más preferentemente de 99,5% respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1.

La identidad de la secuencia de aminoácidos puede calcularse utilizando herramientas de análisis tales como, por ejemplo, FASTA, BLAST, PSI-BLAST, SSEARCH u otros tipos de software disponible comercialmente o por líneas de telecomunicación (Internet). Concretamente, generalmente se lleva a cabo una búsqueda de BLAST bajo las condiciones iniciales siguientes con el fin de calcular la identidad (%) de la secuencia de aminoácidos.

BLAST 2.1 avanzado:
Programa: blastp.
Valor esperado: 10.
Filtros: todos DESACTIVADOS.

Matriz: BLOSUM62.
Coste de presencia de hueco: 11 (por defecto).
Coste por residuo de hueco: 1 (por defecto).
Proporción lambda: 0,85 (por defecto).
Otros parámetros (por defecto).

Respecto a los polipéptidos (Ab) y (Ac), la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato puede confirmarse de la manera siguiente. En primer lugar, se añade un polipéptido de interés a una solución de sustrato de la composición indicada posteriormente, a una concentración de 0,001 mg/ml. A continuación, la solución se incuba a 37ºC durante 2 horas con el fin de comprobar la presencia o ausencia de dihidrodaidzeína en la solución. La presencia de dihidrodaidzeína en la solución tras la incubación se utiliza como indicador de la actividad del polipéptido de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

Composición de la solución de sustrato

tampón de fosfato potásico 0,1 M
PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
ditiotreitol 2 mM
hidrosulfito sódico 5 mM
NADPH o NADH 2 mM
daidzeína 40 µM
pH 7,0

Propiedad enzimática

Debido a que el polipéptido E1 presenta una actividad enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato. El polipéptido también se denomina enzima E1. El enzima E1 resulta activado por la presencia de un agente reductor, tal como $Na_2S_2O_4$ y por iones metálicos tales como Fe^{2+} y Mn^{2+}. Además, el enzima E1 requiere NADPH o NADH a modo de coenzima. La temperatura óptima del enzima E1 es de aproximadamente 30ºC y el pH óptimo es de 7,0. El enzima no sólo puede sintetizar dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato, sino que también puede sintetizar daidzeína a partir de dihidrodaidzeína, como reacción inversa.

El polipéptido puede producirse mediante técnicas de ingeniería genética que se describirán posteriormente, o mediante aislamiento y purificación a partir de microorganismos capaces de producirla. Además, pueden utilizarse métodos de síntesis química comunes para producir el polipéptido E1, basándose en la información de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, nº 2 o nº 3. Entre dichos métodos de síntesis química se incluyen métodos de síntesis peptídica en fase líquida o en fase sólida comunes.

A continuación se describe un método para el aislamiento y purificación de polipéptido E1 a partir de un microorganismo capaz de producir polipéptido E1. En primer lugar, se rompen las células de un microorganismo capaz de producir polipéptido E1, con el fin de obtener un extracto bruto del microorganismo. En la presente invención, las células pueden romperse mediante métodos utilizados en procedimientos de rotura celular comunes, tales como la rotura utilizando una prensa francesa, un molino celular y otros sistemas de rotura celular, y la sonicación en una solución hipotónica. El extracto bruto puede suplementarse con un tampón apropiado. En el caso de que el polipéptido E1 se condicione anaeróbicamente, resulta deseable añadir un agente reductor adecuado al extracto bruto para mantener la actividad del polipéptido E1. Para mejorar la pureza, el extracto bruto puede purificarse adicionalmente mediante procedimientos tales como la precipitación con sulfato amónico, la precipitación con solvente orgánico utilizando etanol o similar, y la precipitación isoeléctrica. A continuación, puede obtenerse una fracción que contiene polipéptido E1 sometiendo el extracto bruto a procedimientos tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la cromatografía hidrofóbica, diversos tipos de cromatografía de afinidad, la cromatografía de fase inversa y la cromatografía de columna de hidroxiapatito. Estos procedimientos de cromatografía pueden utilizar una columna abierta o puede utilizarse la HPLC, según se requiera. La pureza de la fracción que incluye polipéptido E1 puede estimarse fácilmente mediante visualización mediante electroforesis, y particularmente mediante SDS-PAGE. La confirmación del polipéptido E1 también resulta posible mediante análisis de la secuencia de aminoácidos, espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas tal como EM MALDI-TOF, EM ESI Q-TOF y EM MALDI Q-TOF y la huella peptídica, por ejemplo.

En la presente invención, el microorganismo capaz de producir polipéptido E1 preferentemente se cultiva en un medio que contiene una cantidad deseada de daidzeína (por ejemplo, aunque sin limitación, un medio que contiene por lo menos 0,01 µg/ml de daidzeína) en términos de producción eficiente de polipéptido E1.

El polipéptido puede ser monomérico o dimérico o polimérico, con la condición de que pueda sintetizar dihidrodaidzeína. Además, para mejorar la estabilidad y otras características, el polipéptido E1 puede modificarse según resulte necesario, mediante la adición de polietilenglicol o una cadena sacárida.

El polipéptido E1 puede servir como catalizador que convierte la daidzeína (un sustrato) en dihidrodaidzeína. La dihidrodaidzeína es convertida posteriormente en ecuol por el enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína y el enzima de síntesis de ecuol, tal como se indica posteriormente. Se cree que el ecuol muestra diversas actividades fisiológicas en el cuerpo. A este respecto, el polipéptido E1, que es capaz de proporcionar el material para la síntesis del ecuol, se considera importante.

A-2. Polinucleótido.

La presente invención proporciona además un polinucleótido (en adelante también denominado "polinucleótido E1") que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato. Concretamente, la invención proporciona:

(Ad) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4,

(Ae) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y

(Af) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Ad) o (Ae) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando la daidzeína como sustrato.

La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 6.

Con respecto al polinucleótido (Af), la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" se refiere al hibridación entre dos fragmentos polinucleótidos bajo condiciones de hibridación ordinarias, tal como describen Sambrook *et al.*, en: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989. Más concretamente, "condiciones restrictivas" se refiere a la hibridación en 6,0xSSC a aproximadamente 45ºC y el lavado con 2,0xSSC a 50ºC. Entre los ejemplos de polinucleótido (Af) se incluyen la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 6.

El "polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas" generalmente presenta más de un determinado nivel de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido utilizado como sonda. La identidad es, por ejemplo, de 60% o más, preferentemente de 70% o más, más preferentemente de 80% o más, todavía más preferentemente de 90% o más, todavía más preferentemente de 95% o más, y con particular preferencia de 98% o más. La identidad de la secuencia de nucleótidos puede calcularse utilizando herramientas de análisis tales como, por ejemplo, FASTA, BLAST, PSI-BLAST, SSEARCH u otros tipos de software disponible comercialmente o por líneas de telecomunicación (Internet). Concretamente, generalmente se lleva a cabo una búsqueda de BLAST bajo las condiciones iniciales siguientes con el fin de calcular la identidad (%) de la secuencia de nucleótidos.

BLAST 2.1 avanzado:
Programa: blastn.
Parámetros: por defecto.

La homología de secuencias de bases entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 5 es de 99,6% (Blast2). La homología de secuencias de bases entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 6 es de 97,6% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una forma de realización preferida de la invención, un polinucleótido (Af) comprende una secuencia de bases que presenta una homología de 97,6% y más preferentemente una homología de 99,6% respecto a la secuencia de bases SEC ID nº 4.

Con respecto al polinucleótido (Af), la "actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato" puede confirmarse mediante el método utilizado para los polipéptidos (Ab) y (Ac).

El polinucleótido puede producirse u obtenerse mediante métodos químicos de síntesis de ADN, basándose en la información de secuencia SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6. Generalmente, el polinucleótido E1 puede producirse u obtenerse fácilmente mediante técnicas de ingeniería genética comunes (ver, por ejemplo, Molecular Cloning, 2a edición, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989; y Zoku Seikagaku Jikken Kouza, Gene Kennkyu-hou I, III y III, The Japanese Biochemical Society, 1986).

Un ejemplo de dichos métodos químicos de síntesis de ADN es un método de síntesis en fase sólida utilizando el método de fosforamidita, que puede utilizar un autosintetizador.

En un ejemplo específico de técnicas de ingeniería genética comunes, se prepara una biblioteca de ADNc mediante

un método ordinario a partir de una fuente adecuada que expresa el polinucleótido de E1 y la biblioteca se criba para los clones deseados utilizando una sonda o anticuerpo adecuado específico para el polinucleótido de E1 (ver, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6613, 1981; Science 222:78, 1983).

La fuente de ADNc no se encuentra particularmente limitada con la condición de que sea un organismo que expresa el polinucleótido E1. Entre los ejemplos específicos se incluyen microorganismos capaces de producir ecuol, preferentemente bacterias del ácido láctico, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Streptococcus* capaces de producir ecuol, más preferentemente *Lactococcus garvieae*, *Bacteroides ovatus* y *Streptococcus constellatus*, capaces de producir ecuol, siendo adicionalmente preferente *Lactococcus garvieae* fecal, capaz de producir ecuol, y con particular preferencia, *Lactococcus* cepa 20-92, *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15, *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-10036, nº FERM BP-6435 y nº FERM BP-6437, respectivamente; depositados en el Depósito Internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), cepas fecales de *Lactococcus garvieae* capaces de producir ecuol.

Pueden utilizarse métodos ordinarios para procedimientos que incluyen la separación del ARN total, la separación y purificación del ARNm y la preparación y clonación de ADNc. El método de cribado de la biblioteca de ADNc para un polinucleótido de la presente invención no se encuentra particularmente limitado y puede utilizarse un método ordinario. Por ejemplo, puede cribarse para polipéptidos producidos a partir de ADNc mediante la selección de los clones de ADNc correspondiente mediante un cribado inmunológico utilizando un anticuerpo específico de polipéptido. Además, el cribado puede llevarse a cabo mediante técnicas de hibridación tales como la hibridación de placas y la hibridación de colonias, las cuales utilizan sondas que se unen específicamente a secuencias de nucleótidos diana. Además, puede utilizarse una combinación de dichas técnicas diferentes.

Generalmente, la sonda puede ser, por ejemplo, ADN sintetizado químicamente que se ha obtenido basándose en información referente a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido E1 (por ejemplo la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4, nº 5 o nº 6). Además, la sonda utilizada para el cribado puede ser un cebador sentido y/o un cebador antisentido diseñado basándose en la información de secuencia de bases de un polinucleótido de la presente invención.

El polinucleótido puede obtenerse convenientemente mediante el método de PCR (Science 130:1350, 1985) o mediante variantes del método de PCR, tales como el método de amplificación de ADN o ARN. Cualquier dificultad en el cribado de la biblioteca para el ADNc de longitud completa puede evitarse mediante la utilización de técnicas adecuadas tales como el método RACE (Rapid amplification of cDNA ends, Experimental Medicine 12(6):35, 1994) y particularmente el método 5'-RACE (M.A. Frohman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:8998, 1988). El método RACE y el método 5'-RACE resultan útiles para obtener el polipéptido E1 a partir de eucariotas.

Los cebadores utilizados para el método de PCR pueden diseñarse apropiadamente basándose en la información de secuencia del polinucleótido E1. Dichos cebadores pueden sintetizarse mediante un método ordinario. Tal como se ha indicado anteriormente, el aislamiento y la purificación de los fragmentos de ADN o ARN amplificados puede llevarse a cabo mediante un método ordinario, tal como la electroforesis en gel y la hibridación.

El polinucleótido permite fácilmente una producción en masa estable del producto del polinucleótido (el polipéptido) utilizando técnicas de ingeniería genética comunes. El aislamiento con éxito del polinucleótido E1 mediante la presente invención abre la puerta a la producción industrial de ecuol, sin utilización de las difíciles de manipular cepas bacterianas anaeróbicas, utilizadas tradicionalmente para la producción de ecuol.

A-3. Vector de expresión

Un vector de expresión de la presente invención no se encuentra particularmente limitado con la condición de que incluya polinucleótido E1 y sea capaz de expresar polinucleótido E1. Generalmente se selecciona apropiadamente según el tipo de célula huésped.

En el caso de que la célula huésped sea una célula procariótica, el vector de expresión puede ser, por ejemplo, un vector plásmido de expresión, replicable en la célula huésped, preparada mediante la adición de promotores y una secuencia de bases SD (Shine-Dalgarno) cadena arriba del polinucleótido para causar la expresión del polinucleótido. Un ejemplo específico es un plásmido de expresión que utiliza un promotor P_L, un promotor de T7 y un promotor lac. Entre otros ejemplos de vectores de expresión bacterianos preferentes se incluyen el plásmido pKK233-2 y el plásmido pKK233-3 utilizando el promotor tac o el promotor trc. Estos son ejemplos no limitativos y también pueden utilizarse otras cepas y vectores bacterianos conocidos.

En el caso de que la célula huésped sea una célula eucariótica, el vector de expresión puede incluir generalmente promotores cadena arriba del polinucleótido que debe expresarse y otras secuencias específicas, incluyendo un sitio de procesamiento de ARN, un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector de expresión puede incluir además un origen de replicación. Existen varios vectores eucarióticos bien conocidos que resultan útiles para la inserción del polinucleótido. Entre los ejemplos de dichos vectores eucarióticos adecuados se

incluyen pCD y pCMV. Entre otros ejemplos se incluyen pMSG y pSVL, que utilizan el promotor MMTV o el promotor tardío de SV40, según resulte necesario. Son ejemplos no limitativos y también pueden utilizarse diversos eucariotas y vectores conocidos.

A-4. Célula recombinante

La presente invención proporciona una célula recombinante (transformante) transformada con un vector de expresión que incluye el polinucleótido E1.

La célula huésped utilizada para la célula recombinante puede ser una célula procariótica o una célula eucariótica.

Entre los ejemplos adecuados de una célula huésped procariótica se incluyen: células procarióticas bacterianas del género *Lactococcus*, tales como las bacterias del ácido láctico, y células procarióticas bacterianas tales como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, que pueden crecer bajo condiciones aeróbicas.

Entre los ejemplos de una célula huésped eucariótica se incluyen microorganismos eucarióticas tales como las levaduras y *Aspergillus*; células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, y células animales y vegetales tales como células L, células CHO, células COS, células HeLa, células C127, células BALB/c3T3 (incluyendo cepas mutantes que no presentan dihidrofolato reductasa o timidina quinasa), células BHK21, células HEK293, células de melanoma de Bowes y oocitos.

El método utilizado para introducir el vector de expresión en la célula huésped no se encuentra particularmente limitado y puede utilizarse una diversidad de métodos comunes. Por ejemplo, el vector de expresión puede introducirse en la célula huésped según métodos de muchos manuales de laboratorio estándares, incluyendo, por ejemplo, Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986, y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Entre los ejemplos específicos se incluyen la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transvección, la microinyección, la transfección mediada por lípidos catiónicos, la electroporación, la transducción, la carga por raspado, la introducción balística y la infección.

Debido a que la célula recombinante es capaz de producir polipéptido E1 (un enzima conversor de la dihidrodaidzeína), puede utilizarse para producir un enzima conversor de la dihidrodaidzeína. La célula recombinante también puede utilizarse para producir dihidrodaidzeína en forma de célula.

A-5. Producción de polipéptido utilizando células recombinantes

El polipéptido puede producirse mediante el cultivo de una célula recombinante en la que se introduce el polinucleótido E1 y se recoge y cultiva el mismo a partir de la célula.

El cultivo puede ser subcultivo o el cultivo por lotes utilizando un medio adecuado para el huésped. Las células pueden cultivarse hasta obtener una cantidad adecuada de polipéptido E1, utilizando el nivel de polipéptido E1 en el interior y exterior de las células recombinantes a modo de índice.

El medio de cultivo puede seleccionarse apropiadamente a partir de medios comunes según el tipo de célula huésped utilizado. El cultivo puede incubarse bajo condiciones de crecimiento adecuadas para la célula huésped.

El polipéptido E1 resultante opcionalmente puede separarse y purificarse mediante diversos tipos de técnicas de separación utilizando las propiedades físicas y químicas del polipéptido E1 (ver, por ejemplo, Biochemistry Data Book II, páginas 1175 a 1259, 1a edición, 1a impresión, 23 de junio de 1980, Tokyo Kagaku Dozin Co., Ltd.; Biochemistry 25(25):8274, 1986, y Eur. J. Biochem. 163:313, 1987). Concretamente, el polipéptido E1 puede separarse y purificarse, por ejemplo, tal como en el "método de aislamiento y purificación de polipéptido E1 a partir de microorganismos capaces de producir polipéptido E1" descrito en la Sección A-1 bajo el título de "Polipéptido".

A-6. Producción de dihidrodaidzeína utilizando polipéptido E1

La presente invención proporciona un procedimiento para producir dihidrodaidzeína utilizando el polipéptido E1. En el procedimiento de producción, la daidzeína puede convertirse en dihidrodaidzeína haciendo que el polipéptido E1 actúen sobre la daidzeína en presencia de NADPH y/o NADH. Preferentemente, la daidzeína puede convertirse en dihidrodaidzeína haciendo que el polipéptido E1 actúe sobre la daidzeína en presencia de NADPH.

Debido a que la actividad enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína del polipéptido E1 resulta activada por la presencia de Mn^{2+} y Fe^{2+}, el péptido E1 preferentemente hace que el polipéptido E1 actúe sobre la daidzeína en presencia de Mn^{2+} y/o Fe^{2+}. La concentración de Mn^{2+} y/o Fe^{2+} en la solución de reacción no se encuentra particularmente limitada con la condición de que pueda activarse la actividad enzimática del polipéptido E1. La concentración de Fe^{2+} preferentemente es de 2 mM o superior, más preferentemente de entre 2 mM y 100 mM, más

preferentemente de entre 10 mM y 40 mM. La concentración de Mn^{2+} preferentemente es de 0,2 µM o superior, más preferentemente de entre 0,2 µM y 100 mM, y todavía más preferentemente de entre 1,0 µM y 40 mM.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción puede llevarse a cabo en un tampón adecuado. Entre los ejemplos de dichos tampones adecuados se incluyen tampón fosfato, tampón carbonato, tampón acetato, tampón Tris y tampón borato. La condición de pH de la reacción puede seleccionarse convenientemente de manera que no se inactive la actividad enzimática deseada del polipéptido E1. Por ejemplo, la reacción puede llevarse a cabo en un intervalo de pH de entre preferentemente 5,0 y 10,0, y más preferentemente de entre 6,0 y 8,0.

En la reacción, puede añadirse una cantidad apropiada de inhibidor de proteasa, tal como PMSF o EDTA, según resulte necesario. Además, considerando que el polipéptido se deriva de bacterias anaeróbicas, también puede añadirse una cantidad apropiada de agente reductor, tal como DTT, 2ME, DET y $Na_2S_2O_4$.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo bajo condiciones en las que, por ejemplo, se añade cada componente a un medio en los intervalos de concentración mostrados posteriormente al inicio de la reacción, de manera que se prepara una mezcla. La mezcla se incuba durante 0,5 a 10 horas, preferentemente 1 a 6 horas, y más preferentemente 2 a 4 horas, a temperaturas de entre 20ºC y 45ºC, preferentemente de entre 25ºC y 40ºC, y más preferentemente de entre 30ºC y 38ºC. Las concentraciones iniciales de cada componente son las siguientes:

el contenido de polipéptido es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso,

el contenido de daidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso,

el contenido de NADPH y/o de NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

La presente invención proporciona además una mezcla de materiales para la síntesis de dihidrodaidzeína, concretamente una composición para la síntesis de dihidrodaidzeína que incluye (Ai) polipéptido E1, (Aii) NADPH y/o NADH, y (Aiii) daidzeína. Además, la presente exposición proporciona una mezcla de materiales para la síntesis de dihidrodaidzeína, concretamente una composición de materiales de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye (Ai) polipéptido E1, (Aii) NADPH y/o NADH, (Aiii) daidzeína, y (Aiv) Mn^{2+} y/o Fe^{2+}. Mediante la incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la daidzeína contenida en la composición puede convertirse en dihidrodaidzeína. La composición de materiales de síntesis corresponde a la mezcla de materiales anteriormente indicada utilizada para iniciar la reacción de producción de dihidrodaidzeína. Además, las concentraciones de polipéptido E1, NADPH y/o NADH, y la daidzeína en la composición, y otros componentes que pueden añadirse a la composición de materiales de partida de la síntesis son esencialmente los del sistema de reacción (una mezcla de materiales de partida al inicio de la reacción) utilizados en el procedimiento de producción anteriormente indicado.

La presente invención proporciona además un kit para sintetizar dihidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye (Ai) polipéptido E1, (Aii) NADPH y/o NADH, y (Aiii) daidzeína. Además, la presente invención proporciona un kit para sintetizar dihidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye: (Ai) polipéptido E1, (Aii) NADPH y/o NADH, (Aiii) daidzeína, y (Aiv) Mn^{2+} y/o Fe^{2+}. Los componentes opcionalmente puede almacenarse separadamente en el kit de síntesis de manera que permitan de manera conveniente la síntesis de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además un tampón según resulte necesario. El kit de síntesis también puede incluirse cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que ayuden a llevar a cabo la síntesis de dihidrodaidzeína.

A-7. Composición enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína

La presente invención proporciona además una composición enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye polipéptido E1. La composición enzimática puede utilizarse convenientemente como enzima de síntesis de dihidrodaidzeína en el procedimiento de producción de dihidrodaidzeína utilizando polipéptido E1.

La composición enzimática puede ser un polipéptido E1 purificado bruto o la composición enzimática puede ser un polipéptido E1 purificado bruto o purificado formulado con un soporte adecuado.

La proporción de polipéptido E1 en la composición enzimática no se encuentra particularmente limitada con la condición de que la composición pueda utilizarse como enzima de síntesis de dihidrodaidzeína en el procedimiento de producción de dihidrodaidzeína. Concretamente, el contenido de polipéptido E1 es, por ejemplo, de entre 0,001% y 20,0% en peso, preferentemente de entre 0,005% y 5,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,01% y 1,0% en peso, con respecto al total de la composición enzimática.

La composición enzimática puede incluir NADPH y/o NADH, que actúa como coenzima del polipéptido E1. En el caso de que se encuentre contenido en la composición enzimática, la proporción de NADPH y/o NADH, aunque no particularmente limitada, es de entre 0,0005 y 25,0% en peso, preferentemente de entre 0,005% y 5,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,01% y 2,5% en peso, con respecto al total de la composición enzimática.

Además, en una forma de realización preferida, la composición enzimática puede incluir Mn^{2+} y/o Fe^{2+}. En el caso de que se encuentre contenida en la composición enzimática, la proporción de Mn^{2+} y/o Fe^{2+} no se encuentra particularmente limitada con la condición de que la actividad enzimática de síntesis de dihidrodaidzeína del polipéptido E1 pueda activarse. La proporción de Fe^{2+} preferentemente es de 2 mM o superior, más preferentemente de entre 2 mM y 100 mM, y todavía más preferentemente de entre 10 mM y 40 mM con respecto al total de la composición. La proporción de Mn^{2+} preferentemente es de 0,2 µM o superior, más preferentemente de entre 0,2 µM y 100 mM, y todavía más preferentemente de entre 1,0 µM y 40 mM con respecto al total de la composición.

Con el fin de mejorar la estabilidad del polipéptido, la composición enzimática puede incluir además antioxidantes tales como sulfito, ácido ascórbico, α-tocoferol y cisteína, además del polipéptido E1. Además, con el fin de garantizar la conservación de la composición enzimática, ésta puede incluir conservantes tales como p-hidroxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol 2-feniletílico, ácido deshidroacético y ácido sórbico, según resulte necesario.

A-8. Procedimiento de producción de dihidrodaidzeína utilizando células recombinantes

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de dihidrodaidzeína utilizando células recombinantes que incluyen polinucleótido E1. Concretamente, en el procedimiento de producción, se convierte la daidzeína en dihidrodaidzeína haciendo que la célula recombinante actúe sobre la daidzeína.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo bajo condiciones que permiten que sobreviva la célula recombinante y que la daidzeína sea convertida en dihidrodaidzeína.

Concretamente, se añaden cantidades apropiadas de células recombinantes y daidzeína y se cultivan en un medio que permite el crecimiento de las células recombinantes.

El medio utilizado en el procedimiento de producción se selecciona convenientemente de entre diversos tipos de medios convencionales según el tipo de célula utilizado como la célula recombinante huésped.

El medio puede suplementarse con cantidades apropiadas de inhibidores de proteasa, tales como PMSF y EDTA, según resulte necesario. Además, considerando que el polipéptido deriva de bacterias anaeróbicas, también pueden añadirse cantidades apropiadas de agentes reductores tales como DTT, 2ME, DET y $Na_2S_2O_4$. Al utilizar la célula recombinante, el medio puede suplementarse con NADPH y/o NADH según resulte necesario, aunque ello no resulta esencial. Además, el medio puede suplementarse con Mn^{2+} y/o Fe^{2+}.

Concretamente, el procedimiento de producción se lleva a cabo del modo siguiente. En primer lugar, las células recombinantes se inoculan en medio que contiene entre 0,001% y 1% en peso, preferentemente entre 0,01% y 1% en peso, y más preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso de daidzeína, y el cultivo se incuba bajo condiciones térmicas permisivas durante 6 a 30 horas, preferentemente 7 a 24 horas, y más preferentemente 7 a 18 horas.

La presente invención proporciona además una mezcla de materiales para la síntesis de dihidrodaidzeína, concretamente una composición de material de síntesis de dihidrodaidzeína que contiene (Aiv) la célula recombinante y (Aiii) daidzeína. Mediante el cultivo de la composición de materiales de síntesis bajo las condiciones anteriormente indicadas la dihidrodaidzeína en la composición puede convertirse en dihidrodaidzeína. La composición corresponde a la mezcla de materiales de partida anteriormente indicada, utilizada para iniciar la reacción para producir dihidrodaidzeína. Además, las concentraciones de la célula recombinante y daidzeína en la composición, y otros componentes que pueden añadirse a la composición de materiales de partida de síntesis, son esencialmente iguales a las condiciones utilizadas en el procedimiento de producción anteriormente indicado.

La presente invención proporciona además un kit para sintetizar dihidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye (Aiv) la célula recombinante y (Aiii) daidzeína. Además, la presente invención proporciona un kit para sintetizar dihidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de dihidrodaidzeína que incluye (Aiv) la célula recombinante, (Aiii) daidzeína y (Aiv) Mn^{2+} y/o Fe^{2+}. El kit de síntesis puede incluir la célula recombinante y daidzeína separadamente según resulte necesario, de manera que se active la síntesis de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios para ayudar a llevar a cabo la síntesis de dihidrodaidzeína.

Las células recombinantes incluidas en el kit de síntesis pueden conservadas en el mismo mediante métodos conocidos. Existen varias técnicas conocidas de conservación de células recombinantes. Por ejemplo, existe un

método en el que las células recombinantes se conservan a una temperatura de entre 4ºC y 25ºC tras tratarse con un liofilizador para evaluar la ampolla que conserva las células recombinantes en un solvente, tal como dimetilformamida. Otro ejemplo es un método de nitrógeno líquido, en el que las células se suspenden en un medio de conservación suplementado con glicerol al 10%, que seguidamente se almacena en una ampolla específica y se mantiene en un tanque con nitrógeno líquido (a una temperatura de entre -150ºC y -196ºC).

A-9. Anticuerpo con afinidad con el polipéptido

La presente invención proporciona además un anticuerpo (un anticuerpo IgG) con afinidad con el polipéptido E1.

El anticuerpo monoclonal puede prepararse mediante un método ordinario. Concretamente, puede utilizarse el método descrito por Harlow H. y Lane D., en: Antibody: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., New York, páginas 139 a 240, 1988.

El anticuerpo policlonal también puede prepararse mediante un método ordinario. Concretamente, puede utilizarse el método descrito en, por ejemplo, Cell Engineering Experiment Protocol, Department of Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 1992, páginas 155 a 173.

El anticuerpo IgG policlonal y el anticuerpo IgG monoclonal pueden purificarse mediante métodos comunes, tales como un método de precipitación con ácido sulfúrico amonio y la cromatografía de proteína A.

A-10. Método inmunológico para la detección o medición del polipéptido

La presente exposición proporciona además un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido E1 utilizando el anticuerpo. Concretamente, el método inmunológico se lleva a cabo haciendo que el anticuerpo entre en contacto con una muestra de ensayo. Más concretamente, el polipéptido en la muestra de ensayo puede detectarse o medirse de la manera siguiente. En primer lugar, se hace que el anticuerpo entre en contacto con una muestra de ensayo para comprobar la presencia de polipéptido E1 en la muestra de ensayo. En caso de encontrarse presente, el anticuerpo se une específicamente al polipéptido E1. A continuación, el anticuerpo unido al polipéptido E1 se detecta y opcionalmente se cuantifica.

En la presente memoria, la muestra de ensayo es una muestra utilizada para la detección o medición del polipéptido E1. Debido a que se espera que el polipéptido se encuentre presente en las células procarióticas bacterianas, el método inmunológico resulta adecuado para la detección y medición del polipéptido E1 residente en las células procarióticas bacterianas. En la detección y medición del polipéptido E1 en la célula, la muestra de ensayo puede prepararse a partir de células lisadas, o de células sometidas a purificación de las proteínas tras el lisado.

Las técnicas para detectar o medir un polipéptido diana mediante el método inmunológico utilizando el anticuerpo son conocidas, y resultará evidente para el experto en la materia cómo fijar apropiadamente las diversas condiciones adecuadas para el método inmunológico. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos tales como el radioinmunoensayo y ELISA bajo condiciones fijadas apropiadamente.

La presente exposición proporciona además un kit de detección inmunológica que incluye el anticuerpo, utilizado para la detección o medición del polipéptido E1. El kit de detección puede incluir además un polipéptido E1 estándar, según se requiera. El kit de detección puede incluir además, según se requiera, reactivos adicionales que faciliten la detección sencilla del polipéptido E1 bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de detección también puede incluir cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que faciliten la detección sencilla del polipéptido E1.

A-11. Método para la detección o medición de polinucleótido que codifica el polipéptido

La presente exposición proporciona además un método para detectar o medir polinucleótido E1. Concretamente, el método se lleva a cabo causando que la sonda de unión a polinucleótido E1 entre en contacto con una muestra de ensayo. Más concretamente, puede detectarse o medirse el polinucleótido E1 en la muestra de ensayo de la manera siguiente. En primer lugar, se hace que la sonda entre en contacto con una muestra de ensayo hibridándola con la muestra de ensayo, lo que ocurre en el caso de que se encuentre presente polinucleótido E1 en la muestra de ensayo. A continuación, se detecta la presencia o ausencia de la doble cadena, y la doble cadena, en caso de encontrarse presente, se cuantifica opcionalmente.

En la presente memoria, la muestra de ensayo es una muestra utilizada para la detección o medición del polinucleótido E1. Debido a que se espera que el polinucleótido E1 se encuentre presente en las células procarióticas bacterianas, el método resulta adecuado para la detección y medición de polinucleótido E1 residente en las células procarióticas bacterianas. En la detección y medición de polinucleótido E1 en la célula, la muestra de ensayo puede prepararse a partir de células lisadas, o en células sometidas a purificación de ácidos nucleicos tras el lisado.

La sonda utilizada en los métodos presenta una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con el polinucleótido bajo condiciones restrictivas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "condiciones restrictivas" se refiere, por ejemplo, a condiciones comunes a sondas y cebadores, y concretamente, a condiciones indicadas en la Sección A-2 anteriormente indicada.

La sonda puede sintetizarse químicamente basándose en la información referente a la secuencia de nucleótidos del polinucleótido E1 (por ejemplo la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4, nº 5 o nº 6) o puede producirse previamente polinucleótido E1 o un fragmento de polinucleótido E1. La sonda puede encontrarse marcada o no, aunque generalmente se utilizan sondas marcadas. Además, en el caso de que la sonda se utiliza como cebador de PCR (un cebador de sentido o un cebador antisentido), la longitud de la sonda es de, por ejemplo, aproximadamente 10 a 40 nucleótidos, y preferentemente de aproximadamente 20 a 30 nucleótidos.

Entre los ejemplos de métodos para detectar específicamente el polinucleótido se incluyen: la hibridación de placas, la hibridación de colonias, la transferencia Southern, la transferencia Northern y el método de PCR. Desde el punto de vista de la sensibilidad, preferentemente se utiliza un método de PCR que utilice las sondas como cebadores para amplificar parte o la totalidad del polinucleótido E1.

El método de PCR puede ser, por ejemplo, el método de RT-PCR o diversos tipos de métodos variantes utilizados en la técnica. El método de PCR puede utilizarse para someter a ensayo la presencia y cantidad de polinucleótido E1. Entre los ejemplos de dichos métodos de PCR se incluyen un ensayo competitivo tal como MSSA (Kinoshita M. *et al.*, CCA 228:83-90, 1994) y el método de PCR-SSCP, que es un método conocido de detección de mutaciones basado en los cambios de movilidad de ADN de cadena sencilla debido a diferentes estructuras de orden superior (Orita M. *et al.*, Genomics 5:874-879, 1989).

La presente exposición proporciona además un kit para detectar o medir el polinucleótido E1, concretamente un kit de detección de polinucleótido E1 que incluye la sonda. Para facilitar la detección del polinucleótido E1 bajo las condiciones anteriormente indicadas, el kit de detección puede incluir reactivos adicionales o similares según se requiera, además de la sonda. Además, el kit de detección puede utilizarse para identificar células que contienen polinucleótido E1. Desde el punto de vista de permitir una detección exacta, el kit de detección preferentemente puede proporcionarse en forma de kit para llevar a cabo la detección utilizando la PCR.

B. Enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína

B-1. Polipéptido

La presente exposición proporciona un polipéptido (en adelante denominado también "polipéptido E2") para la síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato. Concretamente, la exposición proporciona:

(Ba) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7,

(Bb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, y

(Bc) Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

En el polipéptido (Bb), el intervalo de "uno o más aminoácidos" no se encuentra particularmente limitado con la condición de que el polipéptido presente la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato. Por ejemplo, el intervalo es de entre 1 y 50, preferentemente de entre 1 y 30, más preferentemente de entre 1 y 15, más preferentemente de entre 1 y 5, todavía más preferentemente de entre 1 y 4, todavía más preferentemente de entre 1 y 3 y con particular preferencia 1 o 2.

Entre los ejemplos de polipéptido (Bb) se incluyen un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 y un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 contiene dos aminoácidos sustituidos y una secuencia de aminoácidos que presenta 24 aminoácidos en el extremo N-terminal. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9 contiene 20 aminoácidos sustituidos y pierde 1 aminoácido. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 corresponde al polipéptido enzima E2 de *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15 (nº FERM BP-6435). La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9 corresponde al polipéptido enzima E2 de *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-6437).

En el polipéptido (Bb), la sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido puede llevarse a cabo tal como en la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácido en el polipéptido E1 indicado en la Sección A-1. Resulta preferente que la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácido en el polipéptido (Bb) se encuentre

en regiones en las que el cambio de aminoácido no produzca grandes efectos sobre las estructuras de orden superior del polipéptido, o en donde el cambio no afecte negativamente al centro activo del enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína. Entre los ejemplos de dichas regiones se incluyen regiones poco conservadas entre las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9, y regiones vecinas de las mismas, y la región N-terminal o la región C-terminal. Entre los ejemplos específicos se incluyen valina en la posición 7, prolina en la posición 8, valina en la posición 26, leucina en la posición 36, arginina en la posición 46, ácido aspártico en la posición 94, ácido glutámico en la posición 101, glicina en la posición 126, isoleucina en la posición 137, glutamina en la posición 156, lisina en la posición 157, ácido aspártico en la posición 159, alanina en las posiciones 160 y 171, cisteína en la posición 185, serina en la posición 221, alanina en la posición 233, valina en la posición 241, serina en la posición 258, isoleucina en la posición 266 y valina en la posición 286, de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y regiones contiguas de dichos aminoácidos. La expresión "región contigua" se refiere a una región en la que no resulta afectada la actividad enzimática de síntesis de tetrahidrodaidzeína. Entre los ejemplos de dichas regiones se incluyen aminoácidos a cinco o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, preferentemente aquellos a cuatro o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, más preferentemente aquellos a tres o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, todavía más preferentemente aquellos a dos o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, y con particular preferencia a un aminoácido de uno de los aminoácidos ejemplificados.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la secuencia de los aminoácidos de las posiciones 38 a 45 se considera que corresponde al dominio de unión de NADPH. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que las funciones del dominio no resulten inhibidas, pueden realizarse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Sin embargo, resulta preferente que la treonina en la posición 38, la glicina en la posición 39, la glicina en la posición 43 y la glicina en la posición 45 no muten. En el caso de que la secuencia contenga una o más sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a cuatro, más preferentemente no es superior a tres, todavía más preferentemente no es superior a dos, y más preferentemente a uno.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 115 a 118 se considera que corresponde al motivo altamente conservado dentro de la familia de SDR. En el caso de que la secuencia contenga una o más sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en la secuencia, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a tres, más preferentemente no es superior a dos, y todavía más preferentemente a uno. Resulta más preferente la ausencia de mutaciones en la secuencia.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la serina en la posición 168, la histidina en la posición 182 y la lisina en la posición 186 se consideran asociados al centro de actividad del enzima E2. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que la actividad enzimática no resulte inhibida, los tres aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos arbitrarios. Sin embargo, resulta preferente que estos aminoácidos no muten.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 212 a 217 se considera asociada a la unión a cofactores. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que la función no resulte inhibida, puede producirse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Sin embargo, resulta preferente que la prolina en la posición 212, la glicina en la posición 213 y la treonina en la posición 217 no muten. En el caso de que la secuencia contenga una o más sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a tres, más preferentemente no es superior a dos y todavía más preferentemente a uno. Resulta particularmente preferente la ausencia de mutaciones en la secuencia. En la figura 28 se muestra una alineación, que indica las regiones de las secuencias de aminoácidos con posibles funciones.

En el polipéptido (Bc), la secuencia de aminoácidos presenta, por ejemplo, una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7. Sin embargo, resulta preferente que la secuencia de aminoácidos presente una identidad de generalmente 80% o superior, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, todavía más preferentemente de 98% o superior, y con particular preferencia de 99% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7.

Concretamente, el polipéptido (Bc) puede ser un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9. La identidad entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 es de 99,3% (Blast2). La identidad entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9 es de 93,0% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización preferente de la invención, el polipéptido (Bc) comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 93,0% o superior, y más preferentemente de 99,3%, respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7.

Con respecto a los polipéptidos (Bb) y (Bc), la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato puede confirmarse de la manera siguiente. En primer lugar, se añade un polipéptido de interés a una solución de sustrato de la composición indicada posteriormente, a una concentración de 0,001

mg/ml. A continuación, la solución se incuba a 37ºC durante 2 horas para comprobar la presencia o ausencia de tetrahidrodaidzeína en la solución. La presencia de tetrahidrodaidzeína en la solución tras la incubación se utiliza a modo de indicador de la actividad del polipéptido de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Composición de solución de sustrato

tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0)
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM
ditiotreitol 2 mM
hidrosulfito sódico 5 mM
NADPH 2 mM
NADH 2 mM
dihidrodaidzeína 40 µM

Propiedad enzimática

Debido a que el polipéptido E2 presenta una actividad enzimática de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, el polipéptido E2 también se denomina enzima E2. El enzima E2 requiere NADPH o NADH a modo de coenzima. La temperatura óptima del enzima E2 es de aproximadamente 37ºC y el pH óptimo es de 4,5. El enzima E2 no sólo puede sintetizar tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato, sino que también sintetiza dihidrodaidzeína a partir de tetrahidrodaidzeína, como reacción inversa.

De manera similar al polipéptido E1, el polipéptido E2 puede producirse mediante técnicas de ingeniería genética basándose en la información de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10, nº 11 o nº 12. Además, los métodos de síntesis química comunes pueden utilizarse para producir polipéptido E2, basándose en la información de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, nº 8 o nº 9. El polipéptido E2 también puede producirse mediante aislamiento y purificación a partir de microorganismos capaces de producirlo. Estos métodos pueden llevarse a cabo según la descripción en la Sección A-1 anterior.

El microorganismo capaz de producir polipéptido E2 puede cultivarse en un medio que contiene una cantidad deseada de dihidrodaidzeína y, adicionalmente, daidzeína. El polipéptido E2 también puede producirse de esta manera en microorganismos capaces de producir polipéptido E2.

El polipéptido E2 puede ser monomérico, dimérico o polimérico, con la condición de que pueda sintetizar tetrahidrodaidzeína. Además, para mejorar la estabilidad y otras características, el polipéptido E2 puede modificarse según se requiera, mediante adición de polietilenglicol o una cadena sacárida.

El polipéptido E2 puede servir como catalizador que convierta la dihidrodaidzeína (un sustrato) en tetrahidrodaidzeína. La tetrahidrodaidzeína es convertida adicionalmente en ecuol por el enzima de síntesis de ecuol tal como se indica posteriormente. Se cree que ecuol muestra diversas actividades fisiológicas en el cuerpo. En este sentido, el polipéptido E2, capaz de proporcionar un material de partida para la síntesis del ecuol, se considera importante, Por lo tanto, la presente invención proporciona un enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína que incluye cualquiera de los polipéptidos (Ba) a (Bc).

B-2. Polinucleótido

La presente exposición proporciona además un polinucleótido (en adelante también denominado "polinucleótido E2") que codifica un polipéptido con actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

Concretamente, la exposición proporciona:

(Bd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10,

(Be) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y

(Bf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Bd) o (Be), y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 11. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 9 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12.

Respecto al polinucleótido (Bf), la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" es sinónima de la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" en la Sección A-2. Entre los ejemplos de polinucleótido (Bf) se incluyen la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 11 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12. La homología de secuencia de bases entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 11 es de 99,7% (Blast2). La homología de secuencia de bases entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 12 es de 91,0% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización preferente de la invención, un polinucleótido (Bf) comprende una base de secuencias que presenta una homología de 91,0%, y más preferentemente de 99,7%, respecto a la secuencia de bases SEC ID nº 10.

Respecto al polinucleótido (Bf), la "actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato" puede confirmarse mediante el mismo método utilizado para los polipéptidos (Bb) y (Bc).

El polinucleótido E2 puede producirse u obtenerse mediante métodos químicos de síntesis o técnicas de ingeniería genética, basándose en la información de secuencia de SEC ID nº 10, nº 11 o nº 12. Concretamente pueden utilizarse los métodos descritos para el polinucleótido E1 en la Sección A-2. El método puede modificarse o cambiarse, según se requiera.

La fuente de ADNc del polinucleótido E2 no se encuentra particularmente limitada con la condición de que sea un microorganismo que expresa el polinucleótido E2. Entre los ejemplos específicos se incluyen microorganismos capaces de producir ecuol, preferentemente bacterias del ácido láctico, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Streptococcus* capaces de producir ecuol, más preferentemente *Lactococcus garvieae*, *Bacteroides ovatus* y *Streptococcus constellatus*, capaces de producir ecuol, más preferentemente *Lactococcus garvieae* fecal capaz de producir ecuol, y con particular preferencia *Lactococcus* cepa 20-92, *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15, *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-10036, nº FERM BP-6435 y nº FERM BP-6437, respectivamente; depositados en el Depósito Internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), cepas de *Lactococcus garvieae* fecales capaces de producir ecuol.

La expresión de polinucleótido E2 utilizando técnicas comunes de ingeniería genética permiten fácilmente la producción estable a gran escala del producto del polinucleótido (el polipéptido). El aislamiento con éxito del polinucleótido E2 abrirá la puerta a la producción industrial de ecuol, sin utilizar cepas bacterianas anaeróbicas utilizadas tradicionalmente para la producción de ecuol, las cuales resultan difícil de manipular.

B-3. Vector de expresión

Un vector de expresión de la presente exposición no se encuentra particularmente limitado con la condición de que incluye polinucleótido E2 y sea capaz de expresar el polinucleótido E2. Generalmente, se selecciona apropiadamente según el tipo de célula huésped, de manera similar al vector de expresión que incluye el polinucleótido E1. Concretamente puede utilizarse la célula huésped indicada en la Sección A-3.

B-4. Célula recombinante

La presente exposición proporciona una célula recombinante (transformante) transformada con un vector de expresión que incluye el polinucleótido E2. La célula huésped utilizada para la célula recombinante puede ser la indicada en la Sección A-4, sin limitación. Además, el vector de expresión puede introducirse en la célula huésped mediante el método descrito en la Sección A-4.

Debido a que la célula recombinante es capaz de producir polipéptido E2 (un enzima conversor de la tetrahidrodaidzeína), puede utilizarse para producir un enzima conversor de la tetrahidrodaidzeína. La célula recombinante también puede utilizarse para producir tetrahidrodaidzeína en una forma celular.

B-5. Producción de polipéptido utilizando células recombinantes

Puede producirse polipéptido E2 mediante el cultivo de una célula recombinante en la que se introduce el polinucleótido E2 y se recoge el polipéptido E2 de la célula y del cultivo. Las células recombinantes pueden cultivarse según la descripción de la Sección A-5.

B-6. Producción de tetrahidrodaidzeína utilizando polipéptido E2

La presente exposición proporciona un procedimiento para producir tetrahidrodaidzeína utilizando polipéptido E2. En el procedimiento de producción, la dihidrodaidzeína puede convertirse en tetrahidrodaidzeína haciendo que el polipéptido E2 actúe sobre la dihidrodaidzeína en presencia de NADPH y/o NADH.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción puede llevarse a cabo en un tampón adecuado, tal como el descrito en la Sección A-6.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo bajo condiciones en las que, por ejemplo, se añade cada componente a un medio en los intervalos de concentración indicados posteriormente, al inicio de la reacción, preparando de esta manera una mezcla. La mezcla se incuba durante 0,5 a 10 horas, preferentemente 1 a 6 horas, y más preferentemente 2 a 4 horas, a temperaturas que no alteran o inactivan los materiales de partida, incluyendo el polipéptido E2 y la dihidrodaidzeína, y el producto, incluyendo la tetrahidrodaidzeína. La temperatura de reacción no se encuentra particularmente limitada. Por ejemplo, en el caso de que la temperatura de reacción sea de 0ºC o inferior, la reacción utiliza, por ejemplo, un tampón que no se congela a dichas temperaturas de reacción. La temperatura de reacción es, por ejemplo, preferentemente de entre 0ºC y 45ºC, y más preferentemente de entre 0ºC y 37ºC. Respecto a la tetrahidrodaidzeína, el compuesto se encuentra presente en una forma cis o en una forma trans. Sin embargo, la formación de las configuraciones cis y trans puede controlarse mediante modificación de condiciones de reacción tales como la temperatura de reacción y el tiempo de reacción. Por ejemplo, puede producirse una mezcla de tetrahidrodaidzeínas *cis* y *trans* fijando la temperatura de reacción en 0ºC, o la reacción puede controlarse para favorecer la forma *trans* fijando la temperatura de reacción a 37ºC.

Las concentraciones de cada componente en el procedimiento de producción anteriormente indicado son las siguientes.

el contenido de polipéptido E2 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso;

el contenido de dihidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y

el contenido de NADPH y/o de NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

La presente exposición proporciona además una mezcla de materiales para la síntesis de tetrahidrodaidzeína, concretamente una composición de materiales de síntesis de tetrahidrodaidzeína que incluye (Bi) polipéptido E2, (Bii) NADPH y/o NADH, y (Biii) dihidrodaidzeína. Mediante incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la dihidrodaidzeína contenida en la composición de materiales de partida de síntesis puede convertirse en tetrahidrodaidzeína. La composición corresponde a la mezcla de materiales de partida anteriormente indicada, utilizada para iniciar la reacción con el fin de producir tetrahidrodaidzeína. Además, las concentraciones de polipéptido E2, NADPH y/o NADH, y dihidrodaidzeína en la composición, y otros componentes que pueden añadirse a la composición de materiales de partida de síntesis son esencialmente los mismos que en el sistema de reacción (una mezcla de materiales de partida al inicio de la reacción) utilizado en el procedimiento de producción anteriormente indicado.

La presente exposición proporciona además un kit para sintetizar tetrahidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de tetrahidrodaidzeína que incluye (Bi) polipéptido E2, (Bii) NADPH y/o NADH, y (Biii) dihidrodaidzeína. El kit de síntesis puede incluir los componentes en compartimientos según se requiera, de manera que resulte posible la síntesis de teterahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además un tampón según resulte necesario. El kit de síntesis puede incluir además cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que ayuden a llevar a cabo la síntesis de tetrahidrodaidzeína.

B-7. Composición enzimática de síntesis de tetrahidrodaidzeína

La presente exposición proporciona además una composición enzimática de síntesis de tetrahidrodaidzeína que incluye el polipéptido E2. La composición enzimática puede utilizarse convenientemente como enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína en el procedimiento de producción de tetrahidrodaidzeína utilizando polipéptido E2.

La composición enzimática puede ser un polipéptido E2 purificado bruto o la composición enzimática puede ser un polipéptido E2 purificado bruto o purificado formulado con un soporte adecuado. El soporte no presenta ningún efecto negativo sobre la actividad del polipéptido E2 y se utiliza en una cantidad adecuada.

La proporción de polipéptido E2 en la composición enzimática no se encuentra particularmente limitada con la condición de que la composición pueda utilizarse como enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína en el procedimiento de producción de tetrahidrodaidzeína. Concretamente, el contenido de polipéptido E2 es, por ejemplo, de entre 0,001% y 20,0% en peso, preferentemente de entre 0,005% y 5,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,01% y 1,0% en peso, con respecto al total de composición enzimática.

La composición enzimática puede incluir NADPH y/o NADH, que actúan a modo de coenzima del polipéptido E2. En el caso de que se encuentren contenidos en la composición enzimática, la proporción de NADPH y/o NADH, aunque no se encuentra particularmente limitada, es de entre 0,005% y 50,0% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 10,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 5,0% en peso, respecto al total de composición enzimática.

Con el fin de mejorar la estabilidad del polipéptido y/o para garantizar la conservación de la composición enzimática, ésta puede incluir además diversos antioxidantes y conservantes indicados en la Sección A-7, además del polipéptido E2.

B-8. Procedimiento de producción de tetrahidrodaidzeína utilizando células recombinantes

La presente exposición proporciona un procedimiento de producción de tetrahidrodaidzeína utilizando células recombinantes que incluye el polinucleótido E2. Concretamente, en el procedimiento de producción, se convierte la dihidrodaidzeína en tetrahidrodaidzeína haciendo que la célula recombinante actúe sobre la dihidrodaidzeína.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo bajo condiciones que permiten que la célula recombinante sobreviva y que la dihidrodaidzeína sea convertida en tetrahidrodaidzeína.

Concretamente, se añaden cantidades apropiadas de células recombinantes y dihidrodaidzeína y se cultivan en un medio que permita el crecimiento de las células recombinantes.

El medio utilizado en el procedimiento de producción se selecciona convenientemente de entre diversos tipos de medios convencionales según el tipo de célula utilizado como célula huésped recombinante.

El medio puede suplementarse con cantidades apropiadas de inhibidores de proteasa, tales como PMSF y EDTA, según resulte necesario. Además, considerando que el polipéptido deriva de bacterias anaeróbicas, también pueden añadirse cantidades apropiadas de agentes reductores tales como DTT, 2ME, DET y $Na_2SO_2O_4$. Al utilizar la célula recombinante, el medio puede suplementarse con NADPH y/o NADH según se requiera, aunque ello no resulta esencial.

Concretamente, el procedimiento de producción se lleva a cabo de la manera siguiente. En primer lugar, las células recombinantes se inoculan en medio que contiene entre 0,001% y 1% en peso, preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso, y más preferentemente entre 0,01% y 0,1% en peso de dihidrodaidzeína, y el cultivo se incuba bajo condiciones de temperatura permisivas durante 7 a 30 horas, preferentemente 15 a 24 horas, y más preferentemente 17 a 20 horas. En la presente memoria, las condiciones de temperatura permisivas no se encuentran particularmente limitadas y esencialmente son las indicadas en la Sección B-6 anterior, bajo el título "Producción de tetrahidrodaidzeína utilizando polipéptido E2".

La presente exposición proporciona además una mezcla de materiales para sintetizar tetrahidrodaidzeína, concretamente una composición de materiales de síntesis de tetrahidrodaidzeína que contiene (Biv) la célula recombinante y (Biii) dihidrodaidzeína. Mediante el cultivo de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la dihidrodaidzeína en la composición puede convertirse en tetrahidrodaidzeína. La composición corresponde a la mezcla de materiales de partida anteriormente indicada, utilizada para iniciar la reacción para producir tetrahidrodaidzeína. Además, las concentraciones de la célula recombinante y la dihidrodaidzeína en la composición de materiales de partida de síntesis, y de otros componentes que pueden añadirse a la composición de materiales de partida de síntesis, son esencialmente las condiciones utilizadas en el procedimiento de producción anteriormente indicado.

La presente exposición proporciona además un kit para sintetizar tetrahidrodaidzeína, concretamente un kit de síntesis de tetrahidrodaidzeína que incluye (Biv) la célula recombinante y (Biii) dihidrodaidzeína. El kit de síntesis puede incluir la célula recombinante y dihidrodaidzeína separadamente según se requiera, de manera que resulte posible convenientemente la síntesis de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además un tampón o un medio, según se requiera. El kit de síntesis también puede incluir cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que ayuden a llevar a cabo la síntesis de tetrahidrodaidzeína.

Las células recombinantes incluidas en el kit de síntesis pueden conservarse en el mismo mediante métodos conocidos. Existen varias técnicas conocidas de conservación de células recombinantes. Por ejemplo, en un método las células recombinantes se conservan a una temperatura de entre 4ºC y 25ºC tras tratarlas con un liofilizador para evacuar la ampolla en la que se conservan las células recombinantes en un solvente tal como la dimetilformamida. Otro ejemplo es un método de nitrógeno líquido, en el que las células se suspenden en un medio de conservación suplementado con glicerol al 10%, que seguidamente se almacena en una ampolla específica y se conserva en un tanque de nitrógeno líquido (a una temperatura de entre -150ºC y -196ºC).

