

Biotransformasi (-)-Epigalokatekin-3-O-galat Menjadi (-)-2R,3S-Dihidromirisetin oleh Fungi Endofit *Diaporthe* sp. Isolat E dari Tumbuhan Teh

Biotransformation of (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate into (-)-2R,3S-Dihydromyricetin by the Endophytic Fungus Diaporthe sp. E Isolate Obtained from a Tea Plant

ANDRIA AGUSTA

Phytochemistry Laboratory, Botany Division, Research Center for Biology, The Indonesian Institute of Science, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16119; Phone: +62-21-8765066 ext. 1104, Fax. +62-21-8765063, E-mail: bislunatin@yahoo.com

Received August 21, 2007/Accepted December 19, 2007

Endophytic fungi have been reported possess an interesting ability to mimic their host plant metabolites. Several fungi also show their specific capability to biotransform the chemical constituents of the host plant. The endophytic fungus *Diaporthe* sp. E isolate obtained from young stem of a tea plant (*Camellia sinensis*) show their unique capability to biotransform (-)-epigallocatechin-3-O-gallate [(-)-EGCG] into a major product in glucose-peptone-yeast extract medium that incubated under dark condition at 27 °C for 48 h. The major biotransformation product were isolated and purified through column chromatography techniques using Sephadex LH-20 and silica gel. The chemical structure of the major product were elucidated as (-)-2R,3S-dihydromyricetin based on their IR, FAB-MS, 1D- and 2D-NMR spectra.

Key words: (-)-2R,3S-dihydromyricetin, (-)-EGCG, (-)-2R,3R,4R-leucodelphynidin, biotransformation, *Diaporthe* sp. E isolate, endophytic fungus, *Camellia sinensis*

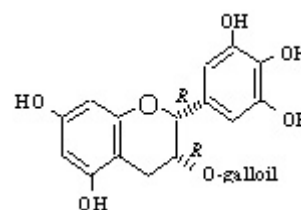
PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade belakangan ini, beberapa kelompok peneliti melaporkan bahwa fungi endofit memiliki keunikan untuk meniru metabolit yang diproduksi oleh tumbuhan inangnya. Stierle *et al.* (1993), melaporkan bahwa fungi endofit *Taxomyces andreanae* yang berasosiasi dengan tumbuhan *Taxus brevifolia* memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa taksol secara *in vitro* di laboratorium. Fungi endofit RJMEF001 yang berasosiasi dengan tumbuhan *Notapodytes foetida* dilaporkan mampu memproduksi kamtotesin di dalam medium semisintetik (Puri *et al.* 2005). Di samping itu, fungi endofit juga dilaporkan memiliki kapabilitas untuk melakukan transformasi komponen kimia tumbuhan inangnya. Shibuya *et al.* (2003) melaporkan bahwa fungi endofit *Xylaria* sp. yang diisolasi dari *Chincona pubescence* dapat mengubah alkaloid kina menjadi turunan 1-N-oksida yang memiliki efek sitotoksik lebih rendah dibanding senyawa asal.

Agusta *et al.* (2006a) telah mengisolasi enam jenis fungi endofit, yang berasosiasi dengan tanaman teh, *Camellia sinensis* (L.) O.K. (Theaceae). Salah satu di antara fungi endofit tersebut, yaitu *Diaporthe* sp. isolat E dapat memproduksi metabolit bisantraknon, yaitu (+)-2,2'-episitoskirin dan (+)-1,1'-bislunatin dalam medium cair *potato dextrose broth* (PDB) (Agusta *et al.* 2006b). Di pihak lain, *Diaporthe* sp. isolat E memperlihatkan kemampuan yang unik untuk mengubah senyawa flavan-3-ol dari tanaman teh

