

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 777**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14	(2006.01) A61P 7/02	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01) A61P 9/02	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61K 31/7034	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 31/7048	(2006.01) A61P 17/18	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)
A61P 1/14	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61P 3/02	(2006.01) C07H 15/203	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01) C07H 17/065	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2008** **PCT/JP2008/050619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008** **WO08088047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008** **E 08703469 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2128265**

54 Título: **Compuestos flavonoides glicosilados**

30 Prioridad:

19.01.2007 JP 2007010766

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

12.01.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 596 777 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

Compuestos flavonoides glicosilados

5 Campo técnico

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

10 Técnica anterior

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

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

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

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

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

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

El Documento de Patente 5 describe los glicósidos de compuestos de catequina en los que la glicosilación se produce en la posición 3', en las posiciones 3' y 5, o en las posiciones 3' y 7. Para este fin, este documento describe los procedimientos detallados en los que un compuesto de catequina y dextrina, ciclodextrina, almidón o una mezcla de los mismos se tratan con ciclomaltodextrina glucanotransferasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*, como en el caso del Documento de Patente 4. Además, en los ejemplos que utilizan dextrina como donador de glicosilo en los procedimientos anteriores, se considera que algunos de los glicósidos resultantes de (-)-epigallocatequina, 3-O-galato de (-)-epigallocatequina y 3-O-galato de (-)-epicatequina tienen de 6 a 8 residuos de glucosa de media por

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

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

Anteriormente, la síntesis, los análisis de estructura, y la caracterización de los glicósidos de galato de epigallocatequina utilizando la glucanosacarosa de Leuconostoc mesenteroides B-1299CB han sido descritos por Moon et al. (J. Agric. Food Chem. 54:1230-1237 (2006)).

Documento de Patente 1: JP 2001-46096 A

Documento de Patente 2: JP 05-176786 A (Patente Japonesa Núm. 3024848)

Documento de Patente 3: JP 07-10897 A (Patente Japonesa Núm. 3071610)

Documento de Patente 4: JP 08-298930 A (Patente Japonesa Núm. 3579496)

Documento de Patente 5: JP 09-3089 A (Patente Japonesa Núm. 3712285)

Documento no de patente 1: Biosci. Biotech. Biochem., 57 (10), 1666-1669 (1993)

Documento no de patente 2: Biosci. Biotech. Biochem., 57 (10), 1290-1293 (1993)

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

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

Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención han realizado esfuerzos extensivos e intensivos para desarrollar una técnica de glicosilación de los compuestos flavonoides incluyendo la catequina. Como resultado, los autores de la invención han encontrado que diversos agentes enzimáticos derivados del género Trichoderma tienen actividad de glicosilación de flavonoides. Así, la presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes puntos.

1. Un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil(-)-epigallocatequina;

3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina;

4'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina;

3'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina; y

3-O-galato de 3'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina.

2. Un alimento, composición farmacéutica o cosmética, que comprende el compuesto de acuerdo con el punto 1.

3. Una bebida, que comprende el compuesto de acuerdo con el punto 1.

Por otra parte, se describe un método para la preparación de un glicósido de un compuesto flavonoide, que comprende la etapa de tratar el compuesto flavonoide y un donador de glicosilo con un agente enzimático que tiene actividad de glicosilación y que deriva del género Trichoderma.

[Compuestos flavonoides]

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "compuesto flavonoide" incluya tanto flavonoides como esculetina, a menos que se especifique lo contrario.

Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "flavonoide" signifique un compuesto de catequina (flavanol), flavanona, flavona, flavonol, flavanonol, isoflavona, antocianina o chalcona, así como un derivado metilado de los mismos, a menos que se especifique lo contrario. El flavonoide incluye naringenina,

quercetina, daidzeína, genisteína y kaempferol. El flavonoide disponible para su uso en la presente invención pueden ser de origen natural o sintético.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "compuesto de catequina" se utiliza en un sentido amplio para significar un derivado polioxilado de 3-oxiflavano, a menos que se especifique lo contrario. Este incluye catequina, galocatequina y derivados 3-galoilo de las mismas, así como isómeros ópticos (isómeros (+), (-), (+)-epi y (-)-epi) y racematos de los mismos. Los ejemplos específicos incluyen catequina, galocatequina (GC), galato de catequina (3-O-galato de catequina; CG), galato de galocatequina (3-O-galato de galocatequina; GCG), epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (3-O-galato de epicatequina; ECG) y galato de epigalocatequina (3-O-galato de epigalocatequina; EGCG), así como los isómeros ópticos de los mismos. Los derivados metilados de los compuestos de catequina se refieren a derivados de los compuestos de catequina anteriores, en los que el H de al menos un grupo OH es sustituido por metilo. Los ejemplos de los derivados metilados de los compuestos de catequina incluyen los que tienen metilo en lugar de H en el grupo OH localizado en cualquiera de las posiciones 3', 4', 3" y 4" de epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina o galato de epigalocatequina. Los compuestos catequina y sus derivados metilados disponibles para uso en la presente invención pueden ser de origen natural o sintético. Los ejemplos de origen natural incluyen extractos de té, productos concentrados y purificados de los mismos (p. ej., extractos de té verde, tales como Teavigo (DSM Nutrition Japón), Polyphenon (Mitsui Norin Co., Ltd., Japón) y Sunphenon (Taiyo Kagaku Co., Ltd., Japón)), así como extractos de un cultivar de té "Benifuki."

Como se describe, los compuestos flavonoides se pueden utilizar solos o combinados.

[Agentes enzimáticos]

Los compuestos reivindicados se preparan mediante el uso de un agente enzimático que tiene actividad de glicosilación y que deriva del género Trichoderma. El género Trichoderma incluye Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Trichoderma saturnisporum, Trichoderma ghanense, Trichoderma koningii, Trichoderma hamatum, Trichoderma harzianum y Trichoderma polysporum.

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

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

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

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

Según se describe en la presente memoria, los agentes enzimáticos que pueden ser preferidos para su uso son aquellos que tienen actividad de glicosilación y que derivan del género Trichoderma. Como se describe en la presente memoria, los agentes enzimáticos que pueden ser eficaces para su uso son aquellos derivados de Trichoderma viride y utilizados como celulasa o β -1,3-glucanasa. De acuerdo con los estudios de los autores de la invención, se ha encontrado que varios agentes enzimáticos derivados del género Trichoderma, tales como los utilizados como celulasa o glucanasa (p. ej., β -1,3-glucanasa), tienen actividad de glicosilación, y que tales agentes enzimáticos pueden ser eficaces para su uso en la glicosilación de los compuestos flavonoides. Por ejemplo, como

se describe en la presente memoria, es posible utilizar agentes enzimáticos comercialmente disponibles, tales como los enumerados en la Tabla 1 del Ejemplo 2 descrito más adelante.

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

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

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

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

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

Además, la siguiente proteína puede ser presentada como un ejemplo de glicosiltransferasas disponibles para su uso en la presente invención:

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

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

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

este tipo de análisis son bien conocidos por los expertos en la técnica. Según se utiliza en la presente memoria para describir una secuencia de nucleótidos, el término "alta identidad" se refiere a una identidad de secuencia de al menos 60% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 90% o más, y lo más preferiblemente 95% o más. Según se utiliza en la presente memoria para describir una secuencia de aminoácidos, el término "alta identidad" se refiere a una identidad de secuencia de al menos 60% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, aún más preferiblemente 90% o más, y lo más preferiblemente 95% o más.

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

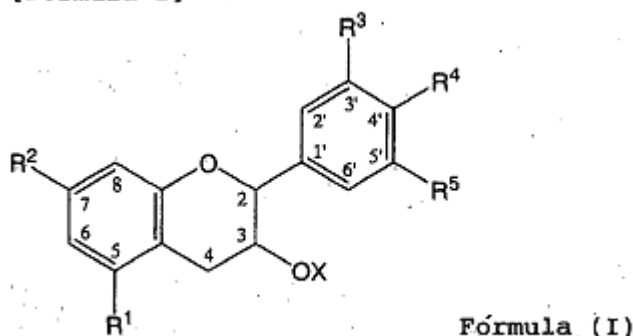
[Donadores de glicosilo]

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

[Glucósidos]

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

[Fórmula 1]



en donde

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

Este abarca además un glucósido de compuestos flavonoides mostrados a continuación:

en la Fórmula (I),
 al menos uno de R^1 a R^4 representa un residuo de glucosa unido a α o un residuo de maltosa o un residuo de maltooligosacárido, y cada uno de los otros representa OH;
 R^5 representa OH o H; y
 X representa H o un grupo galoilo.

La invención abarca los glucósidos de flavonoides enumerados a continuación:

3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil(-)-epigallocatequina;

3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)epigallocatequina;
 4'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
 3'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina;

y

3-O-galato de 3'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)epigallocatequina, así como isómeros ópticos de los mismos.

Los glicósidos de compuestos flavonoides obtenidos como se describe en la presente memoria pueden tener mayor solubilidad en agua en comparación con sus correspondientes compuestos flavonoides. Por ejemplo, la 5-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina muestra una solubilidad al menos 40 veces mayor o más que la (+)-catequina, y también se confirmó que el 3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina tenía una solubilidad significativamente mayor si se comparaba con el 3-O-galato de (-)-epigallocatequina (véase la sección de Ejemplos). Por otra parte, la glicosilación de los compuestos flavonoides también puede contribuir a la modificación del sabor de compuestos flavonoides. Por ejemplo, tras la glicosilación de un extracto de té verde rico en 3-O-galato de (-)-epigallocatequina, se ha confirmado que el producto glicosilado y los componentes de glicósido individuales purificados de manera uniforme (es decir, 3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina, 3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina y 3-O-galato de 7-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina) muestran cada uno un nivel significativamente menor de sabor astringente que el producto no glicosilado. Del mismo modo, los análisis sensoriales realizados por panelistas también han proporcionado los resultados de la evaluación que indican una reducción sabores amargos y astringentes y por lo tanto, un aumento de potabilidad. Además, los estudios de los autores de la invención han demostrado que la 4'-O- α -D-glucopiranosil-(+)- catequina es más estable frente al calor que la catequina. Por lo tanto, los glicósidos de compuestos flavonoides obtenidos como se describe en la presente memoria pueden tener una mayor estabilidad térmica en comparación con sus correspondientes compuestos flavonoides.