B-9. Anticuerpo que presenta afinidad con el polipéptido

La presente exposición proporciona además un anticuerpo (un anticuerpo IgG) que presenta afinidad con el polipéptido E2.

El anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal pueden prepararse mediante un método ordinario.

Concretamente, estos anticuerpos pueden prepararse mediante el método descrito en la Sección A-9.

B-10. Método inmunológico para la detección o medición del polipéptido

La presente exposición proporciona además un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido E2 utilizando el anticuerpo. Concretamente, el método inmunológico puede llevarse a cabo según el método descrito en la Sección A-10.

La presente exposición proporciona además un kit de detección inmunológica que incluye el anticuerpo, utilizado para la detección o medición del polipéptido E2. El kit de detección también puede incluir un polipéptido E2 estándar, según se requiera. El kit de detección puede incluir además, según se requiera, reactivos adicionales que faciliten la detección sencilla del polipéptido E2 bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de detección puede incluir también cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que faciliten la fácil detección del polipéptido E2.

B-11. Método de detección o medición del polinucleótido que codifica el polipéptido

La presente exposición proporciona además un método para detectar o medir el polinucleótido E2. Concretamente, el método se lleva a cabo haciendo que la sonda de unión al polinucleótido E2 entre en contacto con una muestra de ensayo, según el método descrito en la Sección A-11.

La presente exposición proporciona además un kit para detectar o medir el polinucleótido E2, concretamente un kit de detección del polinucleótido E2 que incluye la sonda. Para facilitar la detección del polinucleótido E2 bajo las condiciones anteriormente indicadas, el kit de detección puede incluir reactivos adicionales o similares según se requiera, además de la sonda. Además, el kit de detección puede utilizarse para identificar células que contienen polinucleótido E2. Desde el punto de vista de permitir la detección precisa, el kit de detección preferentemente puede proporcionarse en forma de kit para la realización de la detección utilizando la PCR.

C. Enzima de síntesis de ecuol

C-1. Polipéptido

La presente exposición proporciona un polipéptido (en adelante denominado "polipéptido E3") para la síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato. Concretamente, la exposición proporciona:

(Ca) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13,

(Cb) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato, y

(Cc) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

En el polipéptido (Cb), el intervalo de "uno o más aminoácidos" no se encuentra particularmente limitado con la condición de que el polipéptido presente la actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato. Por ejemplo, el intervalo es de entre 1 y 200, preferentemente de entre 1 y 150, más preferentemente de entre 1 y 200, preferentemente de entre 1 y 150, más preferentemente de entre 1 y 100, más preferentemente de entre 1 y 50, más preferentemente de entre 1 y 45, más preferentemente de entre 1 y 40, más preferentemente de entre 1 y 30, más preferentemente de entre 1 y 15, más preferentemente de entre 1 y 5, todavía más preferentemente de entre 1 y 4, todavía más preferentemente de entre 1 y 3 y con particular preferente 1 o 2.

Entre los ejemplos del polipéptido (Cb) se incluyen un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 contiene dos aminoácidos sustituidos. En comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15 contiene 42 aminoácidos sustituidos y un aminoácido adicional (ácido glutámico) en el extremo C-terminal. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 corresponde al polipéptido enzima E2 de *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15 (nº FERM BP-6435). La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15 corresponde al polipéptido enzima E2 de *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-6437).

En el polipéptido (Cb), "la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácidos" puede llevarse a cabo tal como en la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácidos en el polipéptido E1 descritas en la Sección A-1. Resulta preferente que la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácidos en el polipéptido (Cb) se produzca en regiones en las que el cambio de aminoácidos no presente efectos importantes sobre las estructuras de

orden superior del polipéptido, o en las que el cambio no afecte al centro activo del enzima de síntesis de ecuol. Entre los ejemplos de dichas regiones se incluyen regiones poco conservadas entre las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15 y regiones vecinas de las mismas, y la región N-terminal o la región C-terminal. Entre los ejemplos específicos se incluyen ácido glutámico en la posición 3, arginina en la posición 28, ácido glutámico en la posición 29, arginina en la posición 32, asparagina en la posición 61, isoleucina en la posición 80, asparagina en la posición 92, ácido aspártico en la posición 112, alanina en la posición 119, asparagina en la posición 129, ácido aspártico en la posición 172, alanina en la posición 174, serina en la posición 204, ácido glutámico en la posición 206, treonina en la posición 223, valina en la posición 230, prolina en la posición 244, tirosina en la posición 246, treonina en la posición 280, arginina en la posición 282, alanina en la posición 285, valina en la posición 307, alanina en la posición 322, ácido glutámico en la posición 347, glicina en la posición 359, serina en la posición 360, alanina en la posición 366, leucina en la posición 367, isoleucina en la posición 368, valina en la posición 372, ácido aspártico en la posición 373, treonina en la posición 374, alanina en la posición 377, alanina en la posición 380, ácido aspártico en la posición 381, glutamina en la posición 399, prolina en la posición 403, metionina en la posición 404, valina en la posición 405, ácido glutámico en la posición 406, glicina en la posición 407, arginina en la posición 426, valina en la posición 434, alanina en la posición 436, tirosina en la posición 438 y alanina en la posición 436, tirosina en la posición 438 y alanina en la posición 440, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y regiones contiguas de dichos aminoácidos. La expresión "región contigua" se refiere a regiones en las que la actividad enzimática de síntesis de ecuol no resulta afectada. Entre los ejemplos de dichas regiones se incluyen aminoácidos a cinco o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, preferentemente aquellos a cuatro o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, más preferentemente aquellos a tres o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, todavía más preferentemente aquellos a dos o menos aminoácidos de uno de los aminoácidos ejemplificados, y con particular preferencia a un aminoácido de uno de los aminoácidos ejemplificados. Entre los ejemplos preferentes de regiones de baja conservación y regiones vecinas se incluyen la región correspondiente a las posiciones 25 a 35, la región correspondiente a las posiciones 170 a 177, la región correspondiente a las posiciones 201 a 208, la región correspondiente a las posiciones 242 a 248, la región correspondiente a las posiciones 276 a 289, la región correspondiente a las posiciones 355 a 385, la región correspondiente a las posiciones 396 a 409 y la región correspondiente a las posiciones 431 a 443, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13.

En la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, la secuencia comprendida entre el aminoácido de la posición 14 y el aminoácido de la posición 19 se considera que corresponde al dominio de unión de FAD. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, con la condición de que no resulten inhibidas funciones del dominio, puede producirse una sustitución, deleción, inserción o adición de un aminoácido arbitrario en la secuencia. Sin embargo, resulta preferente que no muten la glicina en la posición 14, la glicina en la posición 16 y la glicina en la posición 19. En la sustitución, deleción, inserción o adición de aminoácidos en la secuencia, el número de aminoácidos mutados preferentemente no es superior a 3, más preferentemente no es superior a 2, todavía más preferentemente a 1. Resulta más preferente la ausencia de mutaciones en la secuencia.

La figura 29 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15.

En el polipéptido (Cc), la secuencia de aminoácidos presenta, por ejemplo, una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13. Preferentemente la secuencia de aminoácidos presenta una identidad generalmente de 80% o más, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, más preferentemente de 95% o superior, todavía más preferentemente de 98% o superior, y con particular preferencia de 99% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13.

Concretamente, el polipéptido (Cc) puede ser un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 o un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15. La identidad de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 es de 99,6% (Blast2). La identidad de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 y la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15 es de 90,9% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, preferentemente, el polipéptido (Bc) comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 90,9% o superior, y más preferentemente de 99,6%, respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13.

Con respecto a los polipéptido (Cb) y (Cc), la actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato puede confirmarse de la manera siguiente. En primer lugar, se añade un polipéptido de interés a una solución de sustrato de la composición indicada posteriormente, a una concentración de 0,001 mg/ml. A continuación, la solución se incuba a 37ºC durante 2 horas para comprobar la presencia o ausencia de ecuol en la solución. La presencia de ecuol en la solución después de la incubación se utiliza como indicador de la actividad del polipéptido de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

<u>Composición de la solución de sustrato</u>

Tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0)
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM
ditiotreitol 2 mM

hidrosulfito sódico 5 mM
dihidrodaidzeína 40 µM

Propiedad enzimática

Debido a que el polipéptido E3 presenta una actividad enzimática de síntesis de ecuol utilizando la tetrahidrodaidzeína como sustrato, el polipéptido E3 también se denomina enzima E3. La temperatura óptima del enzima E3 es de entre aproximadamente 23ºC y 37ºC, y el pH óptimo es de 4,5. El enzima E3 también puede sintetizar tetrahidrodaidzeína a partir de ecuol.

De manera similar al polipéptido E1 y el polipéptido E2, el polipéptido E3 puede producirse mediante técnicas de ingeniería genética basándose en la información de la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16, nº 17 o nº 18. Además, pueden utilizarse métodos comunes de síntesis química para producir polipéptido E3 basándose en la información de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, nº 14 o nº 15. El polipéptido E3 también puede producirse mediante aislamiento y purificación a partir de microorganismos capaces de producirlo. Estos métodos pueden llevarse a cabo según la descripción contenida en la Sección A-1 anterior.

El microorganismo capaz de producir el polipéptido E3 puede cultivarse en un medio que contenga una cantidad deseada de tetrahidrodaidzeína. El polipéptido E3 también puede producirse de esta manera en microorganismos capaces de producir el polipéptido E3.

El polipéptido E2 puede ser monomérico, dimérico o polimérico, con la condición de que puede sintetizar la tetrahidrodaidzeína. Además, para mejorar la estabilidad y otras características, el polipéptido E3 puede ser modificado según se requiera, mediante la adición de polietilenglicol o una cadena sacárida.

El polipéptido E3 puede servir como catalizador que convierta la tetrahidrodaidzeína (un sustrato) en ecuol. El ecuol se cree que muestra diversas actividades fisiológicas en el cuerpo. En este sentido, el polipéptido E3, capaz de proporcionar ecuol, se considera importante. Por lo tanto, la presente exposición proporciona un enzima de síntesis de ecuol que incluye cualquiera de los polipéptidos (Ca) a (Cc).

C-2. Polinucleótido

La presente exposición proporciona además un polinucleótido (en adelante también denominado "polinucleótido E3") que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato. Concretamente, la exposición proporciona:

(Cd) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16,

(Ce) un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y

(Cf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Cd) o (Ce) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando la tetrahidrodaidzeína como sustrato.

La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17. La secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 15 corresponde a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18.

Respecto al polinucleótido (Cf), la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" es sinónima de la expresión "se hibrida bajo condiciones restrictivas" en la Sección A-2. Entre los ejemplos del polinucleótido (Cf) se incluyen la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18. La homología de secuencia de bases entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 17 es de 99,8% (Blast2). La homología entre la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 16 y la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 18 es de 85,2% (Blast2). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, preferentemente, el polinucleótido (Cf) comprende una secuencia de bases que presenta una homología de 85,2%, y más preferentemente una homología de 99,8%, respecto a la secuencia de bases SEC ID nº 16.

Respecto al polinucleótido (Cf), la "actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato" puede confirmarse mediante el mismo método utilizado para los polipéptidos (Cb) y (Cc).

El polinucleótido E3 puede producirse u obtenerse mediante métodos químicos de síntesis del ADN o mediante técnicas de ingeniería genética, basándose en la información de secuencia de SEC ID nº 16, nº 17 o nº 18. Concretamente puede utilizarse el método descrito para el polinucleótido E1 en la Sección A-2.

La fuente de ADNc del polinucleótido E3 no se encuentra particularmente limitada con la condición de que sea un microorganismo que exprese el polinucleótido E3. Entre los ejemplos específicos se incluyen microorganismos capaces de producir ecuol, preferentemente bacterias del ácido láctico, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Streptococcus* capaces de producir ecuol, más preferentemente *Lactococcus garvieae*, *Bacteroides ovatus* y *Streptococcus constellatus* capaces de producir ecuol, más preferentemente *Lactococcus garvieae* fecal y con particular preferencia, *Lactococcus* cepa 20-92, *Bacteroides ovatus* cepa E-23-15, *Streptococcus constellatus* A6G-225 (nº FERM BP-10036, nº FERM BP-6435 y nº FERM BP-6437, respectivamente; depositados en el Depósito Internacional de organismos de patente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), cepas de *Lactococcus garvieae* fecal capaces de producir ecuol.

La expresión de polinucleótido E2 utilizando técnicas comunes de ingeniería genética permite fácilmente la producción estable a gran escala del producto del polinucleótido (el polipéptido). El aislamiento con éxito del polinucleótido E2 abre las puertas a la producción industrial de ecuol sin utilizar cepas bacterianas anaeróbicas utilizadas tradicionalmente para la producción de ecuol, las cuales resultan difícil de manipular.

C-3. Vector de expresión

Un vector de expresión de la presente exposición no se encuentra particularmente limitado con la condición de que incluya el polinucleótido E1 y sea capaz de expresa el polinucleótido E2. Generalmente se selecciona apropiadamente según el tipo de célula huésped, de manera similar al vector de expresión que incluye el polinucleótido E1. Concretamente puede utilizarse la célula huésped indicada en la Sección A-3.

C-4. Célula recombinante

La presente exposición proporciona una célula recombinante (transformante) transformada con un vector de expresión que incluye el polinucleótido E3. La célula huésped utilizada para la célula recombinante puede ser cualquiera de las indicadas en la Sección A-4. Además, el vector de expresión puede introducirse en la célula huésped mediante el método descrito en la Sección A-4.

Debido a que la célula recombinante es capaz de producir polipéptido E3 (un enzima conversor del ecuol), puede utilizarse para producir un enzima conversor de ecuol. La célula recombinante también puede utilizarse para producir ecuol en una forma celular.

C-5. Producción de polipéptido utilizando células recombinantes

El polipéptido E3 puede producirse mediante el cultivo de células recombinantes en las que se introduce el polinucleótido E3 y recogiendo el polipéptido E3 de las células y el cultivo. Las células recombinantes pueden cultivarse según la descripción contenida en la Sección A-5.

C-6. Producción de ecuol utilizando el polipéptido E3

La presente exposición proporciona un procedimiento para producir ecuol utilizando el polipéptido E3. Durante el procedimiento de producción, la tetrahidrodaidzeína puede convertirse en ecuol haciendo que el polipéptido E3 actúe sobre la tetrahidrodaidzeína.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción puede llevarse a cabo en un tampón adecuado. Concretamente pueden utilizarse los tampones indicados en la Sección A-6.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo bajo condiciones en la que, por ejemplo, se añade cada componente al medio en los intervalos de concentración indicados posteriormente, al inicio de la reacción de manera que se prepara una mezcla. La mezcla se incuba durante 0,5 a 10 horas, preferentemente 1 a 6 horas, y más preferentemente 2 a 4 horas, a temperaturas que no alteran o inactivan los materiales de partida, incluyendo el polipéptido E3 y la tetrahidrodaidzeína, y el producto, incluyendo el ecuol. La temperatura de reacción no se encuentra particularmente limitada. Por ejemplo, en el caso de que la temperatura de reacción sea de 0ºC o inferior, la reacción utiliza, por ejemplo, un tampón que no se congele a dichas temperaturas de reacción. La temperatura de reacción es, por ejemplo, preferentemente de entre 0ºC y 45ºC, y más preferentemente de entre 0ºC y 37ºC.

El contenido de polipéptido E3 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso, y el contenido de tetrahidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso.

La presente exposición proporciona además una mezcla de materiales para la síntesis de ecuol, concretamente una composición de materiales de síntesis de ecuol que incluye: (Ci) polipéptido E3, (Cii) tetrahidrodaidzeína. Mediante la incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la tetrahidrodaidzeína contenida en la

composición puede convertirse en ecuol. La composición corresponde a la mezcla de materiales de partida anteriormente indicada, utilizada para iniciar la reacción para producir ecuol. Además, las concentraciones de polipéptido E3 y tetrahidrodaidzeína en la composición y otros componentes que pueden añadirse a la composición son esencialmente iguales a los del sistema de reacción (una mezcla de materiales de partida al inicio de la reacción) utilizado en el procedimiento de producción anterior.

La presente exposición proporciona además un kit para sintetizar ecuol, concretamente un kit de síntesis de ecuol que incluye: (Ci) polipéptido E3 y (Cii) tetrahidrodaidzeína. El kit de síntesis puede incluir los componentes en compartimientos, según se requiera, de manera que resulte posible convenientemente la síntesis de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además un tampón según se requiera. El kit de síntesis también puede incluir cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que ayuden a llevar a cabo la síntesis de ecuol.

C-7. Composición enzimática de síntesis de ecuol

La presente exposición proporciona además una composición enzimática de síntesis de ecuol que incluye polipéptido E3. La composición enzimática puede utilizarse convenientemente como enzima de síntesis de ecuol en el procedimiento de producción de ecuol utilizando el polipéptido E3.

La composición enzimática puede ser un polipéptido E3 purificado bruto o la composición enzimática puede ser un polipéptido E3 purificado bruto o purificado y formulado con un soporte adecuado. El soporte no presenta ningún efecto negativo sobre la actividad del polipéptido E3 y se utiliza en una cantidad adecuada.

La proporción de polipéptido E3 en la composición enzimática no se encuentra particularmente limitada con la condición de que la composición pueda utilizarse como enzima de síntesis de ecuol en el procedimiento de producción de ecuol. Concretamente el contenido de polipéptido E3 es, por ejemplo, de entre 0,001% y 20,0% en peso, preferentemente de entre 0,005% y 5,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,01% y 1,0% en peso, con respecto al total de la composición enzimática.

Con el fin de mejorar la estabilidad del polipéptido y/o para garantizar la conservación de la composición enzimática, la composición enzimática puede incluir además diversos antioxidantes y conservantes indicados en la Sección A-7, además del polipéptido E3.

C-8. Procedimiento de producción de ecuol utilizando células recombinantes

La presente exposición proporciona un procedimiento de producción de ecuol utilizando células recombinantes que incluye polinucleótido E3. Concretamente, durante el procedimiento de producción, la tetrahidrodaidzeína se convierte en ecuol haciendo que las células recombinantes actúen sobre la tetrahidrodaidzeína para su conversión.

La reacción utilizada en el procedimiento de producción se lleva a cabo en un ambiente que permite sobrevivir a la célula recombinante y convertir la tetrahidrodaidzeína en ecuol.

Concretamente se añaden cantidades apropiadas de células recombinantes y tetrahidrodaidzeína y se cultivan en un medio que permita el crecimiento de las células recombinantes.

El medio utilizado en el procedimiento de producción se selecciona convenientemente de entre diversos tipos de medios convencionales según el tipo de célula utilizado como la célula recombinante huésped.

El medio puede suplementarse con cantidades apropiadas de inhibidores de proteasa tales como PMSF y EDTA, según se requiera. Además, considerando que el polipéptido deriva de bacterias anaeróbicas, también pueden añadirse cantidades apropiadas de agentes reductores tales como DTT, 2ME, DET y $Na_2S_2O_4$. Al utilizar las células recombinantes, el medio puede suplementarse con NADPH y/o NADH según se requiera, aunque ello no resulta esencial.

Concretamente, el procedimiento de producción se lleva a cabo de la manera siguiente. En primer lugar, se inoculan las células recombinantes en un medio que contiene entre 0,001% y 1% en peso, preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso, y más preferentemente entre 0,01% y 0,1% en peso de tetrahidrodaidzeína, y el cultivo se incuba bajo condiciones de temperatura permisivas durante 7 a 30 horas, preferentemente 15 a 24 horas, y más preferentemente 17 a 20 horas. En la presente memoria, las condiciones de temperatura permisivas no se encuentran particularmente limitadas, y son esencialmente las indicadas en la Sección C-6 anterior.

La presente exposición proporciona además una mezcla de materiales para la síntesis de ecuol, concretamente una composición de materiales de síntesis de ecuol que contiene: (Ciii) la célula recombinante, y (Cii) tetrahidrodaidzeína. Mediante el cultivo de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la tetrahidrodaidzeína en la composición puede convertirse en ecuol. La composición corresponde a la mezcla de materiales de partida anteriormente indicada, utilizada para iniciar la reacción de producción de ecuol. Además, las

concentraciones de la células recombinante y la tetrahidrodaidzeína en la composición, y de otros componentes que pueden añadirse a la misma, son esencialmente iguales a las condiciones utilizadas en el procedimiento de producción anteriormente proporcionado.

La presente exposición proporciona además un kit para sintetizar ecuol, concretamente un kit de síntesis de ecuol que incluye: (Ciii) la célula recombinante y (Cii) tetrahidrodaidzeína. El kit de síntesis puede incluir la célula recombinante y tetrahidrodaidzeína en compartimientos según se requiera, de manera que resulta posible convenientemente sintetizar ecuol a partir de dihidrodaidzeína bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de síntesis puede incluir además un tampón o un medio, según se requiera. El kit de síntesis puede incluir además cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento que ayuden a llevar a cabo la síntesis del ecuol.

Las células recombinantes incluidas en el kit de síntesis pueden conservarse en el mismo mediante métodos conocidos. Existen varias técnicas conocidas de conservación de células recombinantes. Por ejemplo un método en el que las células recombinantes se conservan a una temperatura de entre 4ºC y 25ºC tras tratarse con un liofilizador para evaluar la ampolla que almacena las células recombinantes en un solvente, tal como dimetilformamida. Otro ejemplo es un método de nitrógeno líquido, en el que las células se suspenden en un medio de conservación suplementado con glicerol al 10%, que seguidamente se almacena en una ampolla específica y se mantiene en un tanque con nitrógeno líquido (a una temperatura de entre -150ºC y -196ºC).

C-9. Anticuerpo con afinidad con el polipéptido

La presente exposición proporciona además un anticuerpo (un anticuerpo IgG) que presenta afinidad con el polipéptido E3.

El anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal pueden prepararse mediante un método ordinario. Concretamente, estos anticuerpos pueden producirse mediante los métodos descritos en la Sección A-9.

C-10. Método inmunológico para la detección o medición del polipéptido

La presente exposición proporciona además un método inmunológico para detectar o medir el polipéptido E3 utilizando el anticuerpo. Concretamente, el método inmunológico puede llevarse a cabo según el método descrito en la Sección A-10.

La presente exposición proporciona además un kit de detección inmunológica que incluye el anticuerpo, utilizado para la detección o medición del polipéptido E3. El kit de detección también puede incluir un polipéptido E3 estándar, según se requiera. El kit de detección puede incluir además, según se requiera, reactivos adicionales que faciliten la detección sencilla del polipéptido E3 bajo las condiciones anteriormente indicadas. El kit de detección también puede incluir cualesquiera herramientas o manuales de funcionamiento necesarios que faciliten la detección sencilla del polipéptido E3.

C-11. Método de detección o medición del polinucleótido que codifica el polipéptido

La presente exposición proporciona además un método para detectar o medir el polinucleótido E3. Concretamente, el método se lleva a cabo causando que la sonda de unión al polinucleótido E3 entre en contacto con una muestra de ensayo según el método descrito en la Sección A-11.

La presente exposición proporciona además un kit para detectar o medir el polinucleótido E3, concretamente un kit de detección del polinucleótido E3 que incluye la sonda. Para facilitar la detección del polinucleótido E3 bajo las condiciones anteriormente indicadas, el kit de detección puede incluir reactivos adicionales o similares, según se requiera, además de la sonda. Además, el kit de detección puede utilizarse para identificar células que contienen el polinucleótido E3. Desde el punto de vista de permitir la detección precisa, el kit de detección preferentemente puede proporcionarse en forma de kit para llevar a cabo la detección utilizando la PCR.

D. Procedimiento de producción de ecuol que utiliza los enzimas E1-E3, o productos intermedios de los mismos

D-I-1. Procedimiento de producción de tetrahidrodaidzeína que comprende una primera y una segunda etapas

La presente exposición proporciona un procedimiento para producir trihidrodaidzeína que comprende las primera y segunda etapas siguientes (en adelante este procedimiento se denomina ocasionalmente "Primer método de producción"). La primera etapa produce dihidrodaidzeína a partir de daidzeína. La segunda etapa produce tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

La primera etapa comprende una etapa de hacer que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Aa) a (Ac) siguientes, y NADPH y/o NADH actúe sobre la daidzeína, produciendo de esta manera dihidrodaidzeína.

(Aa) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1.

(Ab) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 con una sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

(Ac) Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

La segunda etapa comprende una etapa en la que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ba) a (Bc) siguientes y NADPH y/o NADH se hacen actuar sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína.

(Ba) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7.

(Bb) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

(Bc) Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

El primer método de producción de la presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Primera etapa

En la primera etapa, se convierte daidzeína en dihidrodaidzeína haciendo que un enzima que consiste en polipéptido E1 actúe sobre la daidzeína en presencia de NADPH y/o NADH. La reacción en la primera etapa se lleva a cabo mediante incubación en una solución que contiene un enzima que consiste en el polipéptido E1, daidzeína y NADPH y/o NADH a temperaturas que no alteren o inactiven los materiales de partida, incluyendo el polipéptido y daidzeína, y el producto, incluyendo dihidrodaidzeína, es decir las condiciones detalladas en la sección A-6 anterior.

En el caso de que la primera etapa y la segunda etapa descrita posteriormente se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones en las que los componentes satisfagan los intervalos de concentración tal como se muestra posteriormente, en un sistema de reacción al inicio de la reacción (en una mezcla de materiales de partida al inicio de la reacción) y que la mezcla se incuba durante 0,5 a 10 horas, preferentemente 1 a 6 horas, y más preferentemente 2 a 4 horas, a una temperatura de entre 15ºC y 45ºC, preferentemente de entre 25ºC y 40ºC, y más preferentemente de entre 30ºC y 38ºC. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la primera como la segunda etapas. El contenido del enzima que consiste en polipéptido E1 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso. El contenido de daidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso. El contenido de NADPH y/o NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

La fuente de daidzeína utilizada como sustrato en la primera etapa no se encuentra limitada. Por ejemplo, pueden utilizarse daidzeínas disponibles comercialmente o daidzeínas producidas o sintetizadas mediante métodos apropiados.

Además, por ejemplo, puede utilizarse una composición de materiales de síntesis de dihidrodaidzeína que contenga (Ai) un enzima que consiste en polipéptido E1, (Aii) NADPH y/o NADH, y (Aiii) daidzeína, como mezcla de materiales de partida en la producción de dihidrodaidzeína en la primera etapa. Mediante incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la daidzeína en la composición se convierte en dihidrodaidzeína. La composición se describe específicamente en las secciones A-6 y A-7 anteriores.

Segunda etapa

En la segunda etapa, la dihidrodaidzeína se convierte en tetrahidrodaidzeína haciendo que un enzima que consiste en el polipéptido E2 actúe sobre la dihidrodaidzeína en presencia de NADPH y/o NADH.

La reacción en la segunda etapa se lleva a cabo mediante incubación en una solución que contiene un enzima que consiste en el polipéptido E2, dihidrodaidzeína y NADPH y/o NADH a temperaturas que no alteren o inactiven los materiales de partida, incluyendo el enzima que consiste en polipéptido E2 y dihidrodaidzeína, y el producto, incluyendo tetrahidrodaidzeína, es decir, las condiciones indicadas en la sección B-6 anterior.

Respecto a la tetrahidrodaidzeína, el compuesto se encuentra presente en forma cis o en forma trans. La formación de las configuraciones cis y trans puede controlarse modificando las condiciones de reacción, tales como la temperatura de reacción y el tiempo de reacción. Por ejemplo, puede producirse una mezcla de tetrahidrodaidzeínas cis y trans fijando la temperatura de reacción en 0ºC, o la reacción puede controlarse en favor de la forma trans fijando la temperatura de reacción en 37ºC.

Al llevar a cabo las primera y segunda etapas bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones anteriormente indicadas para la realización de la primera y la segunda etapas bajo las mismas condiciones, las cuales se detallan en la explicación anteriormente indicada de la primera etapa. Con este diseño, se llevan a cabo eficientemente tanto la primera como la segunda etapas. En este caso, el contenido del enzima que consiste en polipéptido E2, de dihidrodaidzeína y de NADPH y/o NADH se ajustan de la manera siguiente:

el contenido del enzima que consiste en polipéptido E2 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso; el contenido de dihidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y

el contenido de NADPH y/o NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

Sin embargo, al llevarlas a cabo en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1 o del enzima que consiste en polipéptido E2, las primera y segunda etapas requieren la utilización de NADPH para incrementar la eficiencia de la reacción productora de dihidrodaidzeína. La concentración de NADPH se determina basándose en las condiciones anteriormente indicadas para llevar a cabo las primera y segunda etapas bajo las mismas condiciones, las cuales se detallan en la explicación anteriormente proporcionada de la primera etapa. La concentración de NADH, el cual se utiliza con NADHP, es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

La fuente de dihidrodaidzeína utilizada como sustrato en la segunda etapa no se encuentra limitada.

Por ejemplo, la dihidrodaidzeína producida en la primera etapa a partir de daidzeína puede utilizarse como sustrato para la segunda etapa. La dihidrodaidzeína se utiliza en forma de la solución que contiene dihidrodaidzeína tal como se produce en la primera etapa, o en un estado preliminarmente refinado o en un estado apropiadamente refinado.

También pueden utilizarse dihidrodaidzeínas disponibles comercialmente o dihidrodaidzeínas sintetizadas mediante métodos apropiados.

Además, puede utilizarse una composición de materiales de síntesis de tetrahidrodaidzeína que contenga (Bi) un enzima que consiste en polipéptido E2, (Bii) NADPH y/o NADH, y (Biii) dihidrodaidzeína, como mezcla de materiales de partida en la producción de tetrahidrodaidzeína en la segunda etapa. Mediante incubación del a composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la dihidrodaidzeína en la composición se convierte en tetrahidrodaidzeína. La composición de síntesis se describe específicamente en las secciones A-6 y A-7 anteriores.

En la segunda etapa, resulta preferible utilizar dihidrodaidzeína, producida en la primera etapa utilizando daidzeína como sustrato; sin embargo, la dihidrodaidzeína disponible comercialmente, la composición de materiales de partida de síntesis, la composición enzimática, etc., pueden mezclarse con la dihidrodaidzeína producida en la primera etapa.

Polipéptido E1 y polipéptido E2

El primer método de producción de la presente exposición utiliza el enzima consistente del polipéptido E1 tal como se ha detallado en la sección A-1 anterior, y el enzima que consiste en el polipéptido E2, tal como se ha detallado en la sección B-1 anterior.

D-I-2. Producto que contiene tetrahidrodaidzeína, producida mediante el primer método de producción

La presente exposición proporciona un producto que contiene tetrahidrodaidzeína, producida mediante el procedimiento anteriormente indicado que comprende las primera y segunda etapas (primer método de producción).

Tal como se ha indicado anteriormente, el primer método de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, y de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el producto producido mediante el primer método de producción de la presente exposición contiene no sólo tetrahidrodaidzeína, sino también dihidrodaidzeína y/o daidzeína.

El producto de la presente exposición puede utilizarse en forma de la solución producida en el primer método de producción, o puede ser un producto de tetrahidrodaidzeína obtenido mediante el refinado preliminar o apropiado de la solución.

El producto de la presente exposición puede incorporarse en alimentos, bebidas o materiales de producto cosmético, productos medicinales, etc., o puede utilizarse como sustrato.

D-I-3. Procedimiento de producción de ecuol que comprende segunda y tercera etapas

La presente exposición proporciona un procedimiento para producir ecuol, que comprende seguir las segunda y tercera etapas (en adelante, dicho procedimiento se denomina ocasionalmente "segundo método de producción"). La segunda etapa produce tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína. La tercera etapa produce ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

La segunda etapa comprende una etapa en la que se hace que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ba) a (Bc) siguientes, y NADPH y/o NADH, actúen sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína.

(Ba) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7.

(Bb) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

(Bc) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7 y que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando dihidrodaidzeína como sustrato.

La tercera etapa comprende una etapa en la que se hace que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ca) a (Cc) siguientes actúe sobre la tetrahidrodaidzeína, produciendo de esta manera ecuol.

(Ca) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13.

(Cb) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

(Cc) Un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácido que presenta una identidad de 60% o más respecto a la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13 y que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

El segundo método de producción de la presente exposición permite la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Segunda etapa

La segunda etapa del segundo método de producción de la presente exposición es la misma que la segunda etapa del primer método de producción.

En el caso de que la segunda etapa y la tercera etapa, descrita posteriormente, se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones en las que los componentes satisfacen los intervalos de concentración indicados posteriormente en un sistema de reacción al inicio de la reacción (en una mezcla de materiales de partida al inicio de la reacción) y en las que la mezcla se incuba durante 0,5 a 10 horas, preferentemente 1 a 6 horas, y más preferentemente 2 a 4 horas, a una temperatura de entre 15ºC y 45ºC, preferentemente de entre 25ºC y 40ºC, y más preferentemente de entre 30ºC y 38ºC. Con este diseño, se llevan a cabo eficientemente tanto una primera como una segunda etapas.

El contenido del enzima que consiste en el polipéptido E2 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso. El contenido de dihidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso. El contenido de NADPH y/o de NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

Tercera etapa

En la tercera etapa un enzima que consiste en polipéptido E3 actúa sobre la tetrahidrodaidzeína, convirtiendo de esta manera la tetrahidrodaidzeína en ecuol.

La reacción en la tercera etapa se lleva a cabo mediante incubación en una solución que contiene un enzima que consiste en el polipéptido E3 y tetrahidrodaidzeína a temperaturas que no alteran o inactivan los materiales de partida, incluyendo el enzima que consiste en el polipéptido E3 y tetrahidrodaidzeína, y el producto, incluyendo ecuol; es decir, las condiciones detalladas en la sección A-6 anterior.

En el caso de que las segunda y tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones anteriormente indicadas de realización de las segunda y tercera etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la segunda etapa. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la segunda como la tercera etapas. En este caso, el contenido del enzima que consiste en polipéptido E3, tetrahidrodaidzeína, y NADPH y/o NADH se ajustan de la manera siguiente:

el contenido del enzima que consiste en polipéptido E3 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso;

el contenido de tetrahidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y

el contenido de NADPH y/o NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1 y 0,5% en peso.

La fuente de tetrahidrodaidzeína utilizada como sustrato en la tercera etapa tampoco se encuentra limitada.

Por ejemplo, la tetrahidrodaidzeína producida en la segunda etapa a partir de dihidrodaidzeína puede utilizarse como sustrato para la tercera etapa. La tetrahidrodaidzeína se utiliza en forma de solución que contiene tetrahidrodaidzeína tal como se produce en la segunda etapa, o en un estado preliminarmente o apropiadamente refinado.

También puede utilizarse las tetrahidrodaidzeínas disponibles comercialmente o tetrahidrodaidzeínas sintetizadas mediante métodos apropiados.

Además, puede utilizarse una composición de materiales de síntesis de tetrahidrodaidzeína que contiene (Ci) un enzima que consiste en polipéptido E3, y (Cii) tetrahidrodaidzeína a modo de mezcla de materiales de partida en la producción de tetrahidrodaidzeína en la tercera etapa. Mediante la incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la tetrahidrodaidzeína en la composición se convierte en ecuol. La composición se describe específicamente en las secciones C-6 y C-7 anteriormente indicadas.

En la tercera etapa resulta preferible utilizar tetrahidrodaidzeína producida en la segunda etapa utilizando dihidrodaidzeína como sustrato; sin embargo, puede mezclarse tetrahidrodaidzeína disponible comercialmente, la composición de materiales de partida de síntesis, la composición enzimática, etc., con la tetrahidrodaidzeína producida en la segunda etapa.

Polipéptido E2 y polipéptido E3

El segundo método de producción de la presente exposición utiliza un enzima que consiste en el polipéptido E2 indicado en la sección B-1 anterior, y un enzima que consiste en el polipéptido E3 indicado en la sección C-1 anterior.

D-I-4. Producto que contiene ecuol, producido mediante el segundo método de producción

La presente exposición proporciona un producto que contiene ecuol, producido mediante el procedimiento anteriormente indicado que comprende las segunda y tercera etapas (segundo método de producción).

Tal como se ha indicado anteriormente, el segundo método de producción de la presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el producto producido mediante el segundo método de producción de la presente exposición contiene no sólo ecuol, sino también tetrahidrodaidzeína y/o dihidrodaidzeína.

El producto de la presente exposición puede utilizarse en forma de la solución producida en el segundo método de producción o puede ser un producto de ecuol obtenido mediante refinado preliminar o apropiado de la solución.

El producto de la presente exposición puede incorporarse en alimentos, bebidas, materiales de producto cosmético, productos medicinales, etc., o puede utilizarse como sustrato.

D-I-5. Método de producción de ecuol que comprende la primera a tercera etapas

La presente exposición proporciona un método de producción de ecuol que comprende las primera, segunda y tercera etapas (en adelante dicho procedimiento ocasionalmente se denomina "tercer método de producción").

El tercer método de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Primera etapa

En la primera etapa del tercer método de producción de la presente exposición, la daidzeína se convierte en dihidrodaidzeína haciendo que el enzima que consiste en polipéptido E1 actúe sobre la daidzeína en presencia de NADPH y/o NADH. La primera etapa del tercer método de producción de la presente exposición es la misma que la primera etapa anteriormente indicada.

En el caso de que las primera y segunda etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, en el caso de que las primera y tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, o en el caso de que la primera a tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones/concentraciones anteriormente indicadas de realización de las primera y segunda etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la primera etapa. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la primera como la segunda etapa.

Segunda etapa

En la segunda etapa del tercer método de producción de la presente exposición, la dihidrodaidzeína se convierte en tetrahidrodaidzeína al hacer que un enzima que consiste en polipéptido E2 actúe sobre la dihidrodaidzeína en presencia de NADPH y/o NADH. La segunda etapa del tercer método de producción de la presente exposición es la misma que la segunda etapa anteriormente indicada.

En el caso de que la primera etapa y la segunda etapa se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, o en el caso de que las primera a tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones/concentraciones anteriormente indicadas de realización de la primera y segunda etapa bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la segunda etapa. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la primera como la segunda etapas.

Además, al llevar a cabo las primera y segunda etapas en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1 y el enzima que consiste en polipéptido E2, o en el caso de que la primera a tercera etapas se lleven a cabo en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1, el enzima que consiste en polipéptido E2 y el enzima que consiste en polipéptido E3, la reacción se lleva a cabo mediante incubación en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1 y el enzima que consiste en polipéptido E2, bajo las condiciones/concentraciones anteriormente indicadas, las cuales se detallan en la explicación de la segunda etapa, por ejemplo.

En el caso de que las segunda y tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones/concentraciones anteriormente indicadas de realización de las segunda y tercera etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la segunda etapa. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la segunda como la tercera etapas.

Tercera etapa

En la tercera etapa del tercer método de producción de la presente exposición, se convierte la tetrahidrodaidzeína en ecuol al hacer que un enzima que consiste en polipéptido E3 actúe sobre la tetrahidrodaidzeína en presencia de NADPH y/o NADH, convirtiendo de esta manera la tetrahidrodaidzeína en ecuol. La tercera etapa del tercer método de producción de la presente exposición es la misma que la tercera etapa anteriormente indicada.

En el caso de que las primera y tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, o en el caso de que la primera a tercera etapas se lleven a cabo bajo las mismas condiciones, la reacción se lleva a cabo mediante incubación bajo las condiciones anteriormente indicadas de realización de la primera y la segunda etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la primera etapa. Con este diseño se llevan a cabo eficientemente tanto la primera como la segunda etapas. En este caso, el contenido del enzima que consiste en polipéptido E3, de tetrahidrodaidzeína y de NADPH y/o NADH se ajusta de la manera siguiente:

el contenido del enzima que consiste en polipéptido E2 es de entre 0,0001% y 1,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,01% en peso,

el contenido de tetrahidrodaidzeína es de entre 0,0001% y 10,0% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 1,0% en peso, y más preferentemente de entre 0,001% y 0,1% en peso, y

el contenido de NADPH y/o NADH es de entre 0,01% y 5% en peso, preferentemente de entre 0,05% y 1% en peso, y más preferentemente de entre 0,1% y 0,5% en peso.

Sin embargo, en el caso de que se lleven a cabo en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1 y el enzima que consiste en polipéptido E3, las primera y tercera etapas requieren la utilización de NADPH para incrementar la eficiencia de la reacción de producción de dihidrodaidzeína utilizando el enzima que consiste en polipéptido E1. De manera similar, en el caso de que se lleve a cabo en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1, el enzima que consiste en polipéptido E2 y el enzima que consiste en polipéptido E3, la primera a tercera etapas requieren la utilización de NADPH para incrementar la eficiencia de la reacción de producción de dihidrodaizeína utilizando el enzima que consiste en polipéptido E1. En este caso, la concentración de NADPH se determina basándose en las condiciones anteriormente indicadas de realización de las primera y segunda etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la primera etapa. La concentración de NADH, el cual se utiliza con NADPH, se determina basándose en las condiciones anteriormente indicadas de realización de la reacción en presencia del enzima que consiste en polipéptido E1 y de enzima que consiste en polipéptido E2, las cuales se detallan en la explicación anteriormente proporcionada de la segunda etapa, y las condiciones anteriormente indicadas de realización de las segunda y tercera etapas bajo las mismas condiciones que las detalladas en la explicación anteriormente proporcionada de la segunda etapa.

Polipéptidos E1 a E3

El tercer método de producción de la presente exposición utiliza el enzima que consiste en polipéptido E1, el enzima que consiste en polipéptido E2 y el enzima que consiste en polipéptido E3. Los péptidos E1 a E3 son los mismos que los indicados anteriormente.

D-I-6. Producto que contiene ecuol, producido mediante el tercer método de producción

La presente exposición proporciona un producto que contiene ecuol, producido mediante el procedimiento anteriormente indicado que comprende las primera a tercera etapas (tercer método de producción).

Tal como se ha indicado anteriormente, el tercer método de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el producto producido mediante el tercer método de producción de la presente exposición contiene no sólo ecuol, sino también tetrahidrodaidzeína, dihidrodaidzeína y/o daidzeína.

El producto de la presente exposición puede utilizarse en forma de la solución producida en el tercer método de producción, o puede ser un producto de tetrahidrodaidzeína obtenido mediante el refinado preliminar o apropiado de la solución.

El producto de la presente exposición puede incorporarse en alimentos, bebidas o materiales de productos cosméticos, productos medicinales, etc., o puede utilizarse como sustrato.

D-I-7. Procedimiento para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos dos de entre las cuarta a sexta etapas

La presente exposición proporciona un procedimiento para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos dos de las cuarta a sexta etapas proporcionadas posteriormente (en adelante, este procedimiento se denomina ocasionalmente "cuarto método de producción"). La cuarta etapa produce dihidrodaidzeína a partir de daidzeína. La quinta etapa produce tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína, y la sexta etapa produce ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

La cuarta etapa comprende una etapa en la que se hace que una célula recombinante que consiste en uno de los polinucleótidos (Ad) a (Af) siguientes sobre la daidzeína, produciendo de esta manera dihidrodaidzeína.

(Ad) Un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 4.

(Ae) Un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, y

(Af) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Ad) o (Ae), y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

La quinta etapa comprende una etapa en la que se hace que una célula recombinante que consiste en uno de los polinucleótidos (Bd) a (Bf) siguientes actúe sobre la dihidrodaidzeína, produciendo de esta manera tetrahidrodaidzeína.

(Bd) Un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 10.

(Be) Un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 7, y

(Bf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Bd) o (Be) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína utilizando la dihidrodaidzeína como sustrato.

La sexta etapa comprende una etapa en la que se hace que una célula recombinante que consiste en uno de los polinucleótidos (Cd) a (Cf) siguientes actúe sobre la tetrahidrodaidzeína, produciendo de esta manera ecuol.

(Cd) Un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº16.

(Ce) Un polinucleótido que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 13, y

(Cf) un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones restrictivas con la cadena complementaria del polinucleótido (Cd) o (Ce) y que codifica un polipéptido que presenta una actividad de síntesis de ecuol utilizando tetrahidrodaidzeína como sustrato.

El cuarto método de producción de la presente exposición produce dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol mediante la combinación apropiada de las cuarta a sexta etapas.

El cuarto método de producción de la presente exposición comprende por lo menos dos de entre las cuarta, quinta y sexta etapas.

Por ejemplo, el cuarto método de producción de la presente exposición, que comprende las cuarta y quinta etapas y no comprende la sexta etapa, produce dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, y tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

Por ejemplo, el cuarto método de producción de la presente exposición comprende las quinta y sexta etapas y no comprende la cuarta etapa, produce tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Además, por ejemplo un cuarto método de producción de la presente exposición que comprende la cuarta, la quinta y la sexta etapas produce dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína, y ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Cada célula recombinante utilizada para el cuarto método de producción de la presente invención puede contener uno o más polinucleótidos seleccionados de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), (Bd) a (Bf) y (Cd) a (Cf).

Por ejemplo, en el caso de que la célula contenga dos polinucleótidos: un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af) y un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Bd) a (Bf), pueden llevarse a cabo la cuarta y quinta etapas con dicha célula, es decir, la cuarta y quinta etapas pueden llevarse a cabo con un tipo de célula recombinante.

De manera similar, en el caso de que la célula contenga tres polinucleótidos: un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Bd) a (Bf) y un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Cd) a (Cf), la cuarta a sexta etapas pueden llevarse a cabo con dicha célula, es decir, la cuarta a sexta etapas pueden llevarse a cabo con un tipo de célula recombinante.

En el cuarto método de producción de la presente exposición, la cuarta a sexta etapas también pueden llevarse a cabo utilizando una célula recombinante que contenga dos polinucleótidos: un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Bd) a (Bf), y otra célula recombinante que contiene un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Cd) a (Cf).

De manera similar, en el cuarto método de producción de la presente exposición, las cuarta a sexta etapas también pueden llevarse a cabo utilizando una célula recombinante que contiene dos polinucleótidos: un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Ad) a (Af), un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Cd) a (Cf) y otra célula recombinante que contiene un polinucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en (Bd) a (Bf).

Cuarta etapa

En la cuarta etapa una célula recombinante que presenta el polinucleótido E1 tal como se detalla en la sección A-2 actúa sobre la daidzeína, convirtiendo de esta manera la daidzeína en dihidrodaidzeína.

La reacción de la cuarta etapa puede llevarse a cabo bajo las mismas condiciones a las indicadas en la primera etapa. Más concretamente, la célula recombinante se inocula en el medio de cultivo que contiene entre 0,001% y 1% en peso, preferentemente entre 0,01% y 1% en peso, más preferentemente entre 0,01% y 0,5% en peso de daidzeína, y se incuba durante 6 a 30 horas, preferentemente 7 a 24 horas, más preferentemente 7 a 18 horas, a una temperatura que permita el crecimiento celular. La temperatura no se encuentra limitada y puede ser la temperatura adoptada en la primera etapa.

Células recombinantes utilizadas en la cuarta etapa

Puede utilizarse cualquier célula recombinante utilizada en la cuarta etapa con la condición de que las células contengan polinucleótido E1 y sean capaces de expresar polinucleótido E1. En la etapa pueden utilizarse las células recombinantes detalladas en la sección A-4.

Producción de enzima que consiste en polipéptido E1 utilizando células recombinantes que presentan polinucleótido E1

El enzima que consiste en polipéptido E1 puede producirse mediante cultivo de la célula recombinante tras la introducción de polinucleótido E2 y mediante la recolección de polipéptido E1 del cultivo celular. Más concretamente, puede producirse polipéptido E1 mediante cultivo de la célula recombinante bajo las condiciones detalladas en la sección A-5.

Quinta etapa

En la quinta etapa una célula recombinante que presenta el polinucleótido E2 tal como se detalla en la sección B-2 actúa sobre la dihidrodaidzeína, convirtiendo de esta manera la dihidrodaidzeína en tetrahidrodaidzeína.

La reacción en la quinta etapa puede llevarse a cabo bajo las mismas condiciones que las indicadas en la segunda etapa. Más concretamente, la célula recombinante se inocula en el medio de cultivo que contiene 0,001% a 1% en peso, preferentemente 0,01% a 0,5% en peso, más preferentemente 0,01% a 0,1% en peso de daidzeína, y se incuba durante 7 a 30 horas, preferentemente 15 a 24 horas, más preferentemente 17 a 20 horas, a una temperatura que permita el crecimiento celular. La temperatura no se encuentra limitada y puede ser la temperatura adoptada en la segunda etapa.

Células recombinantes utilizadas en la quinta etapa

Puede utilizarse cualquier célula recombinante en la quinta etapa con la condición de que las células contengan el polinucleótido E2, indicado en la sección B-2, y sean capaces de expresar el polinucleótido E2. Un ejemplo es una célula recombinante detallada en la sección B-4.

Producción de enzima que consiste en polipéptido E2 utilizando células recombinantes que presentan polinucleótido E2

El enzima que consiste en polipéptido E2 puede producirse mediante cultivo de la célula recombinante tras la introducción de polinucleótido E2 y mediante recolección de polipéptido E2 de las células y/o del cultivo.

Pueden utilizarse los mismos procedimientos y condiciones utilizados en la sección "Producción de enzima que consiste en polipéptido E1 utilizando células recombinantes que presentan polinucleótido E1" para la incubación de células recombinantes suministradas con polinucleótido E2 y medio de cultivo, y el aislamiento/purificación del polipéptido E2.

Sexta etapa

En la sexta etapa una célula recombinante que presenta el polinucleótido E2 tal como se detalla en la sección C-2 actúa sobre la tetrahidrodaidzeína, convirtiendo de esta manera la tetrahidrodaidzeína en ecuol.

La reacción en la sexta etapa puede llevarse a cabo bajo las mismas condiciones que en la tercera etapa. Más concretamente, la célula recombinante se inocula en el medio de cultivo que contiene 0,001% a 1% en peso, preferentemente 0,01% a 0,5% en peso, más preferentemente 0,01% a 0,1% en peso de tetrahidrodaidzeína, y se incuba durante 7 a 30 horas, preferentemente 15 a 24 horas, más preferentemente 17 a 20 horas, a una temperatura que permita el crecimiento celular. La temperatura no se encuentra limitada y puede ser la temperatura adoptada en la tercera etapa.

La fuente de tetrahidrodaidzeína utilizada como sustrato en la sexta etapa tampoco se encuentra limitada.

Por ejemplo, la tetrahidrodaidzeína producida en la quinta etapa a partir de dihidrodaidzeína puede utilizarse como sustrato para la sexta etapa. La tetrahidrodaidzeína se utiliza en forma de solución que contiene tetrahidrodaidzeína tal como es producida en la quinta etapa, o en un estado preliminarmente refinado o en un estado apropiadamente refinado.

También pueden utilizarse tetrahidrodaidzeínas disponibles comercialmente o tetrahidrodaidzeínas sintetizadas mediante métodos apropiados.

Además, puede utilizarse una composición de materiales de síntesis de tetrahidrodaidzeína que contiene células recombinantes que contienen polinucleótido E3, y puede utilizarse tetrahidrodaidzeína como mezcla de materiales de partida en la producción de tetrahidrodaidzeína en la sexta etapa. Mediante la incubación de la composición bajo las condiciones anteriormente indicadas, la tetrahidrodaidzeína en la composición se convierte en ecuol. Se aplican las mismas condiciones y restricciones a las indicadas anteriormente con el fin de determinar las concentraciones de las células recombinantes y la tetrahidrodaidzeína en la composición, otros ingredientes añadidos a la composición, condiciones de reacción, etc.

En la sexta etapa, resulta preferible utilizar tetrahidrodaidzeína, producida en la quinta etapa utilizando dihidrodaidzeína como sustrato; sin embargo, la tetrahidrodaidzeína disponible comercialmente, la composición de materiales de partida de síntesis, la composición enzimática, etc., pueden mezclarse con la tetrahidrodaidzeína producida en la quinta etapa.

Células recombinantes utilizadas en la sexta etapa

Puede utilizarse cualquier célula recombinante en la sexta etapa con la condición de que las células contengan el polinucleótido E3 indicado en la sección C-2 y sean capaces de expresar polinucleótido E3. Un ejemplo es una célula recombinante detallada en la sección C-4.

Producción de enzima que consiste en polipéptido E3 utilizando células recombinantes que presentan polinucleótido E3

El enzima que consiste en polipéptido E3 puede producirse mediante cultivo de las células recombinantes tras la introducción de polinucleótido E3 y mediante recolección del polipéptido E3 de las células y/o del cultivo.

Pueden utilizarse los mismos procedimientos y condiciones a los indicados en la sección "Producción de enzima que consiste en polipéptido E1 utilizando células recombinantes que presentan polinucleótido E1" para la incubación de células recombinantes suministradas con polinucleótido E3 y medio de cultivo, y el aislamiento/purificación de polipéptido E3.

Polinucleótidos E1 a E3

El cuarto método de producción de la presente exposición utiliza por lo menos uno de entre los polinucleótidos E1 a E3, los cuales se han detallado en las secciones A-2, B-2 y C-2 anteriores, respectivamente.

D-I-8. Producto que contiene dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, producido mediante el cuarto método de producción

La presente exposición proporciona un producto que contiene dihdirodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, producido mediante el cuarto método de producción anterior.

Tal como se ha indicado anteriormente, el cuarto método de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol mediante la combinación apropiada de la cuarta a sexta etapas.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el producto producido mediante el cuarto método de producción de la presente exposición contiene dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol.

El producto puede utilizarse en forma de la solución producida en el cuarto método de producción o puede ser un producto de dihidrodaidzeína, un producto de tetrahidrodaidzeína o un producto de ecuol, obtenidos mediante purificación preliminar o apropiada de la solución.

El producto puede incorporarse en alimentos, bebidas o materiales de producto cosmético, productos medicinales, etc., o puede utilizarse como sustrato.

D-II-1. Dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, dotado de por lo menos uno de entre el primer a tercer recipientes de reacción

La presente exposición proporciona un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, con la condición de que por lo menos uno de entre el primer a tercer recipientes de reacción siguientes (en adelante, dicho dispositivo se denomina ocasionalmente "primer dispositivo de producción").

Primer recipiente de reacción

El primer recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante, estos medios se denominan ocasionalmente "medios de reacción 1") en los que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Aa) a (Ac) (polipéptidos E1) se encuentra inmovilizado. Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína utilizando el polipéptido. En este recipiente de reacción, los medios de reacción se disponen en una posición que permite el contacto con la daidzeína.

