

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 750**

51 Int. Cl.:

C09B 61/00 (2006.01)

A23L 1/275 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2009 E 09726000 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2274381**

54 Título: **Composiciones de pigmentos que comprenden inclusiones antociánicas vacuolares**

30 Prioridad:

28.03.2008 NZ 56703608

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

21.03.2014

73 Titular/es:

**THE NEW ZEALAND INSTITUTE FOR PLANT AND
FOOD RESEARCH LIMITED (100.0%)
Mt Albert Research Centre 120 Mt Albert Road
Mt Albert, Auckland 1025, NZ**

72 Inventor/es:

**DEROLES, SIMON CHRISTOPHER;
ZHANG, HUAIBI y
DAVIES, KEVIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 449 750 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

Composiciones de pigmentos que comprenden inclusiones antociánicas vacuolares.

Campo técnico

La invención se refiere a composiciones de pigmentos procedentes de plantas y aplicaciones de las mismas.

5 Técnica anterior

La coloración atractiva y estable es un factor importante en la comerciabilidad de alimentos y bebidas. Con frecuencia se usan agentes colorantes sintéticos en la industria de la alimentación y la bebida. Sin embargo, se ha cuestionado la seguridad de los agentes colorantes sintéticos. La confianza del consumidor en los agentes colorantes alimentarios sintéticos en general ha disminuido. Así, existe una necesidad de composiciones de pigmentos que se encuentren en la naturaleza.

La patente de EE.UU. 2008/075797 se refiere a nutraceuticos que contienen pigmentos vacuolares. Wissgott y Bortlik (1.996) se refiere a las perspectivas para nuevos colorantes alimenticios naturales.

Las antocianinas se encuentran en la naturaleza en muchas plantas y pueden servir como pigmentos para impartir un amplio intervalo de colores. Los pigmentos de antocianinas son biodegradables y solubles en agua; además se indica que poseen propiedades antioxidantes.

A pesar de dichos atributos beneficiosos, no se han usado extensamente los pigmentos de antocianinas como aditivos alimentarios por diversas razones. Las antocianinas son difíciles de purificar, que hace difícil obtener cantidades comercialmente útiles. Las antocianinas también se degradan por condiciones de temperatura, luz y pH desfavorables.

El entorno de pH influye en gran medida en el color y la estabilidad de las antocianinas y es esta sensibilidad en particular, lo que limita su uso como colorante natural. En condiciones de pH ideales (ácidas) las antocianinas se colorean fuertemente y son relativamente estables. Sin embargo, muchos alimentos tratados tales como productos lácteos y bebidas sin alcohol son menos ácidos por naturaleza. Las antocianinas aisladas en estas condiciones pueden cambiar el color y tienen una longevidad más reducida.

Sería muy deseable identificar una fuente o forma de pigmentos de antocianinas con realización mejorada como aditivo para productos alimenticios y de bebida. Dichos pigmentos también pueden encontrar uso como colorantes naturales, por ejemplo para tejidos y en particular en productos que entran en contacto con los seres humanos, tales como ropa y cosméticos.

Es un objeto de la invención proporcionar una fuente o forma de antocianinas útiles en una composición de pigmento que supere al menos uno de los problemas asociados a las preparaciones de antocianinas de la técnica anterior y/o al menos proporcionar al público una elección útil.

Sumario de la invención

En un primer aspecto la invención proporciona un producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica como se definió en las reivindicaciones. Además se describe en la presente memoria una composición de pigmento que comprende inclusiones antociánicas vacuolares o "las AVI (por sus siglas en inglés)" de una planta y un portador aceptable. Preferiblemente, la composición de pigmento comprende las AVI aisladas.

Estabilidad de composición de pigmento

La composición de pigmento, o AVI, puede ser estable a pH ácido y 4°C durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 240 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 360 horas.

La composición de pigmento, o AVI, puede ser estable a pH ácido y 25°C durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 240 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 360 horas.

En una realización la composición de pigmento, o AVI, es estable a pH ácido y 37°C durante al menos aproximadamente 72 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas.

Preferiblemente, la composición de pigmento, o AVI, es estable por un intervalo de pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 8,0, preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0, lo más preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

En una realización más la composición de pigmento, o AVI, es estable bajo una alta intensidad de la luz durante al menos aproximadamente 48 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 168 horas.

- 5 Preferiblemente, alta intensidad de la luz se refiere a intensidad de la luz mayor que aproximadamente 10, más preferiblemente mayor que aproximadamente 50, lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 90 umoles de fotones por m² por s.

Estructura de las AVI en composición de pigmento.

En una realización preferida, las inclusiones antociánicas vacuolares (las AVI), en la composición, comprenden:

- a) al menos una antocianina y
10 b) al menos un lípido.

Antocianina

En una realización, la antocianina es un glucósido de una antocianidina.

Tipos de antocianidina

- 15 En una realización, la antocianidina se selecciona de una de: cianidina, peonidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina, malvidina, 3-desoxiatocianindinas y 6- y 8-hidroxi-antocianindinas y derivados de las mismas hidroxilados, acilados y metilados.

En una realización preferida, la antocianidina se selecciona de una de: cianidina, peonidina, delphinidina y pelargonidina y derivados de las mismas hidroxilados, acilados y metilados.

En una realización preferida, la acilación es acilación aromática.

- 20 Tipos de glucósido

En una realización, la antocianina es un glucósido de una antocianidina.

En una realización más, la antocianina es un galactósido de una antocianidina.

La antocianina puede ser un monoglucósido de la antocianidina.

La antocianina puede ser un diglucósido de la antocianidina.

- 25 En una realización más, la antocianina es un glucósido acilado de la antocianidina.

La antocianina puede ser un monoglucósido acilado de la antocianidina.

La antocianina puede ser un diglucósido acilado de la antocianidina.

En una realización más, la antocianina presenta O-glucosilación en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' ó 5'.

La antocianina puede presentar O-glucosilación y acilación en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' ó 5'.

- 30 En una realización más preferida, la antocianina es un 3- ó 5-O-glucósido.

En una realización más preferida, la antocianina es un 3,5 -di-O-glucósido.

La antocianina puede ser un 3,5 -di-O-glucósido con acilación.

En una realización, la composición de pigmento comprende al menos una antocianina seleccionada de las enumeradas en la Tabla 2.

- 35 En una realización más, la composición de pigmento comprende al menos una antocianina seleccionada de las de *lisianthus* enumeradas en la Tabla 2.

La acilación puede ser acilación aromática.