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

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

[Propiedades enzimológicas de la glicosiltransferasa de la presente invención]

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

Selectividad del donador de glicosilo:

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

Especificidad de sustrato:

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

pH y temperatura óptimos de la reacción:

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

[Usos de los glicósidos]

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

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

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

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

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

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

Ventajas de la invención

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

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

El sabor de los compuestos flavonoides puede ser modificado a través de la glicosilación. En particular, cuando un compuesto flavonoide que tiene sabores amargos y astringentes, como un compuesto de catequina, es glicosilado de acuerdo con el método descrito, tales sabores pueden ser reducidos.

La estabilidad térmica de los compuestos flavonoides se puede mejorar a través de la glicosilación.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplos

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

Se inoculó *Trichoderma viride* cepa IAM5141 a partir de un cultivo inclinado en un medio líquido (10 ml) que contenía extracto de levadura al 1% (Difco), polipeptona al 1% (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Japón) y dextrina al 2% (Nacalai Tesque, Inc., Japón), seguido de cultivo con sacudimiento a 30°C durante 1 día para dar una solución pre-

cultivada. Además, todo el volumen de la solución pre-cultivada se inoculó en 900 ml del mismo medio líquido y se cultivó a 30°C durante 3 días, seguido de filtración a través de un filtro para preparar una solución de sobrenadante de cultivo. Después de la adición de sulfato de amonio (387 g, saturación de 80%) al sobrenadante de cultivo (690 ml), la mezcla se agitó y se centrifugó para recoger un producto precipitado. El producto precipitado resultante se diluyó con 10 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0) para su uso como una solución de enzima bruta.

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

Condiciones del análisis

Columna: Develosil C30-UG-5 (4,6 x 150 mm)

Condiciones de gradiente: Eluyente B al 5% → Eluyente B al 50%/20 min

Eluyente A: TFA al 0,1%/agua destilada

Eluyente B: acetonitrilo al 90%/TFA al 0,08%

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Longitud de onda de detección: 280 nm

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

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

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

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

[Tabla 1]

Proveedor	Agente enzimático	Donador de glicosilo	Producto (% de área)	
			7-Glc	5-Glc
Industria Farmacéutica Yakult	Celulasa "Onozuka" derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,86	8,79
		Dex	2,93	8,97
ídem	Celulasa "Onozuka" RS derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
SS		2,21	9,21	
		Dex	1,70	7,95
ídem	Celulasa "Onozuka" R-10 derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	-	7,68
		Dex	-	5,98
ídem	Celulasa "Onozuka" FA derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,92	8,78
		Dex	2,82	9,14
ídem	Pancellase derivado de β-1,3-glucanasa de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	-	2,51
		Dex	-	1,70
ídem	Pancellase SS derivado de celulasa de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	2,18	8,17
		Dex	1,94	7,05
ídem	Pancellase BR derivado de celulasa al 5% + lactosa al 95% de Trichoderma	ninguno		-
		SS	2,86	8,30
		Dex	3,19	9,94
ídem	Celulasa 3S "Onozuka" derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	-
		SS	3,04	9,85
		Dex	2,51	9,28
Enzima Amano	Celulasa T "Amano" 4 derivada de Trichoderma viride 16% celulasa + dextrina	ninguno	0,94	2,86
		SS	1,98	6,00
		Dex	1,41	4,19
ídem	Celulasa XP-425	ninguno	1,71	5,82
		SS	3,27	9,54
		Dex	3,09	8,47
SIGMA	Celulasa derivada de Trichoderma viride	ninguno	-	2,07
		SS	2,57	10,99
		Dex	1,36	6,17
Ninguno: ausencia, SS: almidón soluble, Dex: dextrina 7-Glc: 7-O-α-D-glucopiranosil- (+)-catequina 5-Glc: 5-O-α-D-glucopiranosil- (+)-catequina				

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

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

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

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

7-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 450,9, RMN δ ppm (D₂O); 2,48 (1H, dd), 2,80 (1H, dd), 3,42 (1H, t), 3,4-3,7 (4H, m), 3,80 (1H, t), 4,14 (1H, q), 4,69 (1H, d), 5,47 (1H, d), 6,23 (1H, d), 6,27 (1H, d), 6,78 (1H, dd), 6,84 (1H, d), 6,86 (1H, d).

5-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 450,8, RMN δ ppm (D₂O); 2,62 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,45-3,55 (1H, m), 3,6-3,7 (3H, m), 3,83 (1H, t), 4,18 (1H, dd), 4,76 (1H, d), 5,61 (1H, d), 6,09 (1H, d), 6,31 (1H, d), 6,77 (1H, d), 6,8-6,9 (2H, m).

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

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

3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina: m/z 621,0, RMN δ ppm (D₂O); 2,8-3,1 (2H, m), 3,52 (1H, t), 3,7-3,8 (4H, m), 3,91 (1H, t), 5,01 (1H, s), 5,54 (1H, s), 5,6 (1H, s ancho), 6,35 (1H, s), 6,43 (1H, s), 6,57 (2H, s), 6,95 (2H, s).

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

Se mezcló galato de epigallocatequina (3 g) con Pancellase BR (5 g, Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Japón), dextrina (10 g) y tampón de acetato 0,1 M (100 ml, pH 5), seguido de agitación a 50°C durante 4 horas. Después de la reacción, el sobrenadante centrifugado se adsorbió sobre una columna de Sefarosa LH20 (100 ml, Amersham Biosciences). Después de la elución por etapas con agua destilada (200 ml), etanol del 30% (200 ml) y etanol del 40% (200 ml), se recogieron las fracciones de glicósidos para preparar un producto liofilizado, de los cuales 50 mg se disolvieron adicionalmente en agua destilada (5 ml) y después se fraccionaron y se purificaron bajo las siguientes condiciones: columna: Develosil C30-UG-5 (20 x 250 mm), Eluyente A: TFA al 0,1%/agua destilada, Eluyente B: metanol del 90%/TFA al 0,1%, condiciones de elución: B al 30%, velocidad de flujo: 3 ml/min, longitud de onda de detección: 280 nm. Como componentes principales, se obtuvieron 3-O-galato de 7-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina y 3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina.

3-O-galato de 7-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina: m/z 621,1, RMN δ ppm (D₂O); 2,98 (1H, d), 3,08 (1H, d), 3,53 (1H, t), 3,68 (1H, s), 3,7-3,9 (3H, m), 3,92 (1H, t), 5,14 (1H, s), 5,62 (2H, s ancho), 6,40 (1H, s), 6,48 (1H, s), 6,61 (2H, s), 6,99 (2H, s).

3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina: m/z 783,1, RMN δ ppm (D₂O); 2,93 (1H, dd), 3,00 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,60 (1H, dd), 3,7-3,9 (9H, m), 4,18 (1H, t), 4,96 (1H, s), 5,21 (1H, d), 5,51 (1H, s ancho), 5,59 (1H, d), 6,35 (1H, d), 6,43 (1H, d), 6,57 (2H, s), 6,96 (2H, s).

60 (Ejemplo de Referencia 4: Preparación de glicósidos de flavonoides (2))

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

En vista de los hechos de que la dextrina y la γ -ciclodextrina son polímeros en los que los residuos de glucosa están

unidos a través de enlaces α -1,4 y de que la enzima pretendida tiene la capacidad de degradar estos polímeros, se sugiere que la enzima puede ser una enzima del tipo de las de la familia de la α -amilasa.

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

AMY-12f: 5'-TAYTGYGGNGGNACNTTYAARGGNYT-3' (SEQ ID NO: 1)

AMY-15R: 5'-TTYTCNACRTGYTTNACNGTRTCDAT-3' (SEQ ID NO: 2)

AMY-17R: 5'-GGTNAYRTCYNCKRRTTNGCNGGRTC-3' (SEQ ID NO: 3)

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

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

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

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

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

En primer lugar, el ADN genómico preparado a partir de *T. viride* IAM5141 se digirió completamente con HindIII o PstI, y a continuación se cerró por auto-ligación a través de la incubación durante la noche a 16°C con una ligación elevada (Toyobo Co., Ltd., Japón). Estos ADN (0,1 μ g cada uno) fueron utilizados cada uno como molde para llevar a cabo la reacción de PCR con los cebadores anteriores TRa2-2 y TRa2-3. La PCR se llevó a cabo mediante el uso de LA Taq (Takara Bio Inc., Japón) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, (95°C durante 30 segundos, 66°C durante 15 minutos) x 30 ciclos, y 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, lo que confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 2 kb para el caso de la utilización de ADN genómico digerido con HindIII como molde, y un fragmento de ADN de aproximadamente 4,5 kb para el caso de la utilización del genoma digerido PstI como molde. Estos fragmentos de ADN fueron escindidos cada uno del gel de agarosa y clonados de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Las secuencias de nucleótidos se determinaron a partir de ambos extremos de los fragmentos insertados. Se encontró que las secuencias de nucleótidos del genoma digerido con HindIII y el genoma digerido con PstI se solapaban entre sí hasta llegar a los sitios de las enzimas de restricción. Las secuencias de nucleótidos obtenidas de este modo se ligaron a la secuencia parcial obtenida previamente. Esta secuencia de nucleótidos se muestra en la Figura 4 (TRa2-gDNA) y el SEQ ID NO: 6. La región codificante del homólogo de α -amilasa se dedujo por comparación con las 4 secuencias del Grupo 1 de la Figura 2, la aparición de un codón de iniciación y un codón de terminación, etc. Se consideró que el codón de iniciación era ATG en los nucleótidos 423-425, mientras que se consideró que el codón de terminación era TAA en los nucleótidos 1926-1928.