Segundo recipiente de reacción

El segundo recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante, estos medios se denominan ocasionalmente "medios de reacción 2") en los que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ba) a (Bc) (polipéptidos E2) se encuentra inmovilizado. Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína utilizando el polipéptido. En el recipiente de reacción, los medios de reacción se disponen en una posición que permite el contacto con la dihidrodaidzeína.

Tercer recipiente de reacción

El tercer recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante, estos medios se denominan ocasionalmente "medios de reacción 3") en los que un enzima que consiste en uno de los polipéptidos (Ca) a (Cc) (polipéptidos E3) se encuentra inmovilizado. Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína utilizando el polipéptido. En el recipiente de reacción, se disponen los medios de reacción en una posición que permite el contacto con la tetrahidrodaidzeína.

El primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol mediante la combinación apropiada de primer a tercer recipientes de reacción.

El primer dispositivo de producción de la presente exposición presenta por lo menos uno de entre el primer recipiente de reacción, el segundo recipiente de reacción y el tercer recipiente de reacción.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente el primer recipiente de reacción y no presente los segundo y tercer recipientes de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente segundo recipiente de reacción y no presente primer y tercer recipientes de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente el tercer recipiente de reacción y no presente los primer y segundo recipientes de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente los primer y segundo recipientes de reacción y no presente el tercer dispositivo de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína y de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente los segundo y tercer recipientes de reacción y no presente el primer recipiente de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína, y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente los primer, segundo y tercer recipientes de reacción, el primer dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

En el primer dispositivo de producción de la presente exposición un único recipiente de reacción puede presentar dos de los medios de reacción 1 a 3.

Por ejemplo, en el caso de que se proporcionen los medios de reacción 1 y 2 en un único recipiente de reacción, las reacciones respectivas llevadas a cabo en el primer y segundo recipientes de reacción pueden llevarse a cabo en un recipiente de reacción. Además, por ejemplo en el caso de que los medios de reacción 1 a 3 se proporcionen en un único recipiente de reacción, las reacciones respectivas llevadas a cabo en los primer a tercer recipientes de reacción pueden llevarse a cabo en un recipiente de reacción.

En la medida en que se garantiza el efecto deseado, el modo de diseñar dichos medios de reacción para el recipiente de reacción no se encuentra limitado.

Además, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presenta por lo menos dos de los medios de reacción 1 a 3 y una pluralidad de recipientes de reacción diferentes, estos se encuentran conectados mediante medios de suministro.

Por ejemplo, en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición presente los primer y segundo recipientes de reacción y no presente el tercer recipiente de reacción, en donde los primer y segundo recipientes de reacción son unidades independientes y los primer y segundo recipientes de reacción contienen los medios de reacción 1 y 2, respectivamente, los primer y segundo recipientes de reacción se encuentran conectados mediante medios de suministro que suministran un producto de dihidrodaidzeína producido en el primer recipiente de reacción al segundo recipiente de reacción.

Además, por ejemplo en el caso de que el primer dispositivo de producción de la presente exposición comprenda los medios de reacción 1 y 2 en un recipiente de reacción y los medios de reacción 3 en otro recipiente de reacción, el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 1 y 2 y el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 3 se encuentran conectados mediante medios de suministro para suministrar un producto producido en el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 1 y 2 al recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 3.

El producto puede ser una forma de solución tal como se produce o puede ser un producto de dihidrodaidzeína, etc. obtenido mediante la purificación preliminar o apropiada de una solución.

Recipiente de reacción

Las formas, tamaños, materiales, etc. del primer a tercer recipientes de reacción proporcionados en el primer dispositivo de producción de la presente exposición no se encuentran limitados, dado que cada recipiente es capaz de contener medios de reacción y de producir apropiadamente dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol.

Medios de reacción

Los medios de reacción 1 a 3 que deben utilizarse en el primer dispositivo de producción de la presente exposición no se encuentran limitados con la condición de que cada uno de ellos contenga un enzima inmovilizado respectivo y sea capaz de producir apropiadamente dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol.

El enzima respectivo inmovilizado en cada medio de reacción puede purificarse preliminar o apropiadamente (absolutamente). La inmovilización del enzima que consiste en uno de los polipéptidos en los medios de reacción se lleva a cabo utilizando un método conocido.

Por ejemplo, en el caso de que el enzima se inmovilice en un portador, el portador no se encuentra limitado con la condición de que pueda mostrarse la actividad deseada del enzima. Entre los ejemplos del portador se incluyen un portador que presenta un grupo funcional unible al enzima mediante enlace covalente, tal como grupos amino, grupos carboxilo o grupos hidroxilo, y un portador conectable con el enzima que consiste en el polipéptido mediante un conector. La forma del portador no se encuentra limitada. El portador, grupo funcional y conector, etc. se seleccionan apropiadamente según la técnica conocida adoptada para inmovilizar un enzima en el portador. La inmovilización del enzima que consiste en el polipéptido en el portador se lleva a cabo también utilizando un método conocido.

Medios de suministro

Los medios de suministro proporcionados en el primer dispositivo de producción de la presente exposición no se

encuentran limitados con la condición de que sean capaces de conectar una pluralidad de diferentes recipientes de reacción utilizados en el primer dispositivo de producción de la presente exposición y capaces de producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol en el primer dispositivo de producción de la presente invención. Los medios de suministro se realizan mediante medios apropiados según una tecnología conocida adecuada.

Polipéptidos E1 a E3

Los polipéptidos E1 a E3 utilizados en el primer dispositivo de producción de la presente exposición son los mismos que los indicados anteriormente.

Producción de dihidrodaidzeína en el primer recipiente de reacción

El primer recipiente de reacción causa que un enzima que consiste en el polipéptido E1 inmovilizado en los medios de reacción 1 actúe sobre la daidzeína en presencia de NADPH y/o NADH, convirtiendo de esta manera la daidzeína en dihidrodaidzeína. El enzima que consiste en polipéptido E1 puede inmovilizarse en los medios de reacción conjuntamente con NADPH y/o NADH que sirve como coenzima del enzima que consiste en polipéptido E1. La reacción en el primer recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "Primera etapa".

Producción de tetrahidrodaidzeína en el segundo recipiente de reacción

El segundo recipiente de reacción causa que un enzima que consiste en polipéptido E2 inmovilizado en los medios de reacción 2 actúe sobre la dihidrodaidzeína en presencia de NADPH y/o NADH, convirtiendo de esta manera la dihidrodaidzeína en tetrahidrodaidzeína. El enzima que consiste en polipéptido E2 puede inmovilizarse en los medios de reacción conjuntamente con NADPH y/o NADH que sirva como coenzima del enzima que consiste en polipéptido E2. La reacción en el segundo recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "segunda etapa".

Producción de ecuol en el tercer recipiente de reacción

El tercer recipiente de reacción causa que un enzima que consiste en polipéptido E3 inmovilizado en los medios de reacción 3 actúe sobre la tetrahidrodaidzeína, convirtiendo de esta manera la tetrahidrodaidzeína en ecuol. La reacción en el tercer recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "tercera etapa".

D-II-2. Un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos uno de entre el cuarto a sexto recipientes de reacción

La presente exposición proporciona un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos uno de entre el cuarto a sexto recipientes de reacción siguientes (en adelante este dispositivo es denominado ocasionalmente "segundo dispositivo de producción").

Cuarto recipiente de reacción

El cuarto recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante ocasionalmente denominados "medios de reacción 4") en los que se inmoviliza una célula recombinante que consiste en uno de los polinucleótidos (Ad) a (Af) (polinucleótidos E1). Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína utilizando el polinucleótido. En este recipiente de reacción se disponen medios de reacción en una posición que permite el contacto con la daidzeína.

Quinto recipiente de reacción

El quinto recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante denominados ocasionalmente "medios de reacción 5") en los que se inmoviliza una célula recombinante que consiste en uno de los polinucleótidos (Bd) a (Bf) (polinucleótidos E2). Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína utilizando el polinucleótido. En el recipiente de reacción, los medios de reacción se disponen en una posición que permite el contacto con la dihidrodaidzeína.

Sexto recipiente de reacción

El sexto recipiente de reacción es un recipiente de reacción que presenta medios de reacción (en adelante denominados ocasionalmente "medios de reacción 6") en los que se inmoviliza una célula recombinante que consiste en uno de los polipéptidos (Cd) a (Cf) (polinucleótidos E3). Este recipiente de reacción se utiliza para la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína utilizando el polinucleótido. En el recipiente de reacción, los medios de reacción se disponen en una posición que permite el contacto con la tetrahidrodaidzeína.

El segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol mediante la combinación apropiada del cuarto a sexto recipientes de reacción.

El segundo dispositivo de producción de la presente exposición presenta por lo menos uno de entre el cuarto, quinto y sexto recipientes de reacción.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente el cuarto recipiente de reacción y no presente el quinto y sexto recipientes de reacción, el segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente el quinto recipiente de reacción y no presente el cuarto y sexto recipientes de reacción, el segundo dispositivo de producción de al presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente el sexto recipiente de reacción y no presente cuarto y quinto recipientes de reacción, el segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente cuarto y quinto recipientes de reacción y no presente sexto recipiente de reacción, el segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína y de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente quinto y sexto recipientes de reacción y no presente cuarto recipiente de reacción, el segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente cuarto, quinto y sexto recipientes de reacción, el segundo dispositivo de producción de la presente exposición permite la producción de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína, de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína y de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína.

En el segundo dispositivo de producción de la presente exposición, un único recipiente de reacción puede presentar dos de los medios de reacción 4 a 6.

Por ejemplo, en el caso de que los medios de reacción 4 y 5 se proporcionan en un único recipiente de reacción, las reacciones respectivas llevadas a cabo en el cuarto y quinto recipientes de reacción pueden llevarse a cabo en un recipiente de reacción. Además, por ejemplo, en el caso de que los medios de reacción 4 a 6 se proporcionen en un único recipiente de reacción, las reacciones respectivas llevadas a cabo en el cuarto a sexto recipientes de reacción pueden llevarse a cabo en un recipiente de reacción.

En la medida en que se garantiza el efecto deseado, la manera de incorporar dichos medios de reacción al recipiente de reacción no se encuentra limitada.

Además, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente por lo menos dos de los medios de reacción 4 a 6 y una pluralidad de diferentes recipientes de reacción, los recipientes de reacción se conectan mediante medios de suministro.

Por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición presente cuarto y quinto recipientes de reacción y no presente sexto recipiente de reacción, en el que el cuarto y quinto recipientes de reacción son unidades independientes y el cuarto y quinto recipientes de reacción contienen los medios de reacción 4 y 5, respectivamente, el cuarto y quinto recipientes de reacción se conectan mediante medios de suministro para suministrar un producto de dihidrodaidzeína, producido en el cuarto recipiente de reacción al quinto recipiente de reacción.

Además, por ejemplo, en el caso de que el segundo dispositivo de producción de la presente exposición comprenda los medios de reacción 4 y 5 en un recipiente de reacción y los medios de reacción 6 en otro recipiente de reacción, el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 4 y 5 y el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 6 se conectan mediante medios de suministro para suministrar un producto producido en el recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 4 y 5 al recipiente de reacción que contiene los medios de reacción 6.

El producto puede encontrarse en forma de solución tal como se produce, o puede ser un producto de dihidrodaidzeína, etc. obtenido mediante la purificación preliminar o apropiada de la solución.

Recipiente de reacción

Las formas, tamaños, materiales, etc. del cuarto a sexto recipientes de reacción proporcionados en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición no se encuentran limitados, dado que cada recipiente es capaz de contener medios de reacción y producir apropiadamente dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol.

Medios de reacción

Los medios de reacción 4 a 6 que deben utilizarse en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición no se encuentran limitados con la condición de que cada uno de ellos contenga una célula recombinante inmovilizada respectiva y sea capaz de producir apropiadamente dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol.

La inmovilización de la célula recombinante en los medios de reacción no se encuentra limitada con la condición de que pueda mostrarse la actividad deseada de la célula recombinante y se pueda llevar a cabo mediante un método conocido. La célula recombinante puede incubarse o es incubable en los medios de reacción. Las condiciones de la incubación de las células recombinantes se determinan según las explicaciones anteriormente proporcionadas de la "cuarta etapa", "quinta etapa" y "sexta etapa".

Medios de suministro

Los medios de suministro proporcionados en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición no se encuentran limitados con la condición de que sean capaces de conectar una pluralidad de diferentes recipientes de reacción utilizados en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición y sean capaces de producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición. Los medios de suministro se realizan por medios apropiados según una tecnología conocida adecuada.

Células recombinantes

Las células recombinantes utilizadas en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición son las mismas que las detalladas en las secciones anteriores "Células recombinantes utilizadas en la cuarta etapa", "Células recombinantes utilizadas en la quinta etapa" y "Células recombinantes utilizadas en la sexta etapa".

Polipéptidos E1 a E3

Los polipéptidos E1 a E3 utilizados en el segundo dispositivo de producción de la presente exposición son los mismos que los indicados anteriormente.

Producción de dihidrodaidzeína en el cuarto recipiente de reacción

El cuarto recipiente de reacción convierte la daidzeína en dihidrodaidzeína utilizando una célula recombinante que consiste en polinucleótido E1 inmovilizado en los medios de reacción 4. La reacción en el cuarto recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "Cuarta etapa".

Producción de tetrahidrodaidzeína en el quinto recipiente de reacción

El quinto recipiente de reacción convierte la dihidrodaidzeína en tetrahidrodaidzeína utilizando una célula recombinante que consiste en polinucleótido E2 inmovilizado en los medios de reacción 5. La reacción en el quinto recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "la quinta etapa".

Producción de ecuol en el sexto recipiente de reacción

El sexto recipiente de reacción convierte la tetrahidrodaidzeína en ecuol utilizando una célula recombinante que consiste en polinucleótido E3 inmovilizado en los medios de reacción 6. La reacción en el sexto recipiente de reacción se lleva a cabo según el método detallado en la explicación anteriormente proporcionada de "la sexta etapa".

D-II-e. Dispositivo para producir dhidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos uno de entre el primer a tercer recipientes de reacción y por lo menos uno de entre el cuarto a sexto recipientes de reacción

La presente exposición proporciona un dispositivo para producir dihidrodaidzeína, tetrahidrodaidzeína y/o ecuol, que comprende por lo menos uno de entre el primer a tercer recipientes de reacción y por lo menos uno de entre el cuarto a sexto recipientes de reacción (en adelante dicho dispositivo se denomina ocasionalmente "tercer dispositivo de producción").

Las combinaciones de los recipientes de reacción, medios de reacción en el tercer dispositivo de producción se

llevan a cabo según aquéllas en el primer y segundo dispositivos de producción anteriormente indicados. Los recipientes de reacción, medios de reacción, polinucleótidos, células recombinantes y procedimientos de reacción en los recipientes de reacción en el tercer dispositivo de producción son los mismos que aquellos para el primer y segundo dispositivos de producción.

Ejemplos

Ejemplo A

Ejemplo de referencia A1

Se inoculó una cepa 20-92 de *Lactococcus* (nº FERM BP-10036) en un medio líquido de amplificación que contenía dihidrodaidzeína (un medio caldo GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) al que se añadió daidzeína en una cantidad de 10 µg/ml), y el cultivo se incubó a 37ºC durante el tiempo apropiado, de entre 7 y 18 horas, bajo condiciones anaeróbicas (BBL Gas Pack Systems). Tras la incubación, se recogieron las células mediante centrifugación y se conservaron criogénicamente en los Ejemplos, a continuación.

Ejemplo A1: confirmación de la actividad de biosíntesis de dihidrodaidzeína en el sobrenadante centrifugado de material de células lisadas y confirmación de la dependencia de NADPH

Las células congeladas (2x botellas de 67 ml) se descongelaron y se centrifugaron a 4ºC a 8.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se utilizó en el ensayo indicado posteriormente. En primer lugar, el sedimento se suspendió en 2 ml de una solución 0,1 M de fosfato potásico que contenía PMSF 1 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), DTT 2 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e hidrosulfito sódico 5 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La suspensión se suministró a dos tubos de 2 ml con tapas enroscables (Assist) y se presuplementaron con perlas de zirconio/sílice 0,1 mM (BioSpec Products, Inc.). Las células se lisaron utilizando FastPrep® FP100A (Thermo ELECTRON CORPORATION) (6.500 rpm, 10 segundos, enfriamiento en hielo x8). El líquido resultante se centrifugó con el fin de obtener un sobrenadante. La suspensión de células lisadas se centrifugó a aproximadamente 10.000 rpm a 4ºC durante 10 minutos con el fin de obtener un sobrenadante, que seguidamente se diluyó a 4,5 ml con solución 0,1 M de fosfato potásico que contenía PMSF 1 mM, DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. Éste se utilizó como fuente de enzima.

Se preparó una mezcla de reacción enzimática de la composición indicada posteriormente y la mezcla se incubó a 37ºC durante 2 horas. Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción enzimática para la extracción. Tras secar, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC. A modo de solución estándar para el análisis de HPLC, se utilizó una solución mixta de daidzeína (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), ecuol (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), dihidrodaidzeína (2 µl/ml, Toronto Research Chemicals Inc.).

Composición de la mezcla de reacción enzimática	
Sobrenadante de células lisadas (fuente de enzima):	250 µl
Agua esterilizada, NADH (100 mM) o NADPH (100 mM):	5 µl
Tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7/DTT 1 mM/hidrosulfito sódico 5 mM	735 µl
Total:	1.000 µl

Se muestran los resultados en la figura 1. Los resultados confirmaron la presencia de actividad de biosíntesis de dihidrodaidzeína en el sobrenadante centrifugado del material celular lisado. También se confirmó que la conversión de daidzeína en dihidrodaidzeína dependía del coenzima NADH.

Ejemplo A2: purificación del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína

Se incubaron células de la cepa 20-92 de *Lactococcus* durante 18 horas en un medio caldo GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.), 67 ml por cada botella de incubación. Las células en cultivo procedentes de nueve de dichas botellas se centrifugaron y se suspendieron en un tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7) que contenía DTT 2 mM (1,4-ditiotreitol, Merck), hidrosulfito sódico 5 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e inhibidor de proteasa (cóctel completo de inhibidores de proteasa sin EDTA, Roche Diagnostics). La suspensión se introdujo en tres tubos de 2 ml con tapas enroscables (Assist) cada una de las cuales contenía previamente perlas de zirconio/sílice 0,1 mM (BioSpec Products, Inc.). Las células se lisaron utilizando FastPrep® FP100A (Thermo ELECTRON CORPORATION) (6.500 rpm, 20 segundos x 4). El líquido resultante se centrifugó con el fin de obtener un sobrenadante. Se incubaron células de la cepa 20-92 de *Lactococcus* durante 18 horas en el mismo medio líquido, 200 ml en cada botella de incubación. Las células en cultivo procedentes de ocho de dichas botellas se centrifugaron con el fin de obtener sobrenadante equivalente a ocho botellas.

La purificación se llevó a cabo utilizando un tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) (en adelante "tampón A") que contenía PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma Aldrich), DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. El sobrenadante de las células lisadas se mezcló con tampón A que contenía la misma cantidad de sulfato amónico 2

M y se introdujo en columnas de centrífuga Micro Bio-Spin (x11, BioRad Laboratories, Inc.) con butil-sefarosa 4 Fast Flow (aproximadamente 0,3 ml de gel en cada botella, GE Healthcare) y se equilibraron con tampón A que contenía sulfato amónico 1 M. Tras lavar con tampón A que contenía sulfato amónico 1 M. seguido del enjuague dos veces con 075 ml de tampón A que contenía sulfato amónico 0,5 M, 0,75 ml y después se añadieron 0,5 ml de tampón A para eluir la fracción que presentaba una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína. A continuación, el eluido obtenido mediante adición de 075 ml de tampón A se denomina eluido I y el eluido obtenido mediante la adición de 0,5 ml de tampón A se denomina eluido II.

Se añadieron 0,3 ml y 0,2 ml de tampón A que contenía sulfato amónico 3,4 M al eluido I (con 0,75 ml de tampón A) y al eluido II (con 0,5 ml de tampón A), respectivamente. A continuación, se mezclaron los dos eluidos para someterlos a HPLC utilizando la columna TSKgel Ether-5PW (TOSOH) equilibrada con un eluyente que contenía sulfato amónico 1 M. Se vertieron 0,5 ml de la solución mezclada en la columna 2 a 9 veces, seguido del lavado a un caudal de 0,1 ml/minuto utilizando un eluyente que contenía sulfato amónico 1 M (eluyente B). A continuación, se modificó la proporción de mezcla de eluyente B a eluyente A utilizando un programa de manera que la concentración de sulfato amónico cayese linealmente a 0 M (eluyente A) en 15 minutos. Se observó la actividad enzimática en la posición de elución de entre aproximadamente 0,6 M y 0,35 M de sulfato amónico y el eluido total fue de aproximadamente 3,5 ml. A continuación se indican las condiciones de la HPLC. Se observó absorción de las proteínas en 280 nm.

Columna: TSKgel Ether-5PW
Caudal: 0,05 a 0,1 ml/minuto suministro de muestra; 0,1 ml/minuto durante la elución
Eluyente A: tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0)/DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 2,5 mM/2-propanol al 1%
Eluyente B: eluyente A que contiene sulfato amónico 1 M

El eluido en la posición de elución en la que se observó la actividad enzimática se diluyó con tampón A y el líquido diluido se sometió a una columna micro bio-spin llena de 2',5'-ADP-sefarosa-4B (GE Healthcare; aproximadamente 0,3 ml de gel en cada botella) equilibrada con tampón A. Tras el lavado de la columna con tampón A, la fracción que presenta la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína se eluyó con 0,7 ml y después con 0,6 ml de líquido de composición de tampón A pH 7,5 que contenía NADPH 20 mM.

El eluido obtenido se sometió a HPLC utilizando una columna Mono-Q (GE Healthcare) equilibrada con eluyente C (pH 7,5). Se suministró eluyente C a la columna a un caudal=0,1 ml/min. Tras el lavado, la proporción de la mezcla de eluyente C a eluyente D se modificó para llevar a cabo un programa para modificarlo linealmente a NaCl 0,65 M durante 32,5 minutos. A continuación se indican las condiciones de la HPLC. Se observó absorción de las proteínas en 280 nm.

Columna: mono-Q PC 1.6/5
Eluyente C: tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5/DTT 3 mM/hidrosulfito sódico 2,5 mM/2-propanol al 1%
Eluyente D: eluyente C que contenía NaCl 1 M

Se observó la actividad enzimática en la fracción de NaCl 0,4 a 0,46 M (fracciones nº 28 a nº 30).

La figura 2 muestra el resultado de la HPLC Mono-Q y la actividad enzimática. La figura 3 muestra el resultado del SDS-PAGE para las fracciones nº 27 a nº 31. Según estos resultados, se observa una banda de 70 kDa en la fracción que presenta una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína bajo condiciones reductoras.

Ejemplo A3: determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Se añadieron 30 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% a 70 µl de fracción nº 29 que presentaba una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína obtenida mediante HPLC Mono-Q (100 µl en total).

Se humectó una membrana de PVDF de cartucho ProSorb (Applied Biosystems Japan) con 10 µl de metanol y se aplicó el líquido mezclado anteriormente indicado. Tras la absorción del agua con un filtro ProSorb (Applied Biosystems Japan), se secó la membrana y seguidamente se troqueló utilizando un sacabocados para membranas (Applied Biosystems Japan). La membrana se lavó cinco veces con metanol al 20% y se secó. La membrana se sometió a análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal utilizando un secuenciador de proteínas (Applied Biosystems, Procise 494cLC), encontrando de esta manera una secuencia de aminoácidos continua que presentaba los 22 residuos siguientes:

Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly Asn Leu Glu Val Glu Asn (SEC ID nº 19)

Ejemplo A4: determinación de la secuencia de aminoácidos

La proteína enzima que mostraba una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína se fragmentó utilizando un enzima de digestión, formando un péptido. La secuencia de aminoácidos interna se encontró mediante análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal del péptido.

(1) Preparación de muestra

Se incubaron células de la cepa 20-92 de *Lactococcus* durante 18 horas en un medio caldo GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.), 200 ml por cada botella de cultivo. Se centrifugaron tres cepas de las células en cultivo y se suspendieron en un tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) que contenía DTT 2 mM (1,4-ditiotreitol, Merck), hidrosulfito sódico 5 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e inhibidor de proteasa (cóctel completo de inhibidores de proteasa sin EDTA, Roche Diagnostics). A continuación, la suspensión se transfirió a un tubo de 2 ml (Assist) que presentaba una tapa enroscable y que contenía perlas de zirconio/sílice 0,1 mM (BioSpec Products, Inc.). Las células se lisaron utilizando FastPrep® FP100A (Thermo ELECTRON CORPORATION) (6.500 rpm, 20 segundos x4). El líquido resultante se centrifugó, obteniendo un sobrenadante.

En el procedimiento siguiente se utilizó tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7) (en adelante "tampón A") que contenía PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma Aldrich), DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. El sobrenadante de células lisadas se mezcló con tampón A que contenía la cantidad equivalente de sulfato amónico 2 M y se introdujo en columnas micro Bio-spin (x3, Bio-Rad Laboratories, Inc.) llenas de butil-sefarosa 4 Fast Flow (aproximadamente 0,3 ml de gel en cada botella, GE Healthcare), equilibrado con tampón A que contenía sulfato amónico 1 M. Tras lavar con tampón A que contenía sulfato amónico 1 M, seguido de dos enjuagues con 0,75 ml de tampón A que contenía sulfato amónico 0,5 M, se añadieron dos veces 0,75 ml de tampón A para eluir una fracción que presentaba una actividad de síntesis de dihidrodaidzeína.

Una columna micro BioSpin llena de 2',5'-ADP-sefarosa 4B se equilibró con tampón A y después se añadieron 1,5 ml de la solución eluida anteriormente. Tras lavar cinco veces con 0,75 ml de tampón A, se llevó a cabo la elución utilizando 0,75 ml y después con 0,45 ml de tampón A que contenía NADPH 20 mM. Los eluidos se mezclaron y se desalaron y concentraron a 5 µl en un tubo de concentración mediante microcentrífuga (NANOSEP 10K OMEGA, Pall Life Sciences).

La solución concentrada se mezcló con un tampón para muestras de SDS-PAGE doblemente concentrado que contenía 2-mercaptoetanol y la mezcla se calentó durante siete minutos a 90ºC antes de someterlo a SDS-PAGE según el método de Laemmli. Se utilizó SuperSep HG 10-20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como placa de gel de electroforesis. Tras la tinción con azul coloidal (Invitrogen) y el posterior decolorado con agua Milli-Q, se recortó un gel equimolar y de tamaño equivalente de la misma región en una tira en el área no de proteínas de la electroforesis y se procesaron de la misma manera. Se procesó otro grupo de células de la misma manera y las células se transfirieron a una membrana de PVDF tras el SDS-PAGE. A continuación, una banda en la misma posición se sometió a análisis de la secuencia de aminoácido N-terminal para confirmar la consistencia con la secuencia de la fracción nº 29 en la HPLC MonoQ.

(2) Generación de carboxamida-metilo reducida y digestión enzimática

Los geles recortados se cortaron en trozos, se decoloraron con una solución acuosa de acetonitrilo al 50%, se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron con un espesador centrífugo (SpeedVac A160, Savant). Tras la adición de solución acuosa de hidrogenocarbonato amónico 100 mM que contenía DTT 55 mM, se llevó a cabo la reducción durante una hora a 56ºC. Tras eliminar la solución de DTT, se añadió una solución acuosa de hidrogenocarbonato amónico 100 mM que contenía yodoacetamida 100 mM y la mezcla bloqueada lumínicamente se agitó suavemente durante 30 minutos con el fin de generar carboxamida-metilo. Tras eliminar el reactivo de reacción, el gel se lavó secuencialmente con una solución acuosa de acetonitrilo al 50%, acetonitrilo, una solución acuosa de hidrogenocarbonato amónico 100 mM y acetonitrilo antes de secar con un espesador centrífugo. Se añadió tampón Tris-HCl 20 mM (pH 9) que contenía 2 µg de proteasa-I de *Achromobacter* (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Tween-20 al 0,02% y la digestión se llevó a cabo a 37ºC durante siete horas. El sobrenadante de la centrifugación se transfirió a otro tubo y el gel se mezcló con acetonitrilo al 60%- solución acuosa de TFA al 0,1% y se calentó a 30ºC durante 20 minutos. La mezcla caliente se agitó con vórtex durante 10 minutos x 3 veces con el fin de obtener fragmentos peptídicos. El sobrenadante se recogió para filtrarlo utilizando Ultrafree-MC (0,22 µm, Amicon), seguido de la concentración mediante centrifugación.

(3) Mapeado de epítopos

Mediante HPLC de fase inversa se aisló el péptido resultante de la digestión enzimática.

Columna: µRPC C2/C18 SC2.1/10 (GE Healthcare Bio Science)
Caudal: 0,1 ml/minuto
Eluyente E: TFA al 0,05%
Eluyente F: acetonitrilo al 90%/TFA al 0,04%

Programa de elución: 0 minutos: 5% de F
3 minutos: 5% de F
43 minutos: 65% de F

48 minutos: 100% de F
68 minutos: 100% de F

Fracción: 30 µl
Detección: 215 nm

Por ejemplo, "0 minutos 5% de B" se refiere al uso de un eluyente que contiene eluyente E y eluyente F en una cantidad de 95% y 5%, respectivamente, en el tiempo 0 en la elución.

(4) Análisis de la secuencia de aminoácidos interna

En comparación con el cromatograma de control, se seleccionó un pico de péptido derivado de proteína enzima que mostraba actividad de síntesis de dihidrodaidzeína y se llevó a cabo el análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal utilizando un secuenciador de proteínas (Applied Biosystems, Procise 492HT). Tras el inicio de la separación utilizando HPLC de fase inversa se inició la elución a los 20,6 minutos. A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos (péptido 1, en adelante) del pico de la elución.

Phe Asp Glu Pro Val Tyr Pro Gln Ala Glu (SEC ID nº 20)

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos (péptido 2 en adelante) del pico de la elución iniciada a los 22,1 minutos.

Ala Ser Arg Met Val Met Asp Ala Val His Glu Gly Tyr Ile Ala Gly (SEC ID nº 21)

El pico de la elución iniciada a los 26,6 minutos era un péptido que había sido cortado no específicamente; sin embargo, tal como se muestra posteriormente, su extremo N-terminal presentaba glicina que era el residuo nº 13 desde el extremo N-terminal de dicha proteína enzima (la secuencia de aminoácidos siguiente se denomina péptido 3 en adelante).

Gly Tyr Ile Gly Asn Leu Glu Val Glu Asn Arg Ala Ile Arg Met Pro Met (SEC ID nº 22)

La figura 4 muestra el resultado del mapeado de péptidos en el Ejemplo A4 y la secuencia de aminoácidos correspondiente a los picos respectivos.

Pico 1 (20,6 minutos)
Pico 2 (22,1 minutos)
Pico 3 (26,6 minutos)

Ejemplo A5: amplificación del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína a partir de las secuencias N-terminal y parciales del polipéptido purificado

Basándose en las secuencias de aminoácidos N-terminal y parciales obtenidas en los Ejemplos A3 y A4 se diseñó y creó un cebador degenerado. Mediante la utilización del ADN genómico de *Lactococcus* cepa 20-92 como molde, se llevó a cabo la amplificación del gen codificante del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante PCR degenerada.

(1) Purificación de ADN genómico de *Lactococcus* cepa 20-92

La cepa 20-92 de *Lactococcus* incubada en 40 ml de un medio de cultivo de caldo GAM modificado (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.) bajo condiciones anaeróbicas se centrifugó durante 10 minutos a 5.000 rpm, a 4ºC. Se eliminó el medio de cultivo mediante decantación y se recogieron las células bacterianas. Las células se suspendieron inmediatamente en 11 ml de solución B1 (que contenía 200 µg/ml de ARNasa) en el kit de tampones de ADN genómico QIAGEN (Qiagen) y se incubaron durante 16 horas a 37ºC tras mezclarlas con 300 µl de solución de lisozima (100 mg/ml) y 500 µl de solución de proteasa-K QIAGEN (Qiagen). A continuación, tras mezclar con 4 ml de solución B2 y varias veces de mezcla por inversión, se llevó a cabo una incubación de tres horas a 50ºC.

El cultivo se centrifugó durante diez minutos a 5.000 rpm, a 4ºC. Se vertió el sobrenadante en una columna Genomic-tip 500/G QIAGEN (Qiagen) equilibrada con una solución de QBT de manera que el ADN genómico se adhiriese a la columna. Tras el lavado de la columna dos veces con 30 ml de una solución QC, el ADN genómico se eluyó de la columna utilizando 15 ml de QF; a continuación se añadieron 10,5 ml de isopropanol para precipitar el ADN. El ADN genómico de apariencia filamentosa que había precipitado se introdujo en un microtubo de 1,5 ml, se lavó con etanol al 75% y se secó al aire, antes de disolverlo en 250 µl de una solución de TE (0,4 µg/µl). Se estimó la concentración de la solución de ADN genómico obtenida de esta manera y a continuación se ajustó la concentración de la solución a 40 ng/µl mediante la adición de una solución de TE. Se utilizó esta solución de ADN como molde de PCR.

(2) Diseño y producción de cebador degenerado

En el diseño de cebadores degenerados para reducir el número de degeneraciones, se utilizó el codón más frecuente de cada aminoácido para la secuencia en el extremo 5' según la información de uso de codones (base de datos de uso de codones http://www.kazusa.or.jp/codon/) de *Lactococcus garvieae*. Además, se utilizó una base mezclada para la secuencia del extremo 3' para evitar no correspondencias con el gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína.

Se diseñó y creó el cebador degenerado siguiente basándose en la secuencia N-terminal:

MKNKFYPKTFERGYIGNLEVEN determinada en el Ejemplo A3, para ser utilizada en la PCR degenerada.

E1-extremo N-terminal-31: TGAAGAATAANTTNTAYCCNAARACNTTYGA (SEC ID nº 23)

(en la SEC ID nº 23, "N" en las posiciones 11º y 14º representa inosina, y "N" en las posiciones 20º y 26º representa adenina, guanina, citosina o timina)

E1-extremo N-terminal-37: TGAAGAATAANTTNTAYCCNAARACNTTYGARRGNGG (SEC ID nº 24)

(en la SEC ID nº 24, "N" en las posiciones 11º, 14º, 20º y 26º representa inosina, y "N" en la posición 35º representa adenina, guanina, citosina o timina)

E1-extremo N-terminal-F32: ATGAAGAATAAGTTTTAYCCNAARACNTTYGA (SEC ID nº 25)

(en la SEC ID nº 25, "N" en las posiciones 21º y 27º representa adenina, guanina, citosina o timina)

Además, se diseñó y creó el cebador degenerado siguiente basándose en el péptido 2 de secuencia interna: ASRMVMDAVHEGYIAG determinado en el Ejemplo A4, para ser utilizado en la PCR degenerada.

E1-interno-RP1: CCTGCAATATAACCTTCATGTACNGCRTCCATNACCAT (SEC ID nº 26)

(en la SEC ID nº 26, "N" en las posiciones 24º y 33º representa adenina, guanina, citosina o timina)

Todos los oligos de ADN utilizados como cebadores del presente Ejemplo fueron producidos por Sigma-Aldrich Japan K.K.

(3) Amplificación del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante PCR degenerada

Mediante la utilización del cebador degenerado producido, se llevó a cabo la amplificación del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína mediante PCR degenerada.

A continuación se proporcionan las combinaciones de cebadores degenerados utilizados en la PCR degenerada:

(i) E1-extremo N-terminal-31 y E1-interno-RP1
(ii) E1-extermo N-terminal-37 y E1-interno-RP1
(iii) E1-extremo N-terminal-F32 y E1-interno-RP1

En la amplificación del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante PCR degenerada, se utilizó la ADN polimerasa Ex-Taq (Takara Bio Inc.). El programa de amplificación era: 95ºC, 2 minutos (95ºC, 45 s; 38ºC a 54ºC, 30 s; 72ºC, 2 minutos) x 50 ciclos, y 72ºC, 3 minutos. Considerando la no correspondencia con el ADN genómico del cebador degenerado, se llevó a cabo la hibridación en 5 etapas, partiendo de 38ºC, con un incremento de temperatura de 4ºC antes de cada etapa adicional hasta alcanzar 54ºC. Tras la reacción de PCR, se añadió 1/10 de 10xColorante al producto de PCR. Se sometieron a electroforesis 6 µl del producto utilizando gel de agarosa al 0,8%. En la electroforesis en agarosa del presente Ejemplo, se llevó a cabo la tinción con bromuro de etidio y se utilizaron λ/StyI (Nippongene Co. Ltd.) y una escalera de 100 pb (Toyobo Co. Ltd.) como marcadores de peso molecular.

La figura 5 muestra el resultado de la electroforesis del producto de la PCR degenerada. Para la combinación (E1-extremo terminal-F32 y E1-interno-RP1) del cebador degenerado (iii) en (3) del presente Ejemplo, se observó la amplificación de 1,9 kb en el fragmento de ADN a cualquiera de las temperaturas de hibridación. El incremento más significativo se observó a una temperatura de hibridación de 54ºC.

(4) Determinación de la secuencia de bases del fragmento de ADN amplificado

El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 1,9 kb (temperatura de hibridación=54ºC) se recortó del gel de agarosa y se purificó utilizando un kit de extracción de gel (Qiagen). El fragmento de ADN purificado se insertó en

un vector de clonación pT7-Blue (Novagen) para determinar la secuencia de bases.

La secuencia de bases de ADN obtenida se sometió a ensayo utilizando el software de ensamblaje de secuencias de ADN SEQUENCHER (Gene Codes Inc., USA), resultando que el fragmento de ADN contenía las secuencias de bases correspondientes a las secuencias de aminoácidos de los péptidos 1 y 3 encontrados en el Ejemplo A4.

Ejemplo A6: determinación de la secuencia de bases completa del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína

Con el fin de determinar las secuencias de los extremo 5' y 3' del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína de 1,9 kb obtenido en el Ejemplo A5, para determinar las secuencias de bases completas, se llevó a cabo la amplificación rápida de la secuencia terminal del ADNc (5'-RACE, 3'-RACE) utilizando la biblioteca de ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus* como molde.

(1) Producción de la biblioteca de ADN genómico

El ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus* purificado en el Ejemplo A5 se fragmentó mediante digestión durante 16 horas a 37ºC utilizando endonucleasas de restricción (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SalI, Sau3AI, XhoI, productos de Takara Bio Inc.). Tras el procesamiento con fenol/cloroformo, el fragmento se purificó mediante sedimentación con etanol. Los fragmentos del ADN genómico purificados se ligaron con vectores de clonación pUC19, que previamente habían sido cortados con la endonucleasa de restricción correspondiente y se desfosforilaron con fosfatasa alcalina de gamba (Takara Bio Inc.) utilizando un kit de ligación TaKaRa var. 2.1 (Takara Bio Inc.), produciendo de esta manera una biblioteca de ADN genómico.

(2) Amplificación rápida de la secuencia terminal de ADNc (5'-RACE, 3'-RACE)

La biblioteca de ADN genómico (líquido de reacción de ligación) se diluyó 20 veces con agua esterilizada. Se llevó a cabo la amplificación de las secuencias del extremo 5' y del extremo 3' del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante amplificación rápida de la secuencia terminal de ADNc (5'-RACE, 3'-RACE) utilizando 1 µl de molde.

(2-1) Cebador

Las siguientes son combinaciones de cebadores utilizadas para la 5'-RACE y 3'-RACE, respectivamente.

(2-1-1) 5'-RACE

Primera PCR: E1-RACE-N-P1 y pUC19-FP-1, E1-RACE-N-P1 y pUC19-RP-1
PCR anidada: E1-RACE-N-P2 y pUC19-FP-2, E1-RACE-N-P2 y pUC19-RP-2

(2-1-2) 3'-RACE

Primera PCR: E1-RACE-RP2-1 y pUC19-FP-1, E1-RACE-RP2-1 y pUC19-RP-1
PCR anidada: E1-RACE-RP2-2 y pUC19-FP-2, E1-RACE-RP2-2 y pUC19-RP-2

(2-1-3) Secuencia del cebador utilizado

Las siguientes son las secuencias de los cebadores utilizados para la 5'-RACE y 3'-RACE, respectivamente.

Cebadores para el vector:

pUC19-FP-1: ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG (SEC ID nº 27)
pUC19-RP-1: AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGC (SEC ID nº 28)
pUC19-FP-2: ATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGG (SEC ID nº 29)
pUC19-RP-2: CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG (SEC ID nº 30)

Cebadores para el gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína

E1-RACE-N-P1: ATGCGGATCGCTCGGTTCTCGACCTCTAGGTTAC (SEC ID nº 31)
E1-RACE-RP2-1: ATCGAGGAGAAGTGCGAGGACGTCAGGGTCATC (SEC ID nº 32)
E1-RACE-N-P2: TTCTCGACCTCTAGGTTACCGATGTAGCCGC (SEC ID nº 33)
E1-RACE-RP2-2: ACGTCAGGGTCATCGGCATCGGCGACTGCAAG (SEC ID nº 34)

La totalidad de los oligos de ADN utilizados como cebadores en el presente Ejemplo fueron producidos por Sigma-Aldrich Japan K.K.

(2-2) Amplificación de las secuencias del extremo 5' y del extremo 3' del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína utilizando 5'-RACE y 3'-RACE.

Se utilizó ADN polimerasa Ex-Taq (Takara Bio Inc.) para la 5'-RACE y 3'-RACE. Se llevaron a cabo una primera PCR y PCR anidada utilizando el mismo programa de amplificación: 95ºC 2 minutos (95ºC, 45 s; 60ºC, 30 s; 72ºC, 1 minuto) x30 ciclos, 72ºC, 3 minutos. En la primera PCR, se utilizó como molde 1 µl (40 ng) del líquido de dilución de ADN genómico preparado de la manera anteriormente indicada. En la PCR anidada, se utilizaron 0,5 µl del producto de la primera PCR.

Tras la reacción de PCR anidada, 1/10 de 10xdía se añadió al producto de PCR y 5 µl de la mezcla se sometieron a electroforesis con gel de agarosa al 0,8%. La amplificación observada del fragmento observado fue de aproximadamente 1,2 kb (SacI) y de aproximadamente 1,0 kb (Sau3AI) en la 5'-RACE, y de aproximadamente 0,6 kb (SacI) y 0,3 kb (KpnI) en la 3'-RACE.

En la electroforesis en agarosa del presente Ejemplo la tinción se llevó a cabo con bromuro de etidio (Nippongene Co. Ltd.) y se utilizaron λ/StyI (Nippongene Co. Ltd.) y una escalera de 100 pb (Toyobo Co. Ltd.) como marcadores del peso molecular.

Los fragmentos de ADN amplificados se recortaron del gel de agarosa y se purificaron utilizando un kit de extracción de gel (Qiagen). Las secuencias de bases de los fragmentos de ADN purificados se determinaron mediante secuenciación directa utilizando los cebadores utilizados para la amplificación, con el resultado de que observó la secuencia del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína en los fragmentos de ADN de aproximadamente 1,2 kb (SacI) y de aproximadamente 1,0 kb (Sau3AI) en la 5'-RACE y en los de 0,6 kb (SacI) en la 3'-RACE.

(3) Determinación de la secuencia de bases completa del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína

La secuencia de bases de ADN obtenida mediante PCR degenerativa en el Ejemplo A5 y la amplificación rápida de la secuencia terminal de ADNc en (2) del presente Ejemplo se sometieron a ensayo de ensamblaje utilizando el software de ensamblaje de secuencias de ADN SEQUENCHER (Gene Codes Inc., USA). Como resultado, se encontró la estructura genómica de 3.548 pb en la región del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína. Esto reveló que el gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína era un polipéptido que consistía de 1.935 nucleótidos y 644 aminoácidos.

Se cotejaron las secuencias de aminoácidos completas encontradas con las secuencias de bases y las secuencias de aminoácidos parciales encontradas con la secuencia de aminoácidos, con el resultado de que la totalidad de las secuencias de aminoácidos parciales encontradas con la secuencia de aminoácidos se correspondían con las secuencias de aminoácidos completas encontradas con las secuencias de bases.

(4) Confirmación de la secuencia de bases en la región de recubrimiento

En la secuencia obtenida en (3) del presente Ejemplo, se observaron muchas porciones con clones que presentaban bases inconsistentes causadas por un error de incorporación de las bases por parte de la ADN polimerasa durante la amplificación por PCR. Por lo tanto, utilizando el ADNc de primera cadena como molde, se amplificó la región (2.368 pb) que contenía la región codificante del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína mediante PCR utilizando el enzima de clonación por PCR de alta fidelidad Easy-A® (Stratagene), es decir la ADN polimerasa de alta fidelidad.

A continuación se proporcionan los cebadores de amplificación utilizados anteriormente:

E1-conf-NP: TGCCGGTGCAATGGCTGACATCATGTTCAACCTG (SEC ID nº 35)
E1-conf-CP: TCCTCCATCGTTCCTCCAATCAGTAAGACACGCG (SEC ID nº 36)

El fragmento de ADN obtenido se purificó utilizando un kit de extracción de gel (Qiagen) y la confirmación y la determinación final de la secuencia se llevaron a cabo utilizando secuenciación directa.

Ejemplo A7: inducción de la expresión de gen de enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante la adición de daidzeína a la solución de cultivo de amplificación

Tal como se muestra en el Ejemplo A1, en el caso de que se añade daidzeína, es decir un sustrato, a la solución de cultivo de amplificación de *Lactococcus* cepa 20-92, las células en cultivo muestran actividad de síntesis de dihidrodaidzeína. Esto conduce a la premisa de que la adición de daidzeína a la solución de cultivo de amplificación induce la transcripción del gen del enzima de síntesis de la dihidrodaidzeína, e induce además la traducción en proteína. Se llevó a cabo el ensayo siguiente basándose en esta premisa. Se incubaron dos muestras de ADNc derivado de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, en un medio de cultivo que contenía daidzeína y en un medio de cultivo sin daidzeína; se sometieron a RT-PCR con el fin de determinar si la expresión del gen de enzima de síntesis de dihidrodaidzeína resultaba inducido por la adición de daidzeína a la solución de cultivo de amplificación.

(1) Extracción del ADN completo de *Lactococcus* cepa 20-92 y purificación del ADN

La extracción del ADN completo de *Lactococcus* cepa 20-92 y la purificación se llevaron a cabo de la manera siguiente.

Se incubó cepa 20-92 de *Lactococcus* sellada a 4ºC , durante ocho horas en un cultivo en medio caldo GAM modificado que contenía 10 mg/l de daidzeína (Funakoshi Co., Ltd.) o sin daidzeína, a 37ºC bajo condiciones anaeróbicas. Se transfirieron 25 ml de la solución de cultivo a un tubo de 50 ml y se centrifugaron durante diez minutos a 3.500 rpm, a 4ºC. Se eliminó el medio de cultivo mediante decantación y se recolectaron las células. Las células recolectadas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido. A continuación, se extrajo el ARN completo y se purificó utilizando 1 ml de solución TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones. El ARN completo purificado se procesó con ADNasa I (Invitrogen) para eliminar el ADN genómico y se utilizó para la síntesis de ADNc de primera cadena.

(2) Síntesis de ADNc de primera cadena a partir de ARN completo

A partir de 2 µg del ARN completo procesado de esta manera mediante la ADNasa I, se sintetizó el ADNc de primera cadena (transcripción inversa) utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript® para RT-PCR (Invitrogen). La síntesis del ADNc de primera cadena se llevó a cabo utilizando la mezcla de hexámeros aleatorios como cebador de extensión siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, con el fin de confirmar que el ARN completo procesado por la ADNasa I utilizado para la síntesis del ADNc de primera cadena no contenía ADN genómico, se llevó a cabo otra reacción simultáneamente sin transcripción inversa. El líquido de reacción final se utilizó como molde para la RT-CPR.

A continuación se proporcionan los cuatro tipos de líquidos de reacción final preparados de esta manera:

1. Producto de transcripción inversa del ARN completo derivado de células bacterianas incubadas en un medio que contiene daidzeína (DZN(+)RT(+)).

2. Producto de transcripción inversa del ARN completo derivado de células bacterianas incubadas en un medio sin daidzeína (DZN(-)RT(+)).

3. Producto no de transcripción inversa del ARN completo derivado de células bacterianas incubadas en un medio que contiene daidzeína (DZN(+)RT(-)).

4. Producto no de transcripción inversa del ARN completo derivado de células bacterianas incubadas en un medio sin daidzeína (DZN(-)RT(-)).

(3) Confirmación de la expresión del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína utilizando RT-PCR

El gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína se amplificó mediante RT-PCR utilizando los cuatro productos de reacción final detallados en (2) del presente Ejemplo como moldes. Se compararon las cantidades expresadas entre sí. A modo de control se llevó a cabo otra RT-PCR simultáneamente utilizando la secuencia de ARN ribosómico 16S como gen de control.

A continuación se proporcionan las condiciones de amplificación de la RT-PCR y una secuencia de cebador para cada amplificación génica. Se utilizó la ADN polimerasa Ex-Taq (Takara Bio Inc.) para la RT-PCR. El programa de amplificación era: 95ºC, 2 minutos (95ºC, 30 s; 56ºC, 20 s; 72ºC, 30 s) x30 ciclos, 72ºC, 2 minutos. A modo de molde se utilizó 1 µl de cada líquido de reacción final, tal como en (2) del presente Ejemplo.

A continuación se muestra una secuencia de cebador utilizada para la RT-PCR del presente Ejemplo y el tamaño del fragmento de ADN que debe amplificarse.

enzima de síntesis de dihidrodaidzeína: 239 pb

E1-FP: CTACATCGGTAACCTAGAGGTCG (SEC ID nº 37)
E-RP: CCGTGCTGCTTGATGGTCTTTGC (SEC ID nº 38)

secuencia de ARN ribosómico 16S: 326 pb

Gar-16S-Ribo-FP: TGCGTAGATATATGGAGGAAC (SEC ID nº 39)
Gar-16S-Ribo-RP: CTTATCTCTAAGGATAGCACG (SEC ID nº 40)

El cebador utilizado para la amplificación de la secuencia de ARN ribosómico 16S se creó basándose en la secuencia del gen de ARN ribosómico 16S de la cepa FLG12 de *Lactococcus garvieae*, secuencia parcial (nº de acceso AF352163-66) en la base de datos de ADN (GenBank) proporcionada por el National Center of

Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Se añadió 1/10 de 10xdía al producto de PCR y se sometieron 5 µl de la mezcla a electroforesis con gel de agarosa al 1,5%. Se observó la amplificación de cada fragmento de ADN.

En la electroforesis en agarosa en el presente Ejemplo, la tinción se llevó a cabo utilizando bromuro de etidio (Nippongene Co. Ltd.) y se utilizaron λ/StyI (Nippongene Co. Ltd.) y una escalera de 100 pb (Toyobo Co. Ltd.) como marcadores de peso molecular.

La figura 6 muestra los resultados.

Tal como pone de manifiesto el resultado de la amplificación del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína mediante RT-PCR, se observó la expresión eficiente del gen únicamente en el producto de transcripción inversa del ARN completo derivado de células bacterianas incubadas en un medio con daidzeína. Se observó el mismo nivel de expresión en la amplificación de la secuencia de ARN ribosómico 16S utilizada como control, con independencia de la incorporación de daidzeína. Además, debido a que tanto el gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína como la secuencia del ARN ribosómico 16 S no fueron amplificadas en el producto no de transcripción inversa, se confirmó que el ARN completo procesado por la ADNasa I utilizado para la síntesis del ADNc de primera cadena no contenía ADN genómico. Estos resultados demuestran que la adición de daidzeína al medio induce la expresión de ARNm del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína.

Ejemplo A8: expresión de polipéptido E1 recombinante utilizando *Escherichia coli* y confirmación de la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína

Se utilizó el sistema pET, un sistema de expresión de proteínas recombinantes que utiliza *Escherichia coli*, para expresar el polipéptido E1 se confirmó su actividad de síntesis de dihidrodaidzeína.

(1) Preparación del vector de expresión del polipéptido E1

Para preparar un vector de expresión de polipéptido E1 (pET21-E1-His), se amplificó mediante PCR el ADN en la región de marco de lectura abierta del nucleótido E1.

Se prepararon los cebadores de amplificación siguientes, basándose en la secuencia del nucleótido E1 determinada en el Ejemplo A6.

exp.E1 pet F Nde: AGCTCATATGAAGAACAAGTTCTATCCGAA (SEC ID nº 41)
exp.E1 pet His: AATCGAATTCCTACAGGTTGCAGCCAGCGATGT (SEC ID nº 42)

Para la inserción en pET21a (Novagen), se diseñó que los cebadores de amplificación exp.E1 pet F Nde y exp.E1 pet His incluyesen las secuencias de restricción NdeI y EcoRI, respectivamente.

Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 25 µl de una mezcla de reacción que contenía los cebadores, 5 pmoles de cada uno; dNTP, 5 nmoles de cada uno; ADN genómico de cepa 20-92 de *Lactococcus* purificado en el Ejemplo A5, 40 ng; 10x tampón para la ADN polimerasa KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.). Programa de amplificación: 95ºC durante 3 minutos (94ºC durante 30 s, 60ºC durante 30 s, 68ºC durante 2 minutos) x30 ciclos, 68ºC durante 7 minutos. Dispositivo de PCR: sistema GeneAmpPCR 9700 (Applied Biosystems). El análisis de una parte de la mezcla de reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa detectó una banda de un tamaño esperado. Se recogió el producto de PCR completo con un kit de purificación de PCR QIAGEN (Qiagen).

