

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 445**

51 Int. Cl.:

C07H 13/06	(2006.01) A61K 8/96	(2006.01)
C07H 15/10	(2006.01) A61Q 19/08	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01) A23L 3/3472	(2006.01)
C12P 23/00	(2006.01) A23L 3/3562	(2006.01)
C12Q 1/02	(2006.01) A23L 2/58	(2006.01)
C12R 1/07	(2006.01) A61K 35/742	(2015.01)
C09B 61/00	(2006.01) C12P 19/44	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01) A23K 10/16	(2006.01)
A61K 39/07	(2006.01) A23K 20/179	(2006.01)
A61K 8/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2011 PCT/GB2011/001159**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO2012017199**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2011 E 11752317 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2601203**

54 Título: **Ésteres de ácido graso de glucósidos de carotenoides como agentes colorantes para productos alimenticios**

30 Prioridad:
03.08.2010 GB 201013041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2017

73 Titular/es:
**ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW
COLLEGE (100.0%)
Egham, Surrey TW20 0EX , GB**

72 Inventor/es:
**FRASER, PAUL DAVID y
FONS, LAURA PEREZ**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

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

ES 2 617 445 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

Ésteres de ácido graso de glucósidos de carotenoides como agentes colorantes para productos alimenticios

La presente invención se refiere a usos de carotenoides y a moléculas de carotenoides novedosas. En particular, la invención se refiere a moléculas de carotenoides y a sus usos, tales como usos como agentes colorantes en materia comestible y como componentes en composiciones probióticas adecuadas para su uso en materia comestible, tal como productos alimenticios, yogures probióticos, y bebidas probióticas, y usos adicionales en cosmética.

Hasta la fecha, se han notificado más de 700 estructuras para carotenoides aislados a partir de plantas, hongos y bacterias [1]. Una característica que define a los carotenoides es su cromóforo, que consiste en una serie de dobles enlaces conjugados. Son los enlaces conjugados los que confieren color a la molécula. La capacidad de los carotenoides para conferir color a los productos alimenticios ha provocado el interés comercial en estas moléculas, por ejemplo, para su uso como agentes colorantes naturales. Además de su utilidad como agentes colorantes, se considera que muchos carotenoides tienen propiedades que promueven la salud. Por ejemplo, la ingesta alimenticia de productos que contienen licopeno está asociada con la prevención, y más recientemente el tratamiento, de determinados cánceres tales como cáncer de próstata [2-4]; mientras que el β -caroteno, también conocido como provitamina A, es un componente alimenticio que es esencial para la salud humana [5,6]. Los carotenoides que presentan una estructura principal C40 han sido el objeto de atención comercial debido a su disponibilidad en la naturaleza y su capacidad de aprovecharse. Un ejemplo de un carotenoide bicíclico C40 disponible comercialmente es cantaxantina, con ventas comerciales anuales de 280 millones de dólares estadounidenses; se usa como complemento alimenticio en las industrias de acuicultura y aves de corral [7].

Los carotenoides para su uso en la industria se obtienen normalmente mediante síntesis química. Sin embargo, los altos costes de producción, la dependencia de combustibles fósiles para obtener energía y para el suministro de especies moleculares orgánicas reactivas adecuadas, y los impactos perjudiciales percibidos por el público sobre el medio ambiente, han dado como resultado esfuerzos intensificados para encontrar métodos de producción alternativos, particularmente a partir de fuentes biológicas.

A pesar de su color intenso, las desventajas de usar carotenoides convencionales como agentes colorantes naturales incluyen su escasa solubilidad en disoluciones acuosas e inestabilidad en las mismas. Tales propiedades tienden a ser problemáticas cuando se usan carotenoides con estructura principal C40 convencionales debido a su estructura química hidrófoba.

Determinadas bacterias pueden producir una variedad diversa de carotenoides con estructuras principales tanto C40 como C30. Los carotenoides con una estructura principal C30 se denominan a menudo diapocarotenoides y se encuentran normalmente en un número limitado de bacterias Gram positivas (gram+) tales como *Methyobacterium rhodinum* (antes *Pseudomonas rhodos*), [8-10], *Streptococcus faecium* [11], *Hellobacterium* [12,13] y *Staphylococcus* [14-16].

El documento WO 2007/066108 describe la provisión de *Bacilli* no patógenos que forman de esporas y su uso en productos alimenticios. Sin embargo, el documento WO 2007/066108 no dice nada en cuanto a la identidad e idoneidad de diapocarotenoides C30 de la presente invención que pueden usarse en un contexto comercial, tal como en productos alimenticios humanos o en piensos para animales no humanos. El documento WO 2007/066108 también se refiere a cepas de *Bacilli* que se han depositado en el NCIMB, tales como HU 36 (n.º de NCIMB 41361), a la que se hace referencia en la sección experimental de la presente solicitud. El documento WO 2009/126890 da a conocer un hongo recombinante y un método para preparar un aditivo alimenticio o para piensos que contiene un carotenoide que tiene una estructura principal de carotenoide de 29 carbonos. Los diapocarotenoides C30 de la invención que presentan constituyentes de ácido graso definidos en R₂ no se mencionan en el documento WO 2009/126890. Shindo K. *et al* The Journal of Antibiotics, vol. 61, n.º 12, 1 de diciembre de 2008, páginas 729-735 describen una estructura C30 que tiene un grupo CH₂OH unido al resto glucosilo que no está presente en las estructuras que abarca la presente invención. Además, no se hace referencia a que los compuestos descritos por Shindo *et al* se contemplen para su uso como agentes colorantes para productos alimenticios.