3. ADNc, clonación de homología con α -amilasa:

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

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

TRa2EcoRI-F2: 5'-GGAATTCATGAAGCTTCGATCCGCCGTCCC-3' (SEQ ID NO: 7)

TRa2XhoI-r2: 5'-CCGCTCGAGTTATGAAGACAGCAGCACAAT-3' (SEQ ID NO: 8)

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

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

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

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

45 5. Medición de la actividad glucosidasa de TRa2:

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

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

60 6. Medición de la actividad de glicosilación de TRa2:

A 100 µl de una provisión de partida de sobrenadante de cultivo o un producto concentrado del mismo concentrado aproximadamente 5 veces con un VIVASPIN 10.000 MWCO/PES (VIVASCIENCE), se le añadieron (+)-catequina, o

3-O-galato de (-)-epigallocatequina (3 mg) y dextrina (10 mg) y se hicieron reaccionar con agitación a 50°C durante 1 día. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se diluyó 10 veces con una solución de ácido trifluoroacético al 0,1% y se analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las mismas condiciones que las utilizadas en el Ejemplo 1. Como resultado, no se observó producto de reacción en la solución de reacción que se había hecho reaccionar con el sobrenadante del cultivo de la cepa de control (cepa C-1) transformada con el vector pYE22m, mientras que se confirmó la generación de glicósidos de catequina y glicósidos de 3-O-galato de epigallocatequina en el caso de la cepa TRa2-1 (Figura 7).

7. Preparación catalizada con TRa2 de glicósidos de catequina:

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

5-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,71 (1H, dd), 2,85 (1H, dd), 3,42 (1H, t), 3,56-3,85 (9H, m), 4,19 (1H, t), 4,26 (1H, dd), 4,87 (1H, d), 5,70 (1H, d), 6,19 (1H, d), 6,39 (1H, d), 6,83 (1H, dd), 6,90-6,93 (2H, m).

5-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,62 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,45-3,55 (1H, m), 3,6-3,7 (3H, m), 3,83 (1H, t), 4,18 (1H, dd), 4,76 (1H, d), 5,61 (1H, d), 6,09 (1H, d), 6,31 (1H, d), 6,77 (1H, d), 6,8-6,9 (2H, m).

4'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,54 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 3,43 (1H, t), 3,60 (1H, dd), 3,68-3,94 (9H, m), 4,19-4,28 (2H, m), 4,82 (1H, d), 5,44 (1H, d), 5,62 (1H, d), 6,04 (1H, d), 6,11 (1H, d), 6,91 (1H, dd), 7,00 (1H, d), 7,22 (1H, d).

4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,45 (1H, dd), 2,73 (1H, dd), 3,45 (1H, t), 3,65-3,75 (4H, m), 4,11 (1H, dd), 4,7-4,75 (2H, m), 5,53 (1H, d), 5,95 (1H, d), 6,02 (1H, d), 6,83 (1H, dd), 6,91 (1H, d), 7,15 (1H, d).

3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(+)-catequina: m/z 615,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,54 (1H, dd), 2,80 (1H, dd), 3,44 (1H, t), 3,59 (1H, dd), 3,67-3,90 (9H, m), 4,17-4,24 (2H, m), 4,83 (1H, d), 5,41 (1H, d), 5,55 (1H, d), 6,03 (1H, d), 6,10 (1H, d), 7,10 (1H, d), 7,06 (1H, d), 7,26 (1H, d).

3'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina: m/z 453,2, RMN δ ppm (D₂O); 2,43 (1H, dd), 2,73 (1H, dd), 3,27 (1H, s), 3,44 (1H, t), 3,6 a 3,7 (4H, m), 3,88 (1H, t), 4,10 (1H, dd), 4,69 (1H, d), 5,46 (1H, d), 5,93 (1H, s), 6,01 (1H, s), 6,89 (1H, d), 6,94 (1H, dd), 7,18 (1H, d).

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

La cepa TRa2-1 se inoculó en 100 ml de medio líquido YPD y se cultivó con agitación a 30°C durante 3 días. Las células se recogieron por centrifugación para obtener el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante de cultivo (45 ml) se concentró hasta 20 ml usando un disco de ultrafiltración NMWL 30000/celulosa regenerada mientras se añadían 50 ml de tampón de acetato 0,1 M (pH 5), y se utilizó como una solución de enzima TRa2. Esta solución de enzima TRa2 (20 ml) se mezcló con 3-O-galato de (-)-epigallocatequina (600 mg) y dextrina (2 g), seguido de agitación a 50°C durante 1 día. La solución de reacción se centrifugó, y el sobrenadante se adsorbió sobre una columna de resina LH20 25 ml/φ de 1,5 x 30 cm. Después de la elución con agua destilada (100 ml), etanol del 10% (100 ml), etanol del 20% (100 ml) y etanol del 30% (200 ml), se recogió y se liofilizó la fracción de etanol del 30%. El polvo liofilizado (120 mg) se disolvió en 12 ml de agua destilada y se separó en una columna Develosil C30-UG-5 de 20 x 250 mm, A: TFA al 0,1%/agua destilada, B: metanol del 90%/TFA al 0,1%, B al 40%, 3 ml/min, 280 nm. Los análisis de MS y RMN sugieren que el Pico 2 era 3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina, el Pico 5 era 3-O-galato de 3'-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina, y el Pico 6 era (-)-3-O-galato de 3'-O-α-D-glucopiranosil-epigallocatequina. En contraste, se sugirió que el Pico 3 era una mezcla de glicósido y maltotetraósido, a juzgar por sus datos de MS (m/z 621,2, 1107,3), y el glicósido se consideró que era 3-O-galato de 7-O-α-D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina, a juzgar por su tiempo de retención.

3-O-galato de 7-O-(4-O-α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina: m/z 783,2, RMN δ ppm (CD₃OD); 2,88 (1H, dd), 2,0,1 (1H, dd), 3,26 (1H, t), 3,46 (1H, dd), 3,6-3,9 (9H, m), 4,08 (1H, t), 5,00 (1H, s), 5,20

(1H, d), 5,43 (1H, d), 5,54 (1H, s), 6,27 (1H, d), 6,34 (1H, d), 6,51 (2H, d), 6,94 (2H, d).

3-O-galato de 3'-O-A-D-glucopiranosil(-)-epigallocatequina: m/z 621,1, δ ppm (CD₃OD); 2,88 (1H, dd), 2,99 (1H, dd), 3,42 (1H, dd), 3,51 (1H, t), 3,69 (1H, m), 3,8-3,9 (3H, m), 4,88 (1H, d), 4,98 (1H, s), 5,49 (1H, s ancho), 5,95 (1H, d), 5,96 (1H, d), 6,65 (1H, d), 7,01 (2H, s), 7,11 (1H, d).

5 3-O-galato de 3'-O- (4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina: m/z 783,2, δ ppm (CD₃OD); 2,87 (1H, d ancho), 2,99 (1H, dd), 3,27 (1H, t), 3,44-3,48 (2H, m), 3,6-3,8 (4H, m), 3,85 (2H, d), 3,98 (1H, dd), 4,06 (H, t), 4,85 (1H, d), 4,99 (1H, s), 5,28 (1H, d), 5,49 (1H, s ancho), 5,94 (1H, d), 5,96 (1H, d), 6,64 (1H, d), 7,01 (2H, s), 7,09 (1H, d)

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

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

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

20

25

Cultivo

30 La cepa TRa2-3 se cultivó en 20 ml de SD (-Trp) a 30°C durante 16 hr. La solución pre-cultivada se inoculó en 1 L de SD(-Trp) + KH₂PO₄-KOH 100 mM (pH 6,0) y se cultivó a 30°C durante 3 días, seguido de centrifugación para recoger el sobrenadante de cultivo.

Purificación

35 El sobrenadante de cultivo se aplicó sobre una columna Chelating Sepharose Fast Flow quelada con Ni²⁺ (5 ml, Pharmacia Biotech) equilibrada con Tampón S1 [NaH₂PO₄-NaOH 20 mM (pH 7,4), imidazol 10 mM, NaCl 0,5 M, 2-mercaptoetanol 15 mM], seguido de lavado con el mismo tampón (40 ml). Con posterioridad, las proteínas unidas a la columna se hicieron eluir con Tampón E1 [NaH₂PO₄-NaOH 20 mM (pH 7,4), imidazol 200 mM, NaCl 0,5 M, 2-mercaptoetanol 15 mM]. Se recogieron las fracciones activas, y luego se eliminaron las sales utilizando VIVASPIN (30.000 MWCO, VIVASCIENCE).

40

Posteriormente, se aplicó la solución de enzima (1,5 ml/min) sobre una columna Resource Q (1 ml, Pharmacia Biotech) equilibrada con Tampón S2 [KH₂PO₄-KOH 20 mM₂ (pH 7,4), 2-mercaptoetanol 15 mM, CHAPS al 0,1%], seguido de lavado con el mismo tampón (10 ml). Posteriormente, las proteínas unidas a la columna se hicieron eluir con un gradiente lineal de 0-100% de tampón E2 [KH₂PO₄-KOH 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,6 M, 2-mercaptoetanol 15 mM, CHAPS al 0,1%] (60 ml). Se recogieron las fracciones activas, y luego se sometieron a eliminación de las sales y se concentraron usando VIVASPIN (30.000 MWCO, VIVASCIENCE).

45

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

Medición de la actividad de la enzima:

55 Actividad de glicosilación

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

60

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

Selectividad del donador de glicosilo 1:

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

[Tabla 2]

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

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

Selectividad del donador de glicosilo 2:

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

- 25 Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 3]

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

[Ejemplo de Referencia 6: Especificidad de sustrato]

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

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

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

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

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

[Ejemplo de Referencia 8: Estabilidad térmica del glicósido]

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

[Ejemplo de Referencia 9: Solubilidad de los glicósidos]

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

glucopiranosil(-)-epigallocatequina. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11.