Los fragmentos de ADN recolectados de esta manera se cortaron los enzimas de restricción NdeI y EcoRI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se recortó una parte que contenía la banda diana y se purificó y recogió con un kit de extracción de gel de Qiagen (Qiagen). Tras la recolección, los fragmentos de ADN se ligaron a 16ºC durante la noche con pET21a digerido con NdeI y EcoRI, utilizando un kit de ligación de ADN ver. 2.1 (Takara Bio Inc.). A continuación, la mezcla de reacción ligada se utilizó para transformar *Escherichia coli* cepa JM109 (Takara Bio Inc.).

El transformante se cultivó a 37ºC durante la noche en una placa de agar medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). Las colonias individuales resultantes se cultivaron durante la noche en 3 ml de medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se extrajo el ADN plasmídico utilizando un extractor automático de plásmidos PI-100 (KURABO).

La secuencia de bases del ADN insertado en el plásmido se secuenció mediante el método del pigmento-terminador. Ello confirmó la inserción con éxito del polinucleótido E1, tal como se pretendía. De esta manera se obtuvo pET21-E1-His. En el presente ejemplo, se determinó la secuencia de ADN utilizando el secuenciador de ADN ABI3700 (Applied Biosystems).

(2) Preparación de recombinante y expresión y confirmación del polipéptido E1 recombinante en *Escherichia coli*

Se utilizaron el plásmido pET21-E1-His que expresaba el polipéptido E1 recombinante y el plásmido pET21a (control negativo) para transformar la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen). Para obtener colonias individuales, los transformantes se cultivaron durante la noche a 37ºC en una placa de agar medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml).

Cada transformante de *E. coli* BL21 (DE3) se cultivó durante la noche a 37ºC en 3 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se precultivaron 0,5 ml del cultivo durante 3 horas (hasta que la DO a 630 nm alcanzase aproximadamente 0,4) mediante la adición de 50 ml de medio LB líquido que contenía la misma concentración de ampicilina. Tras ajustar la concentración final a 1 mM mediante la adición de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), el cultivó se incubó adicionalmente a 37ºC durante 4 horas.

Tras la incubación, las células se recolectaron mediante centrifugación (6.000 rpm, 4ºC, 15 minutos) utilizando un Avanti HP25 (Beckman Coulter). Los procedimientos posteriores se llevaron a cabo sobre hielo. Tras eliminar el sobrenadante (el medio), las células se suspendieron en 1 ml de tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0, KPB-PDH) que contenía PMSF 1 mM, DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. A continuación, la suspensión celular se introdujo en un tubo Assist de 2 ml cargado con 0,7 ml de perlas de zirconio-sílice (BioSpec Products, Inc.) y 400 µl de KPB-PDH. Seguidamente las células se lisaron mediante dos ciclos repetidos de 20 segundos a 6.500 rpm y enfriamiento sobre hielo durante 3 minutos, utilizando un FastPrep® (Thermo Electron Corporation). Como resultado se obtuvo una suspensión de células lisadas.

La expresión del polipéptido E1 recombinante en *E. coli* se confirmó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se añadieron 2,5 µl de 5x tampón para muestras (Tris-HCl 125 mM (pH 6,5)/glicerol al 25%/SDS al 5%/2-mercaptoetanol al 5%/BPB al 0,5%) a 10 µl de la suspensión celular lisada. Tras desnaturalizar térmicamente a 98ºC durante 5 minutos, la suspensión se enfrió sobre hielo y 5 µl fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE. SDS-PAGE se llevó a cabo con una placa de gel disponible comercialmente (SuperSep® 5-20%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Quick CBB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para la tinción. Se utilizó una escalera XL preteñida de amplio rango (Apro Science) como marcador de los pesos moleculares.

En la figura 7 se muestran los resultados del SDS-PAGE. Se confirmó un polipéptido E1 recombinante con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa en la suspensión de células lisadas, derivado del transformante pET21-E1-His.

(3) Confirmación de la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína del polipéptido E1 obtenido de recombinantes

La suspensión de células lisadas obtenida en (2) del presente Ejemplo se utilizó como fuente de enzima para medir la actividad de conversión de daidzeína a dihidrodaidzeína. Como resultado, se confirmó la actividad en el polipéptido E1 recombinante expresado.

En el presente ejemplo, se llevó a cabo la medición de la actividad de conversión de daidzeína a dihidrodaidzeína de la manera siguiente.

Se preparó una mezcla de reacción enzimática de la composición indicada posteriormente y la mezcla se incubó a 37ºC durante 2 horas.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Suspensión de células lisadas (fuente de enzima):	100 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Daidzeína (2 mg/ml):	5 µl
KPB-PDH:	855 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción enzimática para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de daidzeína y dihidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática.

En la figura 8 se muestran los resultados del análisis de HPLC. En la suspensión de células lisadas derivada de transformantes de plásmido pET21-E1-His que expresa el polipéptido E1 recombinante, la daidzeína (sustrato) añadida a la mezcla de reacción enzimática se convirtió en dihidrodaidzeína, mientras que no se detectó dihidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática derivada del transformante de pET21a (control negativo).

Estos resultados demuestran que el polipéptido E1 recombinante presenta actividad de síntesis de dihidrodaidzeína a partir de daidzeína.

Ejemplo B

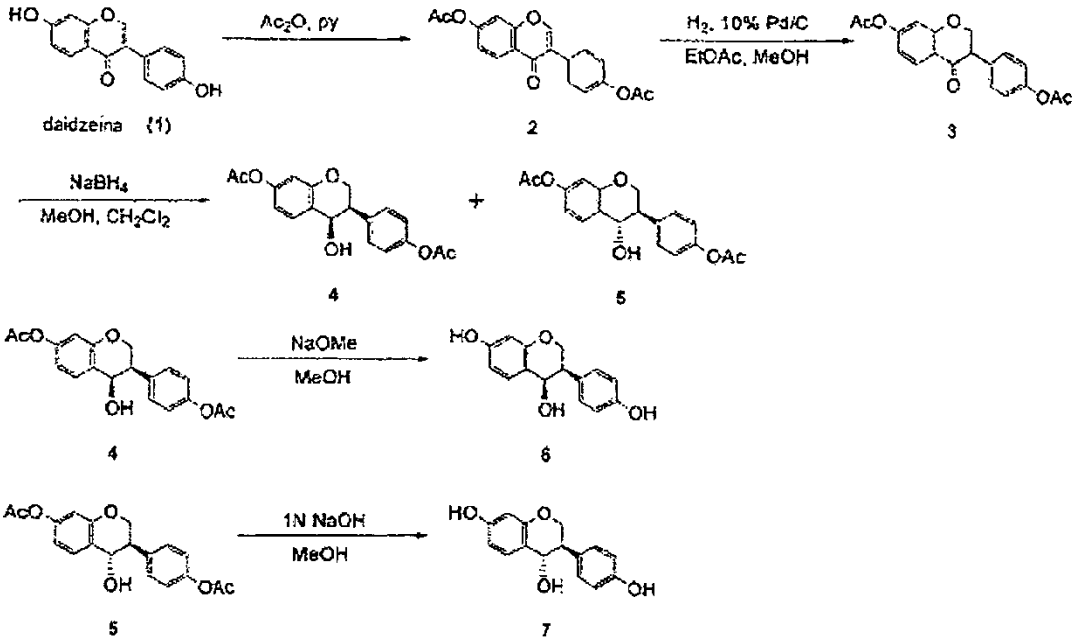
Ejemplo de referencia B1

Síntesis de *cis*-tetrahidrodaidzeína y *trans*-tetrahidrodaidzeína

Se produjeron *cis*-tetrahidrodaidzeína y *trans*-tetrahidrodaidzeína según el flujo de reacción indicado posteriormente. Los compuestos se denominan tal como se indica a continuación:

Compuesto 1 (daidzeína): 4',7-dihidroxi-isoflavona
Compuesto 2: 4',7-diacetoxi-isoflavona
Compuesto 3: 4',7-diacetoxi-isoflaván-4-ona
Compuesto 4: *cis*-4',7-diacetoxi-isoflaván-4-ol
Compuesto 5: *trans*-4',7-diacetoxi-isoflaván-4-ol
Compuesto 6: *cis*-tetrahidrodaidzeína
Compuesto 7: *trans*-tetrahidrodaidzeína

Fórmula 1



Síntesis de compuesto 2

Se añadieron 0,76 ml (8,0 mmoles) de anhídrido acético a una solución de piridina (5 ml) que contenía 500 mg (1,97 mmoles) de daidzeína (compuesto 1) y la mezcla se agitó a 60ºC durante 2 horas. Tras añadir una cantidad minúscula de metanol, la mezcla de reacción se transfirió a ácido clorhídrico 3 N. Tras la dilución con agua, el precipitado sólido resultante se separó mediante filtración y se enjuagó con agua. A continuación, el sólido se secó al aire a temperatura ambiente, obteniendo 609 mg de un compuesto 2 en forma de polvos blancos (1,80 mmoles, rendimiento: 91%).

Compuesto 2: RMN-^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,33 (3H, s), 2,37 (3H, s), 7,13-7,22 (3H, m), 7,32 (1H, d, J=2,3 Hz), 7,54-7,63 (2H, m), 8,01 (1H, s), 8,33 (1H, d, J=8,8 Hz).

Síntesis de compuesto 3

Una suspensión de metanol (6 ml)-acetato de etilo (6 ml) que contenía 400 mg (1,18 mmoles) de compuesto 2 y 150 mg de 10% de paladio-carbono (hidratado, aproximadamente al 50% en peso) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró con Celite y los residuos se lavaron con acetato de etilo. Los residuos obtenidos mediante concentración del filtrado se purificaron mediante cromatografía de columna de gel de sílice (gel de sílice: diclorometano/acetato de etilo=100/0-19/1), obteniendo 312

mg de un compuesto 3 en forma de polvos blancos (0,917 mmoles, rendimiento: 78%).

Compuesto 3: RMN-^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,29 (3H, s), 2,32 (3H, s), 3,93-4,04 (1H, m), 4,60-4,75 (2H, m), 6,76-6,84 (2H, m), 7,04-7,13 (2H, m), 7,27-7,35 (2H, m), 7,93-8,01 (1H, m).

Síntesis de compuesto 4 y de compuesto 5

Se añadieron 11 mg (0,29 mmoles) de borohidruro sódico a una solución de metanol (1 ml)-diclorometano (1 ml) que contenía 100 mg (0,294 mmoles) de compuesto 3 a 0ºC. Tras agitar la mezcla de reacción a 0ºC durante 30 minutos, se añadieron sucesivamente 2 ml de ácido clorhídrico 1 N y 50 ml de agua, seguido de la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con bicarbonato sódico saturado, agua y solución hipersalina saturada, seguido del secado con sulfato sódico anhidro. Se eliminó el solvente mediante destilación y los residuos resultantes se purificaron mediante cromatografía de columna de gel de sílice (gel de sílice: diclorometano/acetato de etilo=19/1-3/1). La mezcla de diastereómeros resultantes se purificó mediante cromatografía de columna de presión media (Yamazen, Ultra Pack SI-40B: n-hexano/acetato de etilo=3/2), obteniendo 44 mg de un compuesto 4 acicular incoloro (0,13 mmoles, rendimiento: 44%) y 26 mg de un compuesto 5 acicular incoloro (75 mmoles, rendimiento: 26%).

Compuesto 4: RMN-^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,80 (1H, d, J=4,0 Hz), 2,30 (3H, s), 2,31 (3H, s), 3,32 (1H, td, J=3,5, 11,5 Hz), 4,32 (1H, ddd, J=1,3, 3,5, 10,5 Hz), 4,59 (1H, dd, J=10,5, 11,5 Hz), 4,76-4,83 (1H, m), 6,64-6,73 (2H, m), 7,06-7,14 (2H, m), 7,27-7,35 (3H, m).

Compuesto 5: RMN-^{1}H (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 2,02 (1H, d, J=5,5 Hz), 2,29 (3H, s), 2,30 (3H, s), 3,11-3,24 (1H, m), 4,26 (1H, dd, J=9,0, 11,3 Hz), 4,37 (1H, dd, J=3,8, 11,3 Hz), 4,92 (1H, dd, J=5,5, 7,8 Hz), 6,62 (1H, d, J=2,3 Hz), 6,72 (1H, dd, J=2,3, 8,5 Hz), 7,04-7,12 (2H, m), 7,21-7,30 (2H, m), 7,47 (1H, d, J=8,5 Hz).

Síntesis de compuesto 6

Se añadieron 55 mg (1,0 mmol) de metóxido sódico a una solución de metanol (4 ml) que contenía 116 mg (0,339 mmoles) de compuesto 4 y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de una resina de intercambio iónico (DOWEX 50X8W, forma amonio). Tras eliminar la resina mediante filtración, el sólido obtenido mediante concentración del filtrado se lavó con metanol, obteniendo 62 mg de un compuesto 6 en forma de polvos blancos (0,24 mmoles, rendimiento: 71%).

Compuesto 6: RMN-^{1}H (250 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 3,03 (1H, td, J=3,3, 12,0 Hz), 4,00-4,15 (1H, m), 4,31-4,51 (2H, m, incluyendo 4,39, dd, J=10,3, 12,0 Hz), 4,96 (1H, d, J=5,8 Hz), 6,18 (1H, d, J=2,3 Hz), 6,32 (1H, dd, J=2,3, 8,3 Hz), 6,69 (2H, d, J=8,5 Hz), 7,00 (1H, d, J=8,3 Hz), 7,09 (2H, d, J=8,5 Hz), 9,19 (1H, br s), 9,31 (1H, br s).

Síntesis de compuesto 7

Se añadieron 0,73 ml (0,73 mmoles) de hidróxido sódico 1 N a una suspensión de metanol (2 ml) que contenía 84 mg (0,25 mmoles) de compuesto 5 y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. A continuación, se añadió cloruro amónico saturado y agua a la mezcla de reacción, seguido de la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó sucesivamente con bicarbonato sódico saturado, agua y solución salina saturada, seguido del secado con sulfato sódico anhidro. Mediante la eliminación por destilación del solvente se obtuvieron 64 mg de un compuesto 7 en forma de polvos blancos (0,25 mmoles, rendimiento cuantitativo).

Compuesto 7: RMN-^{1}H (250 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 2,82-2,96 (1H, m), 4,04-4,22 (2H, m), 4,60 (1H, t, J=7,0 Hz), 5,18 (1H, d, J=7,0 Hz), 6,14 (1H, d, J=2,3 Hz), 6,34 (1H, dd, J=2,3, 8,5 Hz), 6,67 (2H, d, J=8,5 Hz), 7,04 (2H, d, J=8,5 Hz), 7,16 (1H, d, J=8,5 Hz), 9,21 (1H, s), 9,28 (1H, s).

Ejemplo de referencia B2

Se inoculó una cepa 20-92 de *Lactococcus* (nº FERM BP-10036) en un medio líquido de amplificación que contenía daidzeína y el cultivo se incubó a 37ºC durante 7 a 24 horas bajo condiciones anaeróbicas. Tras la incubación, se recolectaron las células y se conservaron criogénicamente para utilizarlas en los Ejemplos, posteriormente.

Ejemplo B1: confirmación de la producción de tetrahidrodaidzeína

Los experimentos siguientes se llevaron a cabo para confirmar que la tetrahidrodaidzeína es el producto intermedio de la biosíntesis de ecuol.

(1) Preparación de material de células lisadas

Las células de la cepa 20-92 de *Lactococcus* conservadas a -80ºC se descongelaron rápidamente. Se suspendieron las células mediante golpes suaves y se centrifugaron a 4ºC (8.000 rpm x 5 minutos) utilizando una centrífuga VC-

960 (Taitec). Tras eliminar el sobrenadante, se añadió tampón de fosfato potásico 0,1 M/PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetanosulfonilo)/DTT 2 mM (ditiotreitol)/hidrosulfito sódico 5 mM (pH 7,0) con el fin de obtener una suspensión celular. La suspensión celular se introdujo en un tubo de 2 ml preparado para incluir perlas de zirconio-sílice (aproximadamente 0,8 ml, 0,1 mm, 1 lb; Wakenyaku Co., Ltd.) y el tubo se cargó con solución de fosfato potásico 0,1 M/PMSF 1 mM/DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM (pH 7,0) hasta llenar el tubo prácticamente por completo. Para el lisado, el tubo se cerró y se mantuvo sobre hielo, en donde se repitió cuatro veces un ciclo de centrifugación a 6.500 rpm x 20 s y enfriamiento sobre hielo, utilizando FastPrep®-FP100A (Thermo Electron Corporation). El material de células lisadas resultantes se utilizó como fuente de enzima en una reacción enzimática.

(2) Reacción enzimática

Se preparó 1 ml de mezcla de reacción enzimática de la composición indicada posteriormente, que contenía 0,1 ml del material de células lisadas obtenido en (1), y la mezcla se incubó a 37ºC durante 2 horas. Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo al producto de reacción enzimática resultante para la extracción. El producto se secó para preparar una muestra para el análisis de HPLC.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Tampón de fosfato potásico 0,1 M/PMSF 1 mM/DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM (pH 7,0)

NADPH 2 mM
NADH 2 mM
10 µg/ml de dihidrodaidzeína o tetrahidrodaidzeína

(3) Producción de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína mediante reacción enzimática

La figura 9 muestra los resultados del análisis de HPLC del producto de reacción enzimática obtenido mediante la utilización de dihidrodaidzeína como sustrato y el material de células lisadas como fuente de enzima. La figura 9 muestra también los resultados del análisis de HPLC de la tetrahidrodaidzeína sintetizada en el Ejemplo de referencia B1. Los resultados demuestran que el producto de reacción enzimática obtenido mediante la utilización de dihidrodaidzeína como sustrato y el material de células lisadas como fuente de enzima incluye un producto intermedio que presenta un tiempo de retención correspondiente al tiempo de retención de la *trans*-tetrahidrodaidzeína, confirmando la producción de *trans*-tetrahidrodaidzeína.

(4) Producción de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína mediante reacción enzimática

La figura 10 muestra los resultados del análisis de HPLC del producto de la reacción enzimática obtenido mediante la utilización de *cis*-tetrahidrodaidzeína o *trans*-tetrahidrodaidzeína como sustrato y el material de células lisadas como fuente de enzima. Tal como se pone de manifiesto en la figura 10, el ecuol se produjo a partir de ambos compuestos, demostrando que la tetrahidrodaidzeína se utiliza como sustrato en la biosíntesis del ecuol tanto en forma *cis* como en forma *trans*.

Ejemplo B2: confirmación de la actividad de biosíntesis de tetrahidrodaidzeína en sobrenadante centrifugado de material de células lisadas y confirmación de la dependencia de NADH o NADHP

Las células congeladas se descongelaron y se centrifugaron a 4ºC durante 15 minutos (5.000 x g). El sedimento se utilizó en el ensayo indicado posteriormente. En primer lugar, el sedimento (peso húmedo: 2,7 g) se suspendió en 10 ml de una solución de fosfato potásico 0,1 M que contenía PMSF 1 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. Tras precalentar a 37ºC durante 5 minutos, se añadió lisozima en una cantidad de 100 mg por cada gramo de sedimento (peso húmedo) para provocar una reacción a 37ºC durante 1,5 horas. A continuación, se añadió una cantidad equivalente de solución de fosfato dipotásico 0,1 M a la mezcla de reacción y ésta se agitó vigorosamente con un mezclador vórtex tras añadir perlas de zirconio-sílice (3 ml). A continuación, las células se lisaron con un sonicador (sonicador Branson Cell Disruptor 200) (3 ciclos de una sonicación de 5 minutos y un periodo de reposo de 2 minutos). La suspensión celular lisada se centrifugó a aproximadamente 10.000 x g durante 15 minutos, obteniendo un sobrenadante, que seguidamente se utilizó como fuente de enzima.

Se preparó una mezcla de reacción enzimática de la composición indicada posteriormente y se incubó a 37ºC durante 2 horas. Tras la incubación, se añadieron 5 ml de acetato de etilo al producto de reacción enzimática para la extracción. Seguidamente, el producto se secó para preparar una muestra para el análisis de HPLC.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Sobrenadante centrifugado de células lisadas (fuente de enzima):	250 µl
NADH (100 mM) o NADPH (100 mM):	20 µl
Dihidrodaidzeína (1 mg/ml):	10 µl

Tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7/DTT 1 mM/hidrosulfito sódico 5 mM	720 µl
Total:	1.000 µl

Se muestran los resultados en la figura 11. Los resultados confirmaron la presencia de actividad de biosíntesis de tetrahidrodaidzeína en el sobrenadante centrifugado del material de células lisadas. También se confirmó que la conversión de dihidrodaidzeína en tetrahidrodaidzeína era dependiente del coenzima NADH y mucho más fuertemente de NADPH.

Ejemplo B3: purificación de tetrahidrodaidzeína

Enzima de síntesis

Se incubaron células de cepa 20-92 de *Lactococcus* durante 20 horas en 67 ml de un medio líquido de amplificación que contenía daidzeína contenido en una botella de incubación. Las células en cultivo de diez de dichas botellas se centrifugaron y se suspendieron en un tampón de fosfato potásico 0,02 M (pH 7, en adelante "tampón A") que contenía PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y DTT 4 mM (ditiotreitol). Las células se lisaron con una prensa francesa (SLM Instruments Inc.) seis veces a 1.800 psi y la suspensión de células lisadas se centrifugó con el fin de obtener un sobrenadante. Separadamente, se incubaron células de la cepa 20-92 de *Lactococcus* durante 18 horas en 200 ml de un medio líquido contenido en una botella de incubación. Las células en cultivo de cinco de dichas botellas se lisaron de manera similar con una prensa francesa y se obtuvo un sobrenadante tras la centrifugación. Estos sobrenadantes, 38 y 47 ml, se mezclaron y 82 ml de la mezcla se alimentaron a sefarosa roja (aproximadamente 7 ml) equilibrada con tampón A. Tras lavar la sefarosa roja con 150 ml de tampón A, la mezcla se eluyó con tampón A que contenía NADPH 10 mM (20 ml/ fracción). Se utilizó cada fracción como fuente de enzima y se midió la actividad de biosíntesis de tetrahidrodaidzeína bajo las mismas condiciones que las de la reacción enzimática del Ejemplo B2 (utilizando NADPH como coenzima). Como resultado se obtuvieron fracciones activas nº 1 a nº 5.

Las fracciones nº 1 a nº 5, con actividad de biosíntesis de tetrahidrodaidzeína, se concentraron mediante ultrafiltración utilizando una ultracentrífuga Amicon UFC801024 (corte de PM: 10.000), obteniendo un concentrado (aproximadamente 2,1 ml). El concentrado se separó en tres porciones y se alimentó a la HPLC utilizando TSKgel Phenyl-5PW (Tosoh) tras mezclar cada porción con una cantidad equivalente de tampón A que contenía sulfato amónico 3 M. Las condiciones de la HPLC fueron las siguientes. Las proteínas se sometieron a ensayo mediante medición de la absorbancia a 280 nm.

Columna: TSKgel Phenyl-5PW
Caudal: 1 ml/min
Fracción: 2 ml/2 minutos/fracción
Eluyente A: tampón de fosfato potásico 0,02 M, pH 7/DTT 1 mM/hidrosulfito sódico 2,5 mM/isoPrOH al 0,5%
Eluyente B: eluyente A que contenía sulfato amónico 1 M

Programa de elución:

Tiempo (minutos)	(eluyente B) / (eluyente A + eluyente B)
0	1
5	1
25	0
45	0

Los resultados de la HPLC revelaron que la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína se encontraba presente en un amplio rango de fracciones (fracción nº 15 y fracciones posteriores, tiempo de retención de 30 minutos y más). Dado este resultado, las fracciones de HPLC nº 19 a nº 22 se mezclaron y se concentraron mediante ultrafiltración (ultracentrífuga Amicon UFC801024, corte de PM: 10.000). A partir de aproximadamente 130 µl del concentrado se alimentaron 100 µl a una HPLC de filtración en gel que utilizaba TSKgel G2000SWXL (Tosoh), bajo las condiciones siguientes:

Columna: TSKgel G2000SWXL
Caudal: 0,6 ml/minuto
Fracción: 1,2 ml/2 minutos/fracción
Eluyente: tampón de fosfato potásico 0,05 M, pH 7/DTT 1 mM/hidrosulfito sódico 2,5 mM/isoPrOH al 1%/NaCl 0,3 M

La figura 12 muestra los resultados de la HPLC de filtración en gel. La figura 13 muestra los resultados del SDS-PAGE de cada fracción llevada a cabo bajo condiciones reductoras. Los resultados mostraron bandas de 28 y 32 kDa bajo condiciones reductoras en la fracción nº 7, una fracción principal de actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína.

Ejemplo B4: análisis de la secuencia de aminoácidos del enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína

La fracción (fracción nº 7) que presentaba actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína obtenida en el Ejemplo B3 se utilizó como muestra para el análisis de EM. Más concretamente, la muestra se separó mediante SDS-PAGE y se recortaron las bandas. Las bandas recortadas se redujeron mediante alquilación dentro del gel y se digirieron con tripsina en el gel. Se recogieron los péptidos digeridos con tripsina y se purificaron para el análisis mediante CL-EM. Los datos obtenidos del análisis de CL-EM se analizaron mediante secuenciación *de novo* utilizando el software de apoyo al análisis de EM PEAKS® (Infocom) para calcular y estimar las secuencias de aminoácidos de los péptidos. Concretamente, lo anterior se llevó a cabo siguiendo los procedimientos indicados posteriormente.

(1) Materiales del experimento

El experimento utilizó los materiales siguientes:

SuperSep HG 10/20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.); kit de tinción de gel Flamingo (Bio-Rad); TCEP (tris[2-carboxietil]fosfina) (Pierce); marcador de peso molecular (Apro Science); DTT (Calbiochem); yodoacetamida (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.); acetonitrilo (Kanto Kagaku); tripsina (Promega); TFA (Pierce); bicarbonato amónico (Sigma); agua amoniacal (Merck); ácido fórmico (Kanto Kagaku); Empore Cation-SR Disk (Sumitomo 3M); columna de concentración MonoCap (GL Science); MonoCap para nanoflujo 0,1 x 150 mm (GL Science); FortisTip (AMR); concentrador SpeedVac (SAVANT); automuestreador HTS-PAL (CTC-Analytics); Chorus 220 (CTC-Analytics); QSTAR Pulsar i (Applied Biosystems) y software PEAKS® (Infocom).

(2) Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

Se añadió 1 µl de TCEP 100 mM a 20 µl de la fracción (fracción nº 7) que presentaba actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína obtenida en el Ejemplo B3. Tras la reducción a 70ºC durante 10 minutos, se aplicó la muestra entera a SuperSep HG y se llevó a cabo la SDS-PAGE mediante el método ordinario. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con el kit de tinción de gel Flamingo (Bio-Rad) (ver la figura 14). A continuación, se recortaron cada una de las bandas LG1 y LG2 que aparecieron tras la tinción hasta un tamaño de aproximadamente 1 mm^2. Los geles recortados se lavaron con solución de bicarbonato amónico 100 mM, se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron y solidificaron con un concentrador SpeedVac.

(3) Digestión con tripsina en gel

Se añadió una solución de DTT (1,54 mg/ml en bicarbonato amónico 100 m) a los geles secos y la mezcla se incubó a 55ºC durante 45 minutos para provocar la reducción. Tras descartar la solución de DTT, se añadió una solución de yodoacetamida (10,1 mg/ml en bicarbonato amónico 100 m) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Tras descartar la solución, los geles se lavaron sucesivamente con una solución de acetonitrilo al 50%, una solución de acetonitrilo al 100%, una solución de bicarbonato amónico 100 mM y una solución de acetonitrilo al 100%, seguido de secado y solidificación con un concentrador SpeedVac. A continuación se añadió una cantidad pequeña de solución de tripsina (12,5 µg/ml en bicarbonato amónico 50 mM) a los geles secos para impregnarlos durante 45 minutos sobre hielo. Tras la impregnación, se eliminó el exceso de solución de tripsina y se añadió una solución de bicarbonato amónico 50 mM hasta sumergir los geles. A continuación se llevó a cabo la reacción a 37ºC durante 16 horas.

(4) Análisis de la secuencia de aminoácidos mediante espectrometría de masas

Se recolectaron los péptidos digeridos con tripsina y se pretrataron mediante purificación de los péptidos con una columna simple rellena de Empore Cation-SR Disk en la punta de la pipeta. Los péptidos digeridos con tripsina se recolectaron mediante lavado con una solución de TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90%. En la columna simple, la muestra se trató en primer lugar con una solución equilibrada de TFA al 0,1%/acetonitrilo al 2%. Tras la adsorción de las muestras, la columna se lavó con una solución de TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90% y la muestra se eluyó con una solución de amonio al 5%/acetonitrilo al 30%. Tras la elución, los péptidos digeridos se secaron y se concentraron con un concentrador SpeedVac. El pH de la solución de péptidos digeridos se ajustó a aproximadamente 3 mediante la adición de TFA y la muestra se montó en el automuestreador HTS-PAL. La muestra montada en el HTS-PAL seguidamente se lavó en la columna mediante la carga de la misma en una columna de concentración de muestras situada en la válvula inyectora de la CL-EM. La muestra en la columna concentradora se separó con una columna analítica utilizando nanoHPLC-Chorus 220 y se analizó con QSTAR Pulsar i tras la ionización con FortisTip montado en la columna analítica. Las condiciones del análisis de CL-EM fueron las siguientes:

CL Chorus220
Solvente A: ácido fórmico al 0,1%/acetonitrilo al 2%
Solvente B: ácido fórmico al 0,1%/acetonitrilo al 90%
Caudal: 300 nl/minuto
Gradiente 5% de A - 65% de B/20 minutos

EM

Modo positivo NanoESI, modo de captación dependiente de información (m/z)=400 a 1.400, durante 25 pulsos, estado de carga=2 a 4); 4 experimentos/1 ciclo: Experimento 1 (TOF-EM, m/z=400 a 1.400, tiempo de acumulación=1 s); Experimentos 2 a 4 (ión producto positivo, m/z=100 a 1.400, tiempo de acumulación=2 s).

Los datos captados por la CL-EM para cada banda LG1 y LG2 (ver la figura 14) se analizaron mediante secuenciación *de novo* utilizando el software PEAKS® para estimar las secuencias de aminoácidos de los péptidos digeridos.

Ejemplo B5: análisis de la secuencia de ADN genómico periférica del gen del enzima de síntesis (E1) de dihidrodaidzeína

(1) Preparación de la biblioteca de ADN genómico para la PCR inversa

El ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus* (nº FERM BP-10036) purificada según el Ejemplo A5 se digirió con enzimas de restricción (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, SacI, SalI, Sau3AI, XhoI; todos disponibles de Takara Bio) a 37ºC durante 16 horas con el fin de obtener los fragmentos de ADN. Tras el tratamiento con fenol-cloroformo, los fragmentos se purificaron mediante precipitación con etanol. Los fragmentos de ADN genómico purificados se autoligaron utilizando el kit de ligación TaKaRa ver. 2.1 (Takara Bio). Cada solución de ligación se diluyó diez veces con agua esterilizada para preparar una biblioteca de ADN genómico para la PCR inversa.

(2) PCR inversa

Se utilizó 1 µl (equivalente a 40 ng) de la biblioteca de ADN genómico para la PCR inversa obtenida en (1), como molde para amplificar las regiones de cadena arriba y de cadena abajo del ADN genómico próximo al polinucleótido E1 utilizando la PCR inversa. Los fragmentos tratados con PstI y XhoI se utilizaron como ADN molde para la PCR inversa de amplificación de la región de cadena arriba. Para la PCR inversa de amplificación de la región de cadena abajo, se utilizaron los fragmentos tratados con HindIII, PstI, SacI y XhoI como ADN molde. Se utilizó Taq LA TaKaRa (Takara Bio) para la PCR inversa. La primera PCR se llevó a cabo utilizando 20 µl de una mezcla de reacción que contenía: 1x tampón de PCR (sin Mg^{2+}); cebadores, 0,5 nM de cada uno; dNTP, 0,5 mM de cada uno; $MgCl_2$, 2,5 mM; y Taq LA TaKaRa, 0,2 U. Se utilizó 1 µl (40 ng) de una solución diluida de la biblioteca de ADN genómico como molde. Programa de amplificación: 98ºC durante 1 minuto (95ºC durante 10 s, 62ºC durante 10 s, 68ºC durante 10 minutos) x 35 ciclos, 68ºC durante 15 minutos. La PCR anidada posterior se llevó a cabo utilizando 0,5 µl del primer producto de PCR como molde y 30 µl de una mezcla de reacción que contenía 1x tampón de PCR (sin Mg^{2+}); cebadores, 0,5 nM de cada uno; dNTP, 0,5 mM de cada uno; $MgCl_2$, 2,5 mM; y Taq LA TaKaRa, 0,3 U. Programa de amplificación: 98ºC durante 1 minuto (95ºC durante 10 s, 62ºC durante 10 s, 68ºC durante 10 minutos) x 30 ciclos, 68ºC durante 15 minutos.

(2-1) Cebadores

Los juegos de cebadores utilizados para la PCR inversa fueron los siguientes.

(2-1-1) Lado cadena arriba

Primera PCR: RACE-N-PE-1 y E1-Bub-N-P1
PCR anidada: RACE-N-PE-2 y E1-Bub-N-P2

(2-1-2) Lado cadena abajo

Primera PCR: RACE-C-PE-1 y E1-Bub-C-P1
PCR anidada: RACE-C-P3-2 y E1-Bub-C-P2

(2-2) Secuencias de cebador

Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los lados de cadena arriba y de cadena abajo mediante PCR inversa fueron los siguientes:

secuencias de cebador para la amplificación del lado de cadena arriba:

RACE-N-P3-1: ATGGAGATAGTGCCGCTGGCAAGGCAACGGCAC (SEC ID nº 43)
RACE-N-PE-2: TCAACGAAGACTCGATTTGAGCGAGAGGCGAGG (SEC ID nº 44)
E1-Bub-N-P1: ACGGTGGAACCGGCATCGTGTTCATGGACAAC (SEC ID nº 45)
E1-Bub-N-P2: GCGTGACCCAGTTCCACCATGTCGGACTGTC (SEC ID nº 46)

secuencias de cebador para la amplificación del lado de cadena abajo:

RACE-C-P3-1: GACATCCCGTTCGAGCGCAGGATCACCCATGAG (SEC ID nº 47)
RACE-C-P3-2: AGGATCACCCATGAGCGCATCGCTATCATGGAC (SEC ID nº 48)
E1-Bub-C-P1: CATCGCTCTTGCAGTCGTTGTCCAGGAAGTCC (SEC ID nº 49)
E1-Bub-C-P2: TTGTCCAGGAAGTCCATCGCGTACACGACGGAG (SEC ID nº 50)

Observar que la totalidad de los oligos de ADN utilizados como cebadores de amplificación en el presente Ejemplo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Japan.

(3) Purificación y determinación de la secuencia de bases de los fragmentos de ADN genómicos periféricos amplificados por PCR inversa, del gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína

Se añadió 10 x día al producto de PCR anidada obtenido en (2), en una cantidad 1/10 del producto de PCR anidada. A continuación, 5 µl se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Esto confirmó la amplificación de fragmentos de ADN de 0,5 kb (PstI) y de 3,5 kb (XhoI) en la región de cadena arriba, y de fragmentos de ADN de 1 kb (HindIII), 1 kb (SacI) y 2,5 kb (XhoI) en la región de cadena abajo. En el presente ejemplo, la electroforesis en agarosa utilizó bromuro de etidio (Nippon Gene) para la tinción y λ/StyI (Nippon Gene) y escalera de 100 pb (Toyobo) como marcadores de peso molecular. Los fragmentos de ADN amplificado se recortaron de gel de agarosa y se purificaron utilizando un kit de extracción de gel QIAGEN (Qiagen). Las secuencias de bases de los fragmentos de ADN purificados seguidamente se determinaron mediante el método de secuenciación directa y el método de paseo génico, utilizando los cebadores utilizados para la amplificación.

(4) Análisis de la secuencia genómico y estimación del ORF (marco de lectura abierto)

Las secuencias de ADN obtenidas en (3) se sometieron a análisis de ensamblaje utilizando el software de ensamblaje de secuencias SEQUENCER (Gene Codes Inc., USA). Además, se llevó a cabo la estimación del ORF. El análisis determinó la secuencia de 6.685 pb en la región genómica periférica que incluía el gen del enzima E1. La figura 15 ilustra esquemáticamente la estructura genómica periférica analizada, incluyendo el gen del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína. La estimación del ORF encontró tres ORF cadena arriba del gen del enzima E1 (el extremo N-terminal no identificado en uno de los ORF) y un ORF en el lado de cadena abajo. Los ORF cadena arriba se denominaron US ("upstream" [cadena arriba]), US2 y US3, en este orden, alejándose del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína. El ORF de cadena abajo se denominó DS ("downstream" [cadena abajo]) 1.

Ejemplo B6: comparación de las secuencias de péptidos digeridos con la secuencia genómica mediante análisis de CL-EM

Las secuencias de aminoácidos estimadas obtenidas en el Ejemplo B4 se compararon con los datos de la secuencia del ADN genómico periférico del gen del enzima de síntesis (E1) de dihidrodaidzeína determinado en el Ejemplo B5. Como resultado, algunas de las secuencias obtenidas principalmente de LG2 correspondían a la secuencia polipeptídica inferida a partir de la secuencia de nucleótidos ORF-US2. Lo anterior sugiere la posibilidad de que el polipéptido ORF-US2 pueda ser el enzima de síntesis de la tetrahidrodaidzeína. Las secuencias de péptidos digeridos que correspondían al polipéptido ORF-US2 se muestran posteriormente. Las figs. 16-1, 16-2 y 16-3 muestran los datos obtenidos mediante CL-EM.

Tabla 1

m/z	z	Masa	Péptido	Puntuación (%)
629,348	2	1.256,682	TPGVAASVADEXK (SEC ID nº 51)	100,0
452,256	2	902,497	MPGAPVFGK (SEC ID nº 52)	99,8
487,847	2	973,680	KXXXTGTTK (SEC ID nº 53)	99,8
654,670	3	1.960,988	VTQEXXCAHGAFVCGSGR (SEC ID nº 54)	99,6
644,348	2	1.286,681	WXSPEESVGQR (SEC ID nº 55)	96,8
449,795	2	897,576	AQEVKVPK (SEC ID nº 56)	74,9

En la tabla anterior, m/z representa la proporción masa-carga, z es el número de cargas, masa es la masa del péptido y péptido son las secuencias estimadas de aminoácidos. La puntuación representa el porcentaje de precisión del cálculo de secuencia realizado por el software PEAKS (siendo 100% la máxima precisión). Observar que, debido a que la isoleucina (I) y la leucina (L) presentan el mismo peso molecular y son indistinguibles, ambas se indican con una X en las secuencias de péptidos digeridos correspondientes al polipéptido ORF-US2.

Ejemplo B7: síntesis de polipéptido ORF-US2 utilizando el sistema acelular de síntesis de proteínas y confirmación de la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína

Se sintetizó el polipéptido ORF-US2 utilizando el sistema acelular de síntesis de proteínas (PURESYSTEM Classic II mini; Post Genome Institute Co., Ltd.) y se confirmó su actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína.

(1) Preparación de ADN molde

Mediante una PCR en dos etapas se preparó ADN molde polinucleótido ORF-US2 para la síntesis acelular de proteínas.

(1-1) Cebadores

Los cebadores utilizados para la PCR para preparar el ADN molde de ORF-US2 eran los siguientes:

E2-invitroTS-FP1: ACTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGCACAGGAAGTCAAAGTCC (SEC ID nº 57)
E2-invitroTS-RP: CTAGACCTCGATCTCGCCCTGCATGCCG (SEC ID nº 58)

Cebador universal:

GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA GATATACCA (SEC ID nº 59)

Tanto E2-invitroTS-FP1 como E2-invitroTS-RP fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Japan basándose en la secuencia de nucleótidos de ORF-US2 determinada en el Ejemplo B5. El cebador universal se obtuvo a partir de la unión del PURESYSTEM Classic II mini (Post Genome Institute Co., Ltd.).

(1-2) Preparación del ADN molde mediante PCR en dos etapas

El ADN molde utilizado para la síntesis del polipéptido ORF-US2 se preparó mediante una PCR en dos etapas según los manuales. En el presente ejemplo, la PCR utilizó el enzima de clonación por PCR de alta fidelidad Easy-A® (ADN polimerasa, Stratagene) y el sistema de PCR GeneAmp PCR System 9700 (dispositivo de PCR, Applied Biosystems).

En la primera PCR, se utilizó el ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus* como molde para amplificar el polinucleótido ORF-US2, utilizando los cebadores E2-invitroTS-FP1 y E2-invitroTS-RP proporcionados en (1-1). El producto de PCR resultante (polinucleótido ORF-US2) se utilizó como molde para llevar a cabo la segunda PCR utilizando el cebador universal y ES-invitroTS-RP. Se purificaron 300 µl (50 µl x 6) del producto de PCR utilizando el kit de purificación de PCR (Qiagen) y se utilizó como ADN molde (ADN molde para la síntesis del polipéptido ORF-US2) para sintetizar el polipéptido ORF-US2. La primera y segunda PCR se llevaron a cabo bajo las condiciones siguientes.

Primera PCR: 50 µl de mezcla de reacción que contenía cebadores de amplificación, 10 pmoles de cada uno; dNTP, 2,5 pmoles de cada uno; ADN genómico derivado de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, 40 ng; tampón Easy-A (Stratagene), y enzima de clonación por PCR de alta fidelidad Easy-A®, 2 U (Stratagene). Programa de amplificación: 95ºC durante 2 minutos (95ºC durante 45 s, 58ºC durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto) x 30 ciclos, 72ºC durante 3 minutos.

Segunda PCR: 50 µl de mezcla de reacción que contenía cebadores de amplificación, 10 pmoles de cada uno; dNTP, 2,5 pmoles de cada uno; mezcla de reacción de primera PCR, 0,5 µl; tampón Easy-A, y enzima de clonación por PCR de alta fidelidad Easy-A®, 2 U. Programa de amplificación: 95ºC durante 2 minutos (95ºC durante 45 s, 45ºC durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto) x 5 ciclos (95ºC durante 45 s, 60ºC durante 20 s, 72ºC durante 1 minuto) x 25 ciclos, 72ºC durante 3 minutos.

(2) Síntesis proteica acelular de polipéptido ORF-US2 y confirmación de la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína

Se descongelaron sobre hielo 25 µl de solución A y 10 µl de solución B de PURESYSTEM Classic II mini, conservados a -80ºC, y se mezclaron entre sí. A continuación, se añadieron 0,6 µg (60 ng/µl, 10 µl) de ADN molde de síntesis de polipéptido ORF-US2 (incluyendo una secuencia de promotor de T7 y una secuencia de unión ribosómica 5' cadena arriba del codón de inicio) preparados mediante la segunda PCR. Se ajustó el volumen total a 50 µl mediante adición de agua esterilizada y la mezcla se incubó a 37ºC durante 90 minutos para sintetizar un polipéptido diana. A modo de control positivo de la síntesis de proteínas con este sistema se utilizaron 0,5 µg (0,2 µg/µl, 2 µl) de ADN molde de síntesis de dihidrofolato reductasa (DHFR), proporcionado como unión de PURESYSTEM Classic II mini. No se añadió ADN molde en un control negativo y sólo se utilizó agua esterilizada. Para la medición de la actividad, se añadieron 40 µl de la mezcla de reacción a un tampón de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente, y la mezcla se incubó a 37ºC durante 6 horas. Tras la reacción, la mezcla de reacción enzimática se extrajo con 3 ml de acetato de etilo. El extracto se secó y se disolvió en tampón de electroforesis y la tetrahidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática se sometió a ensayo mediante análisis de HPLC.

Composición del tampón de reacción enzimática

tampón de fosfato potásico 0,1 M/PMSF 1 mM/DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM (pH 7,0)
NADPH 2 mM
NADH 2 mM
10 µg/ml de dihidrodaidzeína

Las muestras con el ADN molde de síntesis de dihidrofolato reductasa (DHFR) expresaron con éxito la proteína a partir del ADN, mientras que no se observó expresión proteica en muestras sin ADN molde. Estos resultados sugieren que el experimento en efecto resultó apropiado.

Se muestran los resultados en la figura 17. La mezcla de reacción que expresaba el polipéptido ORF-US2 presentaba un pico de tetrahidrodaidzeína aproximadamente en la posición de 6,7 minutos 6 horas después de la reacción, mientras que no se observó pico de tetrahidrodaidzeína en la mezcla de reacción sin síntesis de proteínas (NC) y en la mezcla de reacción que expresa dihidrofolato reductasa (DHFR). Además, aunque la mezcla de reacción que expresaba el polipéptido ORF-US2 presentaba un nivel reducido de dihidrodaidzeína (sustrato) debido a la biosíntesis de tetrahidrodaidzeína, no se observó una reducción de la dihidrodaidzeína en la mezcla de reacción sin síntesis de proteínas (NC) y en la mezcla de reacción que expresaba dihidrofolato reductasa (DHFR). Estos resultados demuestran que el polipéptido ORF-US2 presenta actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína. Por lo tanto, puede afirmarse que el polipéptido ORF-US2 corresponde al polipéptido E2.

Ejemplo B8: expresión de polipéptido ORF-US2 recombinante utilizando *Escherichia coli*, y confirmación de la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína

Se utilizó el sistema pET, un sistema de expresión de proteínas recombinante que utiliza *Escherichia coli*, para expresar el polipéptido ORF-US2 y se confirmó su actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína.

(1) Preparación de vector de expresión del polipéptido ORF-US2

Para preparar un vector de expresión de polipéptido ORF-US2 (pET21-US2), se amplificó por PCR el ADN en la región del marco de lectura abierto del polipéptido ORF-US2.

Se prepararon los cebadores de amplificación siguientes basándose en la secuencia del polipéptido ORF-US2 determinada en el Ejemplo B5.

exp.US2 pet F Nde: TATACATATGGCACAGGAAGTCAAAGTC (SEC ID nº 60)
exp.US2 pet: AATCGAATTCCTAGACCTCGATCTCGCCCTGC (SEC ID nº 61)

Para la inserción en pET21a (Novagen), se diseñaron los cebadores de amplificación exp.US2 pet F Nde y exp.US2 pet para que incluyesen las secuencias de restricción NdeI y EcoRI, respectivamente.

Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 25 µl de una mezcla de reacción que contenía los cebadores, 5 pmoles de cada uno; dNTP, 5 nmoles de cada uno; ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus*, 40 ng; 10x tampón para la ADN polimerasa KOD-plus (Toyobo), 2,5 µl; ADN polimerasa KOD-Plus, 0,3 U (Toyobo). Programa de amplificación: 95ºC durante 3 minutos (94ºC durante 30 s, 60ºC durante 30 s, 68ºC durante 1 minuto) x30 ciclos, 68ºC durante 7 minutos. Dispositivo de PCR: sistema de PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El análisis de una parte de la mezcla de reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa detectó una banda de un tamaño esperado. El producto de PCR entero se recolectó con un kit de purificación por PCR QIAGEN (Qiagen).

Los fragmentos de ADN recolectados de esta manera se cortaron con los enzimas de restricción NdeI y EcoRI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se recortó una porción que contenía la banda diana y se purificaron y se recolectaron con un kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen). Tras la recolección, los fragmentos de ADN se ligaron a 16ºC durante la noche con pET21a digerido con NdeI y EcoRI, utilizando un kit de ligación de ADN ver.2.1 (Takara Bio). La mezcla de reacción ligada seguidamente se utilizó para transformar la cepa JM109 de *Escherichia coli* (Takara Bio).

El transformante se cultivó a 37ºC durante la noche en una placa de agar medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). Las colonias individuales resultantes se cultivaron durante la noche en 3 ml de medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se extrajo ADN plasmídico utilizando un extractor automático de plásmidos PI-100 (KURABO).

La secuencia de bases del ADN insertado en el plásmido se secuenció mediante el método del pigmento-terminador. Lo anterior confirmó la inserción con éxito del polinucleótido ORF-US2, tal como se pretendía. En el presente ejemplo, se determinó la secuencia de ADN utilizando el secuenciador de ADN ABI3700 (Applied Biosystems).

(2) Expresión y confirmación del polipéptido ORF-US2 recombinante en *Escherichia coli*

Se utilizaron el plásmido que expresaba polipéptido ORF-US2 recombinante, pET21-US2, y el plásmido pET21a (control negativo), para transformar la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* (Novagen). Para obtener colonias individuales, los transformantes se cultivaron durante la noche a 37ºC en una placa de agar medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml).

Cada *E. coli* BL21 (DE3) transformante se cultivó durante la noche a 37ºC en 3 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se precultivaron 0,5 ml del cultivo durante 3 horas (hasta que la DO a 630 nm alcanzó aproximadamente 0,4) mediante la adición de 50 ml de medio LB líquido que contenía la misma concentración de ampicilina. Tras ajustar la concentración final a 1 mM mediante la adición de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), el cultivo se incubó adicionalmente a 37ºC durante 4 horas.

Tras la incubación, las células se recolectaron mediante centrifugación (6.000 rpm, 4ºC, 15 minutos) utilizando un Avanti HP25 (Beckman Coulter). Los procedimientos posteriores se llevaron a cabo sobre hielo. Tras eliminar el sobrenadante (el medio), las células se suspendieron en 1 ml de tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0, KPB-PDH) que contenía PMSF 1 mM, DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. A continuación, la suspensión celular se introdujo en un tubo Assist de 2 ml cargado con 0,7 ml de perlas de zirconio-sílice (BioSpec Products, Inc.) y 400 µl de KPB-PDH. Seguidamente, las células se lisaron mediante dos ciclos repetidos de 6.500 rpm durante 20 segundos y enfriamiento sobre hielo durante 3 minutos, utilizando FastPrep® (Thermo Electron Corporation). Como resultado, se obtuvo una suspensión de células lisadas.

La expresión de polipéptido ORF-US2 recombinante en *E. coli* se confirmó mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se añadieron 5 µl de 5x tampón para muestras (Tris-HCl 125 mM (pH 6,5)/glicerol al 25%/SDS al 5%/2-mercaptoetanol al 5%/BPB al 0,5%) a 20 µl de suspensión de células lisadas. Tras desnaturalizar térmicamente a 98ºC durante 5 minutos, la suspensión se enfrió sobre hielo y 10 µl se sometieron a electroforesis mediante SDS-PAGE. Se llevó a cabo la SDS-PAGE con una placa de gel disponible comercialmente (SuperSep® 5-20%; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Quick CBB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para la tinción. Se utilizó la escalera XL preteñida de rango amplio (Apro Science) como marcadores de peso molecular.

Se muestran en la figura 18 los resultados de la SDS-PAGE. Se confirmó un polipéptido recombinante con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa en la suspensión de células lisadas derivada del transformante de pET21-US2.

(3) Confirmación de la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína del polipéptido ORF-US2 recombinante

La suspensión de células lisadas obtenida en (2) del presente Ejemplo se utilizó como fuente de enzima para medir la actividad de conversión de dihidrodaidzeína a tetrahidrodaidzeína. Como resultado, se confirmó la actividad en el polipéptido ORF-US2 recombinante expresado.

En el presente ejemplo, se llevó a cabo la medición de la actividad de conversión de dihidrodaidzeína a tetrahidrodaidzeína de la manera siguiente.

Se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente y la mezcla se incubó a 0ºC durante 2 horas.

Composición de la mezcla de reacción enzimática:

Suspensión de células lisadas (fuente de enzima):	100 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Dihidrodaidzeína (2 mg/ml):	5 µl
KPB-PDH:	855 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción enzimática para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de dihidrodaidzeína y de *cis*-tetrahidrodaidzeínas y *trans*-tetrahidrodaidzeínas en la mezcla de reacción enzimática.

En la figura 19 se muestran los resultados del análisis de HPLC. En la suspensión de células lisadas derivadas del transformante de pET21-US2 que expresaba el polipéptido ORF-US2 recombinante, la dihidrodaidzeína (sustrato) añadida a la mezcla de reacción enzimática fue convertida en *cis*-tetrahidrodaidzeína (c-THD) y *trans*-

tetrahidrodaidzeína (t-THD), mientras que no se detectó tetrahidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática en el transformante de pET21a (control negativo).

Estos resultados demuestran que el polipéptido ORF-US2 recombinante presenta la actividad de síntesis de tetrahidrodaidzeína a partir de dihidrodaidzeína. Por lo tanto, puede afirmarse que el polipéptido ORF-US2 recombinante corresponde al polipéptido E2.

Ejemplo C

Ejemplo C1: confirmación de la actividad de biosíntesis de ecuol de las células bacterianas a partir de tetrahidrodaidzeína

Se inoculó una cepa 20-92 de *Lactococcus* (nº FERM BP-10036) en un medio líquido de amplificación que contenía tetrahidrodaidzeína (un medio GAM Bouillon modificado (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) al que se añadió *cis*-tetrahidrodaidzeína o *trans*-tetrahidrodaidzeína (sintetizada orgánicamente por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.; ver el Ejemplo de referencia B1) en una cantidad de 10 µg/ml) y el cultivo se incubó a 37ºC durante 18 horas bajo condiciones anaeróbicas (utilizando sistemas de recipientes de generación de gas BBL). Tras la incubación, se introdujo inmediatamente 1 ml del cultivo en un tubo de centrífuga de vidrio con tapa y se añadieron 3 ml de acetato de etilo al mismo para la extracción. El producto se secó para preparar una muestra para el análisis de HPLC. A modo de solución estándar para el análisis de HPLC, se utilizó una solución mixta de daidzeína (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), ecuol (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), dihidrodaidzeína (2 µg/ml, Trend Research Chemicals Inc.), *cis*-tetrahidrodaidzeína y *trans*-tetrahidrodaidzeína (2 µg/ml, ambos sintetizados químicamente por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

Se muestran los resultados en la figura 20. La figura 20 muestra que la cepa 20-92 de *Lactococcus* presenta una actividad de biosíntesis de ecuol a partir de tanto *cis*-tetrahidrodaidzeínas como *trans*-tetrahidrodaidzeínas (figura 20, gráficos en la parte intermedia e inferior). Observar que en las figuras, la daidzeína se abrevia como DZN, la dihidrodaidzeína, como DD, la *cis*-tetrahidrodaidzeína, como c-THD, la *trans*-tetrahidrodaidzeína, como t-THD y el ecuol, como EQL.