(Gambar 1) menjadi leukoantosianidin. Hal ini merupakan bukti bahwa fungi endofit dapat mengubah komponen kimia dari tumbuhan inangnya seperti yang dihipotesiskan sebelumnya (Agusta *et al.* 2005; Shibuya *et al.* 2005). Hal yang tidak kalah menariknya adalah kenyataan bahwa fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E tersebut memiliki reaksi biotransformasi selektif terhadap struktur ruang dari molekul substrat dengan konfigurasi 2R-fenil tersubstitusi yang merupakan tipe alami dari senyawa flavan-3-ol dalam tumbuhan teh. Fungi endofit ini tidak dapat melakukan reaksi oksidasi terhadap senyawa flavan dengan konfigurasi 2S-fenil tersubstitusi, seperti (-)-galokatekin-3-O-galat (Agusta *et al.* 2005) yang merupakan senyawa artefak yang terbentuk selama proses pemanasan daun teh atau produk-produk yang berasal dari teh (Wilkins *et al.* 1971).

Salah satu senyawa flavan-3-ol dari tanaman teh yang bisa ditransformasi oleh fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E adalah (-)-epigalokatekin-3-O-galat [(-)-EGCG, 5]. Penambahan



Gambar 1. Struktur kimia (-)-epigalokatekin 3-O-galat (EGCG), flavan-3-ol utama pada tanaman teh (Nonaka *et al.* 1984).

sejumlah larutan (-)-EGCG ke dalam kultur medium *Diaporthe* sp. isolat E yang telah berumur lima hari dapat menghasilkan (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelphinidin (Gambar 2) dalam 28 jam waktu inkubasi dengan kemampuan biotransformasi sebesar 43% (Agusta *et al.* 2005). Untuk mempelajari lebih lanjut tentang seberapa jauh fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E dapat mengubah komponen kimia utama pada tumbuhan inangnya, maka dilakukan penelitian biotransformasi (-)-EGCG oleh *Diaporthe* sp. isolat E pada kondisi biotransformasi yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tumbuhan. Bahan yang digunakan berupa ranting muda tanaman teh, *C. sinensis* (L.) O.K. (Theaceae) yang dikoleksi dari bekas perkebunan teh di Desa Gunung Mas, Kecamatan Cisarua, Kabupaten Bogor, Jawa Barat pada Agustus 2003. Identifikasi jenis dilakukan di Herbarium Bogoriense, Puslit Biologi, LIPI.

Deteksi Senyawa Hasil Biotransformasi. Fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium GYP (20 g glukosa, 1 g ekstrak khamir, 5 g pepton, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1000 ml air) pada *rotary shaker* dengan kecepatan agitasi 90 rpm pada kondisi gelap. Setelah diinkubasi selama lima hari pada suhu 27 °C, 20 ml substrat larutan steril (-)-EGCG dalam metanol (1 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium tumbuh. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi kembali pada kondisi yang sama. Jalannya reaksi biotransformasi dimonitor dengan melakukan sampling 5 ml medium tumbuh berikut miselia pada jam ke-1, 28, dan 48 setelah penambahan substrat, dan diekstraksi dengan etil asetat. Kemudian pelarut diuapkan dengan penguap putar pada suhu 30 °C dan setelah kering dilarutkan kembali di dalam 5 ml metanol. Selanjutnya, 10 µl sampel dianalisis dengan HPLC (TOSOH PD 8020) fasa terbalik menggunakan kolom CAPCELL PAK Phenyl SG-120 (250 x 4.6 mm) pada temperatur ruang. Elusi secara gradien menggunakan 20 mM KH_2PO_4 -asetonitril dari 5-15% asetonitril dengan laju aliran 1 ml/min dalam waktu 40 menit serta dideteksi dengan detektor UV pada 210 nm.

Isolasi dan Purifikasi Produk Biotransformasi. Fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer berukuran 500 ml yang berisikan 200 ml medium GYP, dan diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan di atas. Setelah lima hari, 20 ml substrat larutan steril (-)-EGCG dalam metanol (1 mg/ml) ditambahkan ke dalam medium

tumbuh. Selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 27 °C, 90 rpm selama 48 jam pada kondisi gelap. Kemudian seluruh medium tumbuh berikut miselia diekstraksi dengan etil asetat dan pelarutnya diuapkan dengan penguap putar, dan diperoleh 49 mg ekstrak. Pemisahan dilakukan dengan teknik kromatografi kolom (2 x 70 cm) menggunakan Sephadex LH-20 sebagai fase diam dan metanol sebagai fase gerak sehingga dihasilkan dua fraksi, yaitu fraksi 1 dan fraksi 2. Permurnian fraksi 2 dengan kolom kromatografi menggunakan gel silika sebagai fase diam dengan fase gerak lapisan bawah (fase organik) dari campuran kloroform:metanol:air (65:35:10) dan menghasilkan 5.4 mg produk utama.