Los inventores han aislado ahora moléculas de diapocarotenoides (carotenoides que presentan estructuras principales C30) de *Bacillus spp.* que forma esporas que pueden usarse en la industria alimenticia. Los diapocarotenoides de la invención presentan mejor estabilidad en entornos acuosos y son solubles en tales entornos mientras que los carotenoides C40, tales como licopeno, son sustancialmente insolubles en entornos acuosos. Se ha hallado que los diapocarotenoides de la invención presentan una capacidad antioxidante que es similar a, o mejor que, la del licopeno a pesar de tener un número similar de dobles enlaces, y esto fue inesperado. Además, las esporas que contienen diapocarotenoides de tales *Bacillus spp.* también tienen uso en la industria alimenticia así como los propios *Bacillus spp.*, que también pueden usarse en aplicaciones probióticas [17].

Según la presente invención, se proporciona un compuesto de carotenoide de fórmula (2) tal como se muestra en la figura 4 en la que X es metilo o COOR en el que R se selecciona independientemente de metilo, etilo, metiletilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y n se selecciona de cero, 1, 2 y 3; y R₂ se selecciona independientemente de ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido

dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tetradecanoico y ácido pentadecanoico. Compuestos de carotenoides preferidos de la invención son los de fórmula (1) tal como se muestra en la figura 1 en la que X es metilo o COOR en el que R se selecciona independientemente de metilo, etilo, metiletilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y n se selecciona de cero, 1, 2 y 3. Preferiblemente, un compuesto de fórmula (1) es uno en el que X es metilo y n es 3, o X es COOR en el que R es metilo, y n es 3. Los compuestos de fórmula (1) son normalmente de color naranja o amarillo y son estables hasta una temperatura de aproximadamente 70°C. Tales compuestos de fórmula (1) pueden usarse como aditivos alimenticios en productos alimenticios que se prepararan en condiciones en las que no se permite que la temperatura suba por encima de aproximadamente 70°C y más preferiblemente, en las que no se permite que la temperatura suba por encima de aproximadamente 60°C.

El experto en la técnica apreciará que el grupo R de fórmula (1) puede modificarse por medio de modificación química del grupo carboxilo para formar ésteres. Tales ésteres pueden formarse haciendo reaccionar el grupo carboxilo con el alcohol correspondiente (metanol, etanol, butanol, propanol, isopropanol, etc.) en presencia de un catalizador ácido de protones tal como cloruro de hidrógeno o ácido sulfúrico (esterificación de Fischer). La reacción puede llevarse a cabo según protocolos de química convencionales, por ejemplo, tales como los descritos por Laurence M. Harwood y Christopher J. Moody en "experimental Organic Chemistry, Principles and Practice" (1989), Blackwell Science, Ltd. Además, el experto en la técnica apreciará que también pueden realizarse otros métodos tales como por medio de modificación enzimática de la estructura en la que R es tal como se define para -COOR en la fórmula (1) usando aciltransferasas no específicas (EC 2.3) en presencia o ausencia de acetil CoA. Tales enzimas que modifican carotenoides pueden aislarse y purificarse de tejidos vegetales que tienen un alto contenido en carotenoides, usando protocolos y procedimientos conocidos en la técnica. Normalmente, pueden seleccionarse tejidos vegetales ricos en carotenoides de flores y frutas. Pueden usarse glicosiltransferasas (EC. 2.4) para modificar el contenido en azúcar de la molécula usando donadores de nucleótido de azúcar, por ejemplo, UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-GlcNAc, GDP-manosa, UDP-GalNAc, UDP-xilosa, UDP-ácido glucurónico y GDP-fucosa.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de al menos un compuesto aislado de fórmula (2) o de fórmula (1) como agente colorante para un producto alimenticio. Los productos alimenticios que incluyen compuestos aislados de fórmula (1) son normalmente de un color más vivo que productos alimenticios comparables y como resultado de contener tales compuestos pueden tener una vida útil de almacenamiento más larga que productos alimenticios convencionales que no contienen compuestos aislados de la invención. Los compuestos aislados de fórmula (1) de la invención también presentan actividad antioxidante y se cree que funcionan en parte para retrasar la oxidación de los productos alimenticios que los contienen. Por tanto, como aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto alimenticio que comprende al menos un compuesto aislado de fórmula (1). El producto alimenticio puede incluir dos, tres, cuatro o más compuestos aislados de fórmula (1) según el diseño. Para los fines de la presente invención, un producto alimenticio puede ser una bebida, un producto alimenticio no líquido o pueden componer un complemento que se incorpora a un producto alimenticio. Un producto alimenticio se compone normalmente de uno o más de proteínas, hidratos de carbono y grasas. El producto alimenticio puede contener uno o más micronutrientes tales como vitaminas o minerales y similares. Los ejemplos de productos alimenticios que pueden incorporar compuestos aislados de fórmula (1) incluyen barras de tentempié, cereales, productos para untar y para extender, productos de confitería, formulaciones probióticas incluyendo yogures, y dulces congelados, quesos, líquidos a base de aceites vegetales o grasas vegetales, líquidos a base de grasas animales y otros productos lácteos. Los productos alimenticios preferidos que incorporan compuestos aislados de fórmula (1) incluyen yogures, quesos, refrescos tales como zumos de frutas diluidos con agua (por ejemplo, naranja y limón), mezclas de bebidas secas, bebidas nutritivas y té. La bebida puede ser alcohólica y los compuestos aislados de fórmula (1) pueden añadirse para introducir color. En el documento WO2007/066108 pueden encontrarse tipos adicionales de productos alimenticios, incluyendo animales acuáticos y marinos que están destinados a ser un producto alimenticio para consumo humano o no humano y a los que se les puede alimentar con una dieta que contiene compuestos aislados de fórmula (1).