Ejemplo C2: búsqueda e identificación de enzima de síntesis de ecuol mediante un sistema de expresión recombinante de proteínas utilizando *Escherichia coli*

Se utilizó el sistema pET (Novagen), un sistema de expresión recombinante de proteínas que utiliza *Escherichia coli*, para expresar polipéptidos, cada uno de los cuales corresponde a tres polinucleótidos ORF (ORF-US3, US1 y DS1), identificados en la secuencia de ADN genómico periférica del gen del enzima de síntesis (E1) de dihidrodaidzeína determinado en el Ejemplo B5, en *Escherichia coli*. Se estudió la actividad de catálisis de conversión del ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína en busca del enzima de síntesis (E3) de ecuol.

(1) Preparación de vector de expresión de polipéptido ORF

Para preparar un vector de expresión de cada polipéptido ORF (ORF-US3, US1 y DS1), el polinucleótido en al región del marco de lectura abierto de cada polipéptido se amplificó mediante PCR y se insertó en el vector pET21a (Novagen).

(1-1) Cebador de amplificación

Se prepararon los cebadores de amplificación siguientes basándose en la secuencia del ADN genómico periférica del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína (E1) determinado en el Ejemplo B5.

Polipéptido ORF-US3

exp.US3 F: TATACATATGGCAGAATTCGATGTTGAG (SEC ID nº 62)
exp.US3 R: CCGCAAGCTTCTACATAGTGGAGATCGCGTGG ORF-US (SEC ID nº 63)

Polipéptido ORF-US1

exp.US1 F: TATACATATGTTCAAGGGTCCACAGGGC (SEC ID nº 64)
exp.US1 R: GCTCGAATTCTTAGTGCTGCTGTGCCTTTTCAG (SEC ID nº 65)

Polipéptido ORF-DS1:

exp.DS1 F: ATATACATATGCAGGATATGGACTTCATGG (SEC ID nº 66)
exp.DS1 R: GCTCGAATTCTCATAGTGACATCAGCGCTCCC (SEC ID nº 67)

Para la inserción en pET21a (Novagen), los cebadores de amplificación exp.US3 F, exp.US1 F y exp.DS1 F se

diseñaron para que incluyesen la secuencia de restricción NdeI; exp.US3 R para que incluyese la secuencia de restricción HindIII, y exp.US1R y exp.DS1 R para que incluyese la secuencia de restricción EcoRI.

(1-2) Amplificación de cada polinucleótido ORF

Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 25 µl de una mezcla de reacción que contenía los cebadores, 5 pmoles de cada uno; dNTP, 5 nmoles de cada no; ADN genómico de la cepa 20-92 de *Lactococcus* purificada en el Ejemplo A5, 40 ng; 10x tampón para la ADN polimerasa KOD-plus (Toyobo Co., Ltd.), 2,5 µl; ADN polimerasa KOD-Plus, 0,3 U (Toyobo Co., Ltd.). Programa de amplificación: 95ºC durante 3 minutos (94ºC durante 30 s, 60ºC durante 30 s, 68ºC durante 2 minutos) x 30 ciclos, 68ºC durante 7 minutos. Dispositivo de PCR: sistema de PCR GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El análisis de una parte de la mezcla de reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa detectó una banda de un tamaño esperado para cada cebador. Se recolectó el producto de PCR entero utilizando un kit de purificación por PCR QIAGEN (Qiagen).

(1-3) Preparación de vector de expresión del polipéptido ORF

Los fragmentos de polinucleótido ORF-US3 recogidos en el procedimiento (1-2) se cortaron con los enzimas de restricción NdeI e HindIII, y los fragmentos de polinucleótidos ORF-US1 y ORF-DS1 se cortaron con los enzimas de restricción NdeI y EcoRI. Los fragmentos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se recortó una parte que contenía la banda diana y se purificó y recolectó utilizando un kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen). Tras la recolección, los fragmentos de polinucleótido se ligaron a 16ºC durante la noche con pET21a digerido con NdeI e HindIII o EcoRI, utilizando un kit de ligación de ADN ver.2.1 (Takara Bio). A continuación, la mezcla de reacción ligada se utilizó para transformar *Escherichia coli* cepa JM109 (Takara Bio) mediante un método ordinario. El transformante obtenido se cultivó a 37ºC durante la noche en una placa de agar medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). Las colonias individuales resultantes se cultivaron durante la noche en 3 ml de medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, el ADN plasmídico se extrajo utilizando un extractor automático de plásmidos PI-100 (KURABO).

La secuencia de bases del ADN insertado en el plásmido se secuenció mediante el método del pigmento-terminador. Lo anterior confirmó la inserción con éxito de cada polinucleótido, tal como se pretendía. De esta manera, se obtuvieron pET-US3, pET-US1 y pET-DS1. En el presente ejemplo, se determinó la secuencia de ADN utilizando el secuenciador de ADN ABI3700 (Applied Biosystems).

(2) Expresión de cada polipéptido recombinante en *Escherichia coli*

(2-1) Preparación de *Escherichia coli* BL21 transformante

Se utilizaron los plásmidos que expresaban polipéptido ORF recombinante, pET-US3, pET-US1, pET-DS1 y pET21a (control negativo) para transformar *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) (Novagen) mediante un método ordinario. Para obtener colonias individuales, los transformantes se cultivaron durante la noche a 37ºC en una placa de agar medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml).

(2-2) Inducción de la expresión de polipéptido recombinante

Cada *E. coli* BL21 (DE3) transformante se cultivó durante la noche a 37ºC en 3 ml de medio LB líquido que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se precultivaron 0,5 ml del cultivo durante 3 horas (hasta que la DO a 630 nm alcanzó entre 0,4 y 0,7) mediante la adición de 50 ml de medio LB líquido que contenía la misma concentración de ampicilina. Tras ajustar la concentración final a 1 mM mediante la adición de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), el cultivo se incubó adicionalmente a 37ºC durante 4 horas. De esta manera se indujo la expresión de polipéptido recombinante en *Escherichia coli*.

(2-3) Preparación de suspensión de células lisadas

Tras la inducción de la expresión en el procedimiento (2-2), se recolectaron las células mediante centrifugación (6.000 rpm, 4ºC, 15 minutos) utilizando un Avanti HP25 (Beckman Coulter). Los procedimientos posteriores se llevaron a cabo sobre hielo. Tras eliminar el sobrenadante (el medio), las células se suspendieron en 1 ml de tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0, en adelante abreviado como KPB-PDH) que contenía PMSF 1 mM, DTT 2 mM e hidrosulfito sódico 5 mM. A continuación, la suspensión celular se introdujo en un tubo Assist de 2 ml cargado con 0,7 ml de perlas de zirconio-sílice (BioSpec Products, Inc.) y 400 µl de KPB-PDH. Seguidamente las células se lisaron mediante dos ciclos repetidos de 6.500 rpm durante 20 segundos y enfriamiento sobre hielo durante 3 minutos utilizando un FastPrep® (Thermo Electron Corporation). Como resultado, se obtuvo una suspensión de células lisadas.

(2-4) Confirmación de la expresión de polipéptido recombinante mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

La expresión de cada polipéptido ORF recombinante en *E. coli* se confirmó mediante SDS-PAGE. Se añadieron 5 µl de 5x tampón para muestras (Tris-HCl 125 mM (pH 6,5)/glicerol al 25%/SDS al 5%/2-mercaptoetanol al 5%/BPB al 0,5%) a 20 µl de la suspensión de células lisadas obtenida en el procedimiento (2-3). Tras la desnaturalización térmica a 98ºC durante 5 minutos, la suspensión se enfrió en hielo y 4 µl se sometieron a electroforesis mediante SDS-PAGE. La SDS-PAGE se llevó a cabo con una placa de gel disponible comercialmente (SuperSep® 5-20%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Quick CBB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para la tinción. Se utilizó la escalera XL preteñida de rango amplio (Apro Science) como marcadores de peso molecular. Se muestran los resultados de la SDS-PAGE en la figura 21. La expresión de los polipéptidos ORF-US3 y ORF-DS1 recombinantes con pesos moleculares de aproximadamente 52 kDa y 50 kDa se confirmó en las suspensiones de células lisadas derivadas de los transformantes de pET-US3 y pET-DS1, respectivamente. No se observó expresión de polipéptido ORF-US1 recombinante en la suspensión de células lisadas derivada de transformante de pET-US1.

Ejemplo C3: medición de la actividad de síntesis de ecuol del polipéptido ORF recombinante

La suspensión de células lisadas obtenida en el Ejemplo C2 se utilizó como fuente de enzima para medir la actividad de conversión de tetrahidrodaidzeína en ecuol. En el presente ejemplo, la medición de la actividad de conversión de tetrahidrodaidzeína a ecuol se llevó a cabo de la manera siguiente.

Se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente, y la mezcla se incubó a 37ºC durante 1 hora.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Suspensión de células lisadas (fuente de enzima):	100 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Cis-tetrahidrodaidzeína (2 mg/ml):	5 µl
Trans-tetrahidrodaidzeína (2 mg/ml):	5 µl
KPB-PDH:	850 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción enzimática para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de dihidrodaidzeína, *cis*-tetrahidrodaidzeína, *trans*-tetrahidrodaidzeína y ecuol en la mezcla de reacción enzimática. Como solución estándar para el análisis de HPLC, se utilizó una solución mixta de daidzeína (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), ecuol (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), dihidrodaidzeína (2 µg/ml, Trend Research Chemicals Inc.), *cis*-tetrahidrodaidzeína y *trans*-tetrahidrodaidzeína (2 µg/ml, ambos sintetizados químicamente por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.).

Como resultado del análisis de HPLC, en la suspensión de células lisadas derivada del transformante de plásmido pET-US3 que expresaba el polipéptido ORF-US3 recombinante, la tetrahidrodaidzeína añadida a la mezcla de reacción enzimática se convirtió en ecuol (figura 22). Además, la actividad de conversión en dihidrodaidzeína, que es un precursor de la tetrahidrodaidzeína, se confirmó durante la ruta biosintética de ecuol (figura 22). Respecto a los transformantes de pET-US1 y pET-DS1, y el transformante de pET21a (control negativo), únicamente se detectó tetrhidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática. Observar que en las figuras, la daidzeína se abrevia DZN, la dihidrodaidzeína como DD, la *cis*-tetrahidrodaidzeína como c-THD, la *trans*-tetrahidrodaidzeína como t-THD y el ecuol como EQL.

Estos resultados demuestran que el polipéptido ORF-US3 presenta la actividad de biosíntesis de ecuol a partir de tetrahidrodaidzeína. Por lo tanto, puede afirmarse que el polipéptido ORF-US3 recombinante corresponde al polipéptido E3.

Ejemplo D

Ejemplo D1: expresión y purificación de enzima recombinante etiquetado con His relacionado con la producción ecuol, utilizando *Escherichia coli*

Mediante la utilización de un sistema pET (Novagen), que es un sistema de expresión de proteínas recombinante que utiliza *Escherichia coli*, se expresaron tres enzimas relacionados con la producción de ecuol etiquetados con His: enzima de síntesis de dihidrodaidzeína (E1), enzima de síntesis de tetrahidrodaidzeína (E2), enzima de síntesis de ecuol (E3), seguido de la purificación por afinidad utilizando una columna de purificación (Ni) de proteínas etiquetada con His.

(1) Producción de vector de expresión de enzima etiquetado con His

Para producir vectores de expresión para los enzimas (E1, E2 y E3), se amplificó por PCR un polinucleótido en cada región de marco de lectura abierto y se insertó en un vector pET21a.

(1-1) Cebador de amplificación

Basándose en la secuencia genómica en la región del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína (E1) encontrado en el Ejemplo B5, se produjeron los cebadores de amplificación siguientes.

Enzima E1 etiquetado con His

exp.E1 pet F Nde: AGCTCATATGAAGAACAAGTTCTATCCGAA (nº de secuencia: 41)
exp.E1 pet His: AATCGAATTCGTACAGGTTGCAGCCAGCGATGT (nº de secuencia: 42)

enzima E2 etiquetado con His

exp.US2 pet F Nde: TATACATATGGCACAGGAAGTCAAAGTC (nº de secuencia: 60)
exp.E2 pet His. AATCGAATTCGAGACCTCGATCTCGCCCTGC (nº de secuencia: 68)

enzima E3 etiquetado con His

exp.US3 F: TATACATATGGCAGAATTCGATGTTGAG (nº de secuencia: 62)
exp.E3 R His: CCGCAAGCTTGTACATAGTGGAGATCGCGTGG (nº de secuencia: 69)

Para la inserción en pET21a (Novagen), se diseñaron los cebadores de amplificación exp.E1 pet F Nde, exp.US2 pet F y exp.US3 F para que incluyesen, cada uno, una secuencia de sitio de corte NdeI de enzima de restricción; exp.E1 pet His y exp.E2 pet His se diseñaron para que incluyesen una secuencia de sitio de corte EcoRI, y exp.E3 R His se diseñó para incluir una secuencia de sitio de corte HindIII.

(1-2) Amplificación de polinucleótidos de enzima etiqueta con His

Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 25 µl de una mezcla de reacción que contenía los cebadores, 5 pmoles de cada uno; dNTP, 5 nmoles de cada uno; ADN genómico de cepa 20-92 de *Lactococcus* (nº FERM BP-10036) purificado en el Ejemplo A5, 40 ng; 10x tampón para la ADN polimerasa KOD-plus (Toyobo), 2,5 µl; ADN polimerasa KOD-Plus (Toyobo), 0,3 U, utilizando un programa de amplificación: 95ºC durante 3 minutos (94ºC durante 30 s, 60ºC durante 30 s, 68ºC durante 2 minutos) x30 ciclos, 68ºC durante 7 minutos (dispositivo de PCR: sistema de PCR GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems)). El análisis de una parte de la mezcla de reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa detectó una banda de un tamaño esperado. El producto de PCR completo se recolectó mediante el kit de purificación por PCR QIAGEN (Qiagen).

(1-3) Producción de vector de expresión de polipéptido enzima etiquetado con His

Los fragmentos de polinucleótido de enzima etiquetado con His recolectados en (1-2) se cortaron con los enzimas de restricción NdeI y EcoRI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se recortó la porción que contenía la banda diana y se purificó y se recolectó con el kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen). Tras la recolección, los fragmentos polinucleótidos se ligaron a 16ºC durante la noche con pET21a digerido con NdeI y EcoRI, utilizando el kit de ligación de ADN ver.2.1 (Takara Bio). Con la mezcla de reacción ligada, se llevó a cabo la transformación de *Escherichia coli* cepa JM109 (Takara Bio) siguiendo un método general. El transformante obtenido de esta manera se cultivó a 37ºC durante la noche en una placa de agar medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). Las colonias individuales resultantes se cultivaron durante la noche en 3 ml de medio LB (GIBCO) que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el extracto automático de plásmidos PI-100 (KURABO).

La secuencia de bases del ADN insertado en el plásmido se secuenció mediante el método del pigmento-terminador. Lo anterior confirmó la inserción con éxito del polinucleótido ORF-US2 tal como se pretendía. Se obtuvieron pET-E1-His, pET-E2-His y pET-E3-His. En el presente ejemplo se determinó la secuencia de ADN utilizando el secuenciador de ADN ABI3700 (Applied Biosystems).

(2) Expresión y purificación por afinidad de cada polipéptido enzima recombinante etiquetado con His en *Escherichia coli*

(2-1) Producción de *Escherichia coli* BL21 transformante

Mediante la utilización del plásmido pET-E1-His, pET-E2-His, pET-E3-His para expresar el polipéptido enzima etiquetado con His, se transformaron cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen) utilizando un método general.

Los transformantes se cultivaron a 37ºC durante la noche en placas de agar medio LB (GIBCO) que contenían ampicilina (50 µg/ml), obteniendo de esta manera colonias individuales.

(2-2) Purificación de los polipéptidos enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His

(2-2-1) Cultivo de *Escherichia coli* e inducción de la expresión de los polipéptidos enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His

Cada uno de los transformantes de *E. coli* BL21 (DE3), transformados respectivamente con pET-E1-His y pET-E2-His, se cultivó durante la noche a 37ºC en 10 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se precultivaron 7,5 ml del cultivo durante 2 horas (hasta que la DO a 600 nm alcanzase aproximadamente 0,5) mediante la adición de 150 ml de medio líquido LB que contenía la misma concentración de ampicilina. Tras ajustar la concentración final a 0,5 mM mediante la adición de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), el cultivo se incubó adicionalmente a 30ºC durante 4 horas, bajo agitación suave, induciendo de esta manera la expresión de los polipéptidos enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His en *Escherichia coli*.

(2-2-2) Preparación del lisado

Tras la inducción de la expresión en (2-2), el cultivo se centrifugó (6.000 rpm, 4ºC, 10 minutos) utilizando un Avanti HP25 (Beckman Coulter) para recolectar las células, obteniendo de esta manear polipéptidos enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His expresados en *Escherichia coli*, en cantidades de 0,66 g y 0,73 g, respectivamente. Se añadió una solución de extracción de proteínas Bugbuster (Novagen) a las células obtenidas en una cantidad de 15 ml por gramo (peso húmedo) de célula. La mezcla se suspendió suavemente con una pipeta y se añadió lisozima (Sigma) y benzonasa (Novagen) a la suspensión en cantidades de 2.000 unidades/ml y 25 unidades (1 µl)/ml, respectivamente. A continuación, la mezcla se agitó lentamente con un agitador (RT-50: Taitec) a temperatura ambiente durante 30 minutos, obteniendo de esta manera un lisado (lisado A). El lisado A se centrifugó (8.000 rpm, 4ºC, 15 minutos) con un Avanti HP25 (Beckman Coulter) para separar el sobrenadante (lisado B).

(2-2-3) Purificación por afinidad de los polipéptidos enzimas E1 y E2 etiquetados con His

Mediante la utilización de His GraviTrap (GE Healthcare Bioscience) como columna de purificación de proteínas etiquetadas con His, se llevó a cabo la purificación por afinidad de los polipéptidos enzimas E1 y E2 etiquetados con His siguiendo el manual de instrucciones, excepto por alguna modificación. Más concretamente, se equilibró la columna His GraviTrap con 10 ml de tampón de unión enfriado con hielo, y se vertió la totalidad del lisado B preparado en (2-2-2) en la mezcla de manera que los enzimas E1 o E2 diana etiquetados con His se adhiriesen a His GraviTrap mediante caída libre. A continuación, se lavó dos veces la columna His GraviTrap con 10 ml de tampón de lavado enfriado con hielo, seguido de la elución de los enzimas E1 y E2 diana etiquetados con His procedentes de la columna His GraviTrap, utilizando 3 ml de tampón de elución. Se añadió DTT (ditiotreitol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al eluido de manera que la concentración final fuese de 3 mM. Se dividió la mezcla en microtubos de 300 µl. Se examinó una parte de los microtubos para sus actividades enzimáticas de E1 y de E2 en los eluidos respectivos. El eluido se conservó a 4ºC hasta su utilización para el ensayo enzimático.

Las composiciones del tampón de unión, tampón de lavado y tampón de elución utilizados para la purificación se muestran a continuación:

tampón de unión: Tris-HCl 20 mM, imidazol 20 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), NaCl 0,5 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), DTT 1 mM (ditiotreitol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Tampón de lavado: Tris-HCl 20 mM, imidazol 60 mM, NaCl 0,5 M, DTT 1 mM (ditiotreitol), PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

Tampón de elución: Tris-HCl 20 mM, imidazol 500 mM, NaCl 0,5 M, DTT 1 mM (ditiotreitol), PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

(2-3) Purificación de polipéptido enzima E3 recombinante etiquetado con His

(2-3-1) Cultivo de *Escherichia coli* e inducción de la expresión de polipéptido enzima E3 recombinante etiquetado con His

El transformante de *E. coli* BL21 (DE3), transformado con pET-E3-His, se cultivó durante la noche a 37ºC en 50 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina (50 µg/ml). A continuación, se precultivaron 20 ml del cultivo durante 3 horas (hasta que la DO a 600 nm alcanzase aproximadamente 0,4) mediante la adición de 1 l de medio líquido LB que contenía la misma concentración de ampicilina. Tras ajustar la concentración final a 0,5 mM mediante la adición de IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), el cultivo se incubó adicionalmente

a 37ºC durante 4 horas, bajo agitación, induciendo de esta manera la expresión del polipéptido enzima E3 recombinante etiquetado con His en *Escherichia coli*. Tras la inducción de la expresión, el cultivo se centrifugó (6.000 rpm, 4ºC, 10 minutos) utilizando un Avanti HP25 (Beckman Coulter) para recolectar las células. Para generar una suspensión se añadió tampón de fosfato potásico 0,1 M que contenía PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), DTT 2 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e hidrosulfito sódico 5 mM (en adelante "tampón A", pH 7,0). Tras la centrifugación (6.000 rpm, 4ºC, 10 minutos), se mantuvo el cultivo a -80ºC.

(2-3-2) Preparación del lisado

Las células conservadas a -80ºC se descongelaron rápidamente y se centrifugaron (10.000xg, 15 minutos). Las células se suspendieron mediante la adición de 25 ml de nuevo tampón A. Para el lisado, las células se lisaron mediante tres ciclos repetidos de 6.500 rpm durante 20 segundos y enfriamiento con hielo durante 3 minutos utilizando FastPrep® (Thermo Electron Corporation). El material celular lisado resultante se centrifugó (10.000 xg, 15 minutos). Se separó el sobrenadante para obtener un lisado.

(2-3-3) Purificación por afinidad del polipéptido enzima E3 recombinante etiquetado con His

Se suministraron 4 ml del lisado obtenido en (2-3-3) a una columna HisTrap HP (GE Healthcare Bioscience), que es una columna de purificación de proteínas de fusión a etiquetas His, con el fin de purificar el polipéptido enzima E3 recombinante etiquetado con His, bajo las condiciones de purificación indicadas posteriormente. Se midieron las proteínas basándose en la absorbancia a 280 nm. El fraccionamiento utilizando un recolector de fracciones se inició tras reducirse la absorbancia a 280 nm de la fracción eluida hasta la línea base.

Caudal: 1 ml/min.
Fracción: 2 ml/2 minutos/fracción.
Eluyente A: tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7)/NaCl 0,5 M/isoPrOH al 1%.
Eluyente B: eluyente A que contiene imidazol 0,5 M.

Programa de elución:

Tiempo (minutos)	(Eluyente B)/(Eluyente A + Eluyente B)
0	0,05
5	0,05
25	0,5
30	1
35	1
37	0,05

Se observó la actividad de síntesis de E3 en las fracciones nº 7 a nº 9. Las fracciones activas obtenidas mediante una pluralidad de purificaciones se agruparon, se mezclaron con glicerina en una proporción de 8%, se reservaron a -28ºC y se disolvieron según se requiriese para su utilización experimental.

Ejemplo D2: síntesis de tetrahidrodaidzeína a partir de daidzeína utilizando los enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His

Mediante la utilización de los enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His obtenidos en el procedimiento (2-2-3) del Ejemplo D1 como fuente de enzima, se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente, y se hizo reaccionar a 37ºC durante 2 horas con el fin de sintetizar tetrahidrodaidzeína a partir de daidzeína. Además, las reacciones utilizando el enzima E1 o E2 recombinante etiquetado con His individualmente como fuente de enzima se llevaron a cabo simultáneamente.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Enzima E1 recombinante etiquetado con His:	20 µl
Enzima E2 recombinante etiquetado con His:	20 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Daidzeína (2 mg/ml):	5 µl
Tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7/PMSF	1 mM/
DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM:	915 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a la mezcla de reacción enzimática obtenida, para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de *cis*-tetrahidrodaidzeínas y *trans*-tetrahidrodaidzeínas en la mezcla de reacción enzimática.

A modo de solución estándar para el análisis de HPLC se utilizó una solución mixta de daidzeína (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), ecuol (2 µg/ml, Funakoshi Corporation), dihidrodaidzeína (2 µg/ml, Trend Research Chemicals Inc.), *cis*-tetrahidrodaidzeína (2 µg/ml, Ejemplo de referencia B1) y *trans*-tetrahidrodaidzeína (2 µg/ml, Ejemplo de referencia B1).

La figura 23 muestra los resultados del análisis de HPLC. Al utilizar la mezcla de enzimas E1 y E2 recombinantes etiquetados con His como fuente de enzima, se confirmó la presencia de *cis*-tetrahidrodaizeínas y *trans*-tetrahidrodaidzeínas en el producto. Sin embargo, al utilizar el enzima E1 o E2 recombinante etiquetado con His individualmente como fuente de enzima, no se confirmaron *cis*-tetrahidrodaidzeínas o *trans*-tetrahidrodaidzeínas en el producto.

Ejemplo D3: síntesis de ecuol a partir de dihidrodaidzeína utilizando los enzimas E2 y E3 recombinantes etiquetados con His

Mediante la utilización de los enzimas E2 y E2 recombinantes etiquetados con His obtenidos en los procedimientos (2-2-3) y (2-3-3) del Ejemplo D1 como fuente de enzima, se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente, y se hizo reaccionar a 37ºC durante 2 horas para sintetizar ecuol a partir de dihidrodaidzeína. Además, se llevaron a cabo simultáneamente reacciones con el enzima E1 o E2 recombinante etiquetado con His individualmente a modo de fuente de enzima.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Enzima E2 recombinante etiquetado con His:	20 µl
Enzima E3 recombinante etiquetado con His:	20 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Dihidrodaidzeína (2 mg/ml):	5 µl
Tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7/PMSF	1 mM/
DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM:	915 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a la mezcla de reacción enzimática obtenida, para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de ecuol en la mezcla de reacción enzimática.

La figura 24 muestra los resultados del análisis de HPLC. Al utilizar la mezcla de enzimas E2 y E3 recombinantes etiquetados con His como fuente de enzima, se confirmó la presencia de ecuol en el producto. Sin embargo, al utilizar el enzima E2 o E3 recombinante etiquetado con His individualmente como fuente de enzima, no se confirmó la presencia de ecuol en el producto.

Ejemplo D4: síntesis de ecuol a partir de daidzeína utilizando los enzimas E1, E2 y E3 recombinantes etiquetados con His

Mediante la utilización de los enzimas E1, E2 y E3 recombinantes etiquetados con His en los procedimientos (2-2-3) y (2-3-3) del Ejemplo D1 como fuente de enzima, se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente, y se hizo reaccionar a 37ºC durante 2 horas para sintetizar ecuol a partir de daidzeína. Además, se llevaron a cabo simultáneamente reacciones con el enzima E1, E2 o E3 recombinante etiquetado con His individualmente a modo de fuente de enzima.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Enzima E1recombinante etiquetado con His:	20 µl
Enzima E2 recombinante etiquetado con His:	20 µl
Enzima E3 recombinante etiquetado con His:	20 µl
NADH (100 mM):	20 µl
NADPH (100 mM):	20 µl
Dihidrodaidzeína (2 mg/ml):	5 µl
Tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7/PMSF	1 mM/
DTT 2 mM/hidrosulfito sódico 5 mM:	895 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a la mezcla de reacción enzimática obtenida, para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de ecuol en la mezcla de reacción

enzimática.

La figura 25 muestra los resultados del análisis de HPLC. Al utilizar el enzima E1, E2 o E3 recombinante etiquetado con His individualmente como fuente de enzima, no se confirmó la presencia de ecuol en el producto. Sin embargo, al utilizar la mezcla de los enzimas E1, E2 y E3 recombinantes etiquetados con His como fuente de enzima, se confirmó la presencia de ecuol en el producto.

Ejemplo E: influencia de los iones metálicos sobre la actividad de síntesis de dihidrodaidzeína del enzima E1 recombinante etiquetado con His

Mediante la utilización del enzima E1 recombinante etiquetado con His (E1-His) expresado en *Escherichia coli*, purificado mediante Ni-sefarosa, como fuente de enzima, se examinó la influencia de los iones metálicos sobre la actividad de conversión de daidzeína en dihidrodaidzeína. Se disolvieron diversos metales ($MnCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$) en agua destilada para obtener una concentración de 100 mM. Mediante la utilización de una solución de iones metálicos, se preparó una mezcla de reacción enzimática con la composición indicada posteriormente y se hizo reaccionar a 37ºC durante 2 horas para medir la actividad.

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Enzima E1 recombinante etiquetado con His:	20 µl
NADH (100 mM):	10 µl
NADPH (100 mM):	10 µl
Daidzeína (1 mg/ml):	10 µl
Solución de iones metálicos:	100 µl
KPB-DH 0,2 M:	850 µl
Total:	1.000 µl

Tras la incubación, se añadieron 3 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción enzimática obtenida, para la extracción. Tras el secado, el extracto se disolvió en la fase móvil (eluyente). El producto disuelto se analizó mediante HPLC para medir el contenido de daidzeína y dihidrodaidzeína en la mezcla de reacción enzimática. Como resultado, se confirmó que Mn^{2+} y Fe^{2+} estimulaban la actividad (figura 26).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo A1. Los tres cromatogramas superiores: productos de reacción enzimática sin utilización de coenzima (control), y NADH y NADPH como coenzimas. Gráfico de columnas: las áreas de los picos corresponden a la dihidrodaidzeína en el control (sin coenzima) y en muestras utilizando NADH y NADPH como coenzimas.

La figura 2 muestra los resultados de la HPLC MonoQ del Ejemplo A2 (parte superior) y la actividad del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína de cada fracción (parte inferior). La actividad enzimática se muestra como el área del pico correspondiente a la dihidrodaidzeína utilizando la daidzeína como sustrato.

La figura 3 muestra los resultados de la SDS-PAGE del Ejemplo A2 (parte izquierda) y la actividad del enzima de síntesis de dihidrodaidzeína de cada fracción (parte derecha). Se muestra la actividad enzimática como área del pico correspondiente a la dihidrodaidzeína utilizando la daidzeína como sustrato. Se utilizó SuperSep HG 10-20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como placa de gel de electroforesis.

La figura 4 muestra los resultados del mapeado de péptidos del Ejemplo A4 y las secuencias de aminoácidos de los péptidos correspondientes a los picos. Los números junto a las flechas ▼ en el gráfico superior de análisis de HPLC corresponden a 1: FDEPVYPQAE, 2: ASRMVMDAVHEGYTAG, y 3: GYIGNLEVENRAIRMPM, respectivamente.

La figura 5 muestra los resultados de la electroforesis de agarosa del producto de PCR degenerada del Ejemplo A5. (1) E1-N-terminal-31 y E1-interno-RP1, (2) E1-N-terminal-37 y E1-interna-RP1, (3) E1-N-terminal-F32 y E1-interno-RP1; marcador M1: λ/Styl, M2: escalera de 100 pb.

La figura 6 muestra los resultados de la electroforesis en agarosa del producto de RT-PCR del Ejemplo A7. Parte superior: dihidrodaidzeína sintasa; parte inferior: ARN ribosómico.

La figura 7 muestra los resultados de la SDS-PAGE del Ejemplo A8.

La figura 8 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo A8. Parte superior: control; parte intermedia: pET-E1-His; parte inferior: pET21a.

La figura 9 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo B1. Gráfico superior: *cis*-tetrahidrodaidzeína (REF-000312); gráfico en parte intermedia: producto de reacción enzimática utilizando la dihidrodaidzeína como sustrato y el material de células lisadas como fuente de enzima; gráfico inferior: *trans*-tetrahidrodaidzeína (REF-000313).

La figura 10 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo B1. Los dos gráficos superiores: producto de reacción enzimática utilizando la *cis*-tetrahidrodaidzeína (REF-000312) como sustrato y el material de células lisadas como fuente de enzima; dos gráficos inferiores: producto de reacción enzimática utilizando la *trans*-tetrahidrodaidzeína (REF-000313) como sustrato y el material celular lisado como fuente de enzima.

La figura 11 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo B2. Los tres gráficos superiores: productos de reacción enzimática sin utilizar coenzima (control), y utilizando NADH y NADPH como coenzimas. Gráfico de columnas: las áreas de los picos corresponden a la tetrahidrodaidzeína de control (sin coenzima) y en muestras utilizando NADH y NADPH como coenzimas.

La figura 12 muestra los resultados del análisis de HPLC de filtración en gel del Ejemplo B3. Gráfico superior: los resultados para la proteína estándar; gráfico parte intermedia: actividad enzimática de cada fracción mostrada como el área de pico correspondiente al producto tetrahidrodaidzeína; gráfico inferior: nivel de absorbancia (280 nm) correspondiente a la proteína de cada fracción.

La figura 13 muestra los resultados de la SDS-PAGE del Ejemplo B3.

La figura 14 muestra los resultados de la SDS-PAGE del Ejemplo B4.

La figura 15 muestra una ilustración esquemática de una estructura genómica periférica del gen del enzima de síntesis (E1) de la dihidrodaidzeína determinado en el Ejemplo B5.

La figura 16-1 muestra datos del análisis de CL-EM y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de péptido digerido inferida a partir de los datos de CL-EM del Ejemplo B6; L, un residuo aminoácido indicado con una X en la descripción. La figura superior es para el péptido TPGVAASVADEXK y la figura inferior se refiere al péptido MPGAPVFGK.

La figura 16-2 muestra datos del análisis de CL-EM y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de un péptido digerido inferida a partir de datos de CL-EM del Ejemplo B6; L, un residuo aminoácido indicado por una X en la descripción. La figura superior se refiere al péptido KXXXTGTTK y la figura inferior se refiere al péptido VTQEXXCAHGAFVCGSGR.

La figura 16-3 muestra datos del análisis de CL-EM y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de un péptido digerido (WXSPEESVGQR) inferida a partir de datos de CL-EM del Ejemplo B6, L, un residuo aminoácido indicado por X en la descripción.

La figura 17 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo B7. Gráficos parte superior izquierda: producto de reacción enzimática que utiliza dihidrodaidzeína como sustrato y una mezcla de reacción de expresión de polipéptido ORF-US2 como fuente de enzima (ORF-US2); gráficos parte superior derecha: producto de reacción enzimática utilizando una mezcla de reacción sin proteínas como fuente de enzima (NC). Gráfico de columnas: las áreas de los picos corresponden a la dihidrodaidzeína (DD) y tetrahidrodaidzeína (THD) producidas mediante reacciones enzimáticas en NC (sin síntesis de proteínas) y en muestras utilizando DHFR (mezcla de reacción que expresa dihidrofolato reductasa) y ORF-US2 (mezcla de reacción que expresa polipéptido ORF-US2) como fuente de enzima.

La figura 18 muestra los resultados del SDS-PAGE del Ejemplo B8.

La figura 19 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo B8. Gráfico superior: producto de reacción enzimática que utiliza dihidrodaidzeína como sustrato y una suspensión de células lisadas derivada del transformante de plásmido pET21-US2 que expresa polipéptido recombinante ORF-US2 como fuente de enzima (pET21-US2); gráfico inferior: producto de reacción enzimática que utiliza dihidrodaidzeína como sustrato y una suspensión de células lisadas derivada del transformante de pET21a (control negativo) como fuente de enzima (pET21a). Gráfico de columnas: las áreas de los picos correspondientes a dihidrodaidzeína (DD) y a *cis*-tetrahidrodaidzeínas (c-THD) y a *trans*-tetrahidrodaidzeínas (t-THD) producidas mediante reacciones enzimáticas en muestras utilizando suspensiones de células lisadas derivadas de mezcla de reacción que expresa polipéptido ORF-US2 y transformante de pET21a como fuente de enzima.

La figura 20 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo C1.

La figura 21 muestra los resultados del SDS-PAGE del Ejemplo C2.

La figura 22 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo C3. Parte superior: estándar; parte intermedia: pET-US3; parte inferior: pET21a.

La figura 23 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo D2. En primer lugar desde la parte superior: estándar; en segundo lugar: E1 y E2; en tercer lugar: E1; en cuarto lugar: E2.

La figura 24 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo D3. En primer lugar desde la parte superior: estándar; en segundo lugar: E2 y E3; en tercer lugar: E2; en cuarto lugar: E3.

La figura 25 muestra los resultados del análisis de HPLC del Ejemplo D4. En primer lugar desde la parte superior: estándar; en segundo lugar: E1, E2 y E3; en tercer lugar: E1; en cuarto lugar: E2; en quinto lugar: E3.

La figura 26 muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad del enzima E1.

La figura 27 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1, nº 2 y nº 3.

La figura 28 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9.

La figura 29 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15.

Listado de secuencias-texto libre

SEC ID nº 23 es la secuencia de bases del cebador E1-N-terminal-31.
SEC ID nº 24 es la secuencia de bases del cebador E1-N-terminal-37.
SEC ID nº 25 es la secuencia de bases del cebador E1-N-terminal-F32.
SEC ID nº 26 es la secuencia de bases del cebador E1-interno-RP1.
SEC ID nº 27 es la secuencia de bases del cebador pUC19-FP-1.
SEC ID nº 28 es la secuencia de bases del cebador pUC19-RP-1.
SEC ID nº 29 es la secuencia de bases del cebador pUC19-FP-2.
SEC ID nº 30 es la secuencia de bases del cebador pUC19-RP-2.
SEC ID nº 31 es la secuencia de bases del cebador E1-RACE-N-P1.
SEC ID nº 32 es la secuencia de bases del cebador E1-RACE-RP2-1.
SEC ID nº 33 es la secuencia de bases del cebador E1-RACE-N-P2.
SEC ID nº 34 es la secuencia de bases del cebador E1-RACE-RP2-2.
SEC ID nº 35 es la secuencia de bases del cebador E1-conf-NP.
SEC ID nº 36 es la secuencia de bases del cebador E1-conf-CP.
SEC ID nº 37 es la secuencia de bases del cebador E1-FP.
SEC ID nº 38 es la secuencia de bases del cebador E1-RP.
SEC ID nº 39 es la secuencia de bases del cebador Gar-16S-Ribo-FP.
SEC ID nº 40 es la secuencia de bases del cebador Gar-16S-Ribo-RP.
SEC ID nº 41 es la secuencia de bases del cebador exp.E1 pet F Nde.
SEC ID nº 42 es la secuencia de bases del cebador exp.E1 pet His.
SEC ID nº 43 es la secuencia de bases del cebador RACE-N-P3-1.
SEC ID nº 44 es la secuencia de bases del cebador RACE-N-P3-2.
SEC ID nº 45 es la secuencia de bases del cebador E1-Bub-N-P1.
SEC ID nº 46 es la secuencia de bases del cebador E1-Bub-N-P2.
SEC ID nº 47 es la secuencia de bases del cebador RACE-C-P3-1.
SEC ID nº 48 es la secuencia de bases del cebador RACE-C-P3-2.
SEC ID nº 49 es la secuencia de bases del cebador E1-Bub-C-P1.
SEC ID nº 50 es la secuencia de bases del cebador E1-Bub-C-P2.
SEC ID nº 57 es la secuencia de bases del cebador E2-invitroTS-FP.
SEC ID nº 58 es la secuencia de bases del cebador E2-invitroTS-RP.
SEC ID nº 59 es la secuencia de bases del cebador Cebador Universal.
SEC ID nº 60 es la secuencia de bases del cebador exp.US2 pet F Nde.
SEC ID nº 61 es la secuencia de bases del cebador exp.US2 pet.
SEC ID nº 62 es la secuencia de bases del cebador exp.US3 F.
SEC ID nº 63 es la secuencia de bases del cebador exp.US3 R.
SEC ID nº 64 es la secuencia de bases del cebador exp.US1 F.
SEC ID nº 65 es la secuencia de bases del cebador exp.US1 R.
SEC ID nº 66 es la secuencia de bases del cebador exp.DS1 F.
SEC ID nº 67 es la secuencia de bases del cebador exp.DS1 R.

Listado de secuencias

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<120> Enzima involucrado en la síntesis de ecuol

<130> P08-130

<140> EP 08867315.7
<141> 2008-12-25

<150> JP2007-336227
<151> 2007-12-27

<150> JP2008-054874
<151> 2008-3-5

<150> JP2008-080570
<151> 2008-3-26

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 644
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<400> 1

```
Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly
1               5                   10                  15

Asn Leu Glu Val Glu Asn Arg Ala Ile Arg Met Pro Met Gly Thr Glu
            20                  25                  30

Leu Gly Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ser Trp Ala Ser Leu Lys Ala Tyr
        35                  40                  45

Ala Glu Ala Ala Asp Gly Gly Thr Gly Ile Val Phe Met Asp Asn Ala
    50                  55                  60

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

Tyr Ile Gly Pro Met Ser Val Leu Ala Lys Thr Ile Lys Gln His Gly
                85                  90                  95

Ala Ile Pro Gly Leu Gln Ile Val His Pro Gly Arg Asp Ala Ala Phe
            100                 105                 110

Val Arg Gly Asp Asp Leu Ile Ser Ser Ser Arg Ile Gln Trp Glu Pro
        115                 120                 125

Trp Tyr Glu Asn Gly Gly Ala Val Pro Arg Glu Leu Thr Ile Glu Glu
    130                 135                 140
```

Ile His Asp Phe Val Gly Tyr Phe Gly Asp Cys Ala Leu Arg Ala Gln
145 150 155 160

Thr Ala Gly Phe Glu Ile Val Asp Val His Ala Ala Cys Gly Val Leu
165 170 175

Leu Ser Asn Phe Leu Ser Pro Arg Asn Asn Thr Arg Asn Asp Met Tyr
180 185 190

Gly Gly Ser Leu His Asn Arg Ala Arg Phe Leu Leu Glu Val Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Lys Lys Lys Cys Pro Asn Leu Pro Leu Ala Ile Arg Leu Ser
210 215 220

Gly Ile Asp Phe Glu Pro Asp Gly Ile Thr Ile Glu Glu Thr Cys Glu
225 230 235 240

Val Ala Lys Met Cys Glu Ala Ala Gly Ala Asp Ala Ile Asn Ile Thr
245 250 255

Trp Gly Ser His Ala Glu Val Ile Asn Ala Ala Gly Leu Leu Ser Lys
260 265 270

His Gly Ala Asn His Val Glu Ala Ala Lys Met Ile Lys Asp Ala Val
275 280 285

Ser Ile Pro Thr Met Leu Cys Gly Gly Ile Tyr Ser Pro Glu Ile Gly
290 295 300

Glu Lys Leu Leu Glu Asp Gly Val Cys Asp Phe Ile Gly Ile Gly Lys
305 310 315 320

Pro Ala Leu Ala Asp Pro Met Trp Ala Lys Lys Ala Ala Glu Gly Arg
325 330 335

Pro Glu Asp Ile Arg Pro Cys Ile Gly Cys Gly Val Gly Cys His Asp
340 345 350

Arg Gly Met Leu Ser Gly Gly Val Val Gln Cys Ala Val Asn Ala Ala
355 360 365

Leu Tyr Lys Phe Asp Glu Pro Val Tyr Pro Gln Ala Glu Val Pro Lys
370 375 380

Lys Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Cys Glu Ala Ala Ile
385 390 395 400

Thr Ala Lys Lys Cys Gly His Asp Val Thr Ile Tyr Glu Lys Arg Lys
405 410 415

Ile Gly Gly Val Leu Lys Glu Ala Thr Val Ser Asp Ser Lys Glu Asp
420 425 430

Leu Gly Arg Leu Ile Thr Tyr Tyr Glu Thr Gln Leu Lys Lys Glu Gly
435 440 445

Ile Glu Val Ile Tyr Glu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Val Val Ala Gly
450 455 460

Gly Phe Asp Val Ala Ile Val Ala Cys Gly Ala Thr Val Arg Asn Leu
465 470 475 480

Asn Ile Asp Gly Gln Asp Asp Pro Ser Val Val Tyr Ala Met Asp Phe
485 490 495

Leu Asp Asn Asp Cys Lys Ser Asp Ala Asp Arg Val Val Val Val Gly
500 505 510

Gly Gly Ile Val Gly Ala Glu Thr Ala Leu Ile Leu Ala Glu Glu Arg
515 520 525

Gly Lys Asp Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Pro Glu Phe Phe Val Ser
530 535 540

Gly Val Met Gly Ile Ala Tyr Met Val Arg Leu Gly Met Ala Gly Val
545 550 555 560

Thr Ile Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Ala Val Lys Asp Gly Lys Pro
565 570 575

Met Phe Ala Gly Pro Arg Gly Leu Glu Thr Leu Asp Val Asp Gln Thr
580 585 590

Ile Ile Ser Ser Gly Phe Val Pro Thr Phe Asn Gln Phe Arg Ala Gln
595 600 605

Ile Glu Glu Lys Cys Glu Asp Val Arg Val Ile Gly Ile Gly Asp Cys
610 615 620

Lys Ala Ser Arg Met Val Met Asp Ala Val His Glu Gly Tyr Ile Ala
625 630 635 640

Gly Cys Asn Leu

<210> 2
<211> 644
<212> PRT
<213> Bacteroides ovatus

<400> 2

Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly
1 5 10 15

Asn Leu Glu Val Glu Asn Arg Ala Ile Arg Met Pro Met Gly Thr Glu
20 25 30

Leu Gly Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ser Trp Ala Ser Phe Lys Ala Tyr
35 40 45

Ala Glu Ala Ala Asp Gly Gly Thr Gly Ile Val Phe Met Asp Asn Ala
50 55 60

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

Tyr Ile Gly Pro Met Ser Val Leu Ala Lys Thr Ile Lys Gln His Gly
85 90 95

Ala Ile Pro Gly Leu Gln Ile Val His Pro Gly Arg Asp Ala Ala Phe
100 105 110

Val Arg Gly Asp Asp Leu Ile Ser Ser Ser Arg Ile Gln Trp Glu Pro
115 120 125

Trp Tyr Glu Asn Gly Gly Ala Val Pro Arg Glu Leu Thr Ile Glu Glu
130 135 140

Ile His Asp Phe Val Gly Tyr Phe Gly Asp Cys Ala Leu Arg Ala Gln
145 150 155 160

Thr Ala Gly Phe Glu Ile Val Asp Val His Ala Ala Cys Gly Val Leu
165 170 175

Leu Ser Asn Phe Leu Ser Pro Arg Asn Asn Thr Arg Asn Asp Met Tyr
180 185 190

Gly Gly Ser Leu His Asn Arg Ala Arg Phe Leu Leu Glu Val Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Lys Lys Lys Cys Pro Asn Leu Pro Leu Ala Ile Arg Leu Ser
210 215 220

Gly Ile Asp Phe Glu Pro Asp Gly Ile Thr Ile Glu Glu Thr Cys Glu
225 230 235 240

Val Ala Lys Met Cys Glu Ala Ala Gly Ala Asp Ala Ile Asn Ile Thr
245 250 255

Trp Gly Ser His Ala Glu Val Ile Asn Ala Ala Gly Leu Leu Ser Lys
260 265 270

His Gly Ala Asn His Val Glu Ala Ala Lys Met Ile Lys Asp Ala Val
275 280 285

Ser Ile Pro Thr Met Leu Cys Gly Gly Ile Tyr Ser Pro Glu Ile Gly
290 295 300

Glu Lys Leu Leu Glu Asp Gly Val Cys Asp Phe Ile Gly Ile Gly Lys
305 310 315 320

Pro Ala Leu Ala Asp Pro Met Trp Ala Lys Lys Ala Ala Glu Gly Arg
325 330 335

Pro Glu Asp Ile Arg Pro Cys Ile Gly Cys Gly Val Gly Cys His Asp
340 345 350

Arg Gly Met Leu Ser Gly Gly Val Val Gln Cys Ala Val Asn Ala Ala
355 360 365

Leu Tyr Lys Phe Asp Glu Pro Val Tyr Pro Gln Ala Glu Val Pro Lys
370 375 380

Lys Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Cys Glu Ala Ala Ile
385 390 395 400

Thr Ala Lys Lys Cys Gly His Asp Val Thr Ile Tyr Glu Lys Arg Lys
405 410 415

Ile Gly Gly Val Leu Lys Glu Ala Thr Val Ser Asp Ser Lys Glu Asp
420 425 430

Leu Gly Arg Leu Ile Thr Tyr Tyr Glu Thr Gln Leu Lys Lys Glu Gly
435 440 445

Ile Glu Val Ile Tyr Glu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Val Val Ala Gly
450 455 460

Gly Phe Asp Val Ala Ile Val Ala Cys Gly Ala Thr Val Arg Asn Leu
465 470 475 480

Asn Ile Asp Gly Gln Asp Asp Pro Ser Val Val Tyr Ala Met Asp Phe
485 490 495

Leu Asp Asn Asp Cys Lys Ser Asp Ala Asp Arg Val Val Val Val Gly
500 505 510

Gly Gly Ile Val Gly Ala Glu Thr Ala Leu Ile Leu Ala Glu Glu Arg
515 520 525

Gly Lys Asp Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Pro Glu Phe Phe Val Pro
530 535 540

Gly Val Met Gly Ile Ala Tyr Met Val Arg Leu Gly Met Ala Gly Val
545 550 555 560

Thr Ile Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Ala Val Lys Asp Gly Lys Pro
565 570 575

Met Phe Ala Gly Pro Arg Gly Leu Glu Thr Leu Asp Val Asp Gln Thr
580 585 590

Ile Ile Ser Ser Gly Phe Val Pro Thr Phe Asn Gln Phe Arg Ala Gln
595 600 605

Ile Glu Glu Lys Cys Glu Asp Val Arg Val Ile Gly Ile Gly Asp Cys
610 615 620

Lys Ala Ser Arg Met Val Met Asp Ala Val His Glu Gly Tyr Leu Ala
625 630 635 640

Gly Cys Asn Leu

<210> 3
<211> 644
<212> PRT
<213> Streptococcus constellatus

<400> 3

Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly
1 5 10 15

Asn Leu Glu Val Glu Asn Arg Ala Ile Arg Met Pro Met Gly Thr Glu
20 25 30

Leu Gly Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ser Trp Ala Ser Leu Lys Ala Tyr
35 40 45

Ala Glu Ala Ala Asp Gly Gly Thr Gly Ile Val Phe Met Asp Asn Ala
50 55 60

Gly Val Thr Gln Phe His His Val Gly Leu Ser Leu Ala Ser Asp Lys
65 70 75 80

Tyr Ile Gly Pro Met Ser Val Leu Ala Lys Thr Ile Lys Gln His Gly
85 90 95

Ala Ile Pro Gly Leu Gln Ile Val His Pro Gly Arg Asp Ala Ala Phe
100 105 110

Val Arg Gly Asp Asp Leu Ile Ser Ser Ser Arg Ile Gln Trp Glu Pro
115 120 125

Trp Tyr Glu Asn Gly Gly Ala Val Pro Arg Glu Leu Thr Ile Glu Glu
130 135 140

Ile His Asp Phe Val Gly Tyr Phe Gly Asp Cys Ala Leu Arg Ala Gln
145 150 155 160

Thr Ala Gly Phe Glu Ile Ile Asp Val His Ala Ala Cys Gly Val Leu
165 170 175

Leu Ser Asn Phe Leu Ser Pro Arg Asn Asn Thr Arg Asn Asp Met Tyr
180 185 190

Gly Gly Ser Leu His Asn Arg Ala Arg Phe Leu Leu Glu Val Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Lys Lys Lys Cys Pro Asn Leu Pro Leu Ala Ile Arg Leu Ser
210 215 220

Gly Ile Asp Phe Glu Pro Gly Gly Ile Thr Val Glu Glu Thr Cys Glu
225 230 235 240

Val Ala Lys Met Cys Glu Ala Ala Gly Ala Asp Ala Ile Asn Ile Thr
245 250 255

Trp Gly Ser His Ala Glu Val Ile Asn Ala Ala Gly Leu Leu Ser Lys
260 265 270

His Gly Ala Asn His Val Glu Ala Ala Lys Met Ile Lys Asp Ala Val
275 280 285

Ser Ile Pro Thr Met Leu Cys Gly Gly Ile Tyr Ser Pro Glu Ile Gly
290 295 300

Glu Lys Leu Leu Glu Asp Gly Val Cys Asp Phe Ile Gly Ile Gly Lys
305 310 315 320

Pro Ala Leu Ala Asp Pro Met Trp Ala Lys Lys Ala Ala Glu Gly Arg
325 330 335

Pro Glu Asp Ile Arg Pro Cys Ile Gly Cys Gly Val Gly Cys His Asp
340 345 350

Arg Gly Met Leu Ser Gly Gly Val Val Gln Cys Ala Val Asn Ala Ala
355 360 365

Leu Tyr Lys Phe Asp Glu Pro Val Tyr Pro Gln Ala Glu Val Pro Lys
370 375 380

Lys Val Ile Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly Cys Glu Ala Ala Ile
385 390 395 400