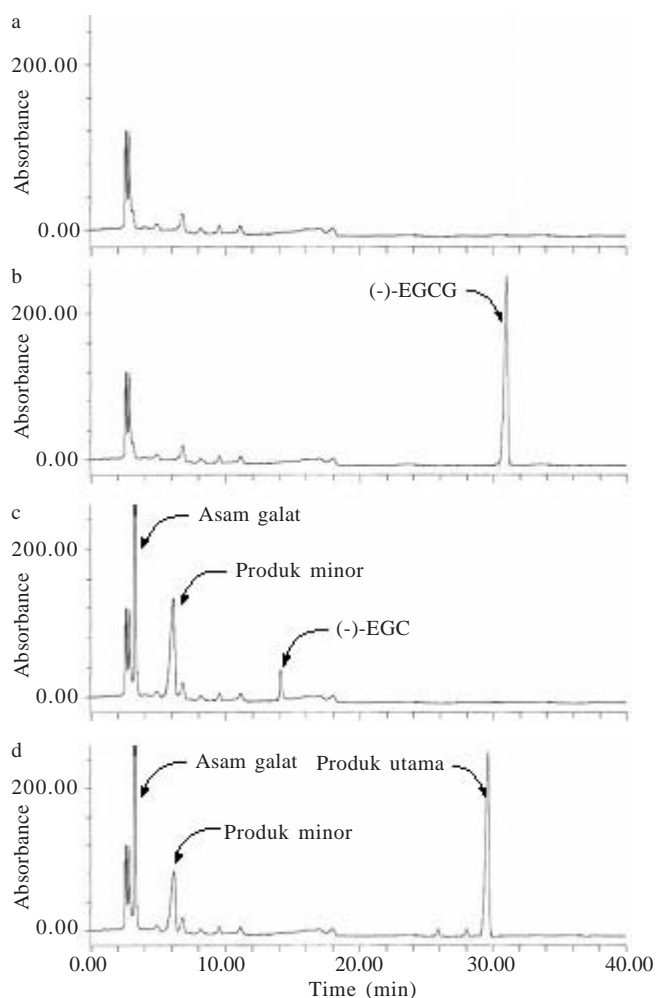
Penentuan Struktur Kimia Produk Utama. Struktur kimia produk utama ditentukan berdasarkan sifat karakter fisikokimianya. Sifat fisikokimia yang ditentukan meliputi rotasi optik yang diukur dengan alat polarimeter digital (Jasco DIP-360) dengan konsentrasi 6.9 mg/ml di dalam metanol pada temperatur 24 °C dan panjang sel 50 mm. *Fast atomic bombardment mass spectrometry* (FAB-MS) diukur dengan menggunakan alat spektrometer masa JMS SX-102 A. Spektrum *infra red* (IR) diukur dengan alat spektrofotometer Shimadzu FT-IR 8500 dengan plat KBr. Sedangkan spektrum 1H - dan ^{13}C -resonansi magnet inti (RMI) diukur dengan spektrometer JEOL JNM-Lambda 500 yang dioperasikan pada 500 MHz untuk 1H dan 125 MHz untuk ^{13}C di dalam pelarut *d*₆-aseton. Geseran kimia diberikan dalam skala δ (ppm) yang relatif terhadap tetrametilsilana (TMS, $\delta=0$) sebagai internal standar, dan konstanta kopling diberikan dalam satuan Herzt.