Lípido

El lípido puede ser una membrana biológica o biomembrana.

- 40 En una realización, el lípido es parte de una membrana biológica o biomembrana.

En una realización preferida, el lípido es un ácido graso.

Estructura independiente de estabilidad

Los productos que comprenden las composiciones o las AVI y los métodos de uso de las AVI y las composiciones, se incluyen también dentro del alcance de la invención, como se definió en las reivindicaciones.

Las AVI pueden comprender mezclas de diferentes tipos de antocianina.

- 5 Una mezcla de diferentes antocianinas, incluyendo al menos un tipo como se discutió anteriormente (la primera antocianina) y una o más antocianinas adicionales, también pueden estar en las AVI, composiciones y productos de la invención.

La antocianina o las antocianinas adicionales pueden ser de un tipo discutido anteriormente, pero diferentes de la primera antocianina.

10 Productos

En un aspecto más, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende una composición de pigmento de la invención, como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto más, la invención proporciona un producto cosmético que comprende una composición de pigmento de la invención, como se define en las reivindicaciones.

- 15 En un aspecto más, la invención proporciona tejido coloreado con una composición de pigmento de la invención, como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto más, la invención proporciona una crema tópica que comprende una composición de pigmento de la invención, como se define en las reivindicaciones.

- 20 Las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o en coloración de tejido pueden ser estables a pH ácido durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 48 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 168 horas.

- 25 Las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o en coloración de tejido pueden ser estables a pH ácido y 4°C durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 240 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 360 horas.

- 30 Las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o en coloración de tejido pueden ser estables a pH ácido y 25°C durante al menos aproximadamente 24 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 240 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 360 horas.

En una realización, las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético o en coloración de tejido son estables a pH ácido y 37°C durante al menos aproximadamente 72 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas.

- 35 En una realización, las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o en coloración de tejido son estables por un intervalo de pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 8,0, preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0, lo más preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

- 40 En una realización más, las AVI usadas en el producto alimenticio, producto cosmético o en coloración de tejido son estables bajo alta intensidad de la luz durante al menos aproximadamente 48 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 120 horas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 168 horas.

Preferiblemente, alta intensidad de la luz se refiere a intensidad de la luz mayor que aproximadamente 10, más preferiblemente mayor que aproximadamente 50, lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 90 umoles de fotones por m² por s.

- 45 Las AVI en la composición de pigmento, producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o usada en coloración de tejido pueden proceder de cualquier planta que contenga las AVI. En una realización preferida, las AVI se aíslan de una especie de *lisianthus*. Preferiblemente, las AVI se aíslan de *Eustoma grandiflorum*.

Métodos

- 50 Se describe en la presente memoria un método de coloración de un producto, comprendiendo el método añadir una composición de pigmento como se describe en la presente memoria al producto.

El producto se puede seleccionar de un producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o un tejido.

En un aspecto más, la invención proporciona un método para colorear un producto, comprendiendo el método añadir una AVI como se define en la presente memoria para el producto.

5 En una realización, el producto se selecciona de un producto alimenticio, producto cosmético, crema tópica o un tejido.

Descripción detallada

1. Definiciones generales

10 En esta memoria descriptiva donde se ha hecho referencia a memorias descriptivas de patentes, otros documentos externos, u otras fuentes de información, esto es en general para el fin de proporcionar un contexto para discutir las características de la invención. A menos que se indique específicamente de otro modo, la referencia a dichos documentos externos no se tiene que interpretar como un reconocimiento de que dichos documentos o dichas fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica anterior, o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

15 El término "que comprende" como se usa en esta memoria descriptiva significa "que consiste al menos en parte en". Cuando se interpreta cada afirmación en esta memoria descriptiva que incluye el término "que comprende", también pueden estar presentes características distintas de la o las introducidas por el término. Los términos relacionados tales como "comprenden" y "comprende" se tienen que interpretar de la misma manera.

2.0 Las AVI

20 Los pigmentos de antocianina lo más comúnmente se acumulan en la vacuola de la célula vegetal y son responsables de muchos de los colores en los pétalos y frutos dentro del intervalo de rojo a azul. En la mayoría de las especies de plantas las antocianinas permanecen en disolución y se distribuyen de manera uniforme dentro de la vacuola. Sin embargo, en algunas especies las antocianinas se agregan en cuerpos pequeños dentro de la vacuola, que aumenta la capacidad de las células para acumular grandes cantidades de antocianina. Estos cuerpos que contienen antocianina se han descrito bajo diversos nombres diferentes en un intervalo de tejidos vegetales como se muestra en la Tabla 1. Dichos cuerpos que contienen antocianina se refieren en la presente memoria como "inclusiones antociánicas vacuolares" o "las AVI".

Tabla 1

Especies Vegetales y Tejido	Descripción	Referencia
Pétalos de rosa	Las AVI	Gonnet, 2.003
Plántulas de <i>Polygonium cuspidatum</i>	Cuerpos esféricos intravacuolares	Kubo et al., 1.995
Pétalos de <i>Matthiola incana</i>	Cristales	Hemleben, 1.981
Pétalos de <i>Consolida ambigua</i>	Cristales azules	Asen et al., 1.975
Hipocótilo de frijol mungo	Cristales rojos	Nozzolillo y Ishikura, 1.988
Hojas de col roja	Antocianoplastos	Small y Pecket, 1.982
Tubérculos de <i>Ipomea batatas</i>	Cianoplastos	Nozue et al., 1.995
Cultivos de células de uvas	Antocianoplastos	Cormier y Do, 1.993

30 También se han descrito inclusiones antociánicas vacuolares por Markham *et al.*, (2.000) y Zhang *et al.*, (2.006). Los mismos documentos describen métodos para el aislamiento de las AVI de lisianthus púrpura (*Eustoma grandiflorum*) y el clavel Azul-gris (*Dianthus caryophyllus*).

Las AVI son de forma globular o irregular. Las AVI presentan diferentes colores según su composición de antocianina.

3.0 Las AVI

La presente invención resulta del descubrimiento sorprendente de que la intensidad del color de las antocianinas ligadas a AVI es estable en condiciones medioambientales normalmente asociadas a la pérdida de la intensidad del color de antocianinas libres, o no ligadas.

- 5 Los solicitantes han elucidado la estructura/composición de las AVI. Los solicitantes han demostrado que las antocianinas y los lípidos son las dos clases principales de compuestos encontrados en las AVI.