Thr Ala Lys Lys Cys Gly His Asp Val Thr Ile Tyr Glu Lys Arg Lys
405 410 415

Ile Gly Gly Val Leu Lys Glu Ala Thr Val Ser Asp Ser Lys Glu Asp
420 425 430

Leu Gly Tyr Leu Ile Thr Tyr Tyr Glu Thr Gln Leu Lys Lys Glu Gly
435 440 445

Ile Glu Val Ile Tyr Glu Glu Ala Thr Ala Ser Thr Val Ala Ala Gly
450 455 460

Gly Phe Asp Val Ala Ile Val Ala Cys Gly Ala Thr Val Arg Asn Leu
465 470 475 480

Asn Ile Asp Gly Gln Asp Asp Pro Ser Val Val Tyr Ala Met Asp Phe
485 490 495

Leu Asp Asn Asp Cys Lys Ser Asp Ala Asp Arg Val Val Val Val Gly
500 505 510

Gly Gly Ile Val Gly Ala Glu Thr Ala Leu Ile Leu Ala Glu Glu Gln
515 520 525

Gly Lys Asp Val Thr Ile Thr Thr Arg Ser Pro Glu Phe Phe Val Pro
530 535 540

Gly Val Met Gly Ile Ala Tyr Met Val Arg Leu Gly Met Ala Gly Val
545 550 555 560

Thr Ile Lys Pro Ser Thr Gln Leu Val Ala Val Lys Asp Gly Lys Pro
565 570 575

Met Phe Ala Gly Pro Arg Gly Leu Glu Thr Leu Asp Val Asp Gln Thr
580 585 590

Ile Ile Ser Ser Gly Phe Val Pro Thr Phe Asn Gln Phe Arg Ala Gln
595 600 605

Ile Glu Glu Lys Cys Glu Asp Val Arg Val Ile Gly Ile Gly Asp Cys
610 615 620

Lys Ala Ser Arg Met Val Met Asp Ala Val His Glu Gly Tyr Ile Ala
625 630 635 640

Gly Cys Asn Leu

<210> 4
<211> 1935
<212> ADN
<213> Lactococcus garvieae

<400> 4

atgaagaaca agttctatcc gaagaccttc gagcgcggct acatcggtaa cctagaggtc 60

gagaaccgag cgatccgcat gccgatgggc accgagctgg gcaacccgga cggctctccc 120

agctgggcct ccctcaaggc gtacgctgag gctgccgacg gtggaaccgg catcgtgttc 180

atggacaacg ccggcgtgac ccagttccac catgtcggac tgtccctggc cagcgacaac 240

tacatcggcc ccatgtccgt cctcgcaaag accatcaagc agcacggggc catccccggc 300

ctgcagatcg tccacccggg ccgcgacgcg gcgttcgtgc gcggtgacga cctgatctcc 360

```
tcttcccgca tccagtggga gccctggtac gagaacggcg gcgctgttcc ccgcgagctc    420
accatcgagg agatccacga cttcgtcggt tacttcggcg actgcgcact ccgcgcgcag    480
accgcgggct tcgaaatcgt cgacgtccac gcggcatgcg gcgtcctgct gagcaacttc    540
ctctcgccgc gcaacaacac ccgcaatgac atgtacggcg gaagcctgca caaccgcgcc    600
cgcttcctgc tcgaggtcat ccgcgacatc aagaagaagt gccccaacct cccgctggct    660
atccgactct ccggcatcga cttcgaaccg gacggcatca ccatcgagga gacctgcgag    720
gtcgccaaga tgtgcgaggc agccggtgcg gacgccatca acatcacctg gggttcccat    780
gcagaggtca taaacgcggc cggcctgctc tccaagcacg gcgccaacca cgtcgaggca    840
gcgaagatga tcaaggacgc tgttagcatc cccaccatgc tgtgcggcgg catctactcc    900
cccgagatcg gcgagaagct gctcgaggac ggcgtctgcg acttcatcgg catcggcaag    960
cccgcgctcg ccgaccccat gtgggccaag aaggcagctg aggggcgtcc tgaggacatc   1020
aggccctgca tcggttgcgg cgtcggctgc catgaccgcg gcatgctctc cggcggcgtc   1080
gtccagtgcg ccgtcaacgc ggccctgtac aagttcgacg aacccgtcta cccgcaggct   1140
gaggttccca agaaggtcat catcatcggc gcaggccccg ctggctgcga ggctgccatc   1200
accgcgaaga agtgcggcca tgacgtcacc atctacgaga agcgcaagat cggtggcgtt   1260
ctgaaggagg ctaccgtctc cgacagcaag gaggacctcg gccgcctcat cacctactac   1320
gagacccagc tcaagaagga gggcatcgag gtcatctacg aggaggccac tgcagacacc   1380
gttgtagccg gcggcttcga cgtcgccatc gtcgcctgcg gcgccaccgt gcgcaacctc   1440
aacatcgacg gccaggacga cccctccgtc gtgtacgcga tggacttcct ggacaacgac   1500
tgcaagagcg atgccgacag ggtcgtcgtt gtcggcggtg gcatcgtggg tgccgagacc   1560
gcgctgatcc tcgcggagga gcggggcaag gatgtcacca tcaccacccg ctccccggag   1620
ttcttcgtct ccggcgtcat gggcatcgcc tacatggttc gcctgggtat ggcgggagtc   1680
acgatcaagc cctccaccca gctcgtcgcc gtcaaggatg gcaagcccat gttcgccggc   1740
ccccgcggcc tggagaccct ggacgtcgac cagacaatca tctcctctgg cttcgtcccg   1800
accttcaacc agttccgcgc ccagatcgag gagaagtgcg aggacgtcag ggtcatcggc   1860
atcggcgact gcaaggcctc ccgcatggtc atggacgctg tccacgaggg ctacatcgct   1920
ggctgcaacc tgtag                                                    1935
```

<210> 5
<211> 1935
<212> ADN
<213> Bacteroides ovatus

<400> 5

```
atgaagaaca agttctatcc gaagaccttc gagcgcggct acatcggcaa cctagaggtc     60
gagaaccgag cgatccgcat gccgatgggc accgagctgg gcaacccgga cggctctccc    120
agctgggcct ccttcaaggc gtacgctgag gctgccgacg gtggaaccgg catcgtgttc    180
atggacaacg ccggcgtgac ccagttccac catgtcggac tgtccctggc cagcgacaac    240
tacatcggcc ccatgtccgt cctcgcaaag accatcaagc agcacggggc catccccggc    300
ctgcagatcg tccacccggg ccgcgacgcg gcgttcgtgc gcggtgacga cctgatctcc    360
tcttcccgca tccagtggga gccctggtac gagaacggcg gcgctgttcc ccgcgagctc    420
accatcgagg agatccacga cttcgtcggt tacttcggcg actgcgcact ccgcgcgcag    480
accgcgggct tcgaaatcgt cgacgtccac gcggcatgcg gcgtcctgct gagcaacttc    540
ctctcgccgc gcaacaacac ccgtaacgac atgtacggcg gaagcctgca caaccgcgcc    600
cgcttcctgc tcgaggtcat ccgcgacatc aagaagaagt gccccaacct cccgctggct    660
atccgactct ccggcatcga cttcgaaccg gacggcatca ccatcgagga gacctgcgag    720
gtcgccaaga tgtgcgaggc agccggtgcg gacgccatca acatcacctg gggttcccat    780
gcagaggtca taaacgcggc cggcctgctc tccaagcacg gcgccaacca cgtcgaggca    840
gcgaagatga tcaaggacgc tgttagcatc cccaccatgc tgtgcggcgg catctactcc    900
cccgagatcg gcgagaagct gctcgaggac ggcgtctgcg acttcatcgg catcggcaag    960
cccgcgctcg ccgaccccat gtgggccaag aaggcagctg aggggcgtcc tgaggacatc   1020
aggccctgca tcggttgcgg cgtcggctgc catgaccgcg gcatgctctc cggcggcgtc   1080
gtccagtgcg ccgtcaacgc ggccctgtac aagttcgacg aacccgtcta cccgcaggct   1140
gaggttccca agaaggtcat catcatcggc gcaggccccg ctggctgcga ggctgccatc   1200
accgcgaaga agtgcggcca tgacgtcacc atctacgaga agcgcaagat cggtggcgtt   1260
ctgaaggagg ctaccgtctc cgacagcaag gaggacctcg gccgcctcat cacctactac   1320
gagacccagc tcaagaagga gggcatcgag gtcatctacg aggaggccac tgcagacacc   1380
gttgtagccg gcggcttcga cgtcgccatc gtcgcctgcg gcgccaccgt gcgcaacctc   1440
aacatcgacg gccaggacga cccctccgtc gtgtacgcga tggacttcct ggacaacgac   1500
tgcaagagcg atgccgacag ggtcgtcgtt gtcggcggtg gcatcgtggg cgccgagacc   1560
gcgctgatcc tcgcggagga gcggggcaag gatgtcacca tcaccacccg ctccccggag   1620
ttcttcgtcc ccggcgtcat gggcatcgcc tacatggttc gcctgggtat ggcgggagtc   1680
acgatcaagc cctccaccca gctcgtcgcc gtcaaggacg gcaagcccat gttcgccggc   1740
ccccgcggcc tggagaccct ggacgtcgac cagacaatca tctcctctgg cttcgtcccg   1800
accttcaacc agttccgcgc ccagatcgag gagaagtgcg aggacgtcag ggtcatcggc   1860
atcggcgact gcaaggcctc ccgcatggtc atggacgctg tccacgaggg ctacctcgct   1920
ggctgcaacc tgtag                                                    1935
```

<210> 6
<211> 1935
<212> ADN
<213> Streptococcus constellatus

<400> 6

```
atgaaaaata agttctatcc gaagaccttc gagcgcggct acatcggtaa cctagaggtc      60
gagaaccgag cgatccgcat gccgatgggc accgagctgg gcaacccgga cggctctccc     120
agctgggcct ccctcaaggc gtacgccgag gctgccgacg gcggtaccgg catcgtgttc     180
atggacaacg ccggcgtgac ccagttccac catgtcggac tttccctggc cagcgacaag     240
tacatcggcc ccatgtccgt cctcgctaag accatcaagc agcacggggc catccccggc     300
ctgcagatcg tccatccggg ccgcgacgcg gcgttcgtgc gcggtgacga cctgatctcc     360
tcctcccgca tccagtggga gccctggtac gagaacggcg gcgctgttcc ccgcgagctc     420
accatcgagg agatccacga cttcgtcggt tacttcggcg actgcgcact ccgcgcgcag     480
accgcgggct tcgaaatcat cgacgtccac gcggcatgcg gcgtcctgct gagcaacttc     540
ctctcgccgc gcaacaacac ccgcaacgac atgtacggcg gaagcctgca caaccgcgct     600
cgcttcctgc tcgaggtcat ccgcgacatc aagaagaagt gccccaacct cccgctggct     660
atccgactct ccggcatcga tttcgagccg ggcggcatca ccgtcgagga gacctgcgag     720
gtcgccaaga tgtgcgaggc agccggtgcg gacgccatca acatcacctg gggttcccat     780
gcagaggtca tcaacgcggc cggcctgctc tccaagcacg gcgccaacca cgtcgaggca     840
gcgaagatga tcaaggacgc tgttagcatc cccaccatgc tgtgcggcgg catctactcc     900
cccgagatcg gcgagaagct gctcgaggac ggcgtctgcg acttcatcgg catcggcaag     960
ccagcgctcg ctgaccccat gtgggccaag aaggcggctg aggggcgtcc tgaggacatc    1020
aggccctgca tcggttgcgg cgtcggctgc catgaccgcg gcatgctctc cggcggcgtc    1080
gtccagtgcg ccgtcaacgc ggccctgtac aagttcgacg agcccgtcta cccgcaggct    1140
gaggttccca agaaggttat catcatcggc gcaggtcccg ctggctgcga ggctgccatc    1200
accgcgaaga agtgcggcca tgacgtcacc atatacgaga agcgcaagat cggcggcgtt    1260
ctgaaggagg ctaccgtctc cgacagcaag gaggacctcg gctacctcat cacctactac    1320
gagacccagc tcaagaagga gggcatcgag gtcatctacg aggaggccac tgcaagcacc    1380
gttgcagccg gcggcttcga cgtcgccatc gtcgcctgcg gcgccaccgt gcgcaacctc    1440
aacatcgacg gccaggacga cccctccgtc gtgtacgcga tggacttcct ggacaacgac    1500
tgtaagagcg acgccgacag ggtcgtcgtt gtcggcggcg gcatcgtggg tgccgagacc    1560
gcgctgatcc tcgcggagga gcagggcaag gacgtcacca tcactacccg ctccccggag    1620
ttcttcgtcc ccggcgtcat gggtatcgcc tacatggttc gccttggcat ggcgggcgtc    1680
acgatcaagc cctccaccca gctcgtcgcc gtcaaggacg gcaagcccat gttcgccggt    1740
ccccgcggcc tggagaccct ggacgtcgac cagaccatca tctcctctgg cttcgtcccg    1800
accttcaacc agttccgcgc ccagatcgag gagaagtgcg aggacgtcag ggtcatcggc    1860
atcggcgact gcaaggcctc ccgtatggtc atggacgctg tccacgaggg ctacatcgct    1920
ggctgcaacc tgtag                                                     1935
```

<210> 7
<211> 286
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<400> 7

Met Ala Gln Glu Val Lys Val Pro Lys Met Pro Gly Ala Pro Val Phe
1 5 10 15

Gly Lys Trp Ile Ser Pro Glu Glu Ser Val Gly Gln Arg Leu Lys Gly
20 25 30

Lys Lys Ile Leu Leu Thr Gly Thr Thr Lys Gly Val Gly Arg Val Thr
35 40 45

Gln Glu Leu Leu Cys Ala His Gly Ala Phe Val Cys Gly Ser Gly Arg
50 55 60

Thr Pro Gly Val Ala Ala Ser Val Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Gly
65 70 75 80

Tyr Gln Ala Ala Gly Met Asp Val Asp Leu Ser Asp Tyr Asp Ala Val
85 90 95

Lys Lys Trp Val Glu Glu Cys Ala Glu Leu Met Gly Gly Ile Asp Val
100 105 110

Val Ile Asn Asn Ala Ser His Pro Gly Met Ala Pro Phe Gly Glu Met
115 120 125

Thr Pro Glu Ile Trp Asn Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asp Leu Val
130 135 140

Tyr Asn Val Cys Asn Cys Ala Trp Pro Tyr Leu Gln Lys Ala Asp Gly
145 150 155 160

Ala Ser Ile Ile Ile Thr Ser Ser Thr Val Ala Leu Gln Gly Ser Asn
165 170 175

Ser Pro Gln Ala Cys His Ala Ala Cys Lys Gly Ala Cys Leu Ser Leu
180 185 190

Ala Arg Gln Leu Ala Ala Glu Gly Gly Pro Phe Gly Ile Arg Cys Asn
195 200 205

Ser Val Thr Pro Gly Leu Val Trp Thr Glu Ala Met Ser Asn Ile Pro
210 215 220

Lys Glu Met Ala Ser Gly Leu Val Ala Ala Gln Thr Thr Gln Gln Ala
225 230 235 240

Val Asp Pro Met Asp Ile Ala Tyr Ala Tyr Leu Phe Leu Ala Ser Asp
245 250 255

Glu Ser Arg Gln Ile Thr Ala Ala Asn Ile Pro Val Asp Gly Gly Cys
260 265 270

Ala Gly Ala Val Thr Gly Gly Met Gln Gly Glu Ile Glu Val
275 280 285

<210> 8
<211> 310
<212> PRT
<213> Bacteroides ovatus

<400> 8

```
Met Ser Pro His Phe Ala Ser Gln Arg Trp Ala Ala Lys Glu Asp Gly
1               5                   10                  15

Pro Arg Gln Gly Lys Glu Pro Thr Met Ala Gln Glu Val Lys Val Pro
            20                  25                  30

Lys Met Pro Gly Ala Pro Val Phe Gly Lys Trp Ile Ser Pro Glu Glu
        35                  40                  45

Ser Val Gly Gln Arg Leu Lys Gly Lys Lys Ile Leu Leu Thr Gly Thr
    50                  55                  60

Thr Lys Gly Val Gly Arg Val Thr Gln Glu Leu Leu Cys Ala His Gly
```

65 70 75 80

Ala Phe Val Cys Gly Ser Gly Arg Thr Pro Gly Val Ala Ala Ser Val
85 90 95

Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Gly Tyr Gln Ala Ala Gly Met Asp Val
100 105 110

Asp Leu Ser Asp Tyr Asp Ala Val Lys Lys Trp Val Glu Glu Cys Ala
115 120 125

Glu Leu Met Gly Gly Ile Asp Val Val Ile Asn Asn Ala Ser His Pro
130 135 140

Gly Met Ala Pro Phe Gly Glu Met Thr Pro Glu Ile Trp Asn Tyr Gly
145 150 155 160

Val Lys Asn Glu Leu Asp Leu Val Tyr Asn Val Cys Asn Cys Ala Trp
165 170 175

Pro Tyr Leu Gln Lys Ala Asp Gly Ala Ser Ile Ile Ile Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Val Gly Leu Gln Gly Ser Asn Ser Pro Gln Ala Cys His Ala Ala
195 200 205

Cys Lys Gly Ala Cys Leu Ser Leu Ala Arg Gln Leu Ala Ala Glu Gly
210 215 220

Gly Pro Phe Gly Ile Arg Cys Asn Ser Val Thr Pro Gly Leu Val Trp
225 230 235 240

Thr Glu Ala Met Ser Asn Ile Pro Lys Glu Met Ala Ser Gly Leu Val
245 250 255

Ala Ala Gln Thr Thr Gln Gln Ala Val Asp Pro Met Asp Ile Ala Tyr
260 265 270

Ala Tyr Leu Phe Leu Ala Ser Asp Glu Ser Arg Gln Ile Thr Ala Ala
275 280 285

Asn Ile Pro Val Asp Gly Gly Cys Ala Gly Ala Val Thr Gly Gly Met
290 295 300

Gln Gly Glu Ile Glu Val
305 310

<210> 9
<211> 287
<212> PRT
<213> Streptococcus constellatus

<400> 9

```
Met Ala Gln Glu Val Lys Cys Ala Lys Met Pro Gly Ala Pro Val Phe
1               5                   10                  15

Gly Lys Trp Ile Ser Pro Glu Glu Ser Ile Gly Gln Arg Leu Lys Gly
            20                  25                  30

Lys Lys Ile Ile Leu Thr Gly Thr Thr Lys Gly Val Gly Lys Val Thr
        35                  40                  45

Gln Glu Leu Leu Cys Ala His Gly Ala Phe Val Cys Gly Ser Gly Arg
    50                  55                  60

Thr Pro Gly Val Ala Ala Ser Val Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Ala Ala Gly Met Asp Val Asp Leu Ser Asp Tyr Glu Ala Val
                85                  90                  95

Lys Lys Trp Val Gln Glu Cys Ala Glu Leu Met Gly Gly Ile Asp Val
            100                 105                 110

Val Ile Asn Asn Ala Ser His Pro Gly Met Ala Pro Phe Glu Glu Met
        115                 120                 125

Thr Pro Glu Ile Trp Asn Tyr Gly Ile Lys Asn Glu Leu Asp Leu Val
    130                 135                 140

Tyr Asn Val Cys Asn Cys Ala Trp Pro Tyr Leu Lys Glu Ala Glu Gly
145                 150                 155                 160

Gly Ala Ser Ile Ile Ile Thr Ser Ser Thr Val Gly Leu Gln Gly Thr
                165                 170                 175

Asn Ser Pro Gln Ala Cys His Ala Ala Ala Lys Gly Ala Cys Leu Ser
            180                 185                 190

Leu Ala Arg Gln Leu Ala Ala Glu Gly Gly Pro Phe Gly Ile Arg Cys
        195                 200                 205

Asn Ser Val Thr Pro Gly Leu Val Trp Thr Glu Ala Met Ala Asn Ile
    210                 215                 220

Pro Lys Glu Met Ala Ser Gly Leu Val Gly Ala Gln Thr Thr Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ala Ile Asp Pro Met Asp Ile Ala Tyr Ala Tyr Leu Phe Leu Ala Ser
                245                 250                 255

Asp Glu Ala Arg Gln Ile Thr Ala Ala Asn Leu Pro Val Asp Gly Gly
            260                 265                 270

Cys Ala Gly Ala Val Thr Gly Gly Met Gln Gly Glu Ile Glu Gly
        275                 280                 285
```

<210> 10
<211> 861
<212> ADN
<213> Lactococcus garvieae

<400> 10

```
atggcacagg aagtcaaagt ccccaagatg cccggcgcac ccgtgttcgg caagtggatc     60
tcccccgagg agtccgtcgg ccagcgcctg aagggcaaga agatcctgct caccggcacc    120
accaagggcg tcggcagggt cacccaggag ctgctgtgcg cacacggcgc cttcgtctgc    180
ggctccggcc gcacccccgg cgtggcagcc tccgtcgccg acgagctgaa ggccaagggc    240
taccaggccg ccggcatgga cgtcgacctg tctgactacg acgccgtgaa gaagtgggtt    300
gaggagtgcg ccgagctcat gggcggcatc gacgtcgtca tcaacaacgc gtcccacccc    360
ggcatggccc ccttcggcga gatgaccccg gagatctgga actacggcat caagaacgag    420
ctcgacctcg tctacaacgt ctgcaactgc gcatggccct acctgcagaa ggcagacggc    480
gcctccatca tcatcacctc ctccaccgtc gccctccagg gcagcaactc ccctcaggcc    540
tgtcacgctg cctgcaaggg cgcctgcctg tccctggccc gccagctcgc cgctgagggc    600
ggccccttcg gcatccgctg caactccgtc accccgggcc tggtctggac cgaggccatg    660
tccaacatcc ccaaggagat ggcaagcggc ctggtcgcag cccagaccac ccagcaggct    720
gtcgacccga tggacatcgc ctacgcctac ctgttcctgg catccgacga gtcccgccag    780
atcaccgctg ccaacatccc cgtcgacggc ggctgcgccg gcgctgtgac cggcggcatg    840
cagggcgaga tcgaggtcta g                                              861
```

<210> 11
<211> 933
<212> ADN
<213> Bacteroides ovatus

<400> 11

```
atgagcccgc attttgcgag ccaaagatgg gctgcaaagg aagacggccc aagacaagga     60
aaggaaccaa ccatggcaca ggaagtcaaa gtccccaaga tgcccggcgc acccgtgttc    120
ggcaagtgga tctcccccga ggagtccgtc ggccagcgcc tgaagggcaa gaagatcctg    180
ctcaccggca ccaccaaggg cgtcggcagg gtcacccagg agctgctgtg cgcacacggc    240
gccttcgtct gcggctccgg ccgcaccccc ggcgtggcag cctccgtcgc cgacgagctg    300
aaggccaagg gctaccaggc cgccggcatg gacgtcgacc tgtctgacta cgacgccgtg    360
aagaagtggg ttgaggagtg cgccgagctc atgggcggca tcgacgtcgt catcaacaac    420
gcgtcccacc ccggcatggc ccccttcggc gagatgaccc cggagatctg gaactacggc    480
gtcaagaacg agctcgacct cgtctacaac gtctgcaact gcgcatggcc ctacctgcag    540
aaggcagacg gcgcctccat catcatcacc tcctccaccg tcggcctcca gggcagcaac    600
tcccctcagg cctgccacgc tgcctgcaag ggcgcctgcc tgtccctggc ccgccagctc    660
gccgctgagg gcggcccctt cggcatccgc tgcaactccg tcaccccggg cctggtctgg    720
accgaggcca tgtccaacat ccccaaggag atggcaagcg gcctggtcgc agcccagacc    780
acccagcagg ctgtcgaccc gatggacatc gcctacgcct acctgttcct ggcatccgac    840
gagtcccgcc agatcaccgc tgccaacatc cccgtcgacg gcggctgcgc cggcgctgtg    900
accggcggca tgcagggcga gatcgaggtc taa                                 933
```

<210> 12

<211> 864
<212> ADN
<213> Streptococcus constellatus

<400> 12

```
atggcacagg aagtcaaatg cgccaagatg cccggagcgc ccgtcttcgg caagtggatc     60
agccccgagg agtcgatcgg ccagcgcctc aagggcaaga agatcattct caccggcacc    120
actaagggcg tcggcaaggt cacccaagag ctgctgtgcg cccacggcgc cttcgtctgc    180
ggctccggtc gtacccccgg cgtggccgct tccgtggccg acgagctgaa ggccaagggc    240
taccaggccg ccggcatgga cgtcgacctg tccgactacg aggccgtgaa gaagtgggtc    300
caagagtgcg ccgagctcat gggcggcatc gacgtcgtca tcaacaacgc ctcccacccg    360
ggcatggccc ccttcgagga gatgaccccc gagatctgga actacggcat caagaacgag    420
ctcgacctgg tctacaacgt gtgcaactgc gcttggccgt acctgaagga agccgagggc    480
ggcgcttcca tcatcatcac ctcctccacc gtcggcctcc agggcaccaa ctccccgcag    540
gcctgccacg ccgccgccaa gggcgcatgc ctgtccctgg cccgccagct ggcagctgaa    600
ggcggcccct tcggcatccg ctgcaactcc gtcacccccg gcctggtgtg gaccgaggcc    660
atggccaaca tcccgaagga aatggcatcc ggcctggtcg gtgcgcagac cacccagcag    720
gctatcgacc ccatggacat cgcctacgct tacctcttcc tggcctccga tgaggctcgc    780
cagatcaccg cagcgaacct tcccgtcgac ggcggctgcg ccggcgctgt gaccggcggc    840
atgcagggcg agatcgaagg ctaa                                           864
```

<210> 13
<211> 486
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<400> 13

Met Ala Glu Phe Asp Val Glu Tyr Asp Leu Val Val Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ile Ala Ala Arg Glu Gly Lys Arg
20 25 30

Val Val Val Leu Glu Lys Met Pro Glu Thr Gly Gly Leu Ser Met Tyr
35 40 45

Ala Glu Gly Thr Ala Ala Phe Glu Ser Ser Ile Gln Asn Glu Leu Gly
50 55 60

Thr Pro Arg Leu Ser Lys Tyr His Phe Pro Thr Lys Gln Glu Gly Ile
65 70 75 80

Glu Lys Phe Met Gly Tyr Ser His Gln Arg Ala Asn Tyr Asp Val Val
85 90 95

Arg Ala Phe Val Glu Asn Ser Ala Glu Thr Ile Asp Ile Tyr Arg Asp
100 105 110

Leu Gly Val Val Tyr Lys Ala Cys Asp Ile Ala Ala Glu Asp Asp Pro
115 120 125

Asn Glu Val Trp Thr Phe His Leu Pro Glu Gly Leu Gly Ala His Cys
130 135 140

Gln Glu Val Leu Leu Asp Ala Ile Gln Lys Leu Asp Val Asp Ile Phe
145 150 155 160

Thr Ser Thr Pro Ala Lys Glu Leu Ile Ile Glu Asp Gly Ala Val Val
165 170 175

Gly Val Val Ala Glu Ser Asp Gly Glu Pro Leu Arg Val Gly Gly Lys
180 185 190

Ala Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Met Gly Ser Ser Pro Glu Arg Ile
195 200 205

Phe Lys Tyr Ser Trp Phe Ala Pro Ala Ala Tyr Asn Met Asn Thr Leu
210 215 220

Thr Pro Leu Gln Asn Val Gly Asp Gly Leu Asp Leu Ala Leu Ser Ala
225 230 235 240

Gly Ala Asp Pro Thr Tyr Ile Thr Thr Cys Pro Ile Leu Ala Ala Gly
245 250 255

Gly Arg Asp Met Thr Met Asp Ser Gln Val Gly Gly Ala Gly Val Asn
260 265 270

Pro Gly Val Trp Ile Asn Lys Thr Gly Arg Arg Phe Ala Ala Glu Ser
275 280 285

Val Ala Glu Asn Ile Gly Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Gly Lys Gln Pro
290 295 300

Gly Gly Val Val Trp Ser Ile Leu Ser Gln Ala Asp Ile Asp Arg Leu
305 310 315 320

Val Ala Glu Gly Ser Glu Ile Ala Ile Gly Glu Phe Val Val Tyr His
325 330 335

Lys Pro Met Glu Arg Leu Pro Ile Glu Leu Glu Ala His Leu Glu Ser
340 345 350

Gly Leu Val Lys Lys Ala Gly Ser Phe Glu Glu Leu Ala Ala Leu Ile
355 360 365

Asp Val Pro Val Asp Thr Phe Val Ala Thr Met Ala Asp Tyr Asn Glu
370 375 380

Ala Cys Glu Lys Gly Tyr Asp Asp Ala Phe Met Lys Lys Pro Gln Tyr
385 390 395 400

Leu Arg Pro Met Val Glu Gly Pro Phe Tyr Ala Ile Pro Leu Ala Thr
405 410 415

Gly Thr Met Gly Ser Ala Gly Gly Ile Arg Ile Asn Gly Asn Met Gln
420 425 430

Val Val Asp Ala Asp Tyr Asn Ala Ile Pro Gly Leu Tyr Ala Val Gly
435 440 445

Leu Asp Ala Thr Gly Leu Tyr Gly Asp Ser Tyr Asn Met Glu Val Pro
450 455 460

Gly Ala Ala Asn Gly Phe Ala His Thr Ser Gly Arg Ile Ala Ala Arg
465 470 475 480

His Ala Ile Ser Thr Met
485

<210> 14
<211> 486
<212> PRT
<213> Bacteroides ovatus

<400> 14

Met Ala Gln Phe Asp Val Glu Tyr Asp Leu Val Val Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ile Ala Ala Arg Glu Gly Lys Arg
20 25 30

Val Val Val Leu Glu Lys Met Pro Glu Thr Gly Gly Leu Ser Met Tyr
35 40 45

Ala Glu Gly Thr Ala Ala Phe Glu Ser Ser Ile Gln Asn Glu Leu Gly
50 55 60

Thr Pro Arg Leu Ser Lys Tyr His Phe Pro Thr Lys Gln Glu Gly Ile
65 70 75 80

Glu Lys Phe Met Gly Tyr Ser His Gln Arg Ala Asn Tyr Asp Val Val
85 90 95

Arg Ala Phe Val Glu Asn Ser Ala Glu Thr Ile Asp Ile Tyr Arg Asp
100 105 110

Leu Gly Val Val Tyr Lys Ala Cys Asp Ile Ala Ala Glu Asp Asp Pro
115 120 125

Asn Glu Val Trp Thr Phe His Leu Pro Glu Gly Leu Gly Ala His Cys
130 135 140

Gln Glu Val Leu Leu Asp Ala Ile Gln Lys Leu Asp Val Asp Ile Phe
145 150 155 160

Thr Ser Thr Pro Ala Lys Glu Leu Ile Ile Glu Glu Gly Ala Val Val
165 170 175

Gly Val Val Ala Glu Ser Asp Gly Glu Pro Leu Arg Val Gly Gly Lys
180 185 190

Ala Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Met Gly Ser Ser Pro Glu Arg Ile
195 200 205

Phe Lys Tyr Ser Trp Phe Ala Pro Ala Ala Tyr Asn Met Asn Thr Leu
210 215 220

Thr Pro Leu Gln Asn Val Gly Asp Gly Leu Asp Leu Ala Leu Ser Ala
225 230 235 240

Gly Ala Asp Pro Thr Tyr Ile Thr Thr Cys Pro Ile Leu Ala Ala Gly
245 250 255

Gly Arg Asp Met Thr Met Asp Ser Gln Val Gly Gly Ala Gly Val Asn
260 265 270

Pro Gly Val Trp Ile Asn Lys Thr Gly Arg Arg Phe Ala Ala Glu Ser
275 280 285

Val Ala Glu Asn Ile Gly Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Gly Lys Gln Pro
290 295 300

Gly Gly Val Val Trp Ser Ile Leu Ser Gln Ala Asp Ile Asp Arg Leu
305 310 315 320

Val Ala Glu Gly Ser Glu Ile Ala Ile Gly Glu Phe Val Val Tyr His
325 330 335

Lys Pro Met Glu Arg Leu Pro Ile Glu Leu Glu Ala His Leu Glu Ser
340 345 350

Gly Leu Val Lys Lys Ala Gly Ser Phe Glu Glu Leu Ala Ala Leu Ile
355 360 365

Asp Val Pro Val Asp Thr Phe Val Ala Thr Met Ala Asp Tyr Asn Glu
370 375 380

Ala Cys Glu Lys Gly Tyr Asp Asp Ala Phe Met Lys Lys Pro Gln Tyr
385 390 395 400

Leu Arg Pro Met Val Glu Gly Pro Phe Tyr Ala Ile Pro Leu Ala Thr
405 410 415

Gly Thr Met Gly Ser Ala Gly Gly Ile Arg Ile Asn Gly Asn Met Gln
420 425 430

Val Val Asp Ala Asp Tyr Asn Ala Ile Pro Gly Leu Tyr Ala Val Gly
435 440 445

Leu Asp Ala Thr Gly Leu Tyr Gly Asp Ser Tyr Asn Met Glu Val Pro
450 455 460

Gly Ala Ala Asn Gly Phe Ala His Thr Ser Gly Arg Ile Ala Ala Arg
465 470 475 480

His Ala Ile Ser Thr Met
485

<210> 15
<211> 487
<212> PRT
<213> Streptococcus constellatus

<400> 15

Met Ala Glu Phe Asp Val Glu Tyr Asp Leu Val Val Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ser Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ile Ala Ala Arg Ala Gly Lys Ser
20 25 30

Val Val Val Leu Glu Lys Met Pro Glu Thr Gly Gly Leu Ser Met Tyr
35 40 45

Ala Glu Gly Thr Ala Ala Phe Glu Ser Ser Ile Gln Lys Glu Leu Gly
50 55 60

Thr Pro Arg Leu Ser Lys Tyr His Phe Pro Thr Lys Gln Glu Gly Val
65 70 75 80

Glu Lys Phe Met Gly Tyr Ser His Gln Arg Ala Ser Tyr Asp Val Val
85 90 95

Arg Ala Phe Val Glu Asn Ser Ala Glu Thr Ile Asp Ile Tyr Arg Glu

100 105 110

Leu Gly Val Val Tyr Lys Thr Cys Asp Ile Ala Ala Glu Asp Asp Pro
115 120 125

Ser Glu Val Trp Thr Phe His Leu Pro Glu Gly Leu Gly Ala His Cys
130 135 140

Gln Glu Val Leu Leu Asp Ala Ile Gln Lys Leu Asp Val Asp Ile Phe
145 150 155 160

Thr Ser Thr Pro Ala Lys Glu Leu Ile Ile Glu Asp Gly Lys Val Val
165 170 175

Gly Val Val Ala Glu Ser Asp Gly Glu Pro Leu Arg Val Gly Gly Lys
180 185 190

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

Phe Lys Tyr Ser Trp Phe Ala Pro Ala Ala Tyr Asn Met Asn Val Leu
210 215 220

Thr Pro Leu Gln Asn Met Gly Asp Gly Leu Asp Leu Ala Leu Ser Ala
225 230 235 240

Gly Ala Asp Asp Thr Ala Ile Thr Thr Cys Pro Ile Leu Ala Ala Gly
245 250 255

Gly Arg Asp Met Thr Met Asp Ser Gln Val Gly Gly Ala Gly Val Asn
260 265 270

Pro Gly Val Trp Ile Asn Lys Ser Gly Lys Arg Phe Cys Ala Glu Ser
275 280 285

Val Ala Glu Asn Ile Gly Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Gly Lys Gln Pro
290 295 300

Gly Gly Ile Val Trp Ser Ile Leu Ser Gln Ala Asp Ile Asp Arg Leu
305 310 315 320

Val Asn Glu Gly Ser Glu Ile Ala Ile Gly Glu Phe Val Val Tyr His
325 330 335

Lys Pro Met Glu Arg Leu Pro Ile Glu Leu Asn Ala His Leu Glu Ser
340 345 350

Gly Leu Val Lys Lys Ala Asp Cys Phe Glu Glu Leu Ala Glu Lys Met
355 360 365

Asp Val Pro Ala Gly Ala Phe Val Asp Thr Met Asn Ala Tyr Asn Glu
370 375 380

Ala Cys Glu Lys Gly Tyr Asp Asp Ala Phe Met Lys Lys Pro Glu Tyr
385 390 395 400

Leu Arg Ala Glu Thr Gln Ala Pro Phe Tyr Ala Ile Pro Leu Ala Thr
405 410 415

Gly Thr Met Gly Ser Ala Gly Gly Ile Lys Ile Asn Gly Asn Met Gln
420 425 430

Val Ile Asp Ser Asp Ala Asn Pro Ile Pro Gly Leu Tyr Ala Val Gly
435 440 445

Leu Asp Ala Thr Gly Leu Tyr Gly Asp Ser Tyr Asn Met Glu Val Pro
450 455 460

Gly Ala Ala Asn Gly Phe Ala His Thr Ser Gly Arg Ile Ala Ala Arg
465 470 475 480

His Ala Leu Ser Thr Met Glu
485

<210> 16
<211> 1461
<212> ADN
<213> Lactococcus garvieae

<400> 16

atggcagaat tcgatgttga gtatgatctt gttgtcgttg gaggaggcgc ctctggaaag 60

tctgcagcgc tgatcgccgc ccgtgagggc aagcgcgtcg tggtgctcga gaagatgccc 120

gagaccggag gcctctccat gtacgccgaa ggcaccgctg ccttcgagtc ctctattcag 180

aacgagctcg gcaccccgcg tctttccaag taccacttcc cgaccaagca ggagggcatc 240

gagaagttca tgggctacag ccatcagcgc gcgaactacg acgtcgtccg cgctttcgtt 300

gagaactccg cagagaccat cgacatctac cgcgacctcg gcgtcgtcta caaggcctgc 360

gacatcgccg cagaggacga ccccaacgag gtctggacct tccatctgcc cgagggcctc 420

ggcgcccatt gccaggaagt cctgctcgac gccatccaga agctcgacgt cgacatcttc 480

acctccaccc ccgccaagga gctcatcatc gaggacggcg ctgtcgtcgg tgtcgtcgca 540

```
gagtctgacg gcgagcccct gcgcgtcggc ggcaaggccg ttatcctggc aaccggcggc    600
atgggctcca gcccggagcg catcttcaag tacagctggt tcgcccccgc tgcctacaac    660
atgaacaccc tcaccccgct gcagaacgtc ggcgacggcc tcgacctcgc cctctccgcg    720
ggcgcagacc ccacctacat caccacctgc ccgattctcg cagcaggcgg ccgtgacatg    780
accatggact cccaggtcgg cggcgcgggc gtcaaccccg gcgtgtggat caacaagacc    840
ggcaggcgct tcgcggccga gtccgttgcc gagaacatcg gcgacatcgg aacctactac    900
ggcaagcagc ccggcggcgt ggtctggtcc atcctctccc aggcggacat cgaccgtctg    960
gtggccgagg gttccgagat cgcgatcggc gagttcgtcg tgtaccacaa gccgatggag   1020
cgcctcccta tcgagctcga ggctcatctc gagtccggcc tggtgaagaa ggctggcagc   1080
ttcgaggagc tcgcagccct cattgacgtg cctgtagaca ccttcgtcgc aactatggcc   1140
gactacaacg aggcatgcga gaagggctac gacgacgcct ttatgaagaa gccccagtac   1200
ctccgcccga tggtcgaggg tcccttctat gccatccctc tggctaccgg caccatgggt   1260
tctgctggcg gcatccgcat taacggcaac atgcaggtcg tcgacgccga ctacaacgcc   1320
attcccggtc tctacgcggt cggtctggac gccacgggtc tctacggcga ttcctacaac   1380
atggaggttc ccggcgcagc aaacggtttc gcccacacct ccggacgcat cgccgcccgc   1440
cacgcgatct ccactatgta g                                             1461
```

<210> 17
<211> 1461
<212> ADN
<213> Bacteroides ovatus

<400> 17

```
atggcacaat tcgatgttga gtatgatctt gttgtcgttg gaggaggcgc ctctggaaag     60
tctgcagcgc tgatcgccgc ccgtgagggc aagcgcgtcg tggtgctcga gaagatgccc    120
gagaccggag gcctctccat gtacgccgaa ggcaccgctg ccttcgagtc ctctattcag    180
aacgagctcg gcaccccgcg tctttccaag taccacttcc cgaccaagca ggagggcatc    240
gagaagttca tgggctacag ccatcagcgc gcgaactacg acgtcgtccg cgctttcgtt    300
gagaactccg cagagaccat cgacatctac cgcgacctcg gcgtcgtcta caaggcctgc    360
gacatcgccg cagaggacga ccccaacgag gtctggacct tccatctgcc cgagggcctc    420
ggcgcccatt gccaggaagt cctgctcgac gccatccaga agctcgacgt cgacatcttc    480
acctccaccc ccgccaagga gctcatcatc gaggaaggcg ctgtcgtcgg tgtcgtcgca    540
gagtctgacg gcgagcccct gcgcgtcggc ggcaaggccg ttatcctggc aaccggcggc    600
atgggctcca gcccggagcg catcttcaag tacagctggt tcgcccccgc tgcctacaac    660
```

```
atgaacaccc tcaccccgct gcagaacgtc ggcgacggcc tcgacctcgc cctctccgcg    720
ggcgcagacc ccacctacat caccacctgc ccgattctcg cagcaggcgg ccgtgacatg    780
accatggact cccaggtcgg cggcgcgggc gtcaaccccg gcgtgtggat caacaagacc    840
ggcaggcgct tcgcggccga gtccgttgcc gagaacatcg gcgacatcgg aacctactac    900
ggcaagcagc ccggcggcgt ggtctggtcc atcctctccc aggcggacat cgaccgtctg    960
gtggccgagg gttccgagat cgcgatcggc gagttcgtcg tgtaccacaa gccgatggag   1020
cgcctcccta tcgagctcga ggctcatctc gagtccggcc tggtgaagaa ggctggcagc   1080
ttcgaggagc tcgcagccct cattgacgtg cctgtagaca ccttcgtcgc aactatggcc   1140
gactacaacg aggcatgcga gaagggctac gacgacgcct ttatgaagaa gccccagtac   1200
ctccgcccga tggtcgaggg tcccttctat gccatccctc tggctaccgg caccatgggt   1260
tctgctggcg gcatccgcat taacggcaac atgcaggtcg tcgacgccga ctacaacgcc   1320
attcccggtc tctacgcggt cggtctggac gccacgggtc tctacggcga ctcctacaac   1380
atggaggttc ccggcgcagc aaacggtttc gcccacacct ccggacgcat cgccgcccgc   1440
cacgcgatct ccactatgta g                                             1461
```

<210> 18
<211> 1464
<212> ADN
<213> Streptococcus constellatus

<400> 18

```
atggctgagt tcgatgttga gtacgacctg gtcgtcgtcg gcggcggcgc atccggcaag     60
tccgcggcct tgatcgcggc tcgcgccggc aagagcgtcg tcgttctcga gaagatgccc    120
gagacgggcg gcctgtccat gtacgccgag gggaccgcgg cgttcgagtc ttccattcag    180
aaggaactcg gtaccccccg tctgagcaag taccatttcc ccacgaagca agagggcgtg    240
gagaagttca tgggatacag tcaccagcgc gcgagctacg acgtggtgcg cgccttcgtg    300
gagaattccg ctgagaccat cgacatctac cgcgagctgg gcgtcgtcta caagacctgc    360
gacatcgccg cagaggacga tcccagcgag gtctggacct tccacctgcc cgagggcctc    420
ggcgcccact gccaggaggt tctgctcgac gccatccaga agctcgacgt ggacatcttc    480
acctccacgc ccgccaagga gctgattatc gaggacggca aggtcgtcgg cgtcgtggcc    540
gagtccgacg gagagccgct gcgcgtcggc ggcaaggccg tcatcctcgc gaccggcggc    600
atgggctcga accccgaccg catcttcaag tacagctggt tcgcccccgc tgcctacaac    660
atgaacgttc tgaccccgct gcagaatatg ggcgacggcc ttgatctggc cctgtccgca    720
ggcgcagatg acacggccat caccacctgc ccgattttgg cggctggcgg ccgtgacatg    780
```

```
accatggatt cccaggtcgg cggcgcaggc gtcaaccccg gcgtgtggat caacaagtcc    840
ggcaagcgct tctgcgccga atccgtcgcc gagaacatcg gcgacatcgg cacctactac    900
ggcaagcagc ccggcggcat cgtgtggtcc atcctctccc aggccgacat cgaccgcctg    960
gtcaacgagg gctccgaaat cgccatcggc gagttcgtcg tgtaccacaa gcccatggag   1020
cgcctaccca tcgagctcaa tgcgcacctg gagtccggcc tggtcaagaa ggccgactgc   1080
ttcgaagagc tggctgagaa gatggacgtt cccgccggcg ccttcgtaga caccatgaac   1140
gcctacaacg aggcgtgcga gaagggctac gacgacgcct tcatgaagaa gcccgagtac   1200
ctgcgtgccg agacccaggc ccccttctac gccatcccct tggcaacggg caccatgggc   1260
tctgccggcg gcatcaagat caacggcaac atgcaggtca tcgattccga cgcgaacccc   1320
atccccggcc tgtacgctgt gggcctggat gccaccggcc tgtacggcga ctcctacaac   1380
atggaggttc ccggcgccgc taacggcttt gcccacacct ccggccgcat tgcggcacgc   1440
cacgccctct ccacgatgga gtaa                                          1464
```

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> Lactococcus garcieae

<400> 19

```
Met Lys Asn Lys Phe Tyr Pro Lys Thr Phe Glu Arg Gly Tyr Ile Gly
1               5                   10                  15

Asn Leu Glu Val Glu Asn
            20
```

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Lactococcus garcieae

<400> 20

```
Phe Asp Glu Pro Val Tyr Pro Gln Ala Glu
1               5                   10
```

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Lactococcus garcieae

<400> 21

```
Ala Ser Arg Met Val Met Asp Ala Val His Glu Gly Tyr Ile Ala Gly
1               5                   10                  15
```

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Lactococcus garcieae

<400> 22

```
Gly Tyr Ile Gly Asn Leu Glu Val Glu Asn Arg Ala Ile Arg Met Pro
1               5                   10                  15

Met
```

<210> 23
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-N-terminal-31

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<400> 23

tgaagaataa nttntayccn aaracnttyg a 31

<210> 24
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-N-terminal-37

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc feature
<222> (14)..(19)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc feature
<222> (20)..(20)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n representa inosina

<220>
<221> misc feature
<222> (35)..(35)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<400> 24

tgaagaataa nttntayccn aaracnttyg arrgngg 37

<210> 25
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-N-terminal-F32

<220>
<221> misc feature
<222> (21)..(21)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<400> 25

atgaagaata agttttaycc naaracntty ga 32

<210> 26
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-interno-RP1

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(29)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> n representa adenina, guanina, citosina o timina

<400> 26

cctgcaatat aaccttcatg tacngcrtcc atnaccat 38

<210> 27
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador pUC19-FP-1

<400> 27

acacaggaaa cagctatgac catgattacg 30

<210> 28
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador pUC19-RP-1

<400> 28

agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 30

<210> 29
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador pUC19-FP-2

<400> 29

atgattacgc caagcttgca tgcctgcagg 30

<210> 30
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador pUC19-RP-2

<400> 30

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag 30

<210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-RACE-N-P1

<400> 31

atgcggatcg ctcggttctc gacctctagg ttac 34

<210> 32
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-RACE-RP2-1

<400> 32

atcgaggaga agtgcgagga cgtcagggtc atc 33

<210> 33
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-RACE-N-P2

<400> 33

ttctcgacct ctaggttacc gatgtagccg c 31

<210> 34
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-RACE-RP2-2

<400> 34

acgtcagggt catcggcatc ggcgactgca ag 32

<210> 35
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-conf-NP

<400> 35

tgccggtgca atggctgaca tcatgttcaa cctg 34

<210> 36
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-conf-CP

<400> 36

tcctccatcg ttcctccaat cagtaagaca cgcg 34

<210> 37
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-FP

<400> 37

ctacatcggt aacctagagg tcg 23

<210> 38
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador E1-RP

<400> 38

ccgtgctgct tgatggtctt tgc 23

<210> 39
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador Gar-16S-Ribo-FP

<400> 39

tgcgtagata tatggaggaa c 21

<210> 40
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Gar-16S-Ribo-RP

<400> 40

cttatctcta aggatagcac g 21

<210> 41
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp. E1 pet F Nde

<400> 41

agctcatatg aagaacaagt tctatccgaa 30

<210> 42
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp. E1 pet His

<400> 42

aatcgaattc ctacaggttg cagccagcga tgt 33

<210> 43
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACE-N-P3-1

<400> 43

atggagatag tgccgctggc aaggcaacgg cac 33

<210> 44
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACE-N-P3-2

<400> 44

tcaacgaaga ctcgatttga gcgagaggcg agg 33

<210> 45
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E1-Bub-N-P1

<400> 45

acggtggaac cggcatcgtg ttcatggaca ac 32

<210> 46
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E1-Bub-N-P2

<400> 46

gcgtgaccca gttccaccat gtcggactgt c 31

<210> 47
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACE-C-P3-1

<400> 47

gacatcccgt tcgagcgcag gatcacccat gag 33

<210> 48
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RACE-C-P3-2

<400> 48

aggatcaccc atgagcgcat cgctatcatg gac 33

<210> 49
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E1-Bub-C-P1

<400> 49

catcgctctt gcagtcgttg tccaggaagt cc 32

<210> 50
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> El-Bub-C-P2

<400> 50

ttgtccagga agtccatcgc gtacacgacg gag 33

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa representa isoleucina o leucina

<400> 51

```
Thr Pro Gly Val Ala Ala Ser Val Ala Asp Glu Xaa Lys
1               5                   10
```

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<400> 52

```
Met Pro Gly Ala Pro Val Phe Gly Lys
1               5
```

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(4)
<223> Xaa representa isoleucina o leucina

<400> 53

```
Lys Xaa Xaa Xaa Thr Gly Thr Thr Lys
1               5
```

<210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> Xaa representa isoleucina or leucina

<400> 54

```
Val Thr Gln Glu Xaa Xaa Cys Ala His Gly Ala Phe Val Cys Gly Ser
1               5                   10                  15


Gly Arg
```

<210> 55
<211> 11
<212> PRT

<213> Lactococcus garvieae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa representa isoleucina or leucina

<400> 55

```
Trp Xaa Ser Pro Glu Glu Ser Val Gly Gln Arg
1               5                   10
```

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Lactococcus garvieae

<400> 56

```
Ala Gln Glu Val Lys Val Pro Lys
1               5
```

<210> 57
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E2-invitroTS-FP1

<400> 57

actttaagaa ggagatatac caatggcaca ggaagtcaaa gtcc 44

<210> 58
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> E2-invitroTS-RP

<400> 58

ctagacctcg atctcgccct gcatgccg 28

<210> 59
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador universal

<400> 59

```
gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaacggttt ccctctagaa ataattttgt     60

ttaactttaa gaaggagata tacca                                           85
```

<210> 60
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> exp.US2 pet F Nde

<400> 60

tatacatatg gcacaggaag tcaaagtc 28

<210> 61
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> exp. US2 pet

<400> 61

aatcgaattc ctagacctcg atctcgccct gc 32

<210> 62
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.US3 F

<400> 62

tatacatatg gcagaattcg atgttgag 28

<210> 63
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.US3 R

<400> 63

ccgcaagctt ctacatagtg gagatcgcgt gg 32

<210> 64
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp. US1 F

<400> 64

tatacatatg ttcaagggtc cacagggc 28

<210> 65
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.US1 R

<400> 65

gctcgaattc ttagtgctgc tgtgcctttt cag 33

<210> 66
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.DS1 F

<400> 66

atatacatat gcaggatatg gacttcatgg 30

<210> 67
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.DS1 R

<400> 67

gctcgaattc tcatagtgac atcagcgctc cc 32

<210> 68
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.E2 pet His

<400> 68

aatcgaattc gagacctcga tctcgccctg c 31

<210> 69
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador exp.E3 R His

<400> 69

ccgcaagctt gtacatagtg gagatcgcgt gg 32

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado seleccionado de entre:

(Aa) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1,

(Ab) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 con la sustitución, deleción, inserción y/o adición de 1 a 250 aminoácidos y que presenta una actividad para sintetizar dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato; y

(Ac) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 60% o superior con la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y que presenta una actividad para sintetizar dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

2. Polinucleótido seleccionado de entre:

(Ad) un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 4, y
(Ae) un polinucleótido que codifica el polipéptido según la reivindicación 1.

3. Procedimiento para producir dihidrodaidzeína, que comprende hacer que el polipéptido aislado según la reivindicación 1 y NADPH y/o NADH actúen sobre la daidzeína.

4. Vector de expresión que incluye el polinucleótido según la reivindicación 2.

5. Célula recombinante transformada con el vector de expresión según la reivindicación 3.

6. Procedimiento para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 5 con el fin de obtener un polipéptido que presenta una actividad para sintetizar dihidrodaidzeína utilizando daidzeína como sustrato.

7. Procedimiento para producir dihidrodaidzeína, que comprende hacer que la célula según la reivindicación 5 actúe sobre la daidzeína.

8. Anticuerpo que presenta afinidad con el polipéptido según la reivindicación 1.

9. Composición de enzima de síntesis de dihidrodaidzeína, que comprende el polipéptido según la reivindicación 1.

10. Kit de síntesis de dihidrodaidzeína que comprende:

(Ai) el polipéptido según la reivindicación 1;
(Aii) NADPH y/o NADH; y
(Aiii) daidzeína.