HASIL

Deteksi Senyawa Hasil Biotransformasi. Setelah fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E tumbuh dan berkembang selama lima hari dalam medium tumbuh, sebanyak 20 mg (-)-EGCG dilarutkan dalam 20 ml metanol ditambahkan ke dalam medium tumbuh dan diinkubasi kembali. Hasil analisis HPLC setelah satu jam waktu inkubasi belum memperlihatkan berlangsungnya proses reaksi biotransformasi (Gambar 3b). Setelah waktu inkubasi berlangsung selama 28 jam terlihat bahwa substrat (-)-EGCG telah diubah seluruhnya menjadi (-)-EGC (diidentifikasi dengan adisi standar (-)-EGC, Wako, Jepang), dan asam galat (diidentifikasi dengan adisi atau penambahan standar asam galat, Wako, Jepang). Pada waktu inkubasi jam ke-28, kromatogram hasil analisis HPLC (Gambar 3c) juga memperlihatkan adanya puncak baru yang selanjutnya disebut sebagai produk minor. Gambar 3d memperlihatkan bahwa perpanjangan waktu inkubasi sampai 48 jam



Gambar 2. Reaksi biotransformasi (-)-EGCG oleh jamur endofit (Agusta *et al.* 2005).



Gambar 3. Kromatogram HPLC untuk medium reaksi biotransformasi (-)-EGCG (5) dengan fungi endofit *Diaporthe* sp. E. a: sebelum penambahan substrat, b: setelah satu jam setelah penambahan substrat, c: setelah 28 jam setelah penambahan substrat, d: 48 jam setelah penambahan substrat. Kondisi HPLC: CAPCELL PAK Phenyl SG-120 250 x 4.6 mm, rt, 20 mM KH_2PO_4 - CH_3CN (gradien: 0 menit, 5% CH_3CN sampai 40 menit, 15% CH_3CN), 210 nm.

mengakibatkan terjadinya reduksi puncak produk minor yang diikuti dengan munculnya suatu puncak baru yang selanjutnya disebut dengan produk utama.

Purifikasi Produk Biotransformasi. Pemurnian fraksi 2 dengan kolom kromatografi menggunakan fase diam gel silika dan dielusi dengan lapisan bawah (fase organik) dari campuran kloroform:metanol:air (65:35:10) menghasilkan 5.4 mg (39%) serbuk putih yang diidentifikasi sebagai produk utama berdasarkan analisis HPLC (data tidak ditampilkan).

Identifikasi Produk Utama. Senyawa produk utama dari proses biotransformasi ini memiliki putaran optik aktif ($[\alpha]_D$) sebesar -31.2° di dalam metanol ($c=0.69$, 24°C) dengan karakter fisikokimia seperti terlihat pada Tabel 1. Spektrum FAB-MS memperlihatkan bahwa produk utama memiliki ion molekul ($[\text{M}+\text{H}]^+$) pada m/z 321 dengan formula molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_8$. Spektrum ^1H -RMI dari produk utama (Tabel 1) memperlihatkan 4 sinyal proton aromatik pada geseran kimia 5.95 ppm (1H, d, $J=2.1$ Hz, 8-H), 5.99 ppm (1H, d, $J=2.1$ Hz, 6-H), 6.63 (2H, s, 2'- & 6'-H). Disamping itu, dua metin proton yang terletak

Tabel 1. Data ^1H -RMI (500 MHz) dan ^{13}C -RMI (125 MHz) (-)-2R,3S-dihidromirisetin di dalam pelarut *d6*-aseton

| Atom | ^{13}C NMR | ^1H NMR |
|------|---------------------|----------------------------|
| C2 | 84.6 | 5.35 (1H, d, $J = 3.1$ Hz) |
| C3 | 73.1 | 4.28 (1H, d, $J = 3.1$ Hz) |
| C4 | 197.9 | - |
| C4a | 101.4 | - |
| C5 | 168.2 | - |
| C6 | 97.6 | 5.99 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) |
| C7 | 168.2 | - |
| C8 | 96.1 | 5.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) |
| C8a | 165.2 | - |
| C1' | 129.1 | - |
| C2' | 108.0 | 6.63 (1H, s) |
| C3' | 146.3 | - |
| C4' | 134.2 | - |
| C5' | 146.3 | - |
| C6' | 108.0 | 6.63 (1H, s) |
| 5-OH | - | 11.72 (1H, br) |