Preferiblemente, la "inclusión antociánica vacuolar" o "AVI" como se usa en la presente memoria significa una estructura encontrada en la vacuola en una planta, que comprende una antocianina y un lípido.

El lípido puede ser parte de una membrana biológica o biomembrana.

- 10 La membrana biológica o biomembrana también puede incluir otros componentes tales como proteínas y grupos azúcar.

3.1 Estabilidad de las AVI.

Preferiblemente, la antocianina es más estable cuando es parte de la AVI, que cuando no es parte de la AVI, tal como cuando está en disolución.

- 15 Preferiblemente, el lípido es más estable (menos susceptible de oxidación) cuando es parte de la AVI, que cuando no es parte de la AVI, tal como cuando está en disolución.

Típicamente, tanto la antocianina como el lípido son más estables cuando forman parte de una AVI de lo que son cuando están separados la antocianina o el lípido, tal como en disolución.

- 20 El término "estable" en relación a las AVI o composiciones de pigmento que contienen AVI se refiere a un índice reducido de pérdida de color antociánico en entornos normalmente asociados a una pérdida de color antociánico. Preferiblemente estable se refiere a retención de al menos 50% (más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%) del color de la antocianina (como se define por la densidad óptica a 530 nm) en las condiciones especificadas.

- 25 El término "estable" en relación a composición de pigmento que contiene AVI se refiere a la estabilidad de las AVI en la composición de pigmento.

3.2 La estructura de las AVI en las AVI está compuesta típicamente de una sola forma o formas múltiples de moléculas de antocianina que están ligadas por un lípido (tal como ácidos grasos o biomembranas), donde dicha interacción da como resultado la estabilidad aumentada de las dos antocianinas y preferiblemente también el lípido.

- 30 El término "inclusión antociánica vacuolar" o "AVI" significa preferiblemente una estructura que comprende una molécula o moléculas de antocianina que está o están ligadas por un lípido, donde dicha interacción da como resultado la estabilidad aumentada de la molécula de antocianina (cuando se compara a la molécula de antocianina sola en disolución) en condiciones variables tales como (pero no limitado a) pH, temperatura, intensidad de la luz. La AVI también puede incluir sustancias adicionales tales como fenilpropanoides, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos.

- 35 El término "antocianinas" significa glucósidos de cualquiera de las antocianidinas, incluyendo pero no limitado a, pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina, malvidina, 3-desoxiatocianidinas y 6- y 8-hidroxi-antocianidinas y derivados de las mismas hidroxilados, acilados y metilados. Preferiblemente, los glucósidos son glucósidos o galactósidos. Preferiblemente la acilación es acilación aromática.

- 40 Preferiblemente, la antocianina presenta O-glucosilación en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' ó 5', más preferiblemente la antocianina presenta O-glucosilación y acilación en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' ó 5', más preferiblemente la antocianina es un 3- ó 5-O-glucósido, más preferiblemente la antocianina es un 3,5-di-O-glucósido y lo más preferiblemente la antocianina es un 3,5-di-O-glucósido con acilación. Preferiblemente, la acilación es acilación aromática.

4.0 Aislamiento de las AVI

- 45 Las AVI se pueden aislar de plantas por diversos métodos. Por ejemplo las AVI se pueden aislar de pétalos de flores usando variaciones del método de Markham *et al.*, (2.000) y métodos descritos en la sección ejemplos de esta memoria descriptiva.

Un ejemplo de dicho procedimiento de aislamiento se proporciona como sigue:

- 50 Se eliminan pétalos sanos de flores completamente abiertas y se lavan con posterioridad cuidadosamente con agua del grifo fría que contiene varias gotas de Tween 20, seguido por enjuague con agua destilada.

5 Los pétalos lavados se cortan después usando un cortador de cebollas sobre una placa de plástico hasta que los pétalos se convierten en una suspensión. Se añadieron pequeñas cantidades de tampón de fosfato (0,1 M, pH 7,0) que contenía AEDT 10 mM durante el corte. Después se añade la suspensión de pétalos a una disolución de maceración que contiene celulasa al 1% Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co., Higashi-Shinbashi, Minatoku, Tokio) y Pectoliasa Y23 al 0,05%. Se incuba la mezcla durante la noche a temperatura ambiente para liberar protoplastos que contienen las AVI.

10 Se filtra con posterioridad la mezcla incubada por estopilla de 50 µm y se lava mediante agitador vorticial en tampón de fosfato 0,1 M más 17,53 g/l de cloruro de sodio (disolución de lavado). Los protoplastos que contienen AVI se recogen después por centrifugación a 100 g durante 5 min. Se repite la etapa de lavado dos veces más y se suspende el gránulo final en un volumen mínimo de disolución de lavado.

Después se transfiere el gránulo suspendido a un nuevo tubo que contiene Percoll al 80% (AMRAD-Pharmacia Biotech, Auckland, Nueva Zelanda). El gránulo de AVI se recoge del fondo del tubo de centrifuga después de centrifugación a 10.000 g durante 10 min. Se lava el gránulo dos veces en disolución de lavado y después se almacena a -80°C hasta uso.

15 El término "aislada" con referencia a las AVI significa purificada referido a su concentración en materia vegetal intacta o en material vegetal no fraccionado macerado. Preferiblemente, las AVI aisladas son al menos aproximadamente 10% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 20% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 30% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 40% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 50% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 70% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 90% puras, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% puras, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% puras.

5.0 Componentes de composiciones de pigmento.

25 El término "portador aceptable" con referencia a la composición de pigmento significa un componente, adicional a la propia AVI, que es aceptable para la aplicación de la composición. Los portadores aceptables incluyen pero no se limitan a disolventes, tampones y conservantes.

Los portadores aceptables para uso en la composición de pigmento para aplicaciones de productos alimenticios son conocidos para los expertos en la materia e incluyen pero no se limitan a:

Portadores solubles en agua:

30 Gomas, Carragenina, Goma Arábica, Alginatos, Alginato de amonio, Alginato de potasio, Alginato de sodio, Almidones, Maltodextrinas, Sacarosa, Dextrosa, Fructosa, Jarabes, Alcoholes, Glicerol, Carbonato de sodio, Hidrogenocarbonato de sodio, Etilcelulosa, Celulosa microcristalina, Celulosa, Alcohol Bencílico en Polvo, Alcohol Etilico (etanol), Acetato de Etilo, Almidón de lactosa, Ácido Cítrico, Tartrato de Dietilo, Éter etílico de ácido láctico, Carbonato de Magnesio, Hidrogenocarbonato de Magnesio, Polidextrosa, Polietilenglicol, Monolaurato de Polioxietileno (20) y Sorbitán, Monooleato de Polioxietileno (20) y Sorbitán, Monopalmitato de Polioxietileno (20) y Sorbitán, Monoestearato de Polioxietileno (20) y Sorbitán, Triestearato de Polioxietileno (20) y Sorbitán, Polivinilpirrolidona, Propan-2-ol, Propilenglicol y Dióxido de Silicio.