En otras aplicaciones, por ejemplo, la adición de compuestos de fórmula (1) a productos alimenticios que se procesan a temperaturas mayores de aproximadamente 70°C, pueden añadirse tales compuestos en forma de esporas aisladas de *Bacillus* spp. que comprenden compuestos de fórmula (1). La ventaja de añadir esporas de *Bacillus* spp. que comprenden compuestos de fórmula (1) es que cuando se incorporan en la espora, los compuestos de fórmula (1) presentan una estabilidad de color significativa frente al calor en relación a agentes colorantes convencionales tales como β -caroteno que se emplean en la técnica, y pueden someterse a temperaturas más altas, tales como temperaturas de hasta aproximadamente 200°C sin alterar el color aparente del producto (como puede detectarse a simple vista) en el que se producen. Productos tales como productos alimenticios que comprenden esporas no parecen experimentar un detrimento sustancial de color, y por tanto del color percibido de los mismos. Tales esporas pueden usarse en la coloración de mezclas alimenticias para productos alimenticios de partida, procesados que luego se cocinan, tales como bollos, magdalenas, galletas, tartas, pasteles, verduras procesadas, caramelos (golosinas), salsas procesadas y similares.

Además de usarse en o como productos alimenticios destinados principalmente al consumo humano, el experto en la técnica apreciará que los diapocarotenoides de la invención pueden usarse como componentes o ingredientes de piensos para animales no humanos. Por tanto, como aspecto adicional de la invención, se proporciona un pienso para animales que comprende compuestos de la invención o esporas de HU 36. Tales piensos comprenden

normalmente alimentos granulados, tales como los que se proporcionan a animales de granja tales como cerdos, ganado, caballos y aves de corral tales como gallinas, pavos y gallinas de Guinea y similares. Tales piensos para animales pueden comprender esporas que comprenden compuestos de la invención de *Bacillus* spp., tales como esporas de HU 36 o pueden comprender simplemente compuestos de diapocarotenoides de la invención que se han añadido en sí mismos.

Los compuestos de diapocarotenoides de la invención también pueden usarse en formulaciones para la industria cosmética, tales como en formulaciones que se aplican de manera tópica incluyendo maquillajes, formulaciones antiedad, por ejemplo, cremas para líneas de expresión y/o arrugas, potenciadores de la penetración en la piel, pulverizadores, y similares. Los compuestos de diapocarotenoides de la invención comprendidos en composiciones cosméticas pueden formularse en una variedad de formas de producto. Preferiblemente, las composiciones se preparan en sistemas de administración dirigida, por ejemplo cremas, lociones, geles, y similares, particularmente para administración tópica.

Las composiciones que contienen diapocarotenoides de la invención en forma de esporas o como compuestos de diapocarotenoides en sí mismos, pueden formularse en vehículos portadores tales como liposomas que pueden comprender otros aditivos frecuentemente usados en la industria cosmética. Preferiblemente, los compuestos de diapocarotenoides de la invención o esporas de *Bacilli* spp. que comprenden tales diapocarotenoides están en una formulación cosmética o dermatológicamente aceptable que es adecuada para ponerse en contacto con la piel humana. Las formulaciones que comprenden diapocarotenoides de la invención pueden estar en cualquier forma cosmética y/o dermatológicamente adecuada, tal como una loción o crema, una base anhidra o acuosa, o en forma de líquido pulverizable. Otras formas de producto cosmético adecuadas incluyen, por ejemplo, una emulsión, un bálsamo de labios, un brillo de labios, una loción, una mascarilla, un ungüento, una espuma, un parche, una pomada, una disolución, un pulverizador, una barra a base de cera o una toallita. Naturalmente, el experto en la técnica apreciará que las composiciones cosméticas que comprenden compuestos de diapocarotenoides de la invención pueden incluir uno o más adyuvantes compatibles cosméticamente aceptables, usados frecuentemente en la técnica, tales como fragancia, emolientes, humectantes, conservantes, vitaminas, quelantes, espesantes, anestésicos, compuestos antialérgicos, antifúngicos, antimicrobianos, otros agentes antiinflamatorios, antioxidantes adicionales, antisépticos, agentes despigmentantes, agentes formadores de película, repelentes de insectos, agentes farmacéuticos, agentes fotoestabilizadores, protectores solares, estabilizantes, tensioactivos, espesantes, modificadores de la viscosidad, y otros componentes tales como agentes botánicos seleccionados de aloe, manzanilla y similares.