bertetangga memberikan sinyal pada geseran kimia 5.35 ppm (1H, d, $J=3.1$, 2-H), 4.28 ppm (1H, d, $J=3.1$ Hz, 3-H) pada spektrum ^1H -RMI-nya. Jika dibandingkan dengan spektrum ^1H -RMI (-)-2R,3R,4R-leukodelfinidin, terjadi pengurangan satu sinyal metin pada posisi C-4. Hal ini diikuti oleh munculnya satu sinyal dengan geseran kimia 198.1 ppm pada spektrum ^{13}C -RMI-nya yang merupakan sinyal dari atom karbon karbonyl (4-C). Disamping itu, pada spektrum ^1H -RMI juga terlihat adanya sinyal pada geseran kimia 11.72 ppm yang mengindikasikan adanya gugus hidroksi (6-C) yang bertetangga dan membentuk kelat (ikatan hidrogen) dengan gugus karbonyl yang ada didekatnya. Keberadaan gugus karbonyl pada produk utama juga didukung oleh serapan IR pada 1670 cm^{-1} , sedangkan serapan gugus hidroksi muncul pada panjang gelombang 3300 cm^{-1} .

Spektrum *heteronuclear multiple quantum coherence* (HMQC) dari produk utama memperlihatkan adanya korelasi antara sinyal pada geseran kimia 5.95 ppm (H-8) pada spektrum ^1H -RMI dengan sinyal pada geseran kimia 96.1 ppm (8-C) pada spektrum ^{13}C -RMI, sinyal pada geseran kimia 5.99 ppm (6-H) pada spektrum RMI dengan 97.6 ppm (6-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Sedangkan sinyal pada geseran kimia 6.63 ppm (H-2' & H-6') memperlihatkan korelasi dengan sinyal pada geseran kimia pada 108.0 ppm (2'-C & 6'-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Dua sinyal metin proton pada geseran kimia 5.35 ppm (2-H) dan pada 4.28 ppm (3-H) pada spektrum ^1H -RMI memperlihatkan korelasi dengan sinyal pada geseran kimia 84.6 ppm (2-C) dan 73.1 ppm (3-C) pada spektrum ^{13}C -RMI berturut-turut. Pada spektrum *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) terlihat ada *long range connectivity* dari sinyal pada geseran kimia 4.28 (3-H) pada spektrum ^1H -RMI dengan sinyal pada geseran kimia 84.6 ppm (2-C), 129 ppm (1'-C), 108.0 ppm (2'-C & 6'-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Sinyal pada geseran kimia 5.35 ppm (2-H) pada spektrum ^1H -RMI memiliki korelasi dengan sinyal pada geseran kimia 73.1 ppm (3-C), 197.9 ppm (4-C), dan 101.4 ppm (4a-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Selanjutnya, sinyal pada geseran kimia 5.95 ppm (H-8) pada spektrum ^1H -RMI, berkorelasi dengan sinyal pada geseran kimia 97.6 ppm (6-C), 168.2 ppm (7-C), 165.2 ppm (8a-C), dan 101.4 ppm (4a-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Sinyal pada geseran kimia 5.99 ppm (6-H) memiliki korelasi terhadap sinyal

pada geseran kimia 168.2 ppm (5- & 7-C), 96.1 ppm (8-C), dan 101.4 ppm (4a-C) pada spektrum ^{13}C -RMI, sedangkan sinyal pada geseran kimia 6.63 ppm ($2'$ -H & $6'$ -H, ^1H -RMI) memiliki korelasi terhadap sinyal pada geseran kimia 146.3 ppm ($3'$ -C & $5'$ -C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Terakhir, sinyal pada geseran kimia 11.72 ppm (5-OH) memperlihatkan korelasi hanya dengan satu sinyal pada geseran kimia 168.2 (5-C) pada spektrum ^{13}C -RMI. Berdasarkan interpretasi dari data di atas, maka struktur kimia produk utama dielusidasi sebagai senyawa baru (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin (Gambar 4).