Portadores Solubles en Aceite:

40 Grasas y aceites comestibles, Triglicéridos de cadena media, Cera de abejas, Parafina, Goma laca, Colofonia, Ácido 6-palmitoil-L-ascórbico, Acetato de Amilo, Butano-1,3-Diol, Dietilenglicol Monoetil Éter, Miristato de Isopropilo, Triacetina y Citrato de Etilo.

Los portadores aceptables para uso en la composición de pigmento para aplicaciones de productos cosméticos son conocidos para los expertos en la materia.

45 Los portadores aceptables para uso en la composición de pigmento para aplicaciones de coloración textil son conocidos para los expertos en la materia.

6. Preparación de las composiciones de pigmento de la invención.

Se puede preparar composición de pigmento que comprende las AVI por métodos conocidos para los expertos en la materia.

50 Por ejemplo, la composición de pigmento se puede vender como un aditivo para alimento u otros productos y se puede preparar en forma seca, por ej., de polvo o como un concentrado a base de agua o alcohol o jarabe dependiendo del uso final y el método propuesto de adición.

La composición de pigmento se puede añadir a productos alimenticios por métodos conocidos en la técnica.

La composición de pigmento se puede combinar con uno o más agentes auxiliares de secado por pulverización tales como goma arábiga y maltodextrinas o la disolución se puede encapsular por técnicas de coacervación clásicas en materiales comestibles usando gelatina.

La composición de pigmento se puede añadir junto con otros materiales tales como adyuvantes saborizantes.

- 5 La composición de pigmento se puede incorporar como un sólido o una disolución acuosa o jarabe en diversas fases durante la fabricación o tratamiento del producto alimenticio.

Las AVI se pueden incorporar a productos alimenticios y de bebida de muchas formas, tales como pero no limitado a:

- mezcla directa vía lote (tanques/mezcladoras), usando impulsores rotacionales en materiales acuosos.

- 10 - mezcladores continuos o en línea en materiales acuosos.

- incorporación en seco en alimentos de conveniencia para reconstitución por el consumidor.

- recubrimiento de las superficies exteriores de productos por pulverización, envoltura y cobertura.

- 15 Las AVI y los portadores pueden requerir que se disuelvan previamente en agua para asegurar la máxima dispersibilidad e incluso la mezcla durante la fabricación de productos alimenticios y de bebida. Se pueden dispersar pequeñas cantidades de las AVI muy concentradas en glaseados (azúcar/mezclas de grasa).

Debido a su naturaleza estable, las AVI se pueden añadir para las fases tempranas de producción, asegurando su distribución uniforme, al tiempo que se mantiene un atractivo visual óptimo.

Las AVI se pueden usar junto con otros materiales de coloración de alimentos para obtener el color deseado en el producto acabado.

- 20 7.0 Productos

El término "producto alimenticio" como se usa en la presente memoria incluye alimentos sólidos, bebidas líquidas y otros materiales comestibles sin tener en cuenta su forma específica. El término producto alimenticio incluye productos que se mastican sin ser tragados. Los productos alimenticios preferidos incluyen pero no se limitan a productos lácteos, tales como yogures.

- 25 La presente invención no se limita a uso de las composiciones de pigmento o las AVI en productos alimenticios. El uso de las AVI o composiciones que contienen AVI para colorear otros productos tales como cosméticos, cremas tópicas, tejidos y en particular productos tales como ropa y cosméticos que se ponen en contacto con los seres humanos, se incluyen dentro del alcance de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La presente invención se entenderá mejor con referencia a los dibujos adjuntos en que:

La Figura 1 muestra los espectros de absorbancia de antocianinas ligadas a AVI resuspendidas en agua y tampones de pH que oscilan de 3,0 – 8,0 durante un periodo de 22 días. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de luz ambiental (luz natural/fluorescente). T1 = 1 hora, D1 = 1 Día, D2 = 2 días - D7 = 7 días.

- 35 La Figura 2 muestra los espectros de absorbancia de las antocianinas, ligadas y no ligadas a las AVI que se volvieron a suspender en agua y tampones de pH que oscilan de 3,0 – 8,0 durante un periodo de 24 horas. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de luz ambiental (luz natural/fluorescente).

La Figura 3 muestra las AVI de *lisianthus* suspendidas de nuevo en yogur natural y dejadas a temperatura ambiente en condiciones de luz ambiental (luz natural/fluorescente) durante 24 y 48 horas.

- 40 Figura 4. Espectro de RMN de AVI purificadas de clavel en disolvente DMSO. Los dos picos alrededor del desplazamiento químico 1,0 ppm son de lípidos presentes en las AVI. Los picos principales entre los desplazamientos químicos 2,0 – 9,0 ppm son de pelargonidin-3,5-di-O-glucósido presente en las AVI.

Figura 5. Espectro de RMN de lípidos aislados de las AVI de clavel. Los lípidos se disolvieron en una mezcla de 50% de metanol y 50% de cloroformo. Los picos a los desplazamientos químicos de 3,4; 4,7 y 7,6 ppm son debidos a los disolventes y todo lo demás se refleja de los lípidos.

- 45 La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 Aislamiento de las AVI de plantas

Materia vegetal

5 Las líneas de *lisianthus* usadas en este estudio fueron líneas 54 y Wakamurasaki (véase Deroles et al. 1.998 para más detalles). Se recogieron flores completamente abiertas y se lavaron con agua destilada para retirar potenciales contaminantes tales como granos de polen. Se eliminaron diversas regiones de pétalos con una cuchilla para estudio adicional.

10 Las AVI de *lisianthus* se encuentran como una o más formas irregulares grandes en las vacuolas de células epidérmicas adaxiales en la garganta de la flor. Las AVI de *lisianthus* se podían retirar de vacuolas de células usando micropipetas de vidrio estrechas. Permanecieron intactas y se adhirieron firmemente al vidrio indicando que son estructurales en lugar de concentraciones localizadas de antocianinas disueltas. Además, las imágenes del microscopio electrónico muestran que el cuerpo de la AVI no está ligado a membrana.