Fig. 1

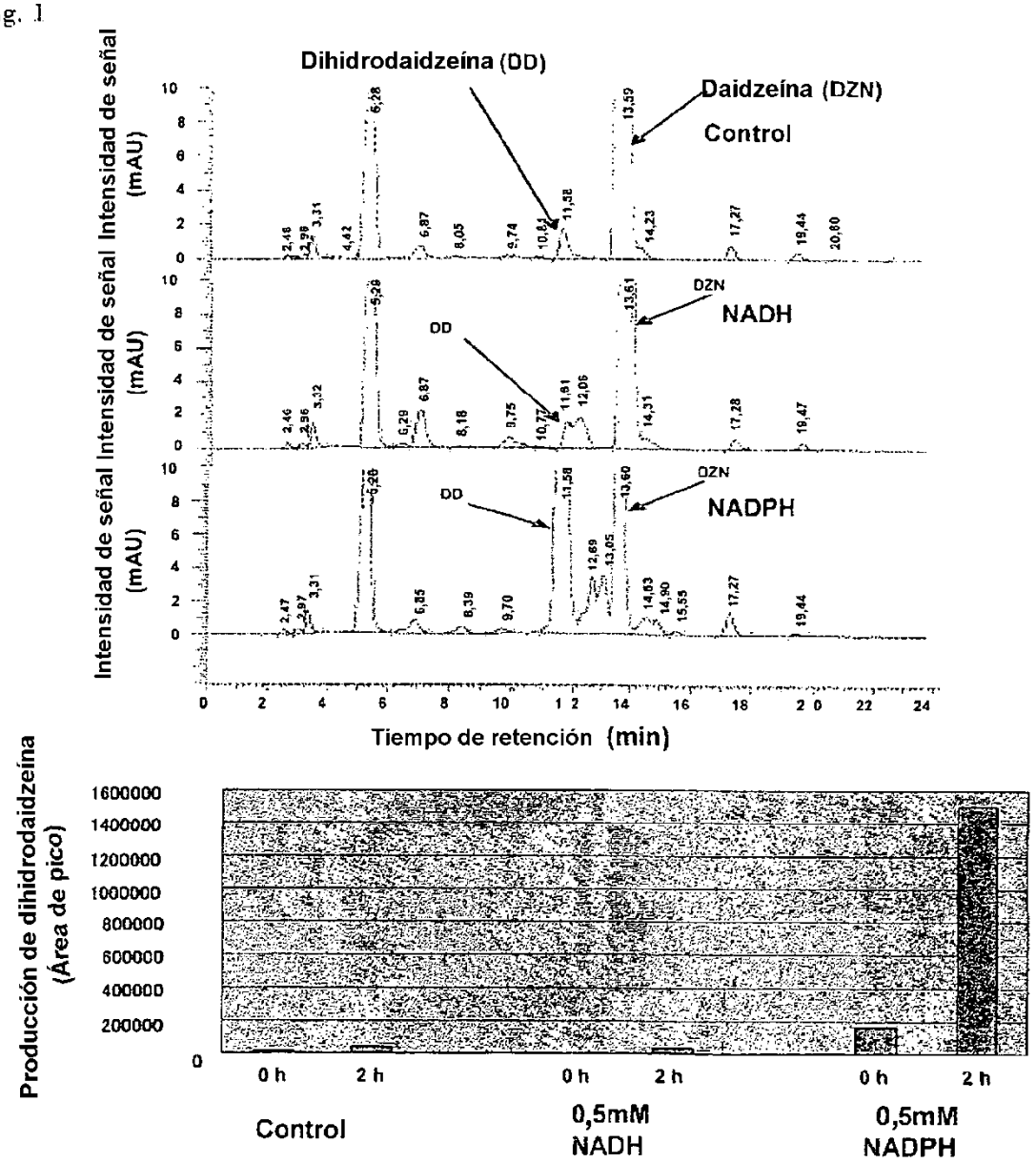
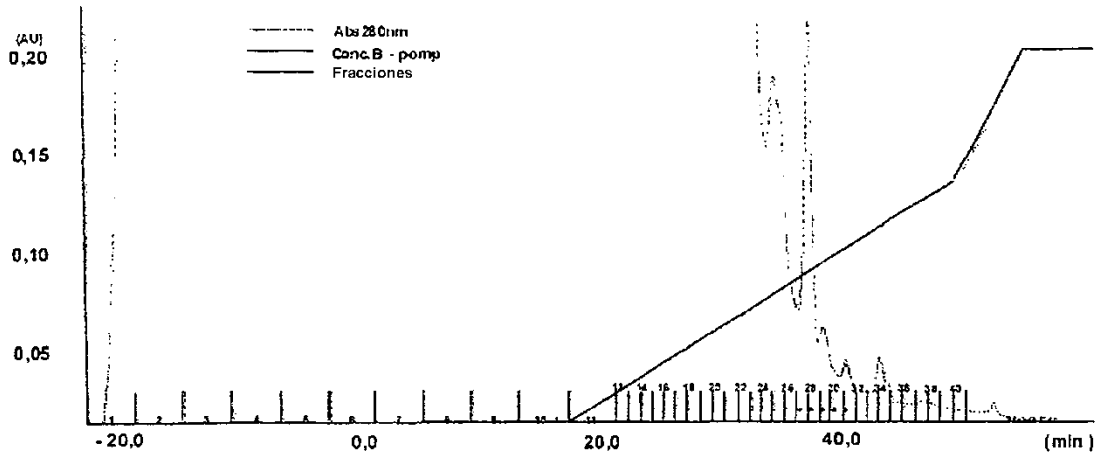

Dihidrodaidzeína (DD)
Daidzeína (DZN)
Control
DZN
NADH
DD
DZN
NADPH
DD
Intensidad de señal Intensidad de señal Intensidad de señal
(mAU)
(mAU)
(mAU)
Tiempo de retención (min)
Producción de dihidrodaidzeína
(Área de pico)
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0 h
2 h
0 h
2 h
0 h
2 h
Control
0,5mM
NADH
0,5mM
NADPH

Fig. 2


(AU)
0,20
0,15
0,10
0,05
Abs 280nm
Conc.B - pomp
Fracciones
-20,0
0,0
20,0
40,0
(min)

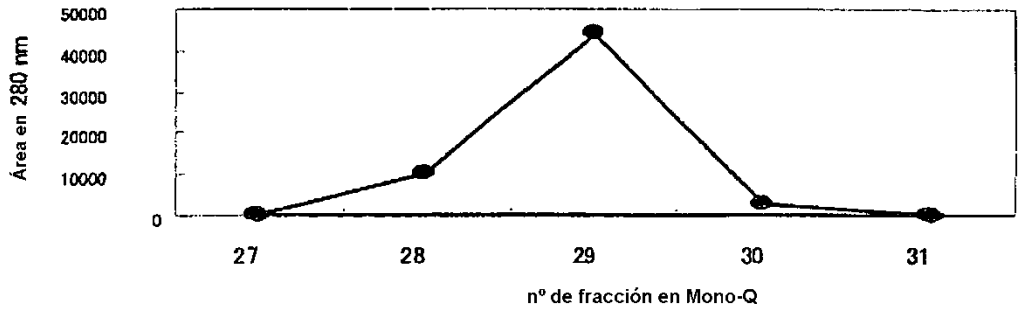
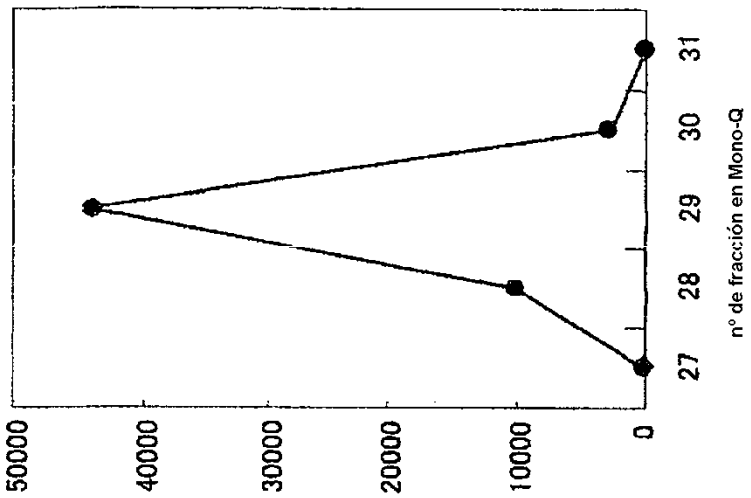

Área en 280 nm
50000
40000
30000
20000
10000
0
27
28
29
30
31
nº de fracción en Mono-Q

Fig. 3


50000
40000
30000
20000
10000
0
27
28
29
30
31
nº de fracción en Mono-Q

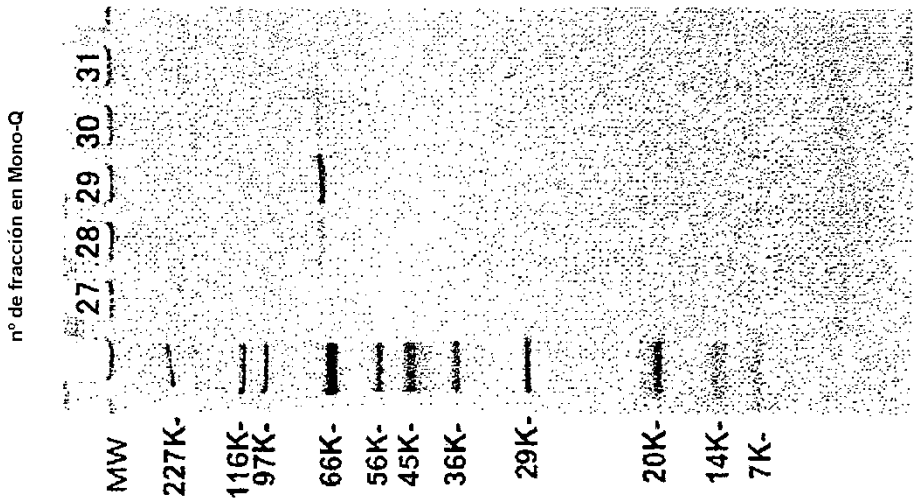

nº de fracción en Mono-Q
27
28
29
30
31
MW
227K-
116K-
97K-
66K-
56K-
45K-
36K-
29K-
20K-
14K-
7K-

Fig. 4

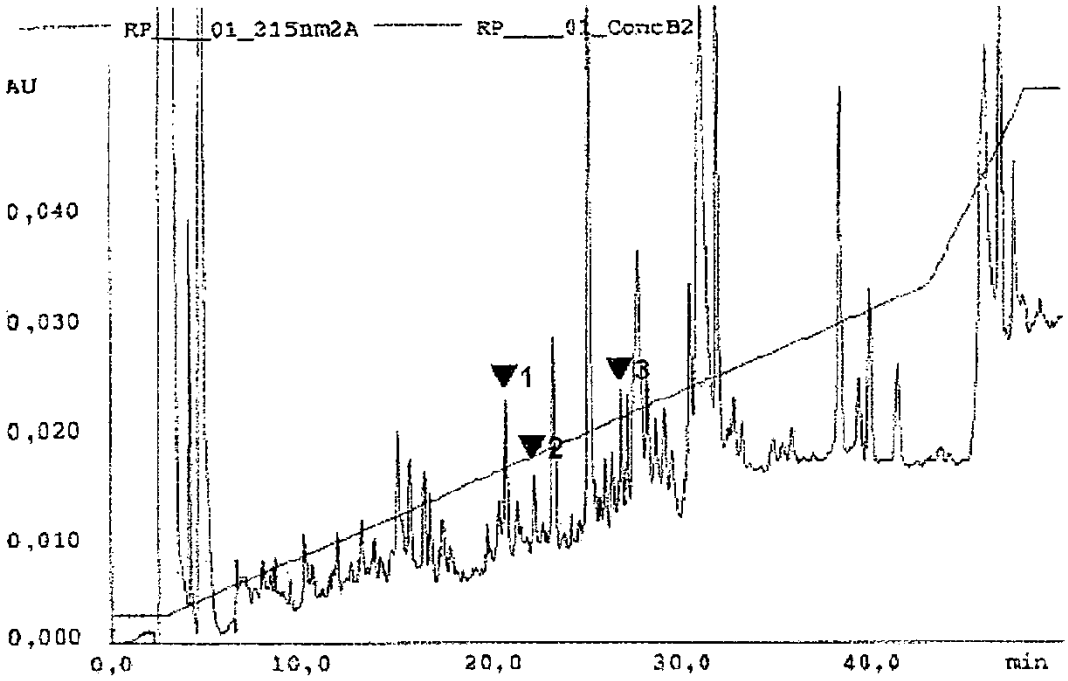

RP____01_215nm2A
RP____01_ConcB2
AU
0,040
0,030
0,020
0,010
0,000
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
min
1
2
3

Fig. 5

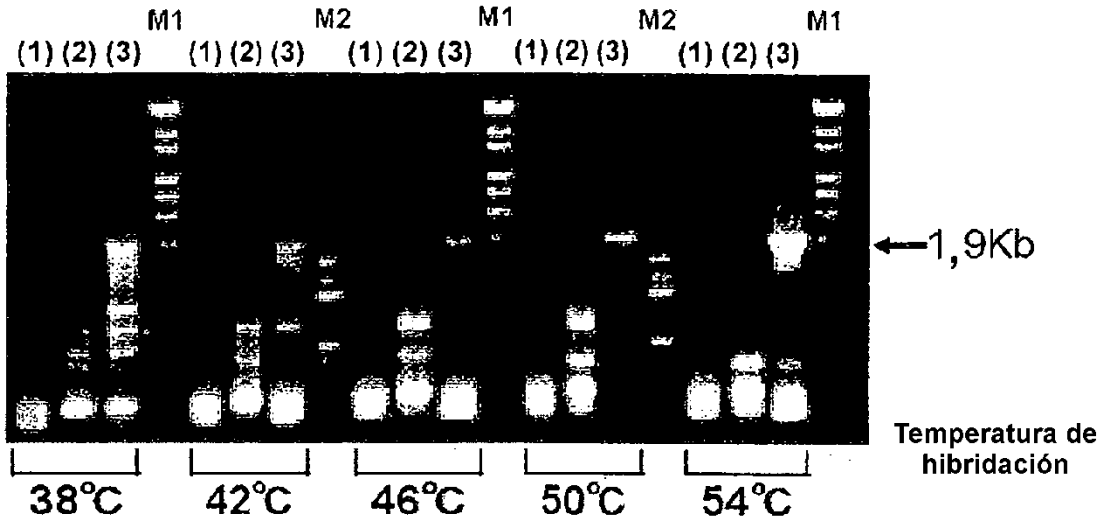

M1
M2
M1
M2
M1
(1) (2) (3)
(1) (2) (3)
(1) (2) (3)
(1) (2) (3)
(1) (2) (3)
1,9Kb
Temperatura de hibridación
38°C
42°C
46°C
50°C
54°C

Fig. 6

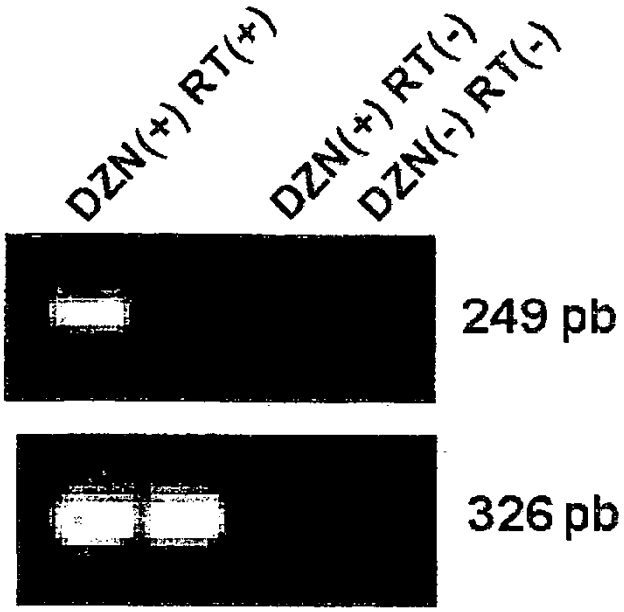


Fig. 7

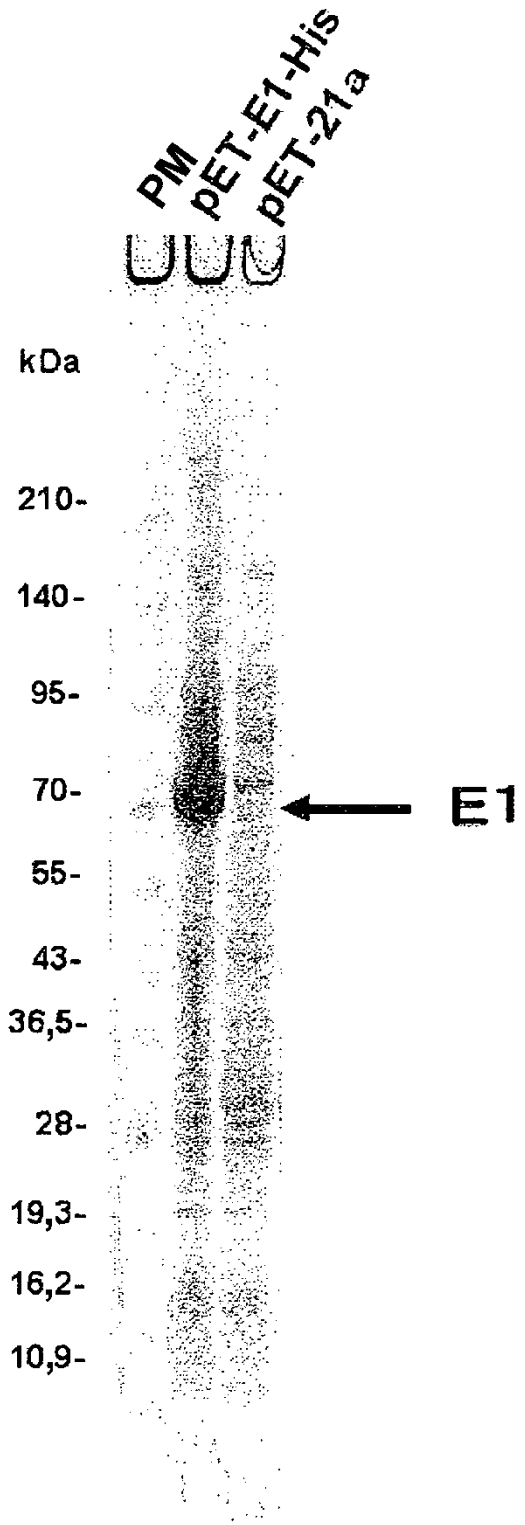


Fig. 8

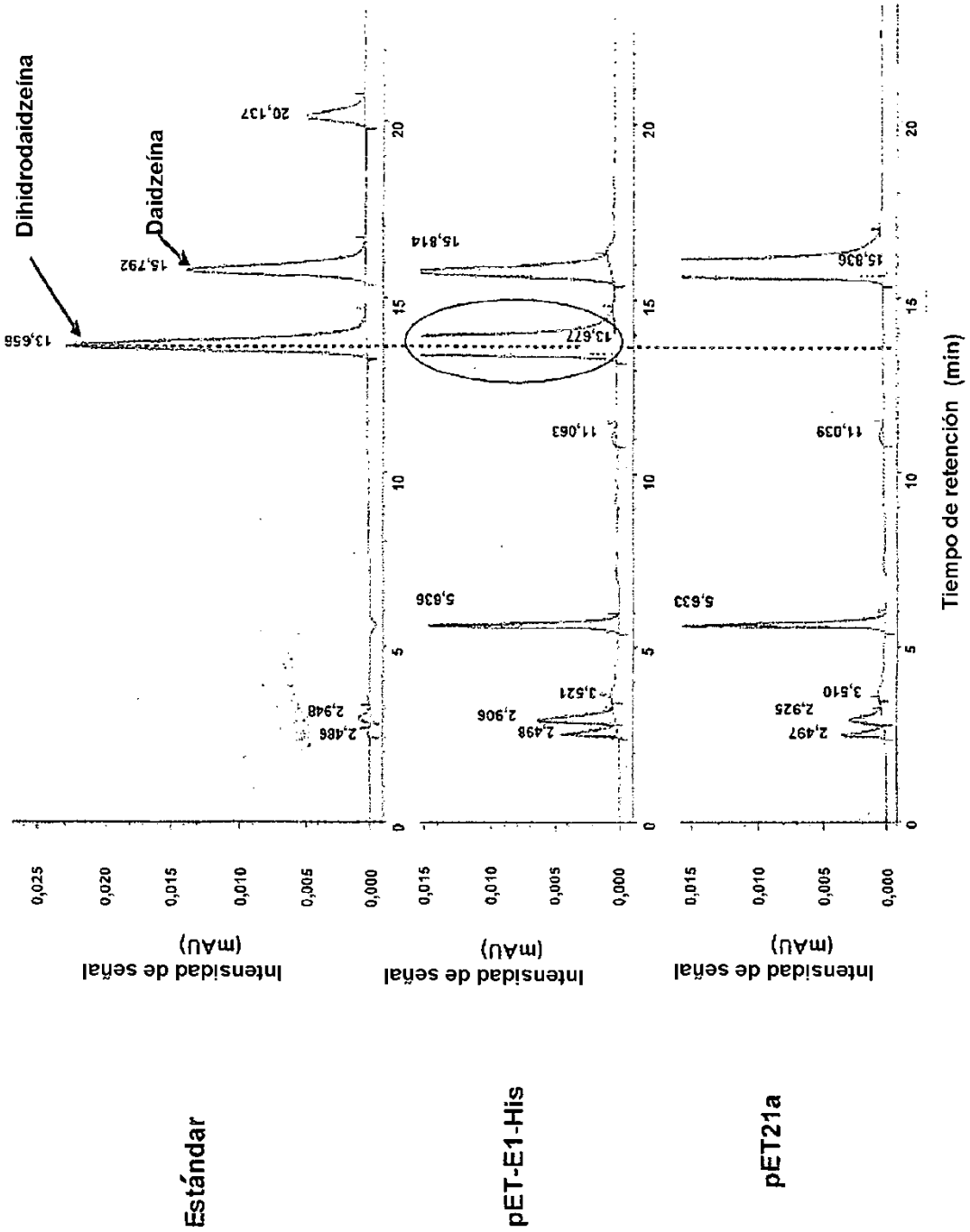

Dihidrodaidzeína
Daidzeína
13,656
15,792
20,137
2,486
2,948
5,836
3,521
2,498
2,906
13,677
15,814
11,063
5,633
3,510
2,497
2,925
11,039
15,836
Intensidad de señal (mAU)
Intensidad de señal (mAU)
Intensidad de señal (mAU)
Tiempo de retención (min)
Estándar
pET-E1-His
pET21a

Fig. 9

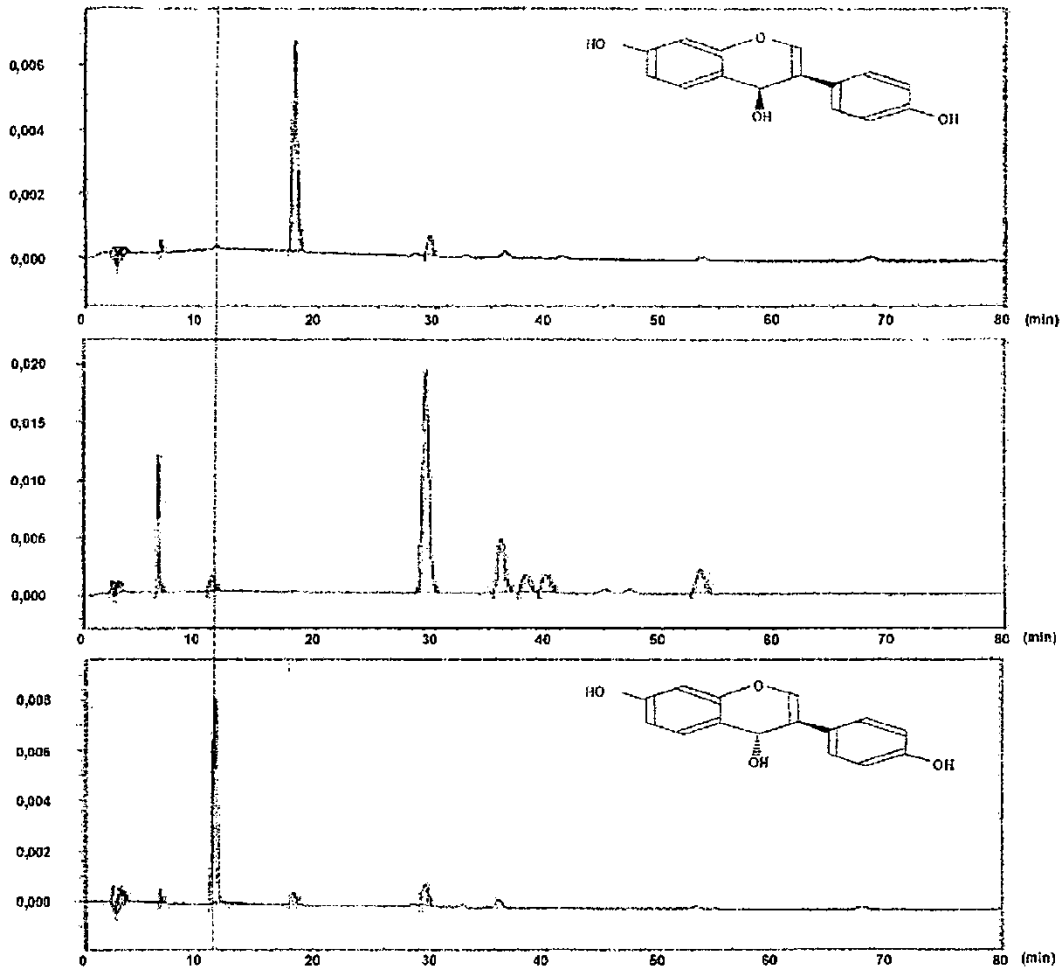

0,006
0,004
0,002
0,000
HO
O
OH
OH
0
10
20
30
40
50
60
70
80
(min)
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000

Fig. 10

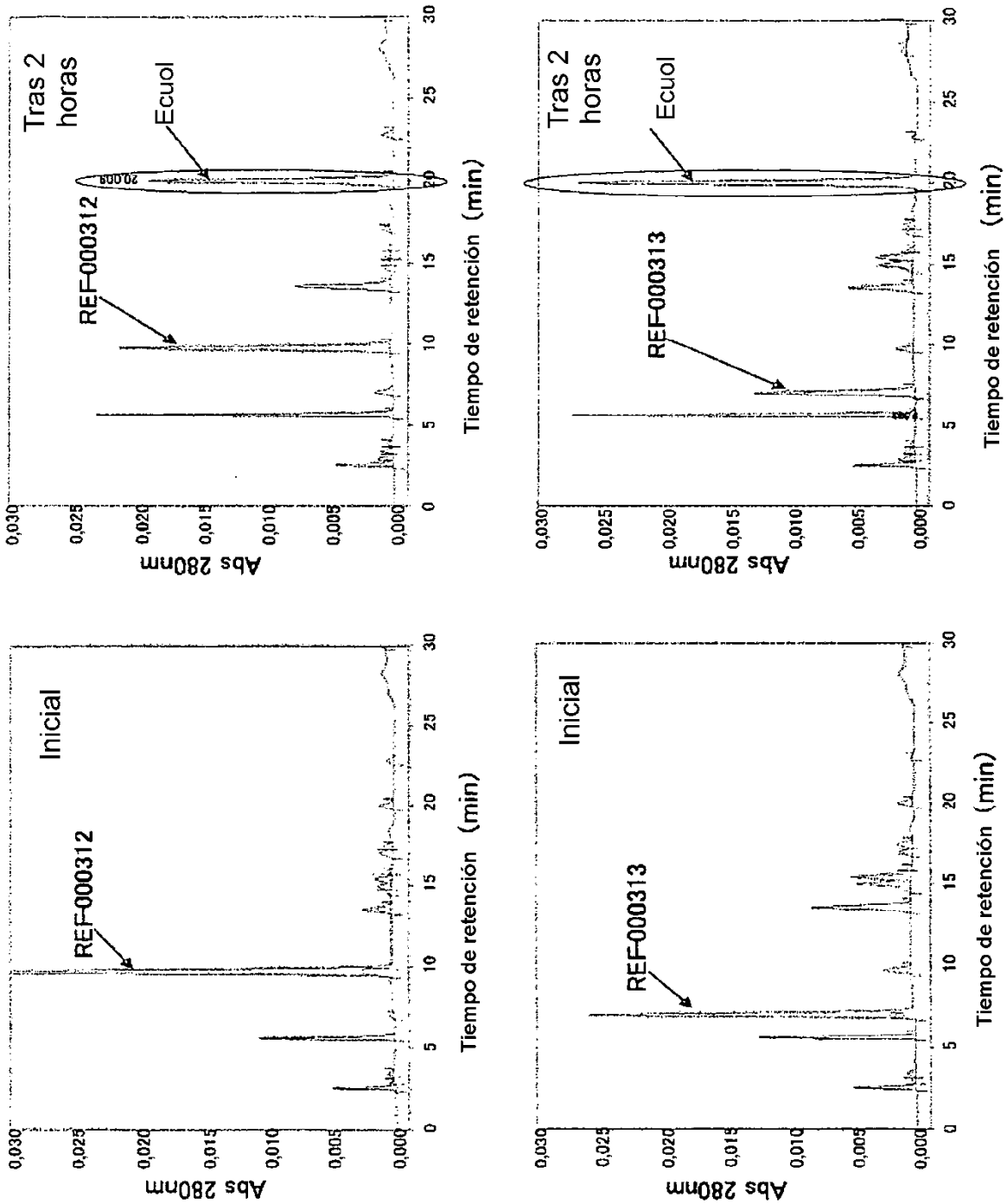

Inicial
REF-000312
Tras 2 horas
Ecuol
REF-000312
Inicial
REF-000313
Tras 2 horas
Ecuol
REF-000313
Abs 280nm
Tiempo de retención (min)
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
0
5
10
15
20
25
30

Fig. 11

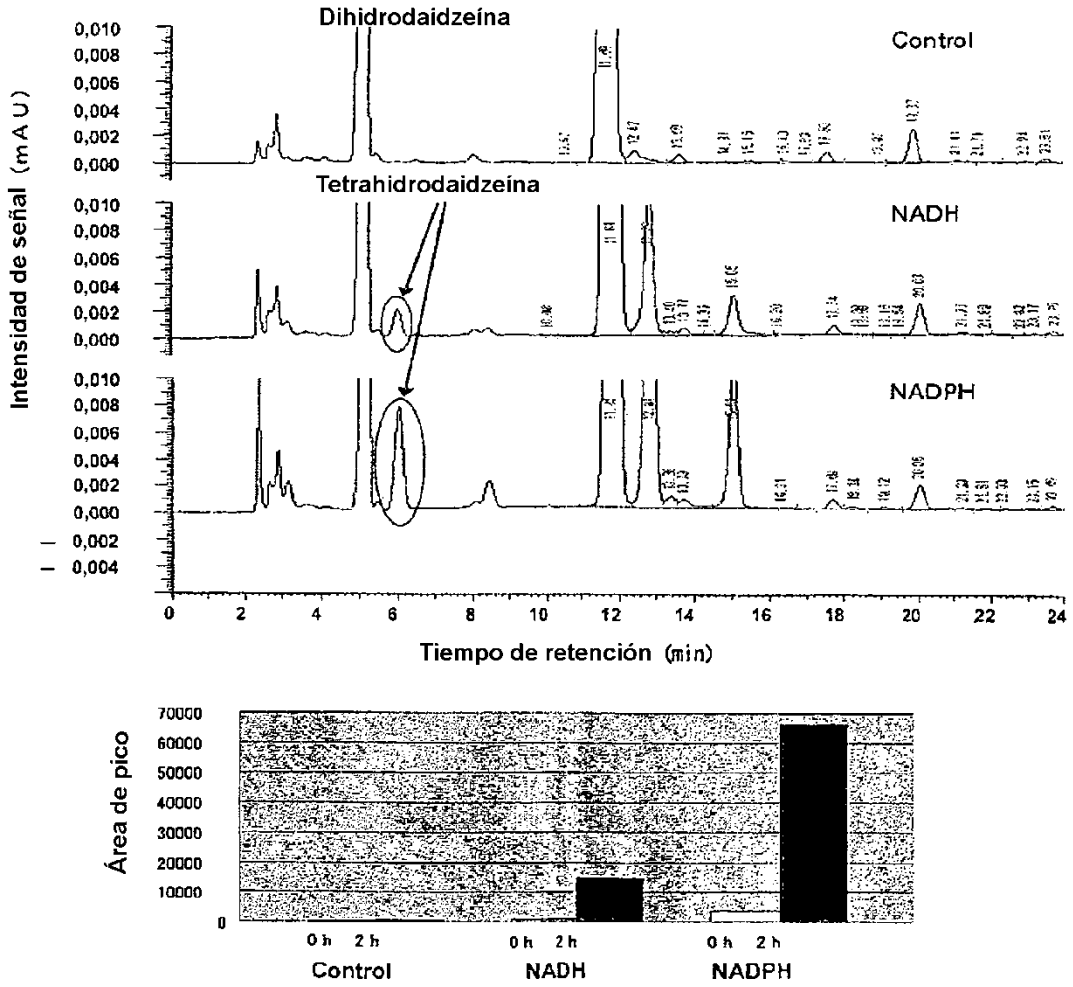

Dihidrodaidzeína
Control
Tetrahidrodaidzeína
NADH
NADPH
Intensidad de señal (mAU)
0,010
0,008
0,006
0,004
0,002
0,000
0,002
0,004
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Tiempo de retención (min)
Área de pico
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0h 2h
Control
0h 2h
NADH
0h 2h
NADPH

Fig. 12

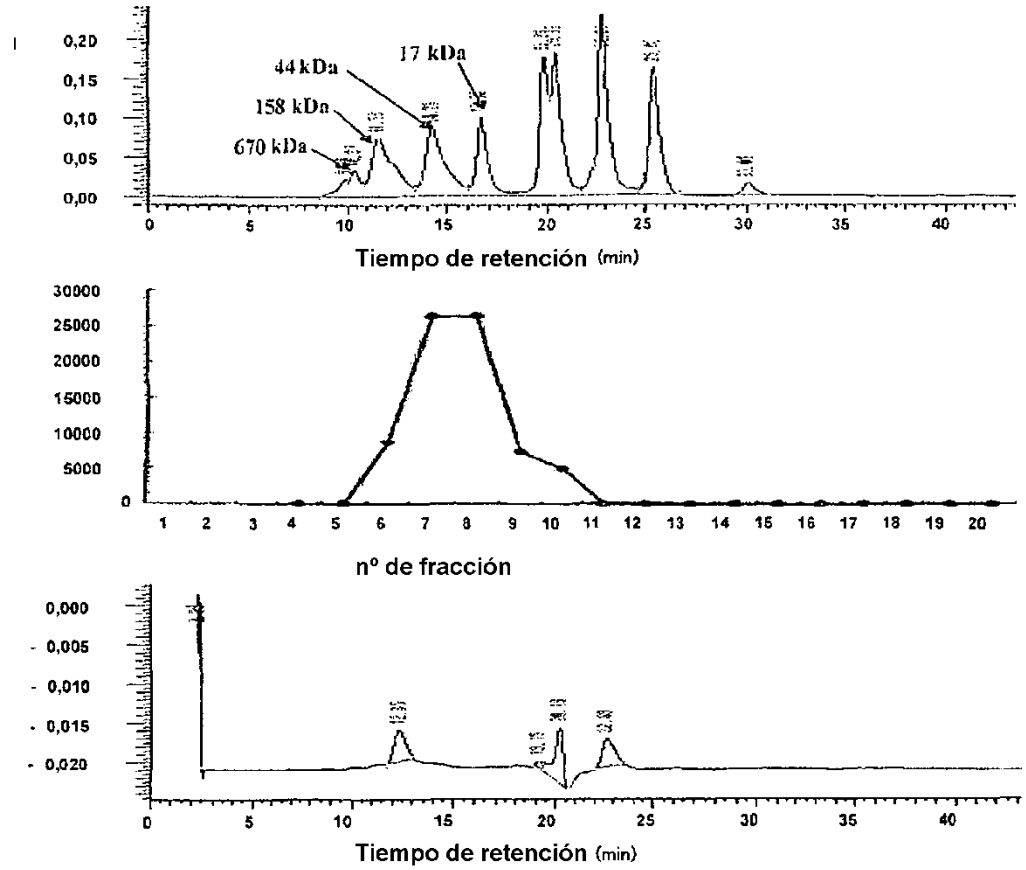

0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
44 kDa
17 kDa
158 kDa
670 kDa
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo de retención (min)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
nº de fracción
0,000
- 0,005
- 0,010
- 0,015
- 0,020
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo de retención (min)

Fig. 13

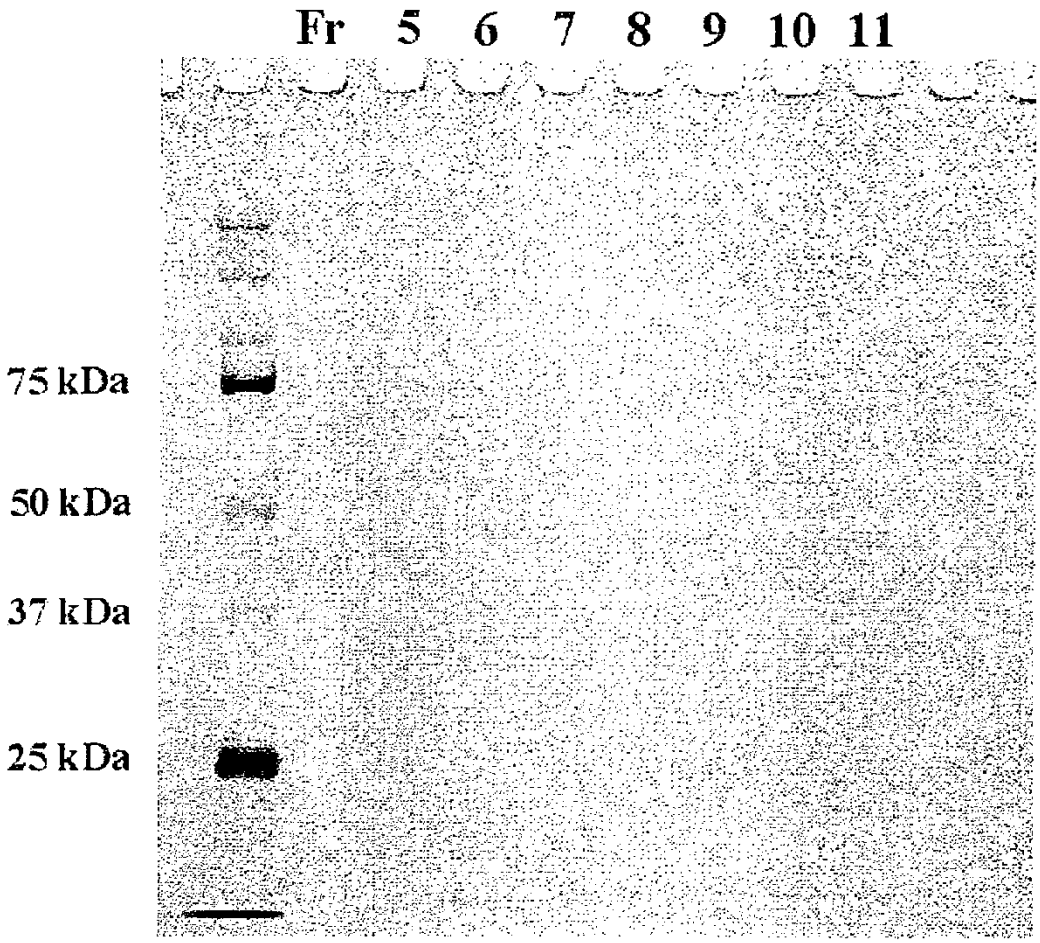


Fig. 14

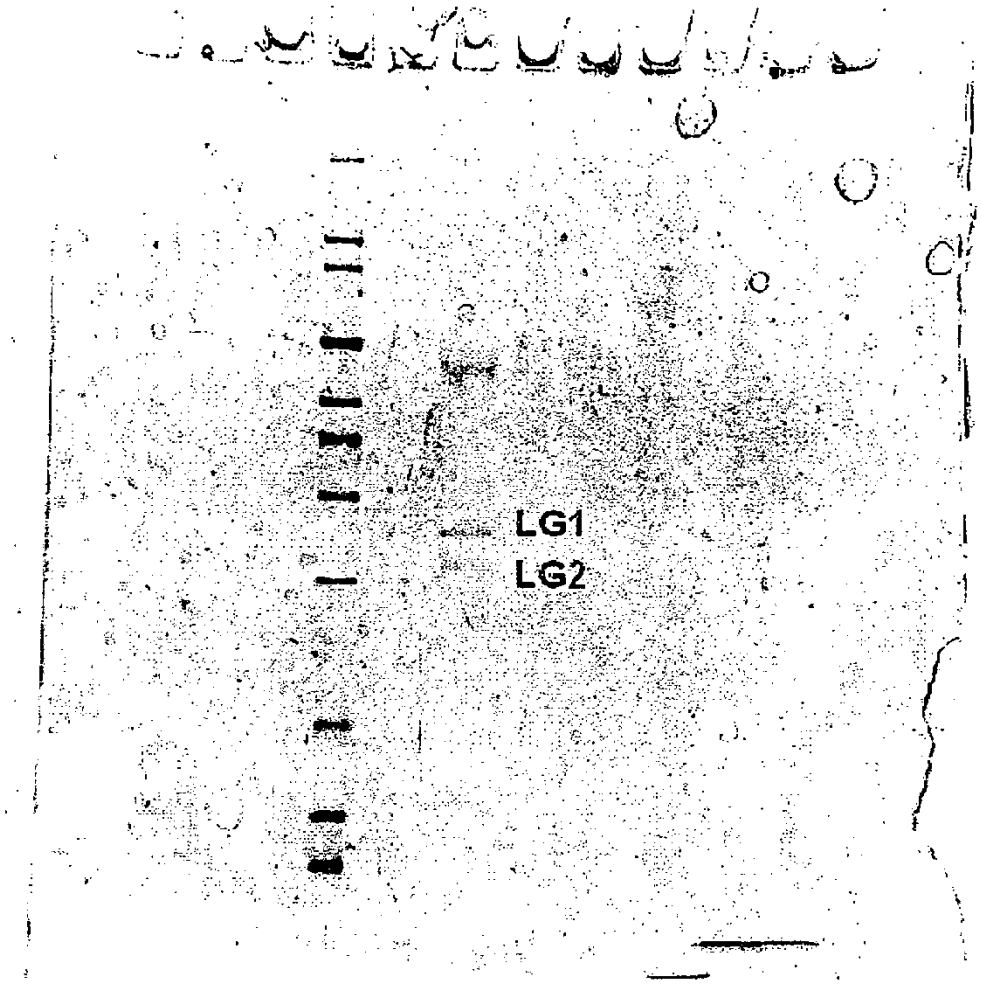


Fig. 15

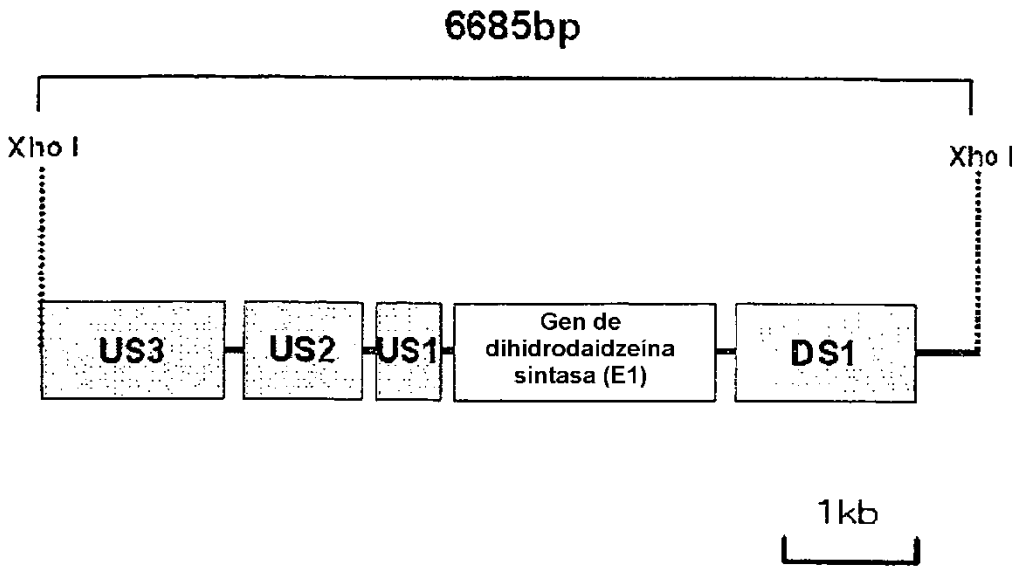

6685bp
Xho I
Xho I
US3
US2
US1
Gen de dihidrodaidzeína sintasa (E1)
DS1
1kb

Fig. 16-1-a

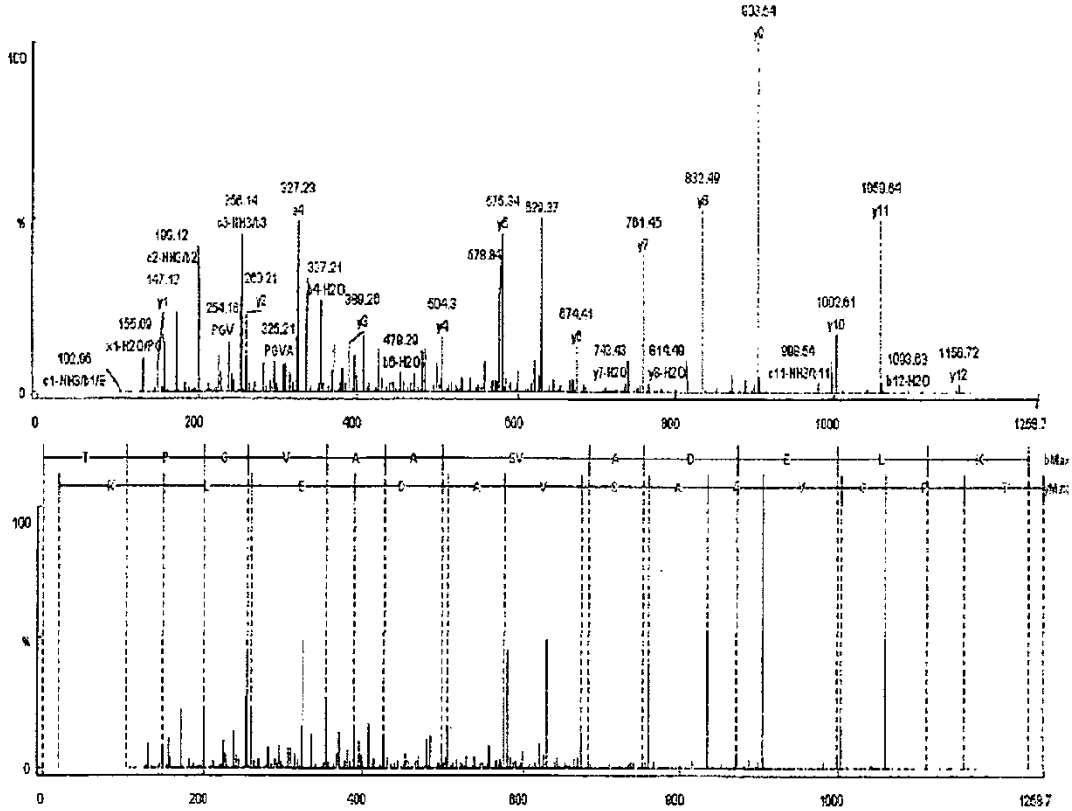


Fig. 16-1-b

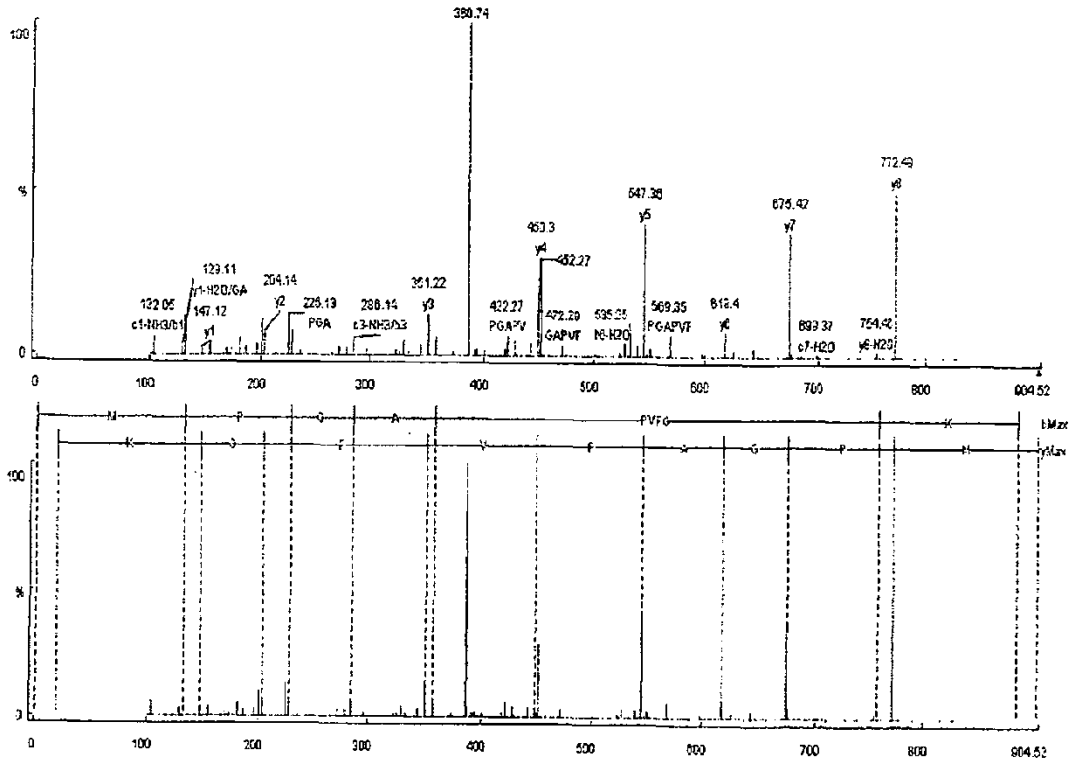

380.74
772.49
y8
547.36
y5
675.42
y7
453.3
y4
452.27
129.11
y1-H2O/GA
204.14
y2
351.22
y3
122.05
c1-NH3/b1
147.12
y1
226.13
PGA
288.14
c3-NH3/b3
422.27
PGAPV
472.29
GAPVF
535.25
N6-H2O
569.35
PGAPVF
613.4
y6
699.37
c7-H2O
754.42
y6-H2O
100
%
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
904.52
M
P
G
A
PVFG
K
bMax
yMax