PEMBAHASAN

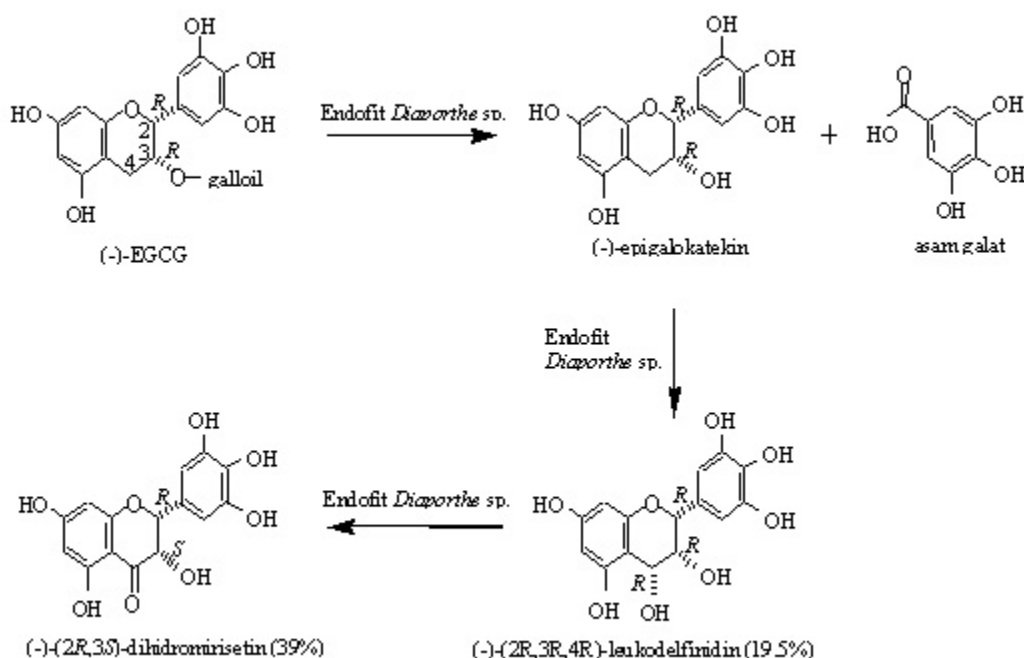
Reaksi biotransformasi (-)-EGCG oleh fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E menjadi (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin terjadi melalui tiga tahapan reaksi. Reaksi tahap pertama adalah reaksi hidrolisis untuk melepaskan gugus galoil menjadi (-)-GCG (galokatekin galat) dan asam galat. Reaksi tahap kedua adalah reaksi oksidasi gugus metilen C-4 menjadi 4-hidroksi untuk menghasilkan produk minor (Gambar 3). Produk minor ini merupakan hasil purifikasi fraksi 1 dengan menggunakan metode purifikasi sama dengan metode purifikasi untuk fraksi 2. Hasil analisis HPLC memperlihatkan bahwa produk minor ini memiliki waktu retensi yang sama dengan senyawa standar (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin (hasil isolasi pada Agusta *et al.* 2005). Hasil analisis HPLC dengan metode adisi atau penambahan senyawa standar, juga memperlihatkan adanya peningkatan puncak tunggal tersebut. Dipihak lain, spektrum ^1H - dan ^{13}C -RMI (data tidak ditampilkan) senyawa ini juga identik dengan (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin. Berdasarkan hal tersebut, senyawa produk minor diidentifikasi sebagai (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin. Kedua tahapan reaksi di atas telah dilaporkan pada tulisan sebelumnya (Agusta *et al.* 2005).

Pada reaksi tahap ketiga terjadi reaksi oksidasi lanjutan pada atom C-4 untuk membentuk gugus karbonil sehingga

menghasilkan (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin. Pada kondisi reaksi biotransformasi ini, keberadaan (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin masih terdeteksi sampai 72 jam waktu inkubasi, namun luas puncak pada kromatogram HPLC sedikit mengalami penurunan. Penurunan tersebut kemungkinan disebabkan terjadinya degradasi molekul (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin menjadi molekul yang lebih kecil.