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

[Ejemplo de Referencia 10: Preparación de enzima inmovilizada]

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

[Tabla 4]

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

[Ejemplo de Referencia 11: Glicosilación de catequina metilada]

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

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

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

[Ejemplo 13: Evaluación del sabor de los glicósidos]

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Suntory Holdings Limited

5 <120> MÉTODO PARA LA GLICOSILACIÓN DE COMPUESTOS FLAVONOIDES

<130> R2272. EP S3

<140> EP 08 70 3469.0

10 <141> 2008-01-18

<150> JP 2007-010766

<151> 2007-01-19

15 <160> 27

<170> PatentIn Versión 3.1

<210> 1

20 <211> 26

<212> ADN

<213> Ascomycetes

<220>

25 <223> Inventor: Ochiai, Misa Inventor: Fukami, Harukazu Inventor: Nakao, Masahiro Inventor: Noguchi, Akio

<220>

<221> rasgo_misc

30 <222> (9) .. (9)

<223> n representa cualquier base

<220>

<221> rasgo_misc

35 <222> (24) .. (24)

<223> n representa cualquier base

<220>

<221> rasgo_misc

40 <222> (15) .. (15)

<223> n representa cualquier base

<220>

<221> rasgo_misc

45 <222> (12) .. (12)

<223> n representa cualquier base

<400> 1

50 taytgyggng gnacnttyaa rggnyt 26

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Ascomycetes

55 <220>

<221> rasgo_misc

<222> (6) .. (6)

<223> n representa cualquier base

60 <220>

<221> rasgo_misc

<222> (15) .. (15)

<223> n representa cualquier base

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (18) .. (18)
 <223> n representa cualquier base
 5
 <400> 2
 ttytnacrt gytnnacngt rtcdat 26
 10
 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Ascomycetes
 15
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (4) .. (4)
 <223> n representa cualquier base
 20
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (13) .. (13)
 <223> n representa cualquier base
 25
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (19) .. (19)
 <223> n representa cualquier base
 30
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (22) .. (22)
 <223> n representa cualquier base
 35
 <400> 3
 ggtnayrtcy tcncrktng cnggrtc 27
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 40
 <213> Trichoderma viride IAM 5141
 <400> 4
 atctacatac ccaacctggt 20
 45
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride IAM 5141
 50
 <400> 5
 agatggcatc aaatcccat 19
 <210> 6
 <211> 2633
 55
 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride IAM 5141
 <400> 1

ES 2 596 777 T3

tcatacaaag ctatttcgaa gaccaatatt ctacccccctt ctccgacgat agagccctat	60
ggtaatgggc cgatgggttg cttattcggc cctttgtcgg ccggggcatg cgtgtttgac	120
atgttgaagc ttgggcagat ctgggatcgg cgtcacggga tgcctataac aggaggtctg	180
taagtggctg tttggccgcg gcaagtttta ttgccggagc gaatatggcg tctcaatgac	240
ctacgggatc ttgttttttg tctgtttggt gtcgtttggg caaagggggc atatgcgata	300
tctatgccct tggggatata tatatatggc ttgccgctct ctcttccttg gatcagcttg	360
ctgaccacag acctcttgca gacgcagcct gaactcgagc atcccacagc tgaaagaaga	420
agatgaagct tcgatccgcc gtcccgtgc tgttgacgct ttctctcccg gccgtccttg	480
gcgccgacac ggcagactgg aggtctcgta ccatctactt tgccctgaca gaccgaattg	540
ctcgcagctc aagcgacacg ggaggctctg cgtgtacaaa tctgaatgac tactgtggtg	600
gcacgttcca gggcttgag agcaagctgg actacatcaa gggcatggga tttgatgcca	660
tctggatcaa ccccgctgta accagtgagt tgcccatcta tccccatcct cttgattggt	720
ggctaacatc tcttgaaaga cagtgatttc ggcttccatg gctactgggc actggatcta	780
aacactatca attctcacta tggcactgcg gatgatttaa agagtctcgt tgatgctgca	840
catggcaagg tatattcaca ccattctccc aactgctgag tgtcagtgct agaaataacc	900
aaaaacaggg cttctacatg atggtcgacg ttgtagccaa ccacatggga aacgcaaaca	960
tcacagacga ctccccctcc cctctgaacc aacaatctc ataccacaca aaatgtgaca	1020
ttgacttcaa caaccagacc agcgtcgaaa actgttggtg tgctggcctc ccagacgttg	1080
acaccagga cctaccatc aggagcctct accaggactg ggtgtccaac ctggtatcta	1140

catacggcctt cgacggcgctc cgcacgcgaca ccgtcaggca cgtcgagcag gactactggc 1200
 ccggcttcgt caatgccagc ggcggtgtact gcacgcggcga agtcttcaac ggagaccag 1260
 actttatgca gccctaccaa tcgctcatgc ccggcctcct caactacgcc atcttctacc 1320
 ccctcaacgc cttttatcag cagacgggct cctcccaagc cctggtcgac atgcatgacc 1380
 gtctcagctc gttcccagac ccgacggcgc tgggcacctt tgtcgataac caccgacaacc 1440
 cccgcttcct cagcgtcaag aacgacacgt ctctcttcaa gaatgcctg acctacacca 1500
 ttctcggccg aggcaccccc attgtctact acggctccga gcaagcctt tcgggaagca 1560
 acgacccgc caacagagag gacctctggc gcagcggcta caacaccgag acggacatgt 1620
 acaatgccat ctccaagctc acctttgcca agcacacggc cggcggcctc gccgacaacg 1680
 accacaagca cctgtacgac gagccacgg catacgcctg gagccgcgc gccggcaagc 1740
 tgggtggcctt taccaccaac agcggcggcg gcagctcggc ccagttctgc ttcggcacgc 1800
 aggtcccca cgggagctgg acgaatgtgt ttgatggcgg caatggcccg acgtacactg 1860
 ctgatggcaa tggacagctc tgcttgacca cgacgaatgg tgagccgatt gtgctgctgt 1920
 cttcataaaa caatatggcg acatataata tacatgtata tcacctagta catacttgga 1980
 taggtacgtg ttacttacct ggatagagct tcagtgtgtt accttcaagc tgttgtttct 2040
 ttcttctctc ttttgtggac atactgtacg atcatgaagg gtacatattt tagtcgtaac 2100
 aaaattaggc atttactact acctagacta aactgtttgt tgttgatcat gtacctagag 2160
 caagcaatga accatgccat gatttccttc atctccaga cccgtatttg aattgcctgt 2220
 ggatagatgt gcttgaaaga cctgccatgc gctcaaagta attgttattg aatagtcctg 2280
 cccaaaatat taactgcagt gccgagatat ctgttgttcc gtcaggcctg ttcaacctgc 2340
 ggggatagaa aatctccatg tgctcatgag tgcataaatt ccgcaccgaa tcctccgctt 2400
 ccaaaaaaaaa aaaagaagca atattataaa aagcaaagtc gtcatgccgt caaatagcct 2460
 ttatagtcctc gtgtatgctc gcaagtcttg tccgtcgtcg ttagcctgta ttattcacat 2520
 gcgtgtgtca tcgatagcct tgtgtttctc gtgtcgcacg atttgctctt gatattgacc 2580
 acattccttc ggtacaatga gcaaatatat ataccgttgt ggtgggtaat gag 2633

<210> 7

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 7

ggaattcatg aagcttcgat ccgccgtccc 30

10

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

<213> Trichoderma viride IAM 5141

15

<400> 8

tatgaagaca ccgctcagat gcagcacaat 30

<210> 9

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

5 <400> 9
 atgaagcttc gatccgccgt cccgctgctg ttgcagcttt ctctcccggc cgtccttggc 60
 gccgacacgg cagactggag gtctcgtagc atctactttg ccctgacaga ccgaattgct 120
 cgcagctcaa gcgacacggg aggcctctgcg tgtacaaatc tgaatgacta ctgtggtggc 180
 acgttccagg gcttggagag caagctggac tacatcaagg gcatgggatt tgatgccatc 240
 tggatcaacc ccgtcgtaac caacagtgat ttcggcttcc atggctactg ggcactggat 300
 ctaaactacta tcaattctca ctatggcact gcggatgatt taaagagtct cgttgatgct 360
 gcacatggca agggcttcta catgatggtc gacgtttag ccaaccacat gggaaacgca 420
 aacatcacag acgactcccc ctcccctctg aaccaacaat cctcatacca cacaaaatgt 480
 gacattgact tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggcttgctgg cctcccagac 540
 gttgacaccc aggaccctac catcaggagc ctctaccagg actgggtgtc caacctggta 600
 tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcacg gacaccgtca ggcacgtcga gcaggactac 660
 tggcccggct tcgtcaatgc cagcggcgtg tactgcatcg gcgaagtctt caacggagac 720
 ccagacttta tgcagcccta ccaatcgctc atgcccggcc tcctcaacta cgccatcttc 780
 taccacctca acgcctttta tcagcagacg ggctcctccc aagccctggg cgacatgcat 840
 gaccgtctca gctcgttccc agaccgacg gcgctgggca cctttgtcga taaccacgac 900
 aacccccgct tcctcagcgt caagaacgac acgtctctct tcaagaatgc cctgacctac 960
 accattctcg gccgaggcat ccccatgtc tactacggct ccgagcaagc cttttcggga 1020
 agcaacgacc ccgccaacag agaggacctc tggcgagcgg gctacaacac cgagacggac 1080
 atgtacaatg ccatctccaa gctcaccttt gccaaacaca cggccggcgg cctcgccgac 1140
 aacgaccaca agcacctgta cgtcgagccc acggcatacg cctggagccg cgccggcggc 1200
 aagctggtgg cctttaccac caacagcggc ggcggcagct cggcccagtt ctgcttcggc 1260
 acgcaggtcc ccaacgggag ctggacgaat gtgtttgatg gcggcaatgg cccgacgtac 1320
 actgctgatg gcaatggaca gctctgcttg accacgacga atggtgagcc gattgtgctg 1380
 ctgtcttcat aa 1392