Generación y aislamiento de protoplastos.

15 Se generaron protoplastos de material de pétalos internos macerado como se describe por Morgan (1.998). Se añadió material de 10 flores a una disolución de protoplastos que contiene celulosa al 1% Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co., Higashi-Shinbashi, Minatoku, Tokio) y Pectoliasa Y23 al 0,05%. Se incubó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente y después se filtró por una malla de acero inoxidable de 50 μm , se lavó en macrosales VKM de concentración 1/10 (Binding y Nehls. 1.977) más 17,53 g/l de NaCl (disolución de lavado) y los protoplastos
20 recogidos por centrifugación (100 x g, 5 min). Se lavaron los protoplastos granulados dos veces con disolución de lavado.

Aislamiento de AVI

25 Para enriquecer en protoplastos que contienen las AVI, se sometieron protoplastos aislados a centrifugación por un gradiente Percoll discontinuo de 4 etapas (AMRAD-Pharmacia Biotech, Auckland, NZ) (20%, 30%, 50%, 80% v/v, Percoll/disolución de lavado). El gradiente se formó por adición secuencial cuidadosa de volúmenes iguales de cada disolución de gradiente en orden descendente. Se añadieron los protoplastos aislados en disolución de lavado a la parte superior del gradiente y se desarrolló el gradiente por centrifugación (300 x g, 5 min en un rotor basculante). Los protoplastos intensamente pigmentados que contenían las AVI se recogieron del límite 50%/80% y se lavaron
30 dos veces con disolución de lavado. Se lisaron los protoplastos que contenían las AVI usando ultrasonidos y el producto se estratificó cuidadosamente en un segundo gradiente de Percoll que se desarrolló como se describió anteriormente. Las AVI aisladas se granularon en el fondo del tubo de centrifuga y se lavaron dos veces con disolución de lavado.

Para uso en experimentos de control se disolvieron las antocianinas de las AVI en condiciones ácidas (MeOH al 90%/Ácido Acético al 5%).

35 Ejemplo 2 Estabilidad de antocianinas ligadas a AVI en una serie de entornos de pH.

Las AVI aisladas de *lisianthus* se suspendieron de nuevo en un tampón McIlvaines (Ácido Cítrico/Fosfato de Sodio) serie de pH 3,0 a 8,0. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente y condiciones de iluminación (luz fluorescente/natural) durante hasta 7 días para determinar la estabilidad y solidez de las antocianinas ligadas a AVI. Se tomó un espectro de cada muestra (350 – 750 nm) a intervalos diarios para determinar el tono y la intensidad de
40 las antocianinas ligadas a AVI con el tiempo. En el experimento de control, se extrajeron antocianinas de las AVI y se sometieron a las mismas condiciones de pH.

Como se muestra en la Figura 1 las antocianinas en este experimento han mantenido su color durante un amplio intervalo de pH y durante un periodo de tiempo significativo. Todos los demás tratamientos no cambian
45 significativamente hasta 7 días en que las muestras a niveles de pH más alcalinos (pH 6-8) empiezan a perder color.

Las antocianinas se extrajeron después de las AVI de *lisianthus* y se volvieron a suspender en la serie de tampones de pH usada previamente. También se trató una muestra de AVI intactas al mismo tiempo. De nuevo, el espectro de absorbancia de las antocianinas ligadas a AVI no cambia significativamente por el intervalo de pH o por un periodo de 24 horas como se muestra en la Figura 2. Sin embargo las mismas antocianinas, cuando se liberan forman las
50 estructuras de las AVI se comportan de una manera más predecible por que presentan espectros de absorbancia significativamente diferentes según el pH de la disolución y sus espectros también cambiaron con el tiempo. Esto demuestra claramente que la estructura de la AVI de *lisianthus* protege con eficacia las antocianinas ligadas de los efectos de diferentes entornos de pH.

Ejemplo 3 Estabilidad de antocianinas ligadas a AVI en yogur natural comercial.

Se mezclaron las AVI de lisianthus con una muestra de yogur natural comercial (pH 4,18) obtenida de un supermercado para determinar su capacidad para mantener el color en un entorno de alimentos tratados. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente en condiciones de luz ambiental durante 24 a 48 horas.

Como se muestra en la Figura 3, las AVI de lisianthus podían mantener su color durante un periodo de 48 horas.

5 Ejemplo 4: Elucidación de la estructura/composición de la AVI

Aislamiento de las AVI de clavel y lisianthus

Materia vegetal

10 Se cultivó clavel (una variedad cultivada coloreada malva de *Dianthus caryophyllus*) o Lisianthus (variedad cultivada 54 de *Eustoma grandiflorum*) en el invernadero en las condiciones de iluminación natural y la extensión del día. Se recogieron pétalos de flores completamente expandidos y se lavaron para retirar contaminantes no deseados.

15 Las AVI de clavel son de forma más redonda por todo el pétalo que las AVI de forma más irregular de lisianthus. Las AVI de clavel se encontraron por todos los pétalos. La estructura de las AVI se desconocía previamente. Los solicitantes formularon hipótesis de que aunque las AVI no presenten membranas superficiales para contenerlas, pueden presentar membranas infraestructurales o lípidos. Los solicitantes han mostrado ahora que las antocianinas y los lípidos son los dos principales componentes de las AVI como se describe más adelante.

Se aislaron las AVI como sigue:

Preparación de protoplastos

20 1) Se maceraron de manera mecánica los pétalos de flores lavados usando un cortador de cebollas o cuchilla para formar una suspensión. Con posterioridad, se incubó la suspensión en una disolución enzimática que comprendía celulasa al 1% Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co., Higashi-Shinbashi, Minatoku, Tokio) y pectolasa Y23 al 0,05% (Morgan, 1.998). Se llevó a cabo la maceración enzimática durante la noche a temperatura ambiente.

25 2) Los protoplastos que contenían AVI se enriquecieron por filtración de la suspensión macerada enzimáticamente a través de estopilla o tamices de metal con tamaños de poro que permitían pasar los protoplastos que contenían AVI. Después se lavaron los protoplastos que contenían AVI con tampones en que toda AVI liberada era estable, por ejemplo, tampón de fosfato 0,1 que contenía 17,53 g/l de cloruro de sodio. Los protoplastos que contenían AVI se concentraron después en un gránulo suelto por centrifugación.

30 3) Después se transfirió el gránulo que contenía AVI a percoll al 80% (AMRAD-Pharmacia Biotech, Auckland, Nueva Zelanda). Las AVI se liberaron de los protoplastos por agitación vorticial o tratamiento de suspensión ultrasónica suave.