Por tanto, como aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición cosmética que comprende esporas que comprenden compuestos de la invención de *Bacillus* spp., tales como esporas de HU 36. Las composiciones cosméticas de la invención también pueden comprender compuestos de diapocarotenoides de la invención en sí mismos, tales como compuestos de fórmula (1) y/o de fórmula (2). Tales composiciones cosméticas incluyen compuestos de diapocarotenoides de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto alimenticio que comprende esporas que comprenden compuestos de la invención de *Bacillus* spp., tales como esporas de HU 36. Tales esporas son normalmente de color amarillo o naranja vivo.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de fórmula (2) tal como se representa en la figura 4 en un producto alimenticio o en un pienso para animales en el que R_2 es H; y X, COOR y n son tal como se definieron para los compuestos de fórmula (1). Se cree que tales compuestos, tal como se definen en la fórmula (4), presentan buena estabilidad gástrica y, por tanto, encuentran uso como antioxidantes en la dieta o como fuente de antioxidantes complementarios en la dieta. Como resultado, tales compuestos representan adiciones útiles en la dieta porque se piensa que son útiles para ayudar a prevenir la aparición de la enfermedad, o de hecho para mejorar los síntomas de la enfermedad. Los extractos de *Bacilli* comprendidos por compuestos de la invención o que consisten en compuestos de la invención, esporas o *Bacilli* en sí mismos pueden usarse en la producción de medicamentos para tratar o prevenir la aparición de enfermedades tales como cánceres, enfermedad cardíaca, aterosclerosis, cataratas y degeneración macular del ojo, accidente cerebrovascular, demencia, enfermedad de Alzheimer, osteoporosis y síndrome de fatiga crónica. Los ejemplos de cánceres frente a los cuales pueden tener aplicación los compuestos de la invención incluyen cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer colorrectal, en particular cáncer de pulmón y de próstata. Los compuestos de la invención pueden usarse en la producción de medicamentos para tratar las arrugas de la piel, y otras características del envejecimiento; para tratar la diabetes antes y después de la presentación de síntomas fisiológicos de la diabetes.

Como aspecto adicional de la invención, se proporciona un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto de la invención para su uso como agente colorante en un producto alimenticio. Además, se proporciona un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto de la invención para su uso como antioxidante en un producto alimenticio.

Naturalmente, el experto en la técnica apreciará que un extracto de la invención puede incluir un extracto que es una combinación de extractos de más de una especie de *Bacillus* o más de una cepa de *Bacillus* o puede comprender un extracto de una única especie o cepa.

Como aspecto adicional de la invención, se proporciona un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto de la invención cuando se usa como agente colorante en un producto alimenticio. Además, se proporciona un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto de la invención cuando se usa como antioxidante en un producto alimenticio.

5 La provisión de compuestos de la invención permite la producción de un medicamento, alimento, complemento alimenticio, complemento probiótico, nutracéutico o dietético para mejorar cualquiera de los estados mencionados en el presente documento. Los compuestos de la invención son normalmente gastrorresistentes y, como tal, pueden emplearse dosis más bajas de compuestos de la invención que las dosis convencionales de otros medicamentos para un beneficio similar.

10 Como tal, puede considerarse que la invención proporciona una composición comestible que comprende un portador comestible y o bien esporas de *Bacillus* o bien un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un diapocarotenoide de la invención, tal como de una cepa de HU36, en una cantidad eficaz para mejorar o paliar cualquiera de los estados mencionados en el presente documento en sujetos que padecen de tales estados. Tales sujetos pueden ser sujetos humanos. La composición es preferiblemente un producto alimenticio, complemento alimenticio, un complemento dietético, un probiótico, un producto nutracéutico o un aditivo alimenticio.

15 Un producto nutracéutico es un componente alimenticio, un complemento alimenticio o un producto alimenticio que se considera que proporciona un beneficio médico o para la salud medible. Generalmente un producto nutracéutico está adaptado específicamente para conferir un beneficio para la salud particular en un consumidor sujeto. Un alimento funcional se comercializa normalmente como que proporciona un beneficio para la salud más allá de suministrar mera nutrición al consumidor.

Las composiciones que comprenden compuestos de la invención pueden estar en diversas formas, por ejemplo, en forma de un comprimido, una cápsula o un polvo. Cuando la composición está en forma de un polvo, puede proporcionarse en un recipiente hermético tal como un sobre o una botella.

25 Los ejemplos de excipientes que pueden estar presentes en las diversas composiciones que comprenden compuestos de la invención incluyen diluyentes (por ejemplo, derivados de almidón o de celulosa, un derivado de azúcar tal como sacarosa, lactosa o dextrosa), un estabilizador (por ejemplo, un componente higroscópico tal como sílice o maltodextrina), un aglutinante, tampón (por ejemplo, un tampón fosfato), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio), agente de recubrimiento, conservante, tinte emulsionante, aromatizante y/o agente de suspensión. Los excipientes adecuados los conocen bien los expertos en la técnica.

30 Los productos de la invención que comprenden compuestos de la invención pueden comprender un portador o excipiente que puede ser un disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente retardante de la absorción o isotónico, edulcorante o similar. Pueden prepararse portadores adecuados a partir de una amplia variedad de materiales incluyendo, pero sin limitarse a, diluyentes, aglutinantes y adhesivos, lubricantes, disgregantes, agentes colorantes adicionales, agentes de carga, o similares, que pueden requerirse para preparar una forma farmacéutica particular.

35 Las formas farmacéuticas orales sólidas pueden contener junto con uno o más compuestos activos de la invención, diluyentes tales como sílice, talco, ácido esteárico, magnesio, o estearato de calcio y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes tales como almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o polivinilpirrolidona; disgregantes tales como almidón, ácido alginico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; colorantes, edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos, sulfatos de laurilo, y similares. Tales preparaciones pueden producirse en modos conocidos, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, granulación, formación de comprimidos, recubrimiento de azúcar o recubrimiento por película.

40 Las dispersiones líquidas para la administración oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes pueden contener como portador, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener como portador, por ejemplo, una goma natural, tal como goma guar, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o poli(alcohol vinílico). Como los diapocarotenoides de la invención son solubles en agua, se empleará una formulación adecuada teniendo en cuenta su solubilidad en agua.

45 Pueden encontrarse tipos adecuados de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, 17ª Ed. 1985.

A continuación se encuentran ejemplos no limitativos y figuras que ilustran la invención. Ha de entenderse que los ejemplos no deben interpretarse como que limitan el alcance de la invención de ningún modo.