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

15 <400> 10

ES 2 596 777 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 596 777 T3

Arg Ile Asp Thr Val Arg His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe
 210 215 220
 Val Asn Ala Ser Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp
 225 230 235 240
 Pro Asp Phe Met Gln Pro Tyr Gln Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn
 245 250 255
 Tyr Ala Ile Phe Tyr Pro Leu Asn Ala Phe Tyr Gln Gln Thr Gly Ser
 260 265 270
 Ser Gln Ala Leu Val Asp Met His Asp Arg Leu Ser Ser Phe Pro Asp
 275 280 285
 Pro Thr Ala Leu Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe
 290 295 300
 Leu Ser Val Lys Asn Asp Thr Ser Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr
 305 310 315 320
 Thr Ile Leu Gly Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln
 325 330 335
 Ala Phe Ser Gly Ser Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg
 340 345 350
 Ser Gly Tyr Asn Thr Glu Thr Asp Met Tyr Asn Ala Ile Ser Lys Leu
 355 360 365
 Thr Phe Ala Lys His Thr Ala Gly Gly Leu Ala Asp Asn Asp His Lys
 370 375 380
 His Leu Tyr Val Glu Pro Thr Ala Tyr Ala Trp Ser Arg Ala Gly Gly
 385 390 395 400
 Lys Leu Val Ala Phe Thr Thr Asn Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Gln
 405 410 415
 Phe Cys Phe Gly Thr Gln Val Pro Asn Gly Ser Trp Thr Asn Val Phe
 420 425 430
 Asp Gly Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Thr Ala Asp Gly Asn Gly Gln Leu
 435 440 445
 Cys Leu Thr Thr Thr Asn Gly Glu Pro Ile Val Leu Leu Ser Ser
 450 455 460

- 5 <210> 11
 <211> 583
 <212> ADN
 <213> Trichoderma reesei IF031328

<400> 11
 tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatttga tgcaatctgg attacgcctg 60
 ttgtgacgag tgagtttcac cttgccttgc cttgcgtcgc acaaagcctt cgggagggaa 120
 taggtagctg actctgtgat acccatgggt agacagtgat ggcggctatc atggctactg 180
 ggcggaggac attgactcca tcaattccca ttatggctct gcggacgact tgaagagtct 240
 tgtcaatgcc gcgcatagca aggtactttc ttcccatcat cacatggctt tacccttttg 300
 cgttgttcta aagcgagaga aactagggct tctatatgat ggtggatgtc gtcgccaacc 360
 acatgggcta cgccaacatc accgacgata gtcctactcc tctgaaccaa gcctcttcgt 420
 atcacccgga gtgtgacatc gactacaaca accagaccag cgtccaggaa tgctggatca 480
 gtggtctccc ggatctcgac accgagagcc cgatgatccg cagcctctac caggactggg 540
 tctccaacct cgtgtccacg tacggcttcg acggcgtccg cat 583

5 <210> 12
 <211> 592
 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride IFO31327

<400> 12
 tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatccga tgccatctgg atcacacctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctgcctcgc cttgcatgtg 120
 tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180
 gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240
 ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300
 cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360
 tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420
 cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacag ccaaaccagc gtcgagaact 480
 gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540
 10 aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

15 <210> 13
 <211> 583
 <212> ADN
 <213> Trichoderma viride IFO5720

<400> 13

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttg ccctgtcccg ccttgccctcg ggctgtacat gggctgctag 120
 agtgaacagc tgacactgat acctctgaac agacagtgat gggggctacc atggctattg 180
 ggcggaggat ctcgattcca tcaactctca ctacggctct gcggtatgact tgaagagtct 240
 cgtcaacgcc gcacatagca aggtacttct tcttgccatg atatgacctt cgcctattct 300
 cctgggttcta atgagagaca aaccagggtt tctatatgat ggtagacgtc gtggccaacc 360
 acatgggcta cgccaacatc tccgatgaca gccccccccc tctgaaccag gcctcttctg 420
 atcacgccga gtgtgacatt gactacaaca accagaccag cgtccagaac tgctggatca 480
 gcggcctccc tgatctcgac acgcagagcc cgaccatccg cagcctctac caggactggg 540
 tctccgacct cgtgtccacg tacggcttct acggcgctccg cat 583

<210> 14

<211> 569

<212> ADN

<213> Trichoderma viride IFO30498

<400> 14

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacccccg 60
 tcgttaccag tgagttgccg acctatcccc agccaatgat atcaattcat cctcttgatt 120
 aatagctaac atgccttgaa tagacagcga ttccggatac cacggttact gggctcagga 180
 tattaattcc atcaattctc actatgggtc ctccgatgat ttaaagagtc ttgttgatgc 240
 tgctcatagc aaggatatata ttacacgac actttcaatt ttatgggtct gtgctaaacc 300
 aatcaacaac agggcttcta catgatgggc gatgtcgtcg ccaaccatat gggaaacgca 360
 aacatcacag acgactctcc ctctcctctg aaccaagact cctcatacca cacaagtgt 420
 gacatcgacy tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggctcgccgg cctcccgat 480
 cttgacactc aaagccctac catcaggagc ttgtaccagg actgggtgtc caaccttgta 540
 tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcat 569

<210> 15

<211> 592

<212> ADN

<213> Trichoderma reesei IFO31329

<400> 15

ES 2 596 777 T3

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctgcctcgc cttgcatgtg 120
 tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180
 gggctacat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240
 ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300
 cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360
 tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420
 cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480
 gctggatcag cggccycccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540
 aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 16

<211> 592

5 <212> ADN

<213> Trichoderma reesei IF031328

<400> 16

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctgcctcgc cttgcatgtg 120
 tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag acagtgatgg 180
 gggctacat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240
 ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300
 cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360
 tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420
 cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480
 gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540
 aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

10

<210> 17

<211> 592

<212> ADN

<213> Trichoderma reesei IFO31326

15

<400> 17

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacacctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctgcctcgc cttgcatgtg 120
 tcgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctytggacag acagtgatgg 180

gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt atggctctgc 240
 ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt ttgttcacac 300
 cagacttcat gattatcaaa attaacacaa accagggctt ctatatgatg gtggacgtcg 360
 tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca ctgaaccagg 420
 cctcgtcgta tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc gtcgagaact 480
 gctggatcag cggcctcccg gatctcaaca cgcagagctc aaccatccgc agcctctacc 540
 aggactgggt ctccaacctc gtgtccacgt acggcttcga cggcgtccgc at 592

<210> 18

<211> 583

<212> ADN

<213> Trichoderma koningii IAM12534

<400> 18

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttg cctgtgcccg ccttgccctcg ggtcgtacat gggctgctag 120
 agtgaacagc tgacactgat acctctgaac agacagtgat gggggctacc atggctattg 180
 ggcggaggat ctcgattcca tcaactctca ctacggctct gcggatgact tgaagagtct 240
 cgtcaacgcc gcacatagca aggtacttct tcctggcatg atatgacctt cgcctattct 300
 cctggttcta acgcgagaca aaccagggct tctatatgat ggtagacgtc gtggccaacc 360
 acatgggcta cgccaacatc tccgatgaca gccctcccc tctgaaccag gcctcttcgt 420
 atcacgccga gtgtgacatt gactacaaca accagaccag cgtccagaac tgctggatca 480
 gcggcctccc tgatctcgac acgcagagcc cgaccatccg cagcctctac caggactggg 540
 tctccaacct cgtgtccacg tacggcttcg acggcgtccg cat 583

<210> 19

<211> 584

<212> ADN

<213> Trichoderma viride SAM1427

<400> 19

tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggatttga tgccatctgg atcactcctg 60
 ttgtgacgag tgagtttcac cttgccttgc cttgcgtcgc acaaagcctt cgagagggaa 120
 taggtagctg actctgtgat acccatgggt agacagtgat ggcggctatc atggctactg 180
 ggcggaggac attgactcca tcaattccca ttatggctct gcagacgact tgaagagtct 240
 tgtcaatgcc gcgcatagca aggtattttc ttcccagcat tggtttgatg tttgcccctt 300
 tggcattatt ctcaagcaag aaaccagggc ttctatatga tgggtgatgt cgtcgccaac 360
 catatgggct acgccaacat caccgacgat agtcctactc ctctgaacca agcctcttcg 420
 tatcaccggg agtgtgacat cgactacagc aaccagacca gcgtccagga atgctggatc 480
 agcggcctcc cggatctcga caccgagagc ccgacgatcc gcagcctcta ccaggactgg 540
 gtctccaate tcgtgtccac gtacggcttc gacggcgtcc gcat 584

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

5

<400> 20
 tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacccctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt gccttgccctt gccttgccctt gccttgccctt gccttgccctt 120
 rccttgccctt gtgtcgacaca caggctcctg gaggaatgg ctgatgctga taccttggaa 180
 tagacagtga tgggggttat catggctatt gggcggagga cattgattcc atcaactctc 240
 attacggctc tgcggacgac ctgaagagtc tcgtcaatgc cgcgcatagc aaggtacatc 300
 tccccatcat tgacataggt ttaccctttt gcatgattct gacgtgagac aaaccagggc 360
 ttctatatga tgggtggacgt cgtggccaac cacatgggct acgccaacat ctccgacgac 420
 agtccttctc ctctgaacca agcgtcgtcc tatcacccag agtgtgacat tgactacaac 480
 aaccagacca gcgtccagaa ctgctggatc agcggcctcc cggatctcaa cacgcagagc 540
 tcgacgatcc gcagcctcta ccagggtctg gtctccgacc tcgtgtccac ctacggcttc 600
 gacggcgtcc gcat 614

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

10

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

15

<400> 21
 tggagagcaa gctggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg atcacgcctg 60
 ttgtgacgag tgagtctttt attaccttgt gtgcacaca gtcttataga ggagatggat 120
 cacactgaca tgtccgata gacagtcagg ggggctacca wggctactgg gcagaggaca 180
 ttgactccat caattctcat tacggctctg cggacgacct gaagagtctc gtcaatgccg 240
 cgcatagcaa ggtacttctt cctctcattg acatgccttt attcctttcg cgttgtccta 300
 aaccgagatt tacagggctt ctatatgatg gtggatgtcg tcgccaacca catgggcaac 360
 gccaacatct ccgacgatag tcctcctcct ctgaacgaag cctcttcgta tcacccccag 420
 tgtgacattg actacaacaa ccamccagc gtccagaact gctggatcag cggcctcccg 480
 gatctcaaca cccagagctc gacgatccgc agcctctacc aggactgggt ccaaacctc 540
 gtgtcgacgt acggcttcga cggcgtccgc at 572