30 Elucidación de la estructura de las AVI.

Análisis de antocianinas

Para análisis de antocianinas, las AVI, preparadas según los procedimientos descritos anteriormente, se extrajeron con metanol al 80% con ácido acético al 5%. Se sometió después el extracto a análisis LC-MS. La Tabla 2 a continuación enumera las antocianinas encontradas en las AVI de clavel y lisianthus.

35 **Tabla 2**

AVI de Lisianthus (púrpura)	[M+H] ⁺
Cianidina-3-O-glucósido	449
Delfinidina-3-O-glucósido	465
Cianidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	757
Cianidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	787
Delfinidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	773
Delfinidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	803
Cianidina-O-cumaroilglucósido	595

(continuación)

Delfinidina-O-cumaroilglucósido	611
Delfinidina-3-O-acetilglucósido-5-O-glucósido (o galactósido)	669
Peonidina- 3-O-ramnogalactósido -5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	813
Delfinidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)+ m/z 123	896
Cianidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)+ m/z 155	912
Delfinidina-3-O-ramnogalactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	919
Cianidina-3- di-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	919
Delfinidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)+ m/z 123	926
Delfinidina-3-di-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	935
Cianidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)+ m/z 155	942
Delfinidina-3-O-ramnogalactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	949
Cianidina-3-di-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	949
Delfinidina-3-di-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	965
Pelargonidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-p-cumaroilglucósido)	741
Pelargonidina-3-O-galactósido-5-O-(6-O-ferulilglucósido)	771
AVI de Clavel	
Pelargonidina	271
Pelargonidina-3-O-glucósido	433
Pelargonidina-3,5-di-O-glucósido	595

Se disolvieron por separado las AVI de clavel y lisanthus liofilizadas en DMSO-D6 y se sometieron a análisis de RMN. La Figura 4 muestra un espectro de RMN que refleja claramente la presencia de pelargonidina 3, 5-di-O-glucósido y otro componente principal.

5 Análisis de lípidos

Para confirmar la presencia de lípidos en las AVI, se aislaron lípidos de las AVI de tanto clavel como lisanthus usando un disolvente orgánico: cloroformo:metanol:TFA (50:50:0,5 v:v:v). Se disolvieron las AVI liofilizadas con el disolvente orgánico. Con posterioridad, el disolvente orgánico que contenía las AVI disueltas se repartió contra agua acidificada (agua con TFA al 0,5%). El procedimiento se repitió varias veces hasta que no fue evidente color antocianico en la fase orgánica. Se recogió la fase orgánica que contenía los lípidos y se secó con posterioridad en nitrógeno para preparar los lípidos. Después se disolvieron los lípidos secos en un cloroformo (d4) y metanol para realizar medición por RMN.

La Figura 5 muestra el espectro de RMN de los lípidos extraídos de las AVI. La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del Protón (RMN de ^1H) de los lípidos totales extraídos de las AVI de clavel mostró una región de campo alto típica de lípidos extraídos de una muestra de membrana biológica (Kriat M, et al. 1.993). El pico de RMN de ^1H más destacado a 1,3 ppm es $-(\text{CH}_2)_n$ en cadena de acilo graso. El pico a 0,9 ppm es característico de $-\text{CH}_3$ en cadena de acilo graso. El pico a 1,6 ppm representa el **H** en itálica y negrita en el $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; a 2,1 ppm $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$; a 2,3 ppm de $-\text{CH}_2-\text{COO}-$; a 2,8 ppm $=\text{CHCH}_2\text{CH}-$ (señal de acilo graso poliinsaturado); a 3,6 ppm $-\text{CH}_2-\text{N}^+$; a 5,4 ppm $-\text{CH}=\text{CH}-$ en cadena de acilo graso.

Los ejemplos anteriores ilustran la práctica de la invención. Se entenderá mejor por los expertos en la materia que se pueden hacer numerosas variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Referencias

- 5 Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H., 1975. Anthocyanin, flavonol co pigments, and pH responsible for larkspur flower colour. *Phytochemistry* 14, 2677-2682.
- Cormier, F., Do, C.B., 1993. XXVII *Vitis vinifera* L. (grapevine): in vitro production of anthocyanins. In: Bajaj Y.P.S. (Ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 24, Medicinal and Aromatic Plants, V. Springer Verlag, Berlin, pp. 373-386.
- 10 Gonnet J-F., 2003. Origin of the Color of Cv. Rhapsody in Blue Rose y Some Other So-called "Blue" Roses. *J. Agric. Food Chem.*, 51,4990-4994.
- Hemleben, V., 1981. Anthocyanin carrying structures in specific genotypes of *Matthiola incana* R.Br. *Z. Naturforsch* 36c, 926-927.
- Kubo, H., Nozue, M., Kawasaki, K. Yauda, H., 1995. Intravacuolar sferical bodies in *Polygonium cuspidatum*. *Plant Cell Physiol.* 36, 1453-1458.
- 15 Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R., 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions - their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* 55 (2000) 327-336.
- Nozzolillo, C, Ishikura, N., 1988. An investigation of the intracellular site of anthocyanins using isolated protoplasts and vacuoles. *Plant Cell Rep.* 7,389.
- 20 Nozue, M., Kubo, H., Nishimura, M. Yasuda, H., 1995. Detection and characterization of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 36, 883-889.
- Small C.J., Pecket, R.C., 1982. The ultrastructure in anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta* 154, 97-99.
- Zhang *et al.*, 2006, New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* 6, Art 29.