Leyendas de las figuras

Figura 1: compuesto de fórmula (1)

55 Figura 2: 1-(6-C11:0)-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopenoato de metilo (naranja)

Figura 3: 1-(6-C11:0)-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopeno (amarillo)

Figura 4: compuesto de fórmula (2)

Figura 5: perfiles de HPLC a 286 nm (A) y 450 nm de extracto no saponificado de células HU36 secadas por congelación (B) y tras la saponificación con NaOH al 10% (C). Se agruparon los picos cromatográficos según sus espectros UV/Vis (I-IV) mostrados en el panel D.

Figura 6: espectros de EM característicos de carotenoides principales hallados en extractos saponificados y no saponificados de HU36 (A-E) y sus correspondientes estructuras y patrones de fragmentación

Figura 7: cromatogramas de HPLC registrados a 286 nm (A) y 350 nm (B) de células HU36 que se hicieron crecer sobre placas de agar TY tratadas con 100 μ M del inhibidor desaturasa difenilamina (DPA). Los picos 1 y 2 representan el primer precursor de carotenoide de la ruta apo-8'-fitoeno y su isómero geométrico. Los siguientes productos intermedios de la biosíntesis de apo-8'-fitoflueno y apo-8'- ζ -caroteno se indican mediante los picos 3-5 y 6, respectivamente. La cuantificación de pigmentos coloreados de glicosil-apolicopeno y glicosil-apolicopenoato de metilo y el precursor incoloro apofitoeno se muestra en la figura C.

Figura 8: cromatogramas de HPLC registrados a 450 nm que muestran el perfil de carotenoides de HU36 que se hicieron crecer sobre medio DSM líquido y se recogieron en diferentes fases de esporulación: 24 h (A) y 72 h (B). El pico 1 representa el pigmento naranja asociado con la esporulación, glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo, y el pico 2 se corresponde al pigmento amarillo glicosil-apo-8'-licopeno. La cuantificación mediante HPLC-PDA de los picos principales se muestra en la figura C.

Figura 9: cromatogramas de HPLC registrados a 450 nm que muestran el perfil de carotenoides de HU36 que se hicieron crecer sobre medio TY líquido y se recogieron en diferentes puntos de tiempo: 24 h (A) y 72 h (B). Los picos 1 y 2 representan los pigmentos naranja y amarillo respectivamente, glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo y glicosil-apo-8'-licopeno. En el medio TY, se detectó un pico adicional que eluía a los 8 min que mostraba un espectro de absorción característico a 436, 466 nm. La cuantificación mediante HPLC-PDA de los picos principales se muestra en la figura C.

Sección de ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1. Cepas bacterianas y cultivo

Los *Bacillus* spp. pigmentados de color amarillo y naranja usados en este estudio se han descrito previamente [18]. Para generar biomasa para el esclarecimiento estructural de pigmentos, se usó de manera rutinaria *Bacillus indicus* HU36. El cultivo general se llevó a cabo en medios LB sobre agar 48 h a 30°C o en cultivo con agitación durante 48 h, 30°C a 200 rpm. La secuenciación del desarrollo del crecimiento se realizó con o bien extracto de tripton-levadura (TY) para el crecimiento de células vegetativas o bien medios de esporulación de Difco (DSM) para la generación de esporas [19].

1.2. Determinación de la eficacia de esporulación y experimentos de evolución temporal.

A partir de una disolución madre en glicerol maestra se inocularon placas de DSM-agar con una línea de HU36 y se incubaron durante 2 días a 30°C. Tras el crecimiento de las colonias, se usó una única colonia para inocular medios líquidos de DSM (10 ml). Se incubó el cultivo a 30°C y se agitó a 200 rpm, hasta que se alcanzó la fase exponencial media de crecimiento (DO_{600} , 0,6 UA). Entonces se usó una alícuota (1 ml) de este cultivo para sembrar medios líquidos de DSM (50 ml) presentes en matraces con deflectores de 250 ml. Entonces se incubaron estos cultivos a 30°C, 200 rpm durante tres días.

Para determinar el porcentaje de esporulación a lo largo del crecimiento y desarrollo, se llevó a cabo el recuento viable de células vegetativas y esporas resistentes al calor. Se recogieron puntos de datos cada 24 h desde la inoculación. En cada punto de tiempo, se tomó una alícuota de cultivo (0,5 ml) y se usaron 0,1 ml para hacer una dilución en serie en tampón fosfato (al 0,85% (p/v) pH 7). Cada dilución se colocó sobre placas de DSM-agar y tras 24 h a 37°C se contaron las colonias. Los 0,4 ml de cultivo restantes se calentaron a 65°C durante 1 h para retirar células vegetativas y retener esporas resistentes al calor. Entonces se llevaron a cabo diluciones en serie de la disolución tratada con calor. Se expresaron los datos como unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por ml y se proporcionó la eficacia de esporulación como porcentaje del número de esporas resistentes al calor/el número de células vegetativas. Para determinar el estado de esporulación, se examinaron los cultivos microscópicamente. El material para el análisis de carotenoides se obtuvo cada 24 h desde la inoculación; se recogió el material celular mediante centrifugación a 10.000 g realizada a 4°C durante 10 min. Las células granuladas se secaron por congelación y se almacenaron a -80°C.