20

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

25

<400> 22

tggagggcaa gttggattac atcaagggga tgggatttga tgctatttgg atcacgcctg 60
 ttgtaacgag taagttattc ataacagcct cagatatcat ctccctgggtc aatagctaata 120
 atatcttgat agatagcgat caggggtatc atggctactg ggcagaggat ctcgattcta 180
 tcaattctca ctatgggttct tcggatgatt tgaagagtct tgcgatgct gcacacagca 240
 aggtacgtca tatcacctca cccccctaca ttctgctaata cctcatggat cgtgctaaac 300
 cgaatgttaa aatagggctt ctatatgatg tgcgatgttg ttgccaatca catgggatat 360
 gcaaacatca ccgacgacct tcccactcct ctaaaccaaa actcgtctta ccacgcagag 420
 tgtaacatcg actataacaa tcagaccagc gtcgaaaact gctggatcga tggctctcca 480
 gaccttgaca cacagagcga gactatccgc accctttaca aggactgggt ttccaacctc 540
 gtctccacat acgggttcga cggcgtccgc at 572

<210> 23

<211> 571

5 <212> ADN

<213> Trichoderma reesei IFO31329

<400> 23

tggagggcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga cgccatctgg atcacgcccg 60
 tcgttacgag tgagttacac acagcctcag gcattacctc ttgaatgcgc ttctaattgtt 120
 aatattttaa tagatagcga cgggggttac cacggttact gggctgagtc tctggattcg 180
 atcaattctc attatggttc tgcggatgat ttaaagagtc tcgttgatgc tgcgcatagc 240
 aagggtacgtg atactccaca ccccatctta tatgcctcta ttttcgaagt acgggtgctaa 300
 aaagggtgaaa acaggggttc tatatgatgg tagatgttgt tgccaatcat atgggttatg 360
 ccaacatttc tgacgacctc ccaactcccc tgaacgaaaa ctgctcgat catccagaat 420
 gcgacattga ctacaacaac cagaccagcg tcgaaaactg ctggatcgat ggccttccgg 480
 atctcgacac tcagagccct accatccgca gcctctacca ggactgggtc tccaacctcg 540
 tatcgaccta cggcttcgac ggcgtccgca t 571

10

<210> 24

<211> 572

<212> ADN

15 <213> Trichoderma hamatum IAM12505

<400> 24

tggagagcaa gttggactat atcaagggca tgggatttga cgccatctgg atcacgcccc	60
tcgttacgag tgagttatat acagcctcac acattatccc ttcaaagagc atctaattatt	120
tatatattaa tagacagtga taagggttat cacgggtact gggcagaaga tatcgattct	180
attaattctc actatggttc tgcggacgat ttaaagagtc tcgtcgatgc tgcgcatagc	240
aaggtaacac atacgcaaca ccccatctta tatgcctcta ctctcgaaat gtcctgctaa	300
aacaagtga aacagggctt ctacatgatg gtagatgttg tcgccaatca tatgggctat	360
gccaatattc ctgacgacct tccaaccccc ctgaacgaga actcgtcgta tcaccggaa	420
tgcgacattg actacaacaa cgagaccagc gtcgaaaact gctggatcag cggctctccc	480
gatctcgaca ccagagccc taccatccgc agtctctacc aggactgggt ctccaacctc	540
gtctcgacct acggcttcga cggcgtccgc at	572

<210> 25

<211> 1329

<212> ADN

<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 25

gccgacacgg cagactggag gtctcgtaac atctactttg ccctgacaga ccgaattgct	60
cgcagctcaa gcgacacggg aggctctgcg tgtacaaatc tgaatgacta ctgtgggtggc	120
acgttccagg gcttggagag caagctggac tacatcaagg gcatgggatt tgatgccatc	180
tggatcaacc ccgtcgtaac caacagtgat ttcggcttcc atggctactg ggcactggat	240
ctaaacacta tcaattctca ctatggcact gcggatgatt taaagagtct cgttgatgct	300
gcacatggca agggcttcta catgatggtc gacgttgtag ccaaccacat gggaaacgca	360
aacatcacag acgactcccc ctcccctctg aaccaacaat cctcatacca cacaaaatgt	420
gacattgact tcaacaacca gaccagcgtc gaaaactgtt ggcttgctgg cctcccagac	480
gttgacaccc aggaccctac catcaggagc ctctaccagg actgggtgtc caacctggta	540
tctacatacg gcttcgacgg cgtccgcacg gacaccgtca ggcacgtcga gcaggactac	600
tggcccggct tcgtcaatgc cagcggcgtg tactgcatcg gcgaagtctt caacggagac	660

ES 2 596 777 T3

```

ccagacttta tgcagcccta ccaatcgctc atgcccggcc tcctcaacta cgccatcttc 720
taccacctca acgcctttta tcagcagacg ggctcctccc aagccctggt cgacatgcat 780
gaccgtctca gctcgttccc agaccggacg gcgctgggca cctttgtcga taaccacgac 840
aaccctcgct tcctcagcgt caagaacgac acgtctctct tcaagaatgc cctgacctac 900
accattctcg gccgaggcat cccattgtc tactacggct ccgagcaagc cttttcgga 960
agcaacgacc ccgccaacag agaggacctc tggcgagcgc gctacaacac cgagacggac 1020
atgtacaatg ccattctcaa gctcaccttt gccaaagcaca cggccggcgg cctcgccgac 1080
aacgaccaca agcacctgta cgtcgagccc acggcatacg cctggagccg cgccggcggc 1140
aagctggtgg cctttaccac caacagcggc ggccgcagct cggcccagtt ctgcttcggc 1200
acgcagggtcc ccaacgggag ctggacgaat gtgtttgatg gcggcaatgg cccgacgtac 1260
actgctgatg gcaatggaca gctctgcttg accacgacga atggtgagcc gattgtgctg 1320
ctgtcttca 1329

```

<210> 26

<211> 443

<212> PRT

<213> Trichoderma viride IAM 5141

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 596 777 T3

Val Ala Asn His Met Gly Asn Ala Asn Ile Thr Asp Asp Ser Pro Ser
 115 120 125
 Pro Leu Asn Gln Gln Ser Ser Tyr His Thr Lys Cys Asp Ile Asp Phe
 130 135 140
 Asn Asn Gln Thr Ser Val Glu Asn Cys Trp Leu Ala Gly Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Asp Thr Gln Asp Pro Thr Ile Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Trp Val
 165 170 175
 Ser Asn Leu Val Ser Thr Tyr Gly Phe Asp Gly Val Arg Ile Asp Thr
 180 185 190
 Val Arg His Val Glu Gln Asp Tyr Trp Pro Gly Phe Val Asn Ala Ser
 195 200 205
 Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Asp Phe Met
 210 215 220
 Gln Pro Tyr Gln Ser Leu Met Pro Gly Leu Leu Asn Tyr Ala Ile Phe
 225 230 235 240
 Tyr Pro Leu Asn Ala Phe Tyr Gln Gln Thr Gly Ser Ser Gln Ala Leu
 245 250 255
 Val Asp Met His Asp Arg Leu Ser Ser Phe Pro Asp Pro Thr Ala Leu
 260 265 270
 Gly Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Ser Val Lys
 275 280 285
 Asn Asp Thr Ser Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Thr Ile Leu Gly
 290 295 300
 Arg Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Ala Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Ser Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Asp Leu Trp Arg Ser Gly Tyr Asn
 325 330 335
 Thr Glu Thr Asp Met Tyr Asn Ala Ile Ser Lys Leu Thr Phe Ala Lys
 340 345 350

ES 2 596 777 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 43

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10

<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador TRa2HisXhol-R2"

<400> 27

gctcgagtta gtggtggtgg tgggtggtg aagacagcag caa 43

15

REIVINDICACIONES

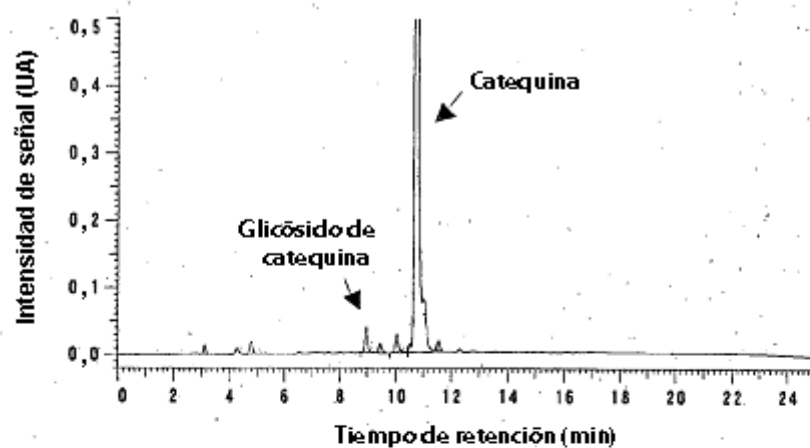
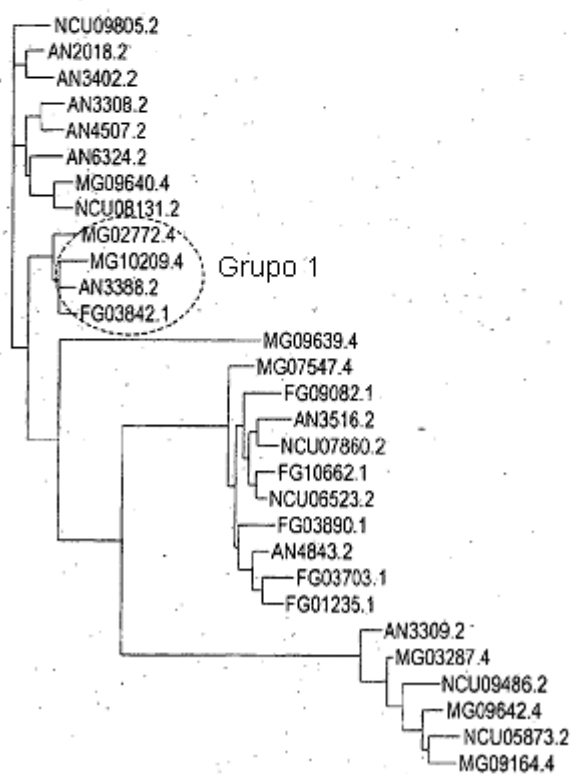
1. Un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 3-O-galato de 5-O- α -D-glucopiranosil-(-)-epigallocatequina;
 3-O-galato de 7-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina;
 4'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina;
 3'-O- (4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(+)-catequina; y
10 3-O-galato de 3'-O-(4-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosil)-(-)-epigallocatequina.