REIVINDICACIONES

1. Un producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica, que comprende o se colorea con al menos una inclusión antociánica vacuolar o "AVI" de una planta, en el que la AVI es estable en al menos una de las siguientes condiciones:
- 5 a) pH ácido y 37°C durante al menos aproximadamente 72 horas;
- b) un intervalo de pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 8,0 y
- c) alta intensidad de la luz durante al menos aproximadamente 48 horas.
2. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 1, en el que la inclusión antociánica vacuolar (AVI) comprende:
- 10 a) al menos una antocianina y
- b) al menos un lípido.
3. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 2, en que la antocianina es un glucósido de una antocianidina.
- 15 4. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 3, en que la antocianidina se selecciona de una de: cianidina, peonidina, delfinidina, pelargonidina, petunidina, malvidina, 3-desoxiatocianindinas y 6- y 8-hidroxi-antocianindinas y derivados de las mismas hidroxilados, acilados y metilados.
5. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 3, en que la antocianidina se selecciona de una de: cianidina, peonidina, delfinidina y pelargonidina y derivados de las mismas hidroxilados, acilados y metilados.
- 20 6. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en que la antocianina es un glucósido o un galactósido de una antocianidina.
7. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en que la antocianina es un glucósido acilado de la antocianidina.
- 25 8. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en que la antocianina presenta O-glucosilación en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' ó 5'.
9. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en que la antocianina es un 3- ó 5-O-glucósido.
10. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en que la antocianina es un 3,5 -di-O-glucósido.
- 30 11. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 2, en el que la antocianina se selecciona de las enumeradas en la Tabla 2.
12. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según la reivindicación 2, en el que la antocianina se selecciona de las de *lisianthus* enumeradas en la Tabla 2.
- 35 13. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en que el lípido es parte de una membrana biológica.
14. El producto alimenticio, producto cosmético, tejido o crema tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en que el lípido es un ácido graso.
15. Un método de coloración de un producto, comprendiendo el método añadir una AVI como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 al producto.

Figura 1

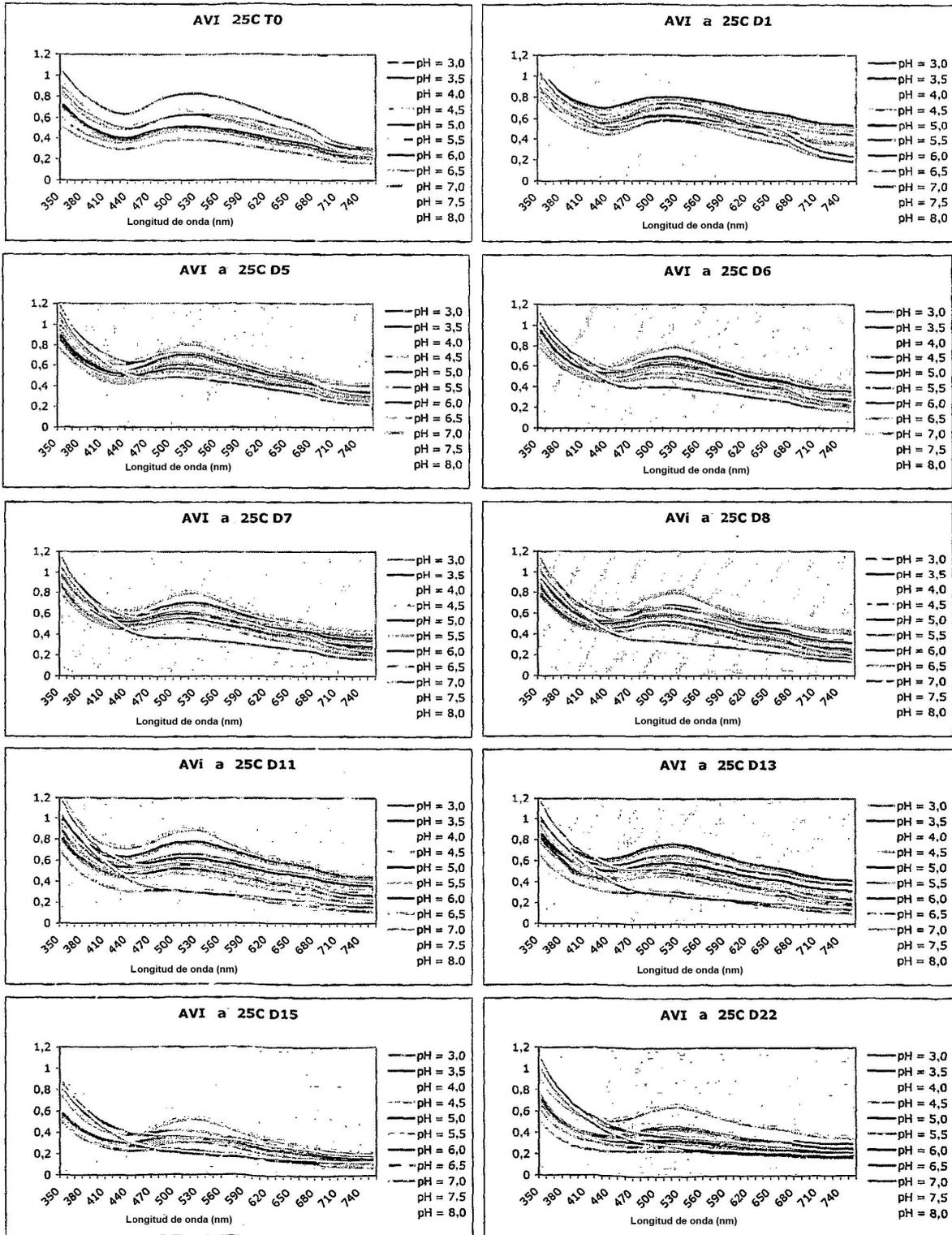
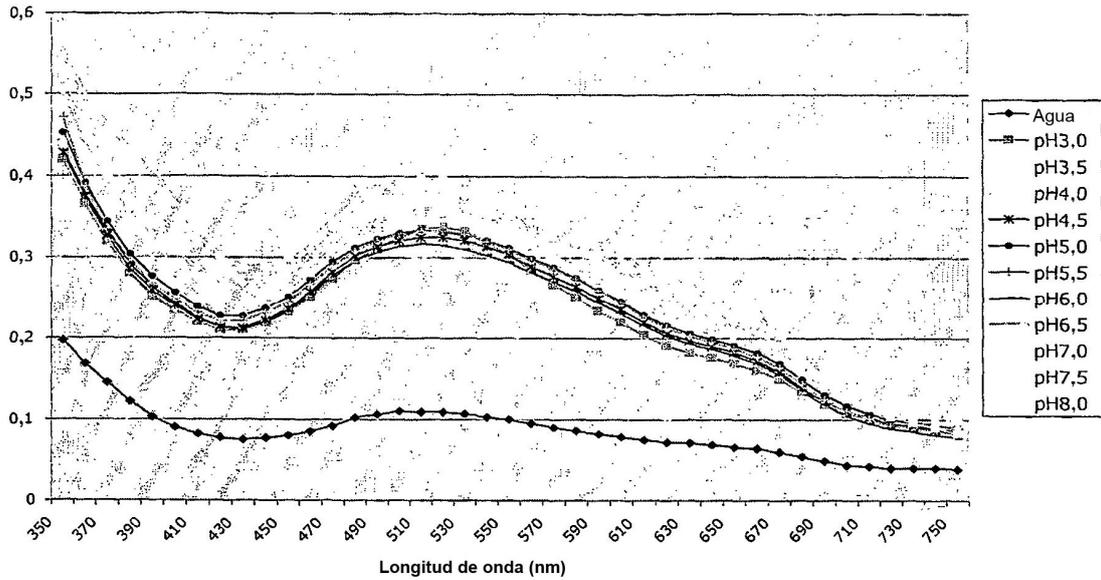