Fig. 16-2-a

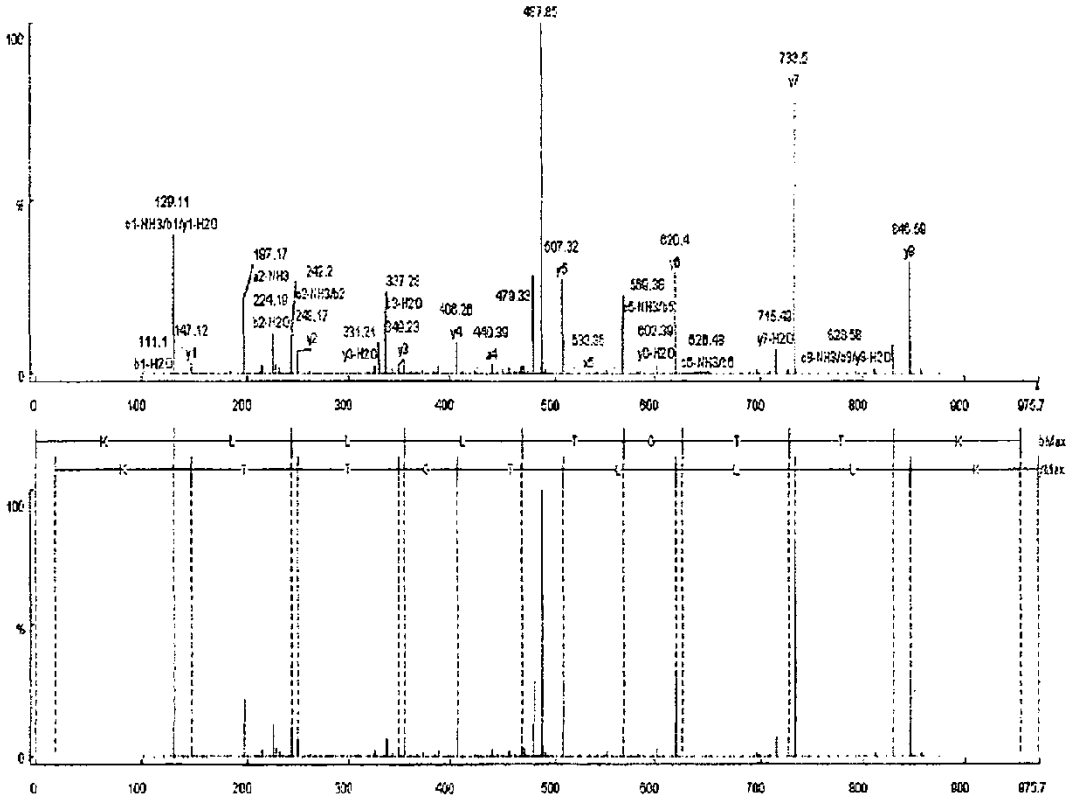


Fig. 16-2-b

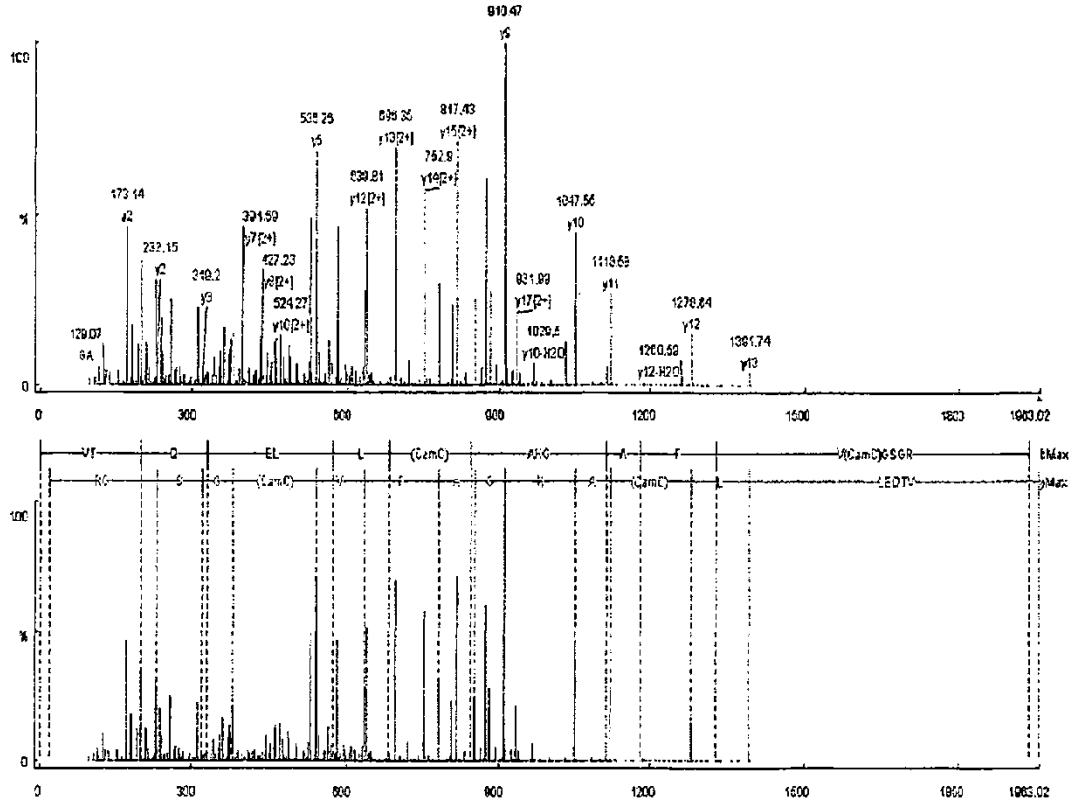


Fig. 16·3

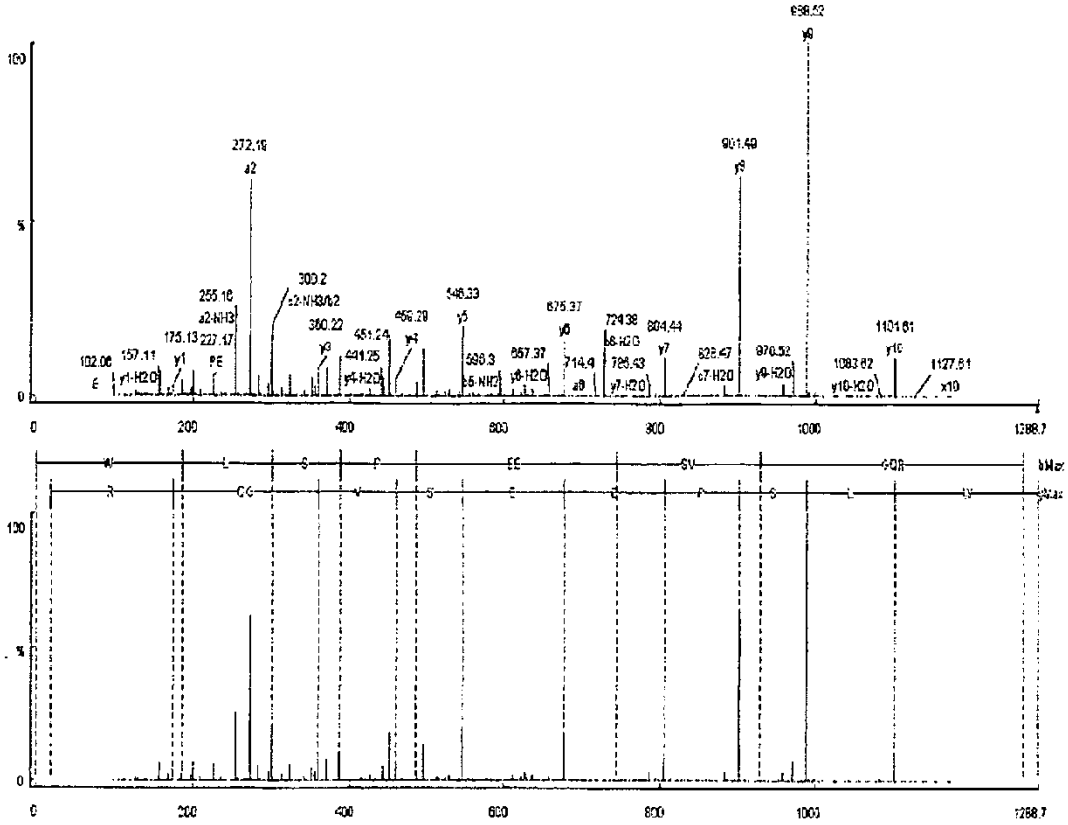
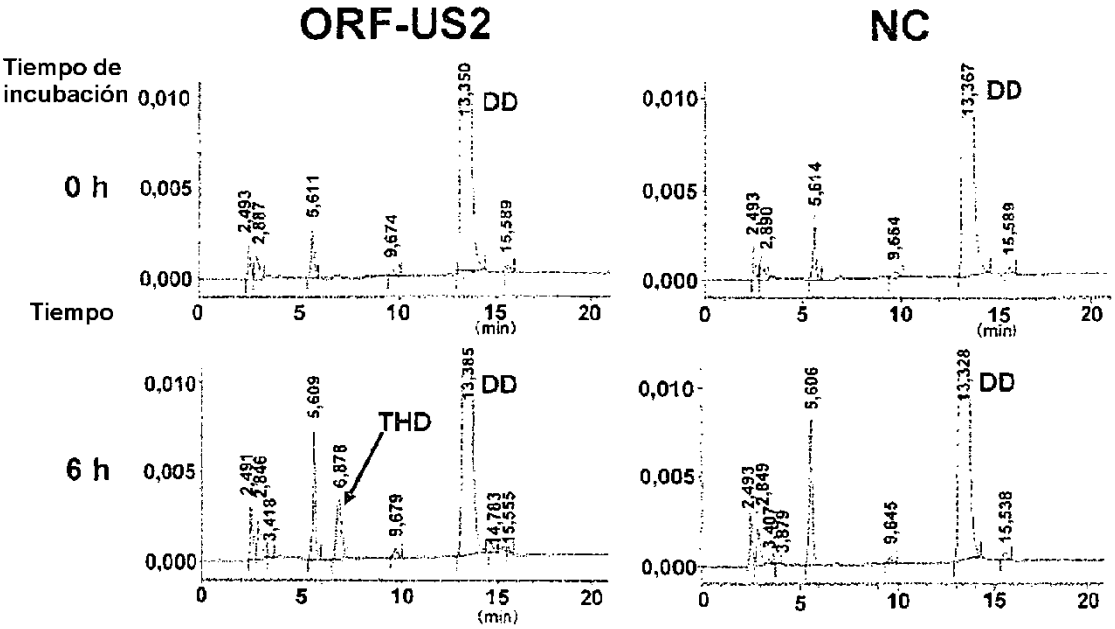

100
%
0
0
200
400
600
800
1000
1288.7
272.19
a2
901.49
y8
1101.61
y10
1127.61
x10
1083.62
y10-H2O
970.52
y9-H2O
828.47
c7-H2O
804.44
y7
724.38
b6-H2O
714.4
a8
675.37
y6
657.37
y6-H2O
546.33
y5
456.29
y4
441.25
y4-H2O
451.24
360.22
y3
303.2
a2-NH3/b2
255.16
a2-NH3
227.17
PE
175.13
y1
157.11
y1-H2O
102.06
E

Fig. 17


ORF-US2
NC
Tiempo de incubación
0 h
6 h
Tiempo
DD
THD
(min)

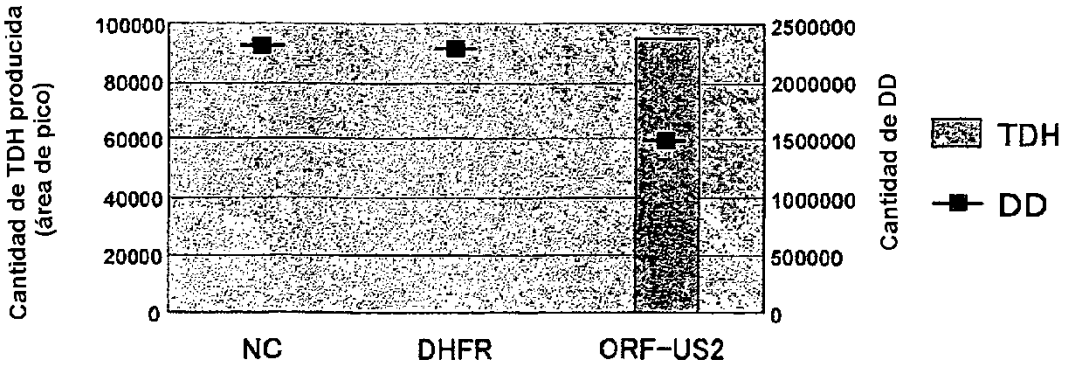

Cantidad de TDH producida (área de pico)
Cantidad de DD
TDH
DD
NC
DHFR
ORF-US2

Fig. 18

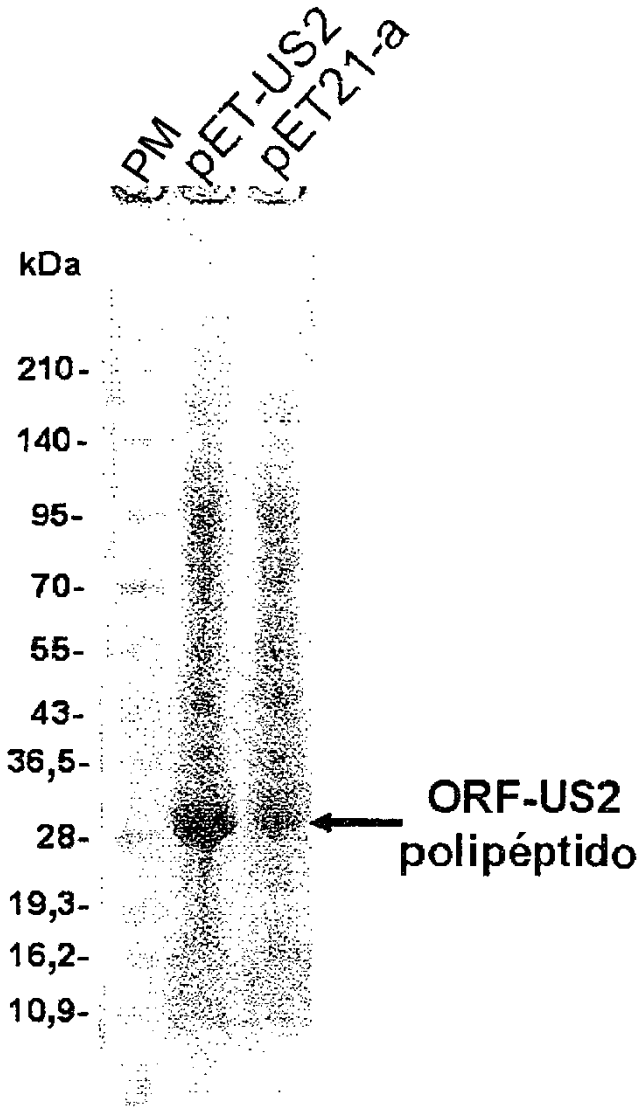
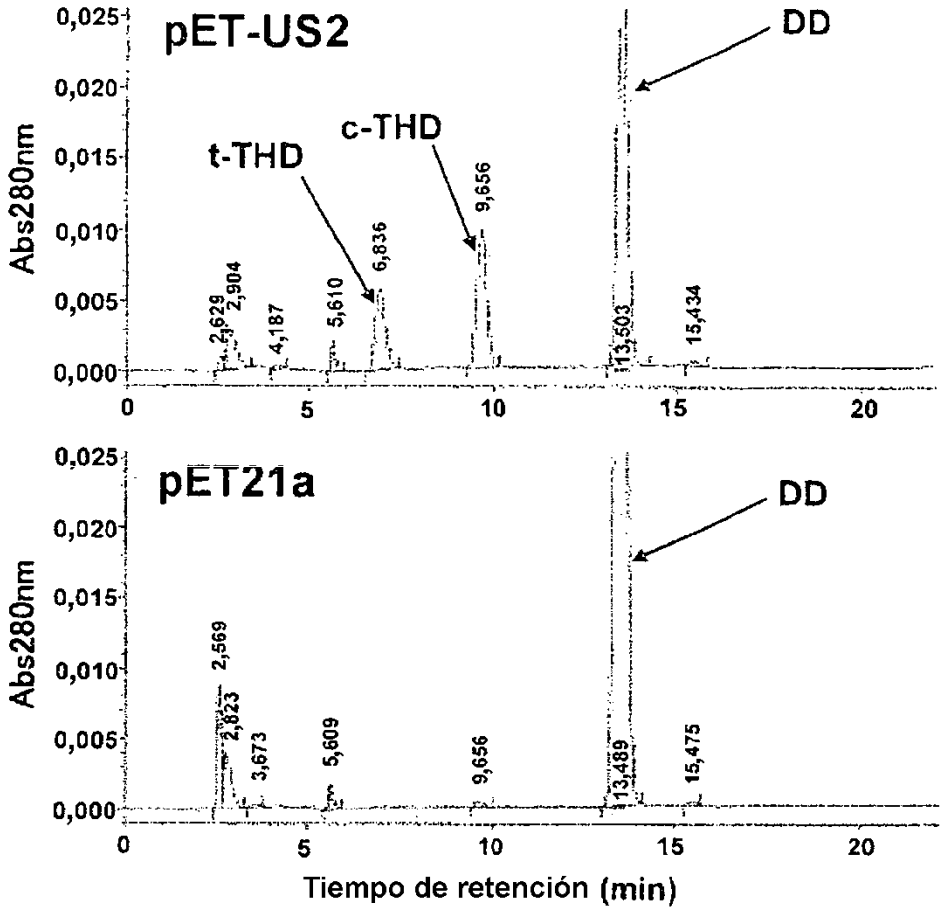

PM
pET-US2
pET21-a
kDa
210-
140-
95-
70-
55-
43-
36,5-
28-
19,3-
16,2-
10,9-
ORF-US2
polipéptido

Fig. 19


pET-US2
DD
c-THD
t-THD
Abs280nm
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
2,629
2,904
4,187
5,610
6,836
9,656
13,503
15,434
0
5
10
15
20
pET21a
DD
2,569
2,823
3,673
5,609
9,656
13,489
15,475
Tiempo de retención (min)

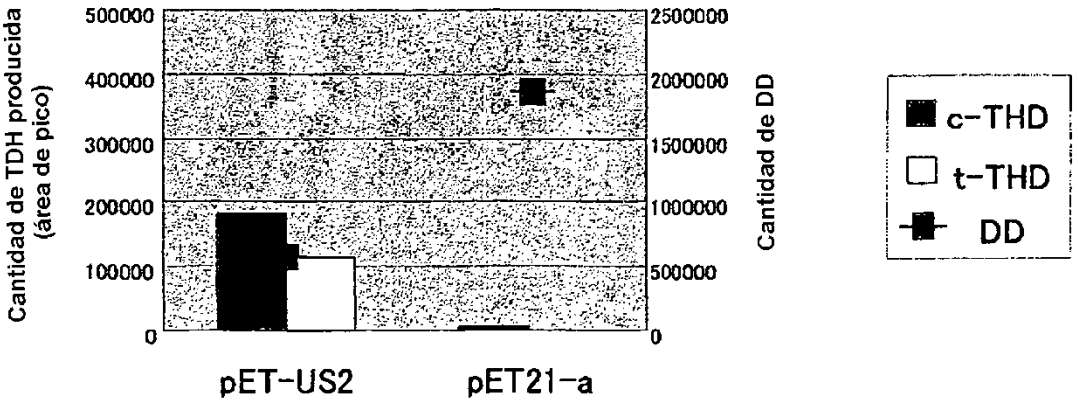

Cantidad de TDH producida (área de pico)
500000
400000
300000
200000
100000
0
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Cantidad de DD
c-THD
t-THD
DD
pET-US2
pET21-a

Fig. 20

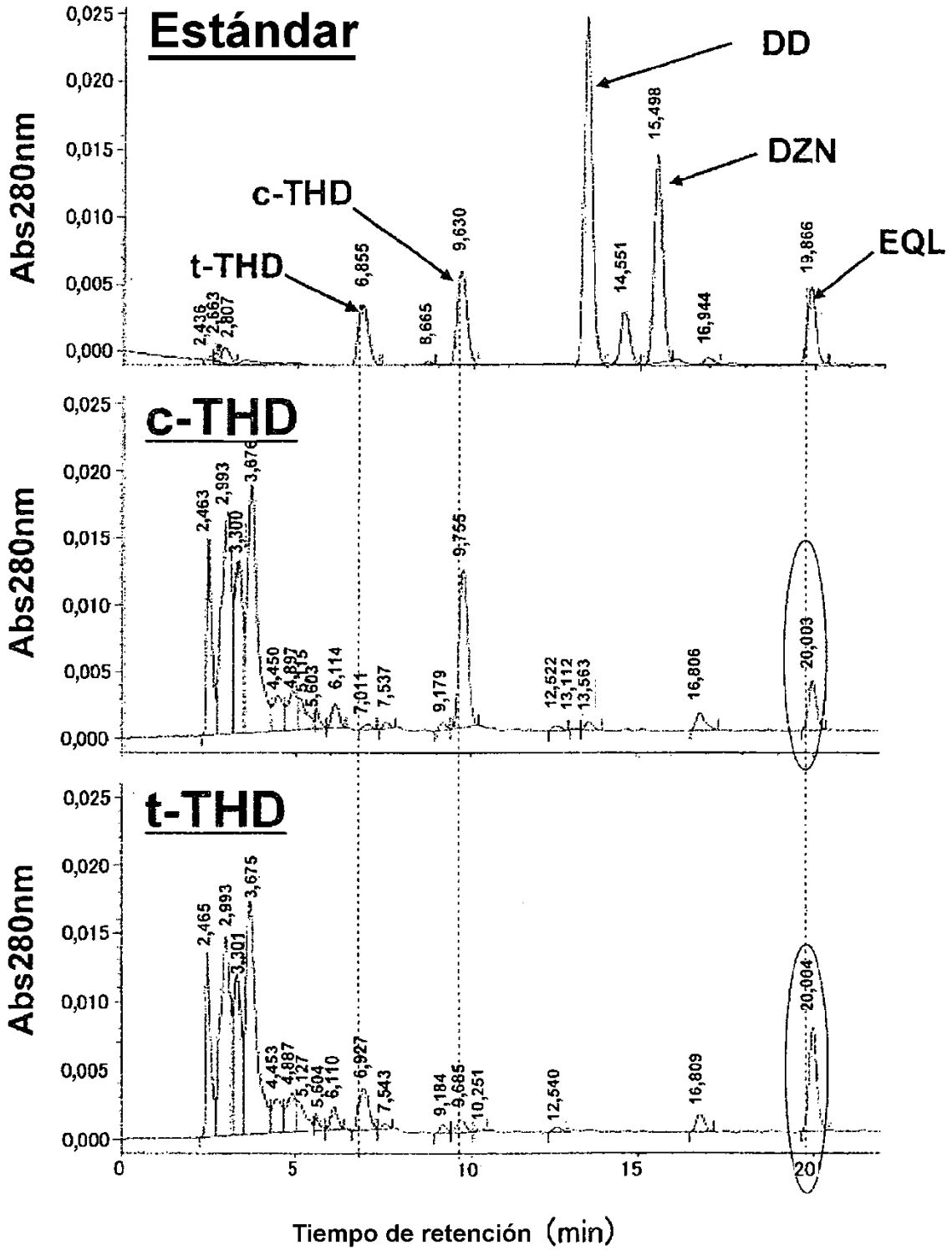

Estándar
DD
DZN
EQL
c-THD
t-THD
Abs280nm
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
2,436
2,663
2,807
6,855
8,665
9,630
14,551
15,498
16,944
19,866
c-THD
2,463
2,993
3,300
3,876
4,450
4,897
5,113
5,603
6,114
7,011
7,537
9,179
9,755
12,522
13,112
13,563
16,806
20,003
t-THD
2,465
2,993
3,301
3,675
4,453
4,887
5,127
5,604
6,110
6,927
7,543
9,184
9,685
10,251
12,540
16,809
20,004
0
5
10
15
20
Tiempo de retención (min)

Fig. 21

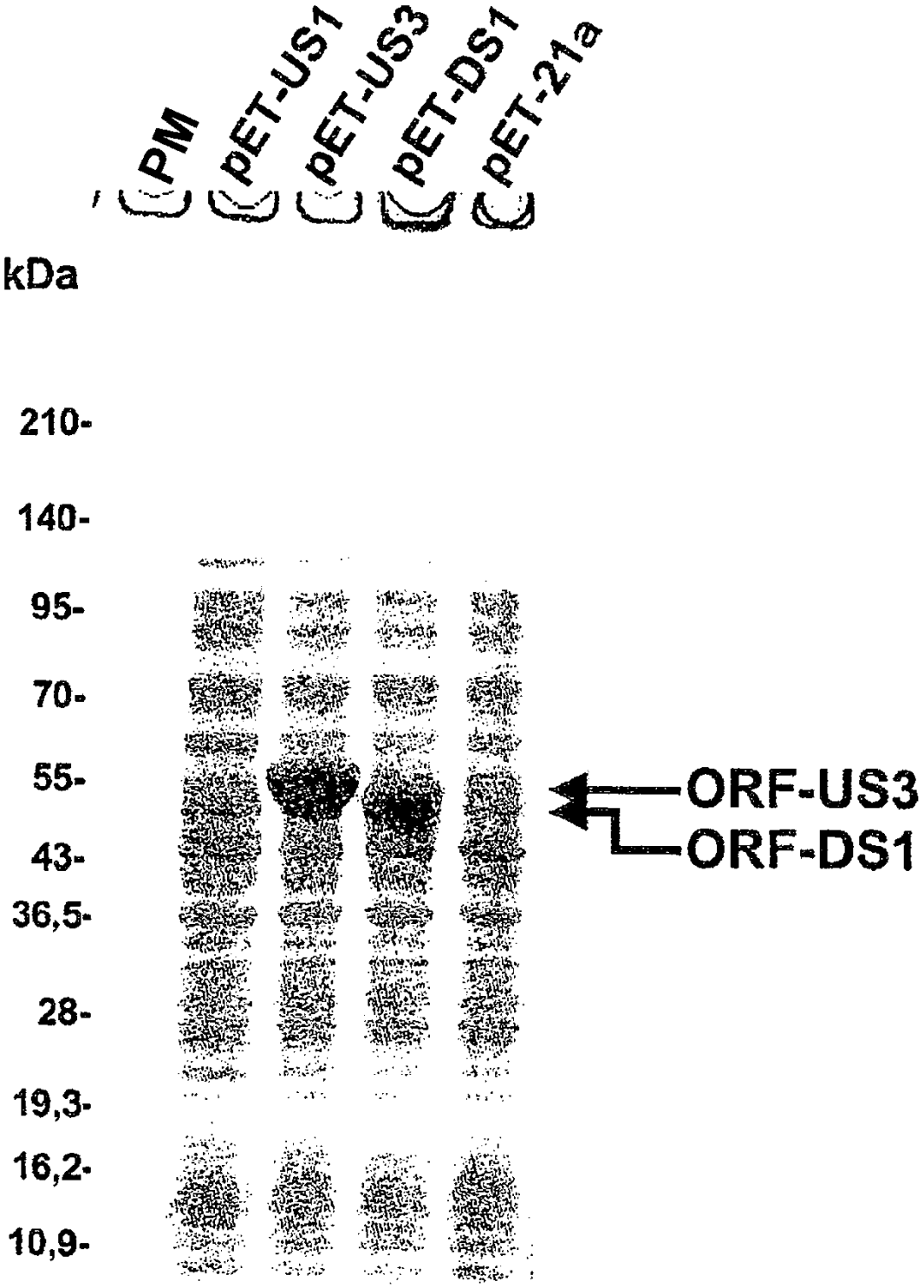

PM
pET-US1
pET-US3
pET-DS1
pET-21a
kDa
210-
140-
95-
70-
55-
43-
36,5-
28-
19,3-
16,2-
10,9-
ORF-US3
ORF-DS1

Fig. 22

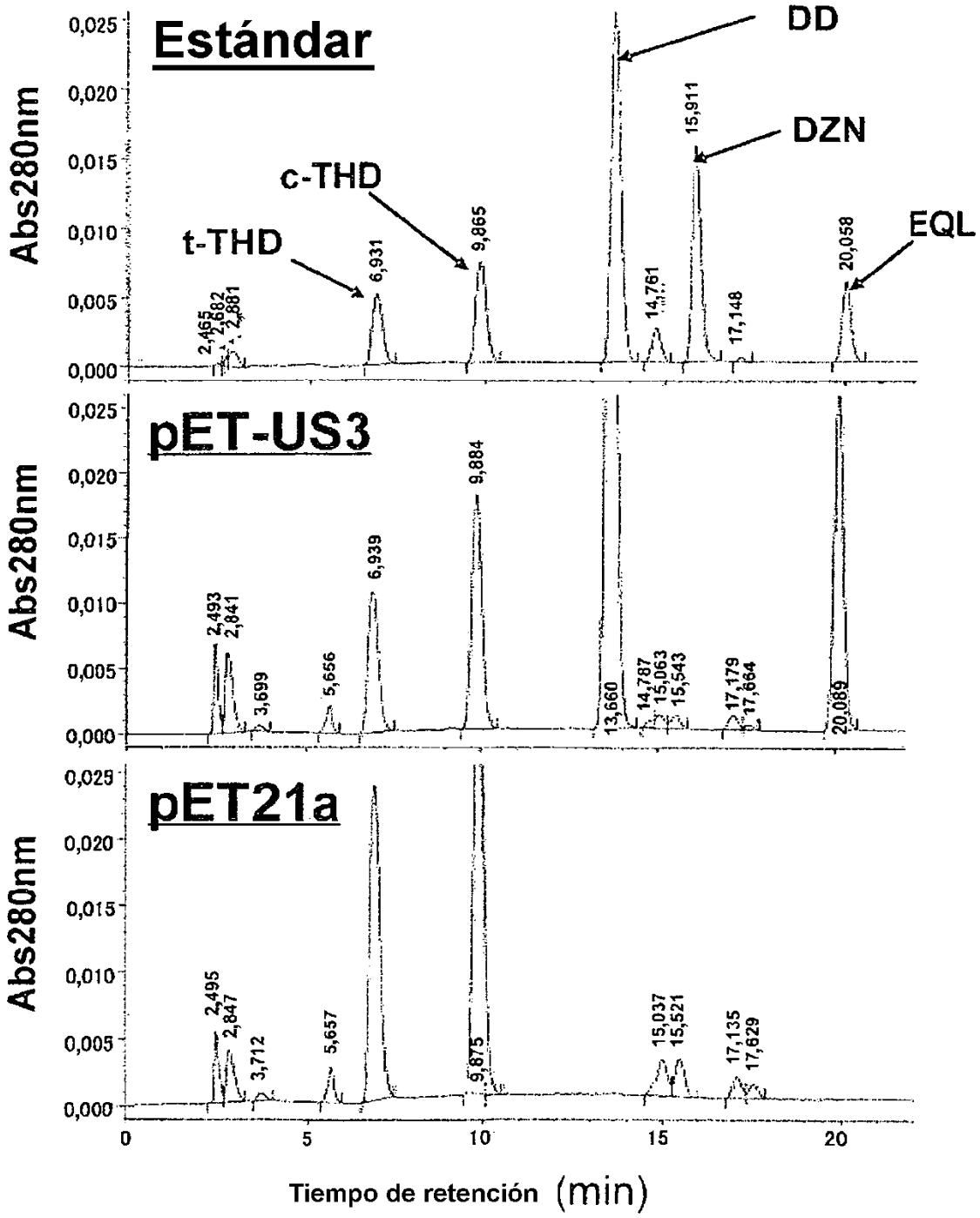

Estándar
DD
DZN
EQL
c-THD
t-THD
Abs280nm
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
2,465
2,682
2,881
6,931
9,865
14,761
15,911
17,148
20,058
pET-US3
2,493
2,841
3,699
5,656
6,939
9,884
13,660
14,787
15,063
15,543
17,179
17,664
20,089
pET21a
2,495
2,847
3,712
5,657
9,875
15,037
15,521
17,135
17,629
0
5
10
15
20
Tiempo de retención (min)

Fig. 23

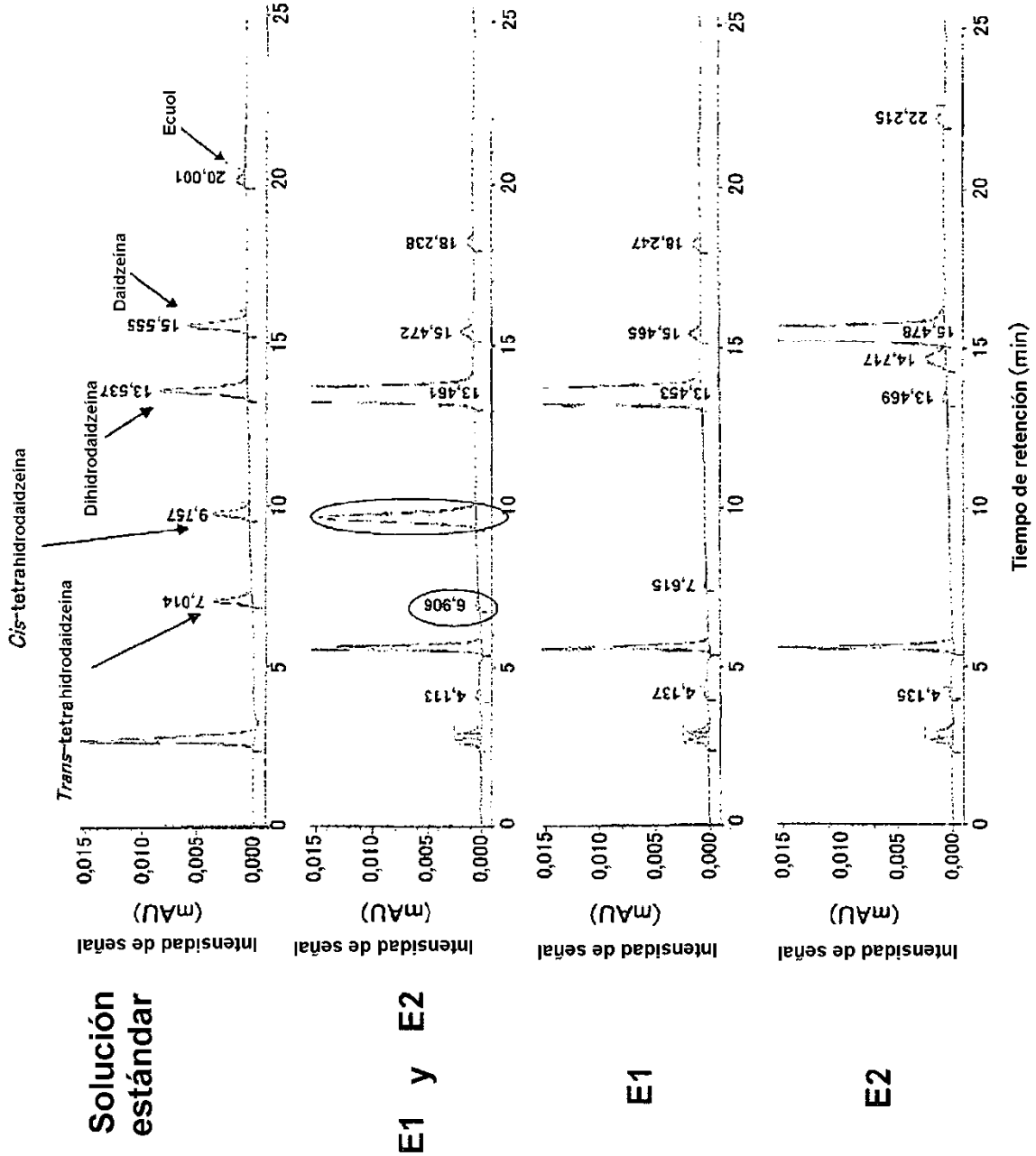

Solución estándar
E1 y E2
E1
E2
Intensidad de señal (mAU)
0,015
0,010
0,005
0,000
Trans-tetrahidrodaidzeina
Cis-tetrahidrodaidzeina
Dihidrodaidzeina
Daidzeína
Ecuol
7,014
9,757
13,537
15,555
20,001
4,113
6,906
13,461
15,472
18,238
4,137
7,615
13,453
15,465
18,247
4,135
13,469
14,747
15,478
22,215
0
5
10
15
20
25
Tiempo de retención (min)

Fig. 24

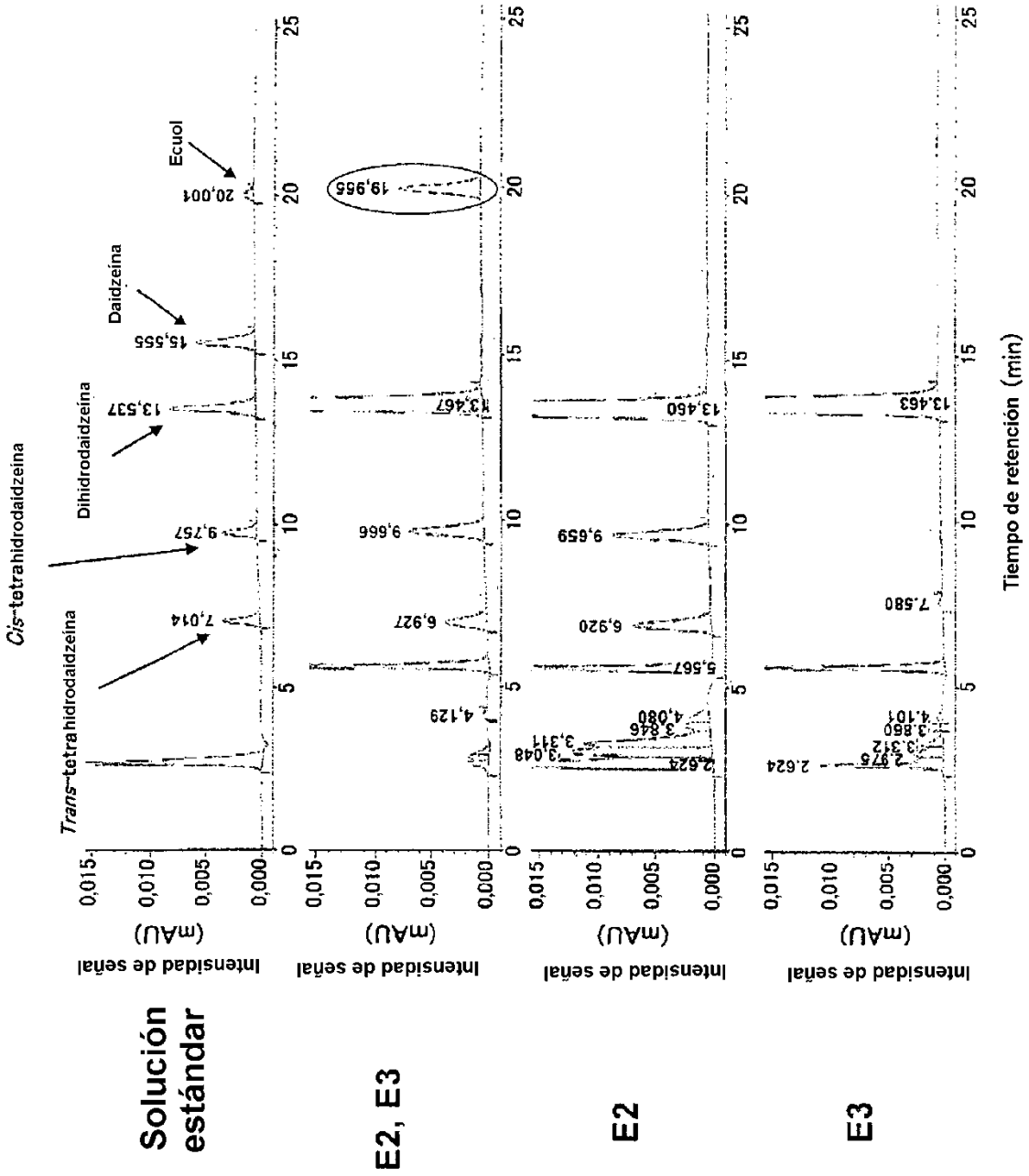

Solución estándar
E2, E3
E2
E3
Intensidad de señal (mAU)
0,015
0,010
0,005
0,000
Trans-tetrahidrodaidzeina
Cis-tetrahidrodaidzeina
Dihidrodaidzeina
Daidzeina
Ecuol
7,014
9,757
13,537
15,555
20,001
4,129
6,927
9,666
13,467
19,955
2,624
3,048
3,311
3,846
4,080
5,567
6,920
9,659
13,460
2,975
3,312
3,860
4,101
7,580
13,463
0
5
10
15
20
25
Tiempo de retención (min)

Fig. 25

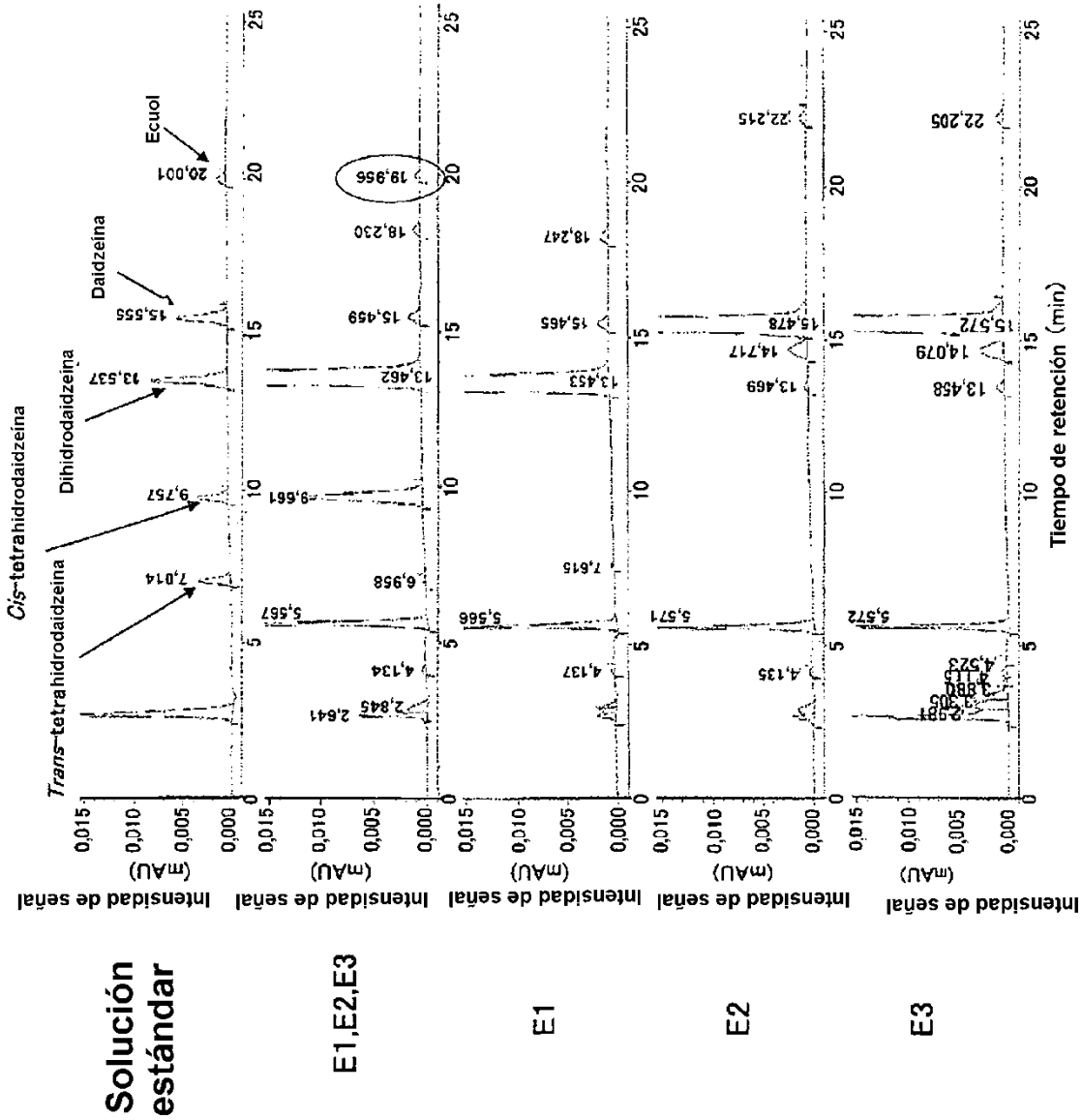

Solución estándar
E1,E2,E3
E1
E2
E3
Intensidad de señal (mAU)
Tiempo de retención (min)
Trans-tetrahidrodaidzeina
Cis-tetrahidrodaidzeina
Dihidrodaidzeina
Daidzeina
Ecuol

Fig. 26

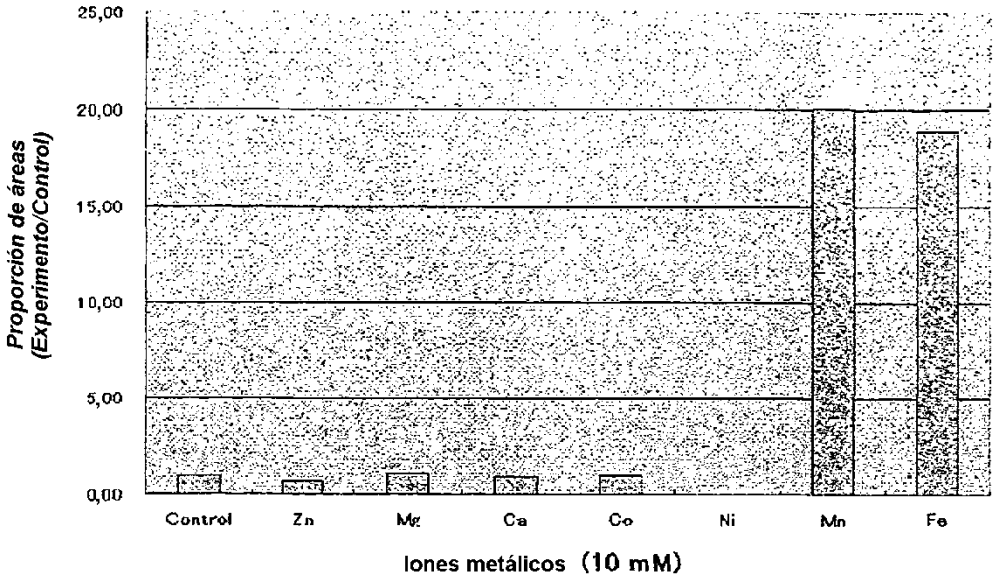

25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
Proporción de áreas
(Experimento/Control)
Control
Zn
Mg
Ca
Co
Ni
Mn
Fe
Iones metálicos (10 mM)

Fig. 27

Dominio de unión a NADPH

Lactococcus_E1 MKNKFYPKTFERGYIGNLEVENRAIRMPMGTELGNPDGSPSWASLKAYAEAADGGTGIVFMDNAGVTQFHHVGLSLASDNYIGPMSVLAKTIKQHGAIPGLQIVHPGRDAAFVRGDDLIS
Bacteroides_E1 MKNKFYPKTFERGYIGNLEVENRAIRMPMGTELGNPDGSPSWASFKAYAEAADGGTGIVFMDNAGVTQFHHVGLSLASDNYIGPMSVLAKTIKQHGAIPGLQIVHPGRDAAFVRGDDLIS
Streptococcus_E1 MKNKFYPKTFERGYIGNLEVENRAIRMPMGTELGNPDGSPSWASLKAYAEAADGGTGIVFMDNAGVTQFHHVGLSLASDKYIGPMSVLAKTIKQHGAIPGLQIVHPGRDAAFVRGDDLIS

secuencia de tipo OYR de la familia de FMN

Lactococcus_E1 SSRIQMEPWYENGGAVPRELTIEEIHDFVGYFGDCALRAQTAGFEIVDVHAACGVLLSNFLSPRNNTRNDMYGGSLHNRARFLLEVIRDIKKKCPNLPLAIRLSGIDFEPDGITIEETCE
Bacteroides_E1 SSRIQMEPWYENGGAVPRELTIEEIHDFVGYFGDCALRAQTAGFEIVDVHAACGVLLSNFLSPRNNTRNDMYGGSLHNRARFLLEVIRDIKKKCPNLPLAIRLSGIDFEPDGITIEETCE
Streptococcus_E1 SSRIQMEPWYENGGAVPRELTIEEIHDFVGYFGDCALRAQTAGFEIIDVHAACGVLLSNFLSPRNNTRNDMYGGSLHNRARFLLEVIRDIKKKCPNLPLAIRLSGIDFEPGGITVEETCE

Grupo de proteínas de hierro-azufre

Lactococcus_E1 VAKMCEAAGADAINITWGSHAEVINAAGLLSKHGANHVEAAKMIKDAVSIPTMLCGGIYSPEIGEKLLEDGVCDFIGIGKPALADPMWAKKAAEGRPEDIRPCIGCGVGCHDRGMLSGGV
Bacteroides_E1 VAKMCEAAGADAINITWGSHAEVINAAGLLSKHGANHVEAAKMIKDAVSIPTMLCGGIYSPEIGEKLLEDGVCDFIGIGKPALADPMWAKKAAEGRPEDIRPCIGCGVGCHDRGMLSGGV
Streptococcus_E1 VAKMCEAAGADAINITWGSHAEVINAAGLLSKHGANHVEAAKMIKDAVSIPTMLCGGIYSPEIGEKLLEDGVCDFIGIGKPALADPMWAKKAAEGRPEDIRPCIGCGVGCHDRGMLSGGV

Señal de nucleótido de piridina reductasa dependiente de FAD

Lactococcus_E1 VQCAVNAALYKFDEPVYPQAEVPKKVIIGAGPAGCEAAITAKKCGHDVTIYEKRKIGGVLKEATVSDSKEDLGRLITYYETQLKKEGIEVIYEEATADTVVAGGFDVAIVACGATVRNL
Bacteroides_E1 VQCAVNAALYKFDEPVYPQAEVPKKVIIGAGPAGCEAAITAKKCGHDVTIYEKRKIGGVLKEATVSDSKEDLGRLITYYETQLKKEGIEVIYEEATADTVVAGGFDVAIVACGATVRNL
Streptococcus_E1 VQCAVNAALYKFDEPVYPQAEVPKKVIIGAGPAGCEAAITAKKCGHDVTIYEKRKIGGVLKEATVSDSKEDLGYLITYYETQLKKEGIEVIYEEATASTVAAGGFDVAIVACGATVRNL

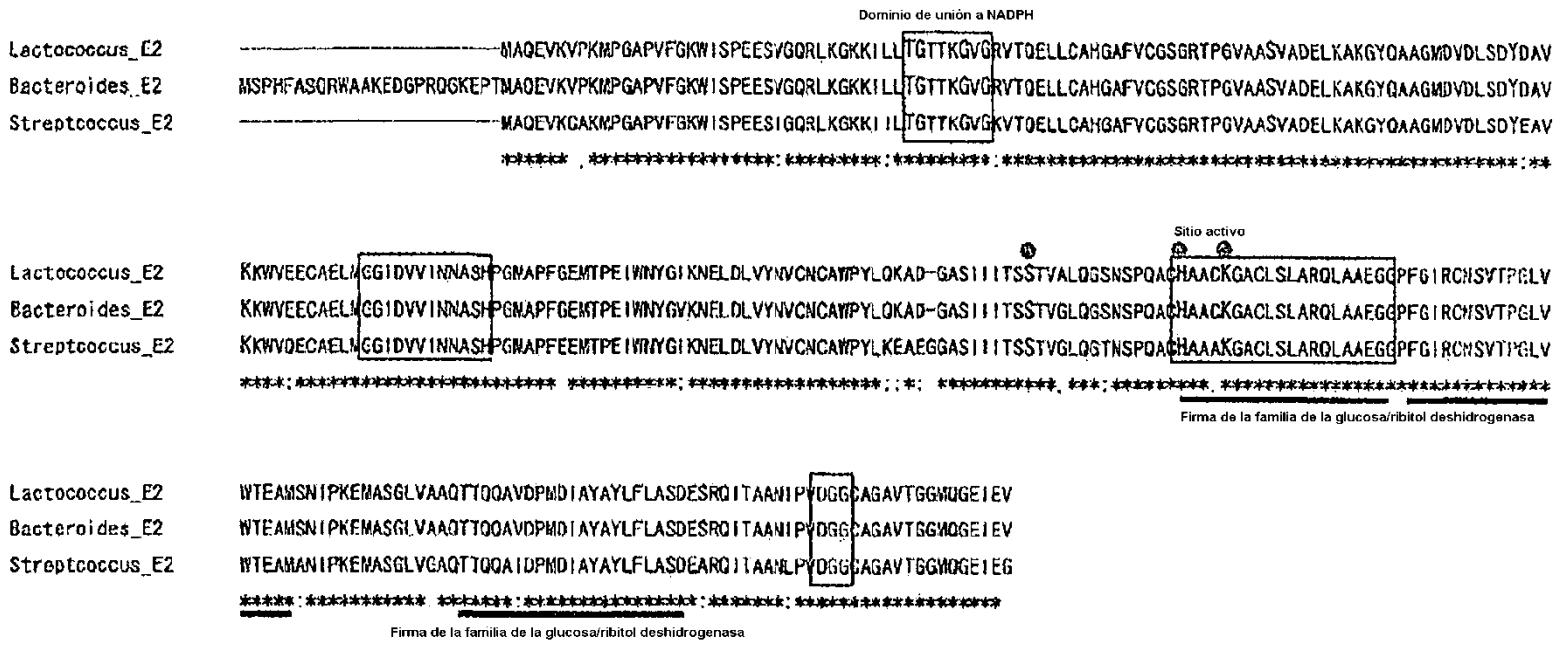
Señal de nucleótido de piridina reductasa dependiente de FAD

Lactococcus_E1 NIDGQDDPSVVYAMDFLDNDCKSDADRVVVCGGIVGAETALILAEERGKDVTITTRSPEFFVSGVMGIAYMVRLGMAGVTIKPSTQLVAVKDGKPMFAGPRGLETLDVDQTIISSGFVP
Bacteroides_E1 NIDGQDDPSVVYAMDFLDNDCKSDADRVVVCGGIVGAETALILAEERGKDVTITTRSPEFFVPGVMGIAYMVRLGMAGVTIKPSTQLVAVKDGKPMFAGPRGLETLDVDQTIISSGFVP
Streptococcus_E1 NIDGQDDPSVVYAMDFLDNDCKSDADRVVVCGGIVGAETALILAEEGGKDVTITTRSPEFFVPGVMGIAYMVRLGMAGVTIKPSTQLVAVKDGKPMFAGPRGLETLDVDQTIISSGFVP

Lactococcus_E1 TFNQFRAQIEEKCEDVRVIGIGDCKASRMVMDAVHEGYIAGCNL
Bacteroides_E1 TFNQFRAQIEEKCEDVRVIGIGDCKASRMVMDAVHEGYLAGCNL
Streptococcus_E1 TFNQFRAQIEEKCEDVRVIGIGDCKASRMVMDAVHEGYIAGCNL

: Sitio de unión de FMN (conservado)
: Sitio de unión de FMN (no conservado)

Fig. 28


Dominio de unión a NADPH
Lactococcus_E2
Bacteroides_E2
Streptococcus_E2
Sitio activo
Firma de la familia de la glucosa/ribitol deshidrogenasa
Firma de la familia de la glucosa/ribitol deshidrogenasa

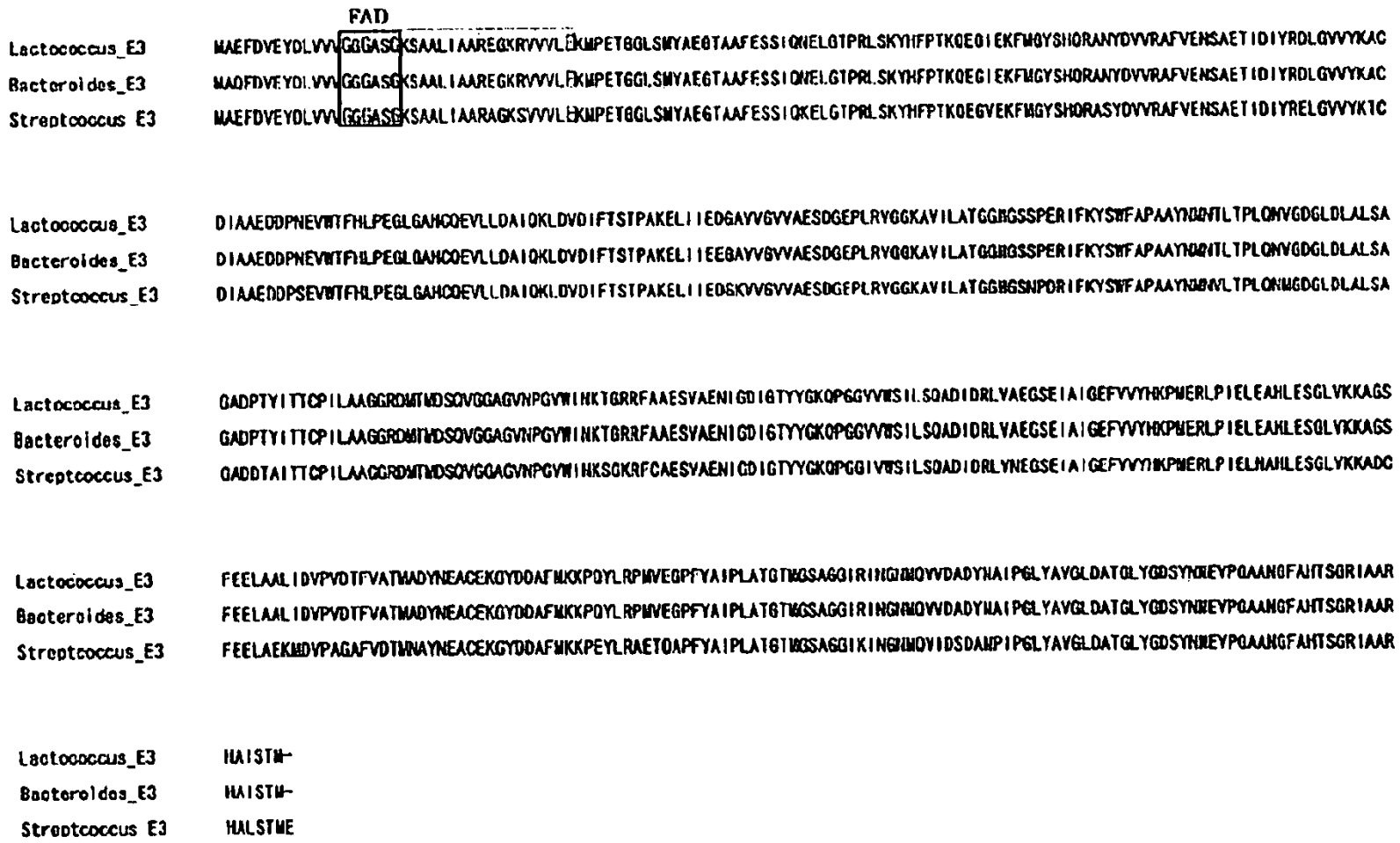



Fig. 29