1.3. Extracción, separación, identificación y cuantificación de carotenoides.

Se preparó el material para el análisis de carotenoides haciendo crecer *Bacillus* spp. en matraces con deflectores (2 l) que contenían medios líquidos TY (500 ml), se incubaron a 30°C y se agitaron a 200 rpm. Se recogieron las células de los medios después de 2 a 3 días de crecimiento mediante centrifugación. Se congeló la biomasa celular y se liofilizó hasta sequedad completa (aproximadamente 3 días). Este material o bien se usó inmediatamente o bien se almacenó a -80°C. Se preparó un polvo homogéneo usando un mortero y mano de almirez o dispositivo TissueLyser (Qiagen, Crawley, R.U.). Se tomó una alícuota (50 mg) del material secado por congelación homogeneizado para extracción. La extracción de carotenoides a partir de este material se realizó con y sin saponificación. En primer lugar, la extracción directa sin saponificación se llevó a cabo con metanol (2 ml), añadido al material celular en polvo. Entonces se sonicó la suspensión creada a temperatura ambiente durante de 10 a 15 min. La centrifugación (12.000 rpm) durante 3 min se llevó a cabo para retirar el residuo celular y crear el sobrenadante que contenía carotenoides. El residuo celular se volvió a extraer hasta que no se recuperó ningún color extraíble del material celular. Se combinaron los extractos metanólicos y después se secaron a vacío (evaporador centrífugo EZ-2 Plus, Genevac, Ipswich, Suffolk, R.U.) y se almacenó el extracto de carotenoide seco a -20°C en nitrógeno para análisis adicional.

Se realizó saponificación antes de la extracción tratando las células secadas por congelación (50 mg) con una disolución de NaOH (al 10% p/v; 1 ml) y sonicando la suspensión durante 15 - 20 min a temperatura ambiente. Se retiró el NaOH mediante centrifugación y del material celular digerido, se añadieron metanol (250 µl) y cloroformo (500 µl), se mezclaron y después se creó un reparto con solución salina tamponada con Tris (Tris-HCl 50 mM, 1 M, pH 7,0). Tras la centrifugación, se retiró la fase inferior que producía carotenoides y se volvió a extraer la fase superior acuosa con cloroformo (500 µl) dos veces (en este punto, no hay color en el residuo celular). Se redujeron los extractos orgánicos combinados hasta sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno; normalmente estos extractos secados se almacenaron a -20°C, para análisis adicional.

Debido a su falta de solubilidad en cloroformo o acetato de etilo, los extractos secados se disolvieron rutinariamente en cloroformo:metanol (1:1 en vol.). Se llevaron a cabo separaciones por CCF de estos carotenoides derivados de *Bacillus* usando dos sistemas. En primer lugar, el sistema I comprendía una fase estacionaria de gel de sílice activado y la fase móvil acetona (al 35%) en éter de petróleo (p.e. de 80-100°C [15]) y el sistema II comprendía una fase estacionaria idéntica con tolueno/acetato de etilo/metanol (50:25:25 en vol.) [20].

Para la modificación química, se disolvieron los extractos de carotenoides no hidrolizados en metanol que contenía KOH al 10% y se calentaron durante 20 min a 60°C. Se fraccionaron adicionalmente mediante reparto directo en éter (fracción alcalina) seguido por ajuste del pH a 3 con HCl y reparto de nuevo en éter (fracción ácida).

Se realizó análisis de carotenoides mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)-red de fotodiodos (PDA) con un sistema Waters Alliance (Milford, MA) 2600S. Se llevó a cabo la detección con un PDA en línea. Se realizaron separaciones sobre una columna de fase inversa (RP) C₃₀, de 5 µm (250 x 4,6 mm de d.i.) con una precolumna C₃₀ (20 x 4,6 mm), (YMC Inc., Wilmington, NC), que se mantuvieron a 25°C. Antes de la inyección en la columna, se filtraron los extractos a través de una membrana de PTFE (0,2 µm: Chromacol Ltd., Herts, R.U.) y luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 min. La fase móvil usada para análisis de rutina comprendía (A) metanol, (B) metanol [21]:agua (80:20 en vol.) que contenía acetato de amonio al 0,2% (p/v) y (C) terc-butil metil éter. Se llevó a cabo la elución de la columna desde el 95% de (A) y el 5% de (B) durante 12 min, después una etapa hasta el 80% de (A), el 5% de (B) y el 15% de (C) seguido por un gradiente lineal hasta el 30% de A, el 5% de B y el 65% de C a los 30 min. Entonces se devolvió la columna a las condiciones iniciales y se equilibró durante 30 min. Se empleó una velocidad de flujo de 1 ml/min y se monitorizó la elución de manera continua con el PDA en línea (de 200 a 600 nm). Se realizó la identificación mediante la comparación de características espectrales y cromatográficas con respecto a carotenoides auténticos y similares así como parámetros de referencia en la bibliografía [17, 22]. Se llevó a cabo la cuantificación usando curvas de dosis-respuesta preparadas a partir de patrones auténticos purificados previamente mediante HPLC. Para la purificación, se separaron extractos saponificados mediante HPLC usando condiciones idénticas a las descritas anteriormente y compuestos puros aislados usando un colector de fracciones. Los coeficientes de absorción (ε) calculados para los pigmentos tanto amarillos como naranjas fueron de 149621 y 122300 (M⁻¹ cm⁻¹), respectivamente [22, 23]. También se identificó menaquinona mediante comparación de espectros con patrones auténticos. Todos los disolventes se adquirieron de VWR (Poole, R.U.).