2. Un alimento, composición farmacéutica o cosmética, que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una bebida, que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

15

Figura 1**Figura 2**

1	150
EAA63356	-----
EAA71544	-----
EAA48146	-----
EAA47529	MANKILVAYIFADELFVLMGALMIGFSJVVGNVRDEVPTGNGAARNLLYQKPLTAGIVNAIFIFITFLLTIPALSTPARGMLKMSGYL VVVNALFSLVIGLFIWIMTLKTRDDLFIWVQQTPOVQSLMEVSFKCGCYNNTAPAFVT
151	300
EAA63356	-----MKLASTLAGLLPLISTVSAADVDANK-----SRNIYFALTDVRAGSDDTGGACDDLSTYCGGTFKGLCKLDYIKMGFDAIWI TPVVANHDCGYHGYWAKDL
EAA71544	-----MKLLQLAALVASISPFASAADANANK-----SRNIYFALTDVRARSDSDSGMACSNLGNVCGGTFKGLAKLDYIKMGFDAIWI TPVVENTDGGYHGYWAKDL
EAA48146	-----MFFFKVLVAELLQIVTVYAADTAANK-----SRSIYFALTDVRAGSNDTGGASCGNL SK YCGGTFKGLSKLDYIKNLGFSIWIIPVVSNAKADGYHGYWAQDL
EAA47529	NQVCPSPAASALMRGCATPITSFANVFVDNIFTVGFMCGIDGLLVITATACLLKDRKEQERFRIHQKTGPMSTLPQGTSVVRQADR I ARNESDSGGNSCSDLGQYCGGTFKGLQSKLDYIKMGFDAIWI SPVVENHKGGYHGYWAKDL
301	450
EAA63356	YSINENYGTADDLKSLVSAHEKGIYIMADVIVANHMGSP--ISDNQPESLSQESAYHSACTIDYSSQESIETCRIADDLPDVNTESEEIRTLFKEWITWLKVEYFEDGLRIDTVKHVEKDFWSDFSSAAGVYTI GEVFDGDPDYLACYANT
EAA71544	YEVNAKYGTDDLKSLVKTAHSKNIYVMADVIVANHMGKG--IQDHRPEPLNQSSYHSPCAIDYNNQNSIEQCEIAD--LPDLNTGSETVKKVLNDWI SWLVTEYSFDGIRIDTVKHVEKSFWDFOKAAAGVYI GEVWDGSPDYLACYSKV
EAA48146	YAINSNYGAADLKSLVNTAHSKGIYVMVDVIVANHMGPGSISDNRPAPLNQNSYHSQCTIDNSNQSSVENCWVAN--LPDINTQSSGIRQLLNTWVSWLWKEYSFDGVRIDTVKHVEKSFWPFVKSI GAYI GEVFDGNPSFMAGYANL
EAA47529	YAINSKYGTADDLKSLIKAAHDKGFLLMVDVIVANHMGNGP ISENKPAPLNQESSYHPECKIDYSNQQSVERCRLGN--LPDLNTEDPKIRTLITDVIKWIVSEFKVDGLRIDTVKHVEKGFWPFCAWASGVYTLGEVYSEDVDYLACYDKT
451	600
EAA63356	MDGLLNAYVYVNVNFYQQAQADIVDMHDKIDSSFDPDSALGTIFIDNHDAWLSNKKDKSLKNAAYVILARGPII VYGTGQYAGGNDPENREDLWRSNFDTDADLYKAI SLLSAARSAAGGLGNDHVLHVAESAYANWRAE
EAA71544	MPGLLNAYIYYPMNRFYQKGDPSAVVDWYNEISQKFDPTVLGTGFI DNHDNPRWLSQNDKALLKNAAYVILSRGPII VYGTGQYAGGNDPANREDLWRSNFKTDSDLYQTISKLKARSAGVGLAGNDQKFLKSNDSAL I WSRAN
EAA48146	MPGLLNAYVYVPMNRFYQQGNPQELVNIIMNITASFDPDPAALGTIFLDNHDPRLWLNQTDQTLQNALAFVFLSRGPII ILYGTGQGLVGGDDPANREDLWRSQYKTDITTLHGAVAKLNAARKAAGGLDGNHDTLHYVTNDTYANWIRAG
EAA47529	MGGFFNFVYKSLCRYLQQGSPQGLVDNHDKITRKFSDPITLANFLDSHDDPRWLSKNRDAALLKNAAYVLLARGPIVYVYGTGQYAGGNDPANREDLWRRARYRTDGDLYRAISRLSGVRACAGGLPADDDQI HLLVNKNSYAFSRDG
601	750
EAA63356	GKLVVVTNSGSGSENEICFDSKTPNGSWENIFEGGT--ISADDSGQICVSI TNGEPAVLVAQS-----
EAA71544	NDLIVVTMNRGGQFSGQYCFNTGANNKTWERVLGGGT--VKSDBGGLCVSYTNGEPEVLVAAN-----
EAA48146	ADLVVLTTNAGRCSHAQHCFTTRANGRWADYGGGAYVFSDKTGRACVKLANGQPVLLALANSTTGCGKPPTLPAPI TWYNSTSPDDSANGSNVCPPAVAVSFTVRVATAPGDTIKMVGNTAQLGSDWDAKAPSL SASGYNSTNMWAW
EAA47529	GGVWVLTTRNGSGFNGQECFDTGRGTATWEDKFGSGT--YTSDESCKVCQVKNGEPPVLVRK-----
751	801
EAA63356	-----
EAA71544	-----
EAA48146	SITLPMAPGRTVQYKVKVSRSGGTTWESDPNRFYTPPVSQATADVSN IWR
EAA47529	-----

Figura 3

Figura 5

1 ATGAAGCTTC GATCCGCCGT CCGCTGCTG TTGACGTTT CTCTCCGGG CGTCTTGGC GCCGACACGG CAGACTGGAG GTCTCGTACC ATCTACTTTG CCCTGACAGA CCGAATTGCT
M K L R S A V P L L L Q L S L P A V L G A D T A D W R S R T I Y F A L T D R I A

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

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

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

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

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

721 CCAGACTTTA TGCAGCCCTA CCAATCGTC ATGCCCGGCC TCCTCAACTA CGGCATCTTC TACCCCTCA ACGCCTTTTA TCAGCAGAGC GGTCTCTCC AACCCCTGGT CGACATGCAT
 P D F M Q P Y Q S L M P G L L N Y A I F Y P L N A F Y Q Q T G S S Q A L V D M H

841 GACCGTCTCA GCTCGTCCC AGACCCGACG GCGCTGGGCA CCTTTGTCGA TAACCAGCAG AACCCCGCT TCCTCAGCGT CAAGAAGCAG ACGTCTCTCT TCAAGAATGC CCTGACCTAC
 D R L S S F P D P T A L G T F V D N H D N P R F L S V K N D T S L F K N A L T Y

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

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

1201 AAGCTGGTGG CCTTTACCAC CAACAGCGGC GCGGCGAGCT CGGCCAGTT CTGCTTGGC ACGCAGTCC CCAACGGGAG CTGGACGAAT GTGTTTGATG GCGGCAATGG CCCGACGTAC
 K L V A F T T N S G G G S S A Q F C F G T Q V P N G S W T N V F D G G N G P T Y

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

Figura 6

1 100
 TRa2 -MKLRSAVPLLLQLSLPAVLGAOTADWRSRTIYFALTDR IARSSSDTGGSACTNLDYCGGTGGLSKLDYIKGMGFDAIWINPVVTNS-----DFGF
 BAA00336 MMVAWWSLFLYGLQVAAPALAAATPADWRSQSIYFLLTDRFARTDGSTTATCNTADQKYCGGTWQG I I DKLDYIQGMGFDAIWI TPVTAQLPQTAYGDAY

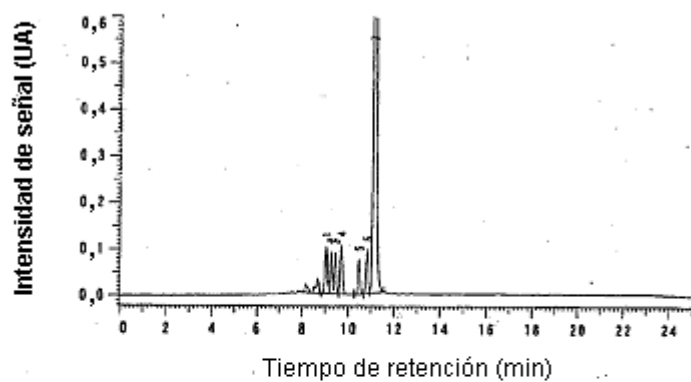
101 200
 TRa2 HGYWALDLNTINSHYGTADDLKS LVDAAHGKGFYMMVDVVANIMGNANI TDDSPS-----PLNQSSSYHTKCDID-FNNQTSVENCWLAG-----LPDVTQ
 BAA00336 HGYWQDDIYSLNENYGTADDLKA LSSALHERGMYLMVDVVANIMGYDAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQTQVEYCWLGDNVTSLDLDTT

201 300
 TRa2 DPTIRSLYQDWVSNLVSTYGFVGVRIDTVRHVEQDYWPGFVNASGVYCI GEVFNQDPDFMQPYQSLMPGLLNIAI FYPLN-AFYQQTGSSQALVDMHDL
 BAA00336 KDVVKNWEYDWVGLSVNYS I DGLRIDTVKHVQKDFWPGYNKAAGVYCI GEVLDVDPAYTCPYQNVMDGVLNYP I YYPLNFAFKSTSGSMDDL YNMI NTV
 *