Figura 2

AVI de Lisianthus a 24 h



Antocianinas de Lisianthus Aisladas a 24 h

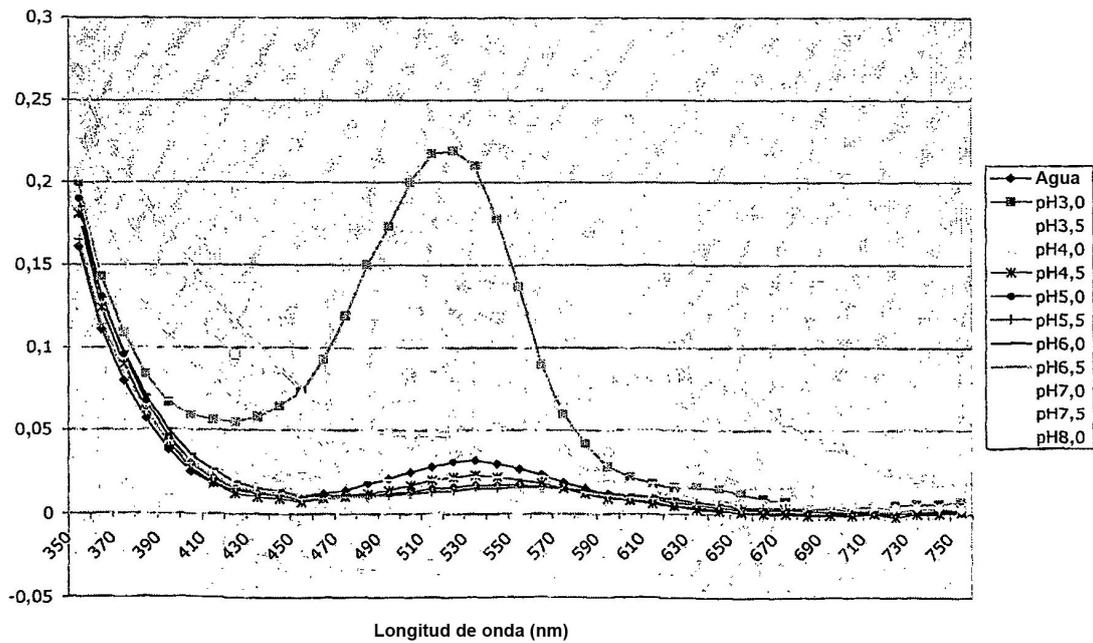


Figura 3

1 h

48 h

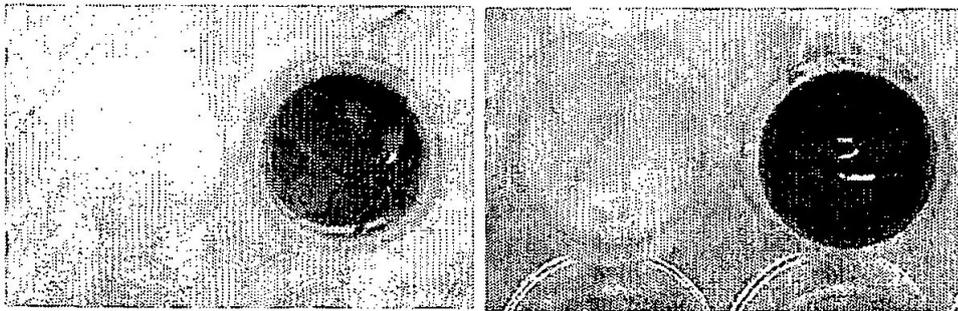


Figura 4

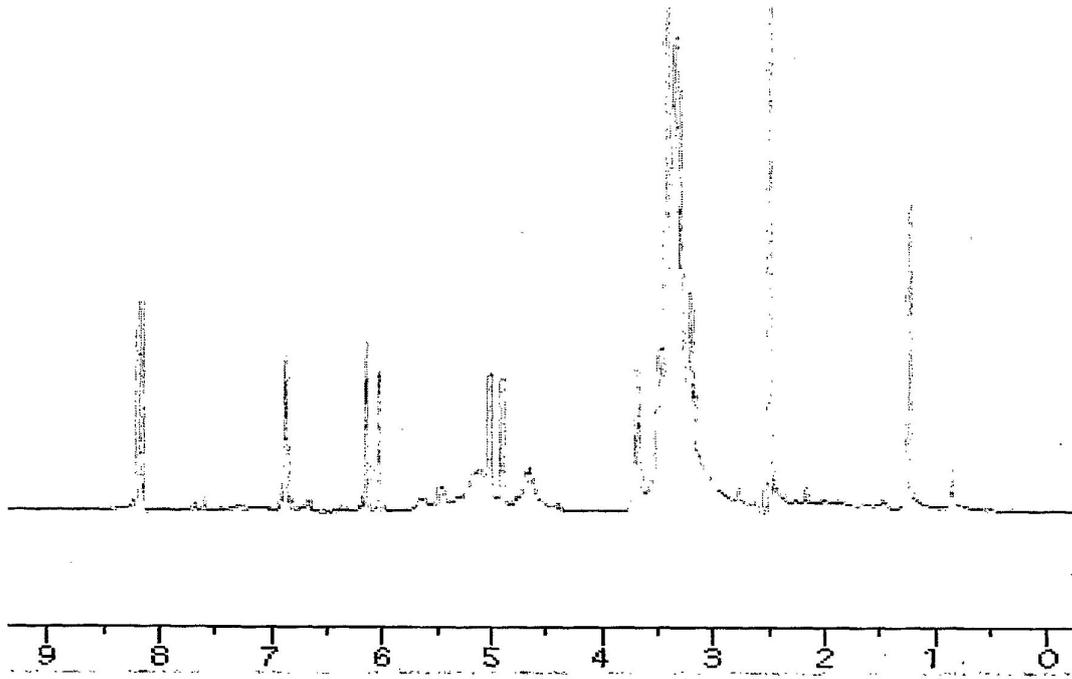


Figura 5