Para complementar las propiedades UV/Vis y cromatográficas usadas para identificar los carotenoides en cuestión, también se empleó espectrometría de masas (EM). Se realizaron separaciones mediante HPLC antes de EM en línea de manera similar a la detallada anteriormente, con la excepción de que se usó una columna de RP C₃₀, de 3 µm (150 x 2,1 mm de d.i.) acoplada a una precolumna C₃₀ de 20 x 4,6 mm. Se alteró la fase móvil para facilitar la ionización y comprendía (A) metanol que contenía ácido fórmico al 0,1% (en vol.) y (B) terc-butil metil éter que contenía ácido fórmico al 0,1% (en vol.). Se usaron estos disolventes en un modo en gradiente empezando desde el 100% de (A) durante 5 min, luego se pasó hasta el 95% de (A) y el 5% de (B) durante 4 min, seguido por un gradiente lineal durante 30 min hasta el 75% de (B) reduciendo el tampón (A) por consiguiente hasta el 25% de (A). Después de este gradiente, se redujo (A) hasta el 10% durante 10 min y se restablecieron las condiciones iniciales (el 100% de A) durante 10 min después del gradiente para volver a equilibrar el sistema. La velocidad de flujo usada

fue de 0,2 ml/min. El modo de ionización empleado fue la ionización química a presión atmosférica (APCI) funcionando en modo positivo (Thermo Scientific, San Jose, California, EE.UU.). Se ajustaron las temperaturas de capilar y vaporizador de APCI a 225°C y 450°C respectivamente y el flujo de gas (nitrógeno) a 80 unidades. Los ajustes de la fuente de APCI fueron los siguientes; voltaje de fuente a 4,5 kV, corriente de fuente de 5 μ A y un voltaje de capilar de 3 V. Se realizó una exploración mediante EM completa desde 300 hasta 1500 m/z y se registraron espectros de EM/EM a una energía de colisión normalizada del 35% y anchura de aislamiento 1 m/z.

2. Resultados y discusión

2.1. Aislamiento de pigmentos de carotenoides a partir de material de *Bacillus*

Se ha determinado el genotipo de *Bacillus* spp. que producen carotenoides amarillos y naranjas [18]. Resulta de particular interés la cepa de *Bacillus indicus* HU36 y especies relacionadas debió a sus propiedades probióticas susceptibles [17]. Los carotenoides amarillos/naranjas formados por estas especies son el foco de atención del presente estudio.

Cuando se hicieron crecer especies de *Bacillus* en medios a base de TY o DSM o bien sólidos o bien líquidos, se produjeron carotenoides. Resultó evidente que el tipo y la cantidad de carotenoides producidos variaban con las condiciones de cultivo usadas. Sin embargo, el crecimiento en caldo de TY durante 48 h dio como resultado una biomasa comparativamente mayor (aumento de 5 veces y 3 veces en los días 2 y 3, respectivamente) con una composición de carotenoide que era representativa de todas las condiciones de cultivo evaluadas. Por tanto, se estandarizó este procedimiento para la generación de material que va a usarse en el esclarecimiento estructural de los carotenoides que estaban presentes. Los carotenoides producidos se retiraron de manera exclusiva dentro del sedimento celular; no hubo carotenoides presentes en los medios gastados. Se evaluaron extracciones de material nuevo, congelado y secado por congelación junto con diferentes tratamientos de disolvente (por ejemplo, metanol, acetona, cloroformo, dietil éter, DMSO y acetato de etilo) y los procedimientos de homogeneización incluyeron prensa francesa, trituración manual con nitrógeno líquido, dispositivos TissueLyser y sonicación. La extracción con metanol de material secado por congelación triturado fue, de manera comparativa, el enfoque más eficaz, pero se requirieron grandes volúmenes y múltiples reextracciones con metanol. Alternativamente, el tratamiento químico rápido con NaOH al 10% a temperatura ambiente seguido por sonicación, liberó los carotenoides en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). Los carotenoides entonces podrían enriquecerse en la fase de CHCl_3 con la adición de un tampón. El perfil y los espectros UV/Vis de los carotenoides extraídos únicamente con metanol y CHCl_3 fueron idénticos. El procedimiento de tratamiento químico usado representó un procedimiento de extracción eficaz que no modificó la estructura de los carotenoides nativos presentes.

2.2. La separación e identificación de carotenoides de *Bacillus*

Se han notificado previamente carotenoides C30 glicosilados en algunas bacterias gram+ tales como *Staphylococcus aureus*, *Planococcus maritimus* y *Helibacillus*. Por tanto, se realizó inicialmente la separación de pigmentos de *Bacillus* con cromatografía de capa fina (CCF), usando sistemas diseñados para estos triterpenoides y sus glicósidos. El sistema de CCF I reveló pigmentos de *Bacillus* tanto amarillos como naranjas con valores de R_f de 0,95 y 0,91 respectivamente, indicando que el pigmento naranja era más polar. Los pigmentos amarillos y naranjas se denominaron C455 (compuesto 19) y C467 (compuesto 15) respectivamente según sus máximos de absorción en el rango visible. Tras la saponificación con KOH, el carotenoide C455 se acumuló en la fracción de éter alcalino, mientras que el producto C467 se encontró en la fracción metanólica acidificada. El análisis por CCF en un sistema adecuado para determinar derivados de ácido glicosil-diapocarotenoico indicó que el producto de hidrólisis C455 tenía un R_f de 0,56, siendo menos polar que el producto C467 que tenía un R_f de 0,50. Los carotenoides no hidrolizados se mantuvieron en el origen. La tabla 1 A y B resume el comportamiento cromatográfico de los pigmentos de *Bacillus* en ambos sistemas de CCF usados y antes y después de la saponificación.