301 400
 TRa2 SS-FPDPTALGTFVDNHDNPRFLSVKNDTS LFKNALT Y I LGRGIP I VYQSEQAFSGSNDPANREDLWRSYNTETDMYNA I SKLTF AKHTAG-----GL
 BAA00336 KSDCPDSTLLGTFVNDNPRFAS Y TND I ALAKNVAAF I I LNDGIP I IYAGQE QHYAGGNDPANREATWLSGYPTDSELYKL I ASANA I RNYA I SKDTGF
 *

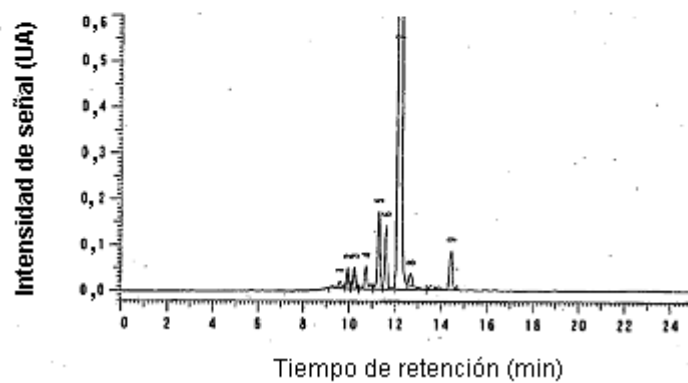
401 499
 TRa2 ADNDHKHLYVEPTAYAWSR--AGGKLVAF T TNSGGSSA QFCFGTQVPNGSWTNVFDGGNGPTYTADGNGQLCLTTTNGEPIVLLSS-----
 BAA00336 VTYKNWPIYKDDTTI AMRKGTDGSQ I VT I LSNKGASGDSYTL SLSGAGYTAGQQLTEV I GCTTVTVGSDGNVPVPMAGGLPRVL YPTEKLAGSK I CSSS

Figura 7



CATEQUINA

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



EGCG

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

Figura 8

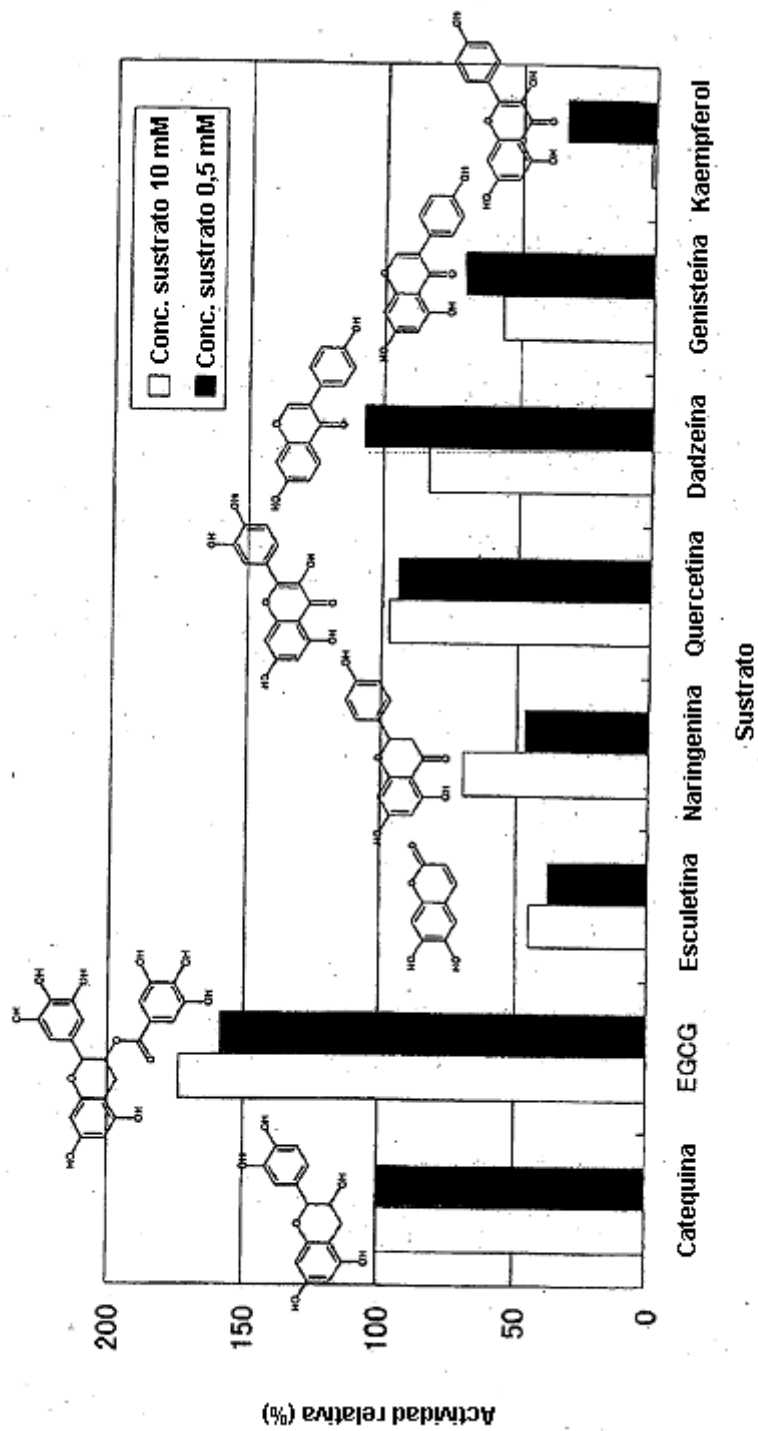


Figura 9

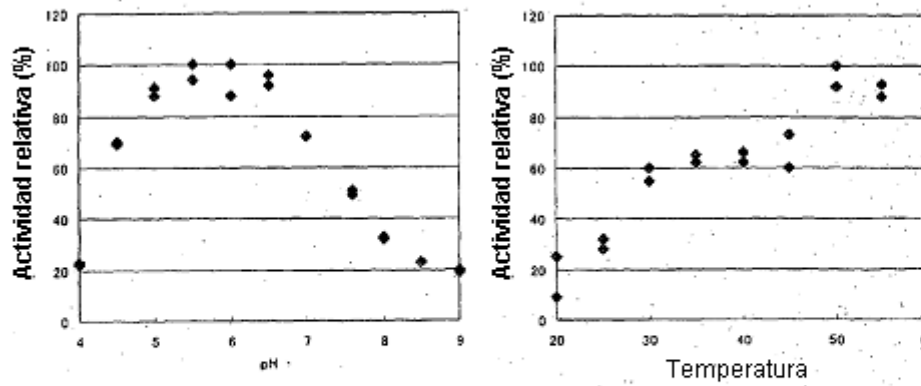


Figura 10

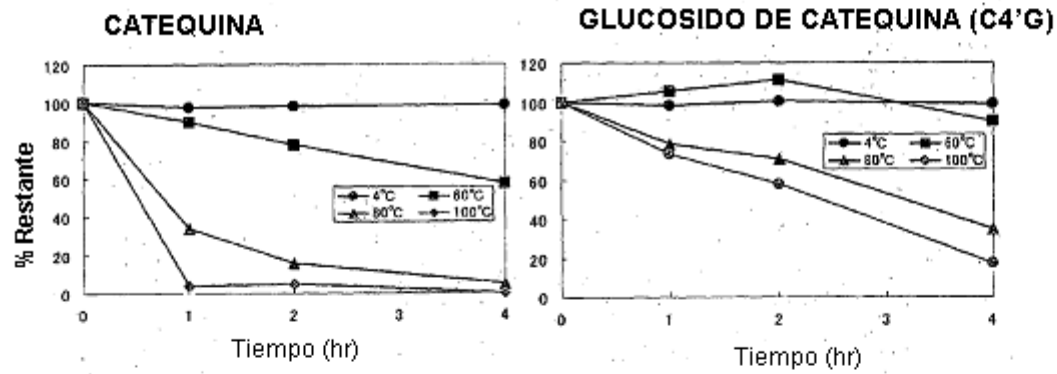


Figura 11

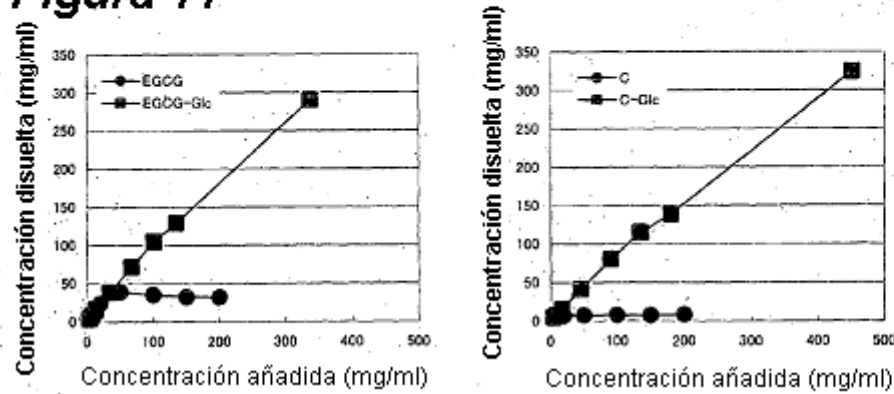


Figura 12

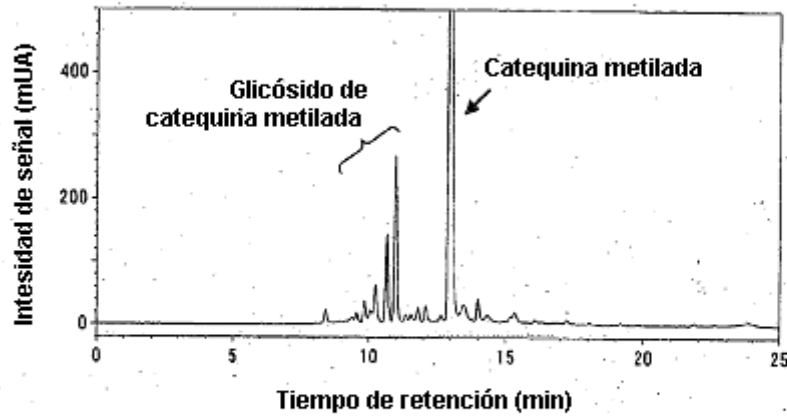


Figura 13