Pada beberapa percobaan terpisah yang dilakukan dalam rangka menemukan kondisi optimal untuk proses biotransformasi ini, diketahui bahwa reaksi tahap ketiga dari proses biotransformasi ini merupakan reaksi yang sensitif terhadap perubahan kondisi lingkungan. Inkubasi (-)-EGCG dengan fungi endofit *Diaporthe* sp. isolat E pada temperatur 30 °C (kondisi gelap), sampai hari ketujuh inkubasi hanya terjadi akumulasi (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin (dimonitor dengan analisis TLC). Di pihak lain, proses reaksi biotransformasi ini masih dapat berlangsung jika temperatur inkubasi diturunkan menjadi 10 °C dalam kondisi gelap yang ditandai dengan terjadinya akumulasi (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin setelah 48 jam waktu inkubasi. Faktor cahaya juga sangat berpengaruh terhadap reaksi tahap ketiga ini. Pada proses biotransformasi yang dilakukan pada kondisi ruangan dengan kondisi terang pada siang hari dan gelap pada malam hari pada kisaran temperatur 20-26 °C, gagal untuk memberikan produk (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin. Beberapa alasan logis tentang pengaruh cahaya (UV) terhadap inaktivasi suatu enzim telah dikemukakan oleh beberapa kelompok peneliti (McLaren & Luse 1961; Blanc *et al.* 1976; Neves-Petersen *et al.* 2002). Namun dalam kasus ini masih perlu kajian yang lebih mendalam untuk mengetahui secara pasti mekanisme efek cahaya dan temperatur tinggi (di atas 30 °C) terhadap proses inaktivasi enzim yang bertanggung jawab terhadap proses oksidasi (-)-2*R*,3*R*,4*R*-leukodelfinidin menjadi (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin.

Sebagai tambahan, (-)-2*R*,3*S*-dihidromirisetin merupakan senyawa yang tidak stabil terutama terhadap temperatur,



Gambar 4. Tahapan reaksi biotransformasi (-)-EGCG menjadi (-)-2*R*,3*R*-dihidromirisetin.

cahaya, dan udara. Jika senyawa ini dibiarkan di udara terbuka dengan temperatur 29-30 °C pada keadaan terang selama beberapa jam akan segera berubah menjadi kecokelatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Natural Product Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima, Jepang penulis mengucapkan terima kasih atas fasilitas pengukuran spektroskopi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A, Maehara S, Ohashi K, Simanjuntak P, Shibuya H. 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chem Pharm Bull* 53:1565-1569.
- Agusta A, Ohashi K, Shibuya H. 2006a. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from a tea plant *Camellia sinensis*. *J Nat Med* 60:268-272.
- Agusta A, Ohashi K, Shibuya H. 2006b. Bisanthraquinone metabolites produce by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. *Chem Pharm Bull* 54:579-582.
- Blanc PL, Tuveson RW, Sargent ML. 1976. Inactivation of carotenoid-producing and albino strains of *Neurospora crassa* by visible light, blacklight, and ultraviolet radiation. *J Bacteriol* 125:616-625.
- McLaren AD, Luse RA. 1961. Mechanism of inactivation of enzyme proteins by ultraviolet light. *Science* 22:836-837.
- Neves-Petersen MT *et al.* 2002. High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue. *Protein Sci* 11:588-600.
- Nonaka G, Sakai R, Nishioka I. 1984. Hydrosable tannins and proanthocyanidins from green tea. *Phytochemistry* 23:1753-1755.
- Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spitteller M. 2005. An endophytic fungus from *Nothapoedytes foetida* that produce camptotecin. *J Nat Prod* 68:1717-1719.
- Shibuya H, Agusta A, Ohashi K, Maehara S, Simanjuntak P. 2005. Biooxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin into 3,4-dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chem Pharm Bull* 53:866-867.
- Shibuya H *et al.* 2003. Transformation of *Chincona* alkaloids into 1-*N*-Oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Chincona pubescens*. *Chem Pharm Bull* 51:71-74.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science* 260:214-216.
- Wilkins CK, de-Bruijn J, Korver O, Frost DJ, Weinges K. 1971. Isolation and identification of (-)-gallocatechin gallate and circular dichroism of green tea flavanols. *J Sci Food Agric* 22:480-484.