Tabla 1: Propiedades cromatográficas y espectrales de carotenoides detectados en extracto no saponificado de HU36 analizado mediante CCF, HPLC-PDA y CL/EM. A: amarillo (glicosil-apolicopeno); AC: amarillo claro; N: carotenoide naranja (glicosilapolicoponoato de metilo); NA: no aplicable Nd: no detectado.

Carotenoide	Análisis por CCF		HPLC	Propiedades espectrales			
	R_f	Color	R_t	λ máx. (nm)	% de III/II	% de AB/AII	[M+H] ⁺
Perfil a 286 nm, extractos saponificados y no saponificados (figura 5A):							
Apo-8'-fitoeno (1)	-	Blanco	9,49	274, <u>286</u> , 298	<1	NA	409,20
Isómero de apo-8'-fitoeno (2)	-	Blanco	10,35	274, <u>286</u> , 298	<1	NA	409,20

ES 2 617 445 T3

Menaquinona-7 (3)			20,65	240, <u>262</u> , 270, 330	NA	NA	649,29
Perfil a 450 nm, extracto no saponificado(figura 5B):							
Éster de cis-1-glicosil-apo-8'-licopeno (4)	0,71	AC	23,22	342, 426, <u>448</u> , 478	53	57,1	401,3, n.d.
Éster de cis-1-glicosil-apo-8'-licopeno (5)	0,71	AC	24,12	342, 426, <u>448</u> , 476	56,7	51	401,2, n.d.
1-(6-C11)-glicosil-apo-8'-licopeno (6)	0,71	AC	24,75	344, 426, <u>450</u> , 478	53	49,8	401,2, 749,2
1-(6-C11)-glicosil-apo-8'-licopeno (7)	0,71	AC	25,05	344, 424, <u>448</u> , 476	58,3	48	401,2, 749,2
1-(6-C9)-glicosil-apo-8'-licopeno (8)	0,71	AC	25,5	344, 434, <u>448</u> , 476	91,2	30	401,2, 721,1
1-(6-C9)-glicosil-apo-8'-licopeno (9)	0,71	AC	26,00	344, 426, <u>448</u> , 476	90,1	17,3	401,2, 721,2
1-(6-C11)-glicosil-apo-8'-licopeno (10)	0,71	AC	27,09	344, 428, <u>452</u> , 480	51,6	18,4	401,2, 581,1, 749,1
1-(6-C11)-glicosil-apo-8'-licopeno (11)	0,71	AC	27,55	424, <u>448</u> , 476	71,8	NA	401,1, 581,1, 749,1
1-(6-C9)-glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo (12)	0,91	N	28,39	440, <u>466</u> , 492	0,35	NA	445,1, 765,1
1-(6-C10)-glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo (13)	0,91	N	29,00	438, <u>466</u> , 492	<1	NA	445,1, 779,1
1-(6-C11)-glicosilapo-8'-licopenoato de metilo (14)	0,91	N	29,42	438, <u>466</u> , 492	<1	NA	445,1, 793,1
1-(6-C11)-glicosilapo-8'-licopenoato de metilo (15)	0,91	N	29,64	440, <u>466</u> , 492	8	NA	445,1, 793,1
1-(6-C8)-glicosil-apo-8'-licopeno (16)	0,94	A	30,02	430, <u>454</u> , 484	68,4	NA	401,2, 707,2
1-(6-C9)-glicosil-apo-8'-licopeno (17)	0,94	A	30,65	430, <u>454</u> , 484	39,4	NA	401,2, 721,2
1-(6-C10)-glicosil-apo-8'-licopeno (18)	0,94	A	31,22	428, <u>454</u> , 484	47,4	NA	401,2, 735,2
1-(6-C11)-glicosil-apo-8'-licopeno (19)	0,94	A	31,84	430, <u>454</u> , 484	48,3	NA	401,2, 749,2
1-(6-C12)-glicosil-apo-8'-licopeno (20)	0,94	A	32,49	430, <u>454</u> , 484	59	NA	401,2, 763,2
1-(6-C13)-glicosil-apo-8'-licopeno (21)	0,94	A	32,91	430, <u>454</u> , 484	64,3	NA	401,2, 777,2
1-(6-C13)-glicosil-apo-8'-licopeno (22)	0,94	A	33,27	430, <u>454</u> , 484	66	NA	401,2, 777,2
1-(6-C14)-glicosil-apo-8'-licopeno (23)	0,94	A	34,05	430, <u>454</u> , 484	64,7	NA	401,2, 791,2
1-(6-C15)-glicosil-apo-8'-licopeno (24)	0,94	A	35,03	430, <u>454</u> , 484	66	NA	401,2, 805,2

Tabla 2: Propiedades cromatográficas y espectrales de carotenoides detectados en extracto saponificado de HU36 analizado mediante CCF, HPLC-PDA y CL/EM. A: amarillo (glicosil-apolicopeno); AC: amarillo claro; N: carotenoide naranja (glicosil-apolicopenoato de metilo), NA: no aplicable; Nd: no detectado.

Carotenoide	Análisis por CCF		HPLC	Propiedades espectrales			
	R _f	Color	R _t	λ máx. (nm)	% de III/I	% de AB/AII	[M+H] ⁺
Perfil a 450 nm, extracto saponificado(figura 5C):							
acis-1-glicosil-apo-8'-licopeno (25)	0,21	Amarillo claro	16,57	342, 424, 446, 474	29,8	47,8	n.d.
cis-1-glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo (26)	0,21	Naranja claro	19,3	358, 460, 488	NA	38,7	n.d.
cis-1-glicosil-apo-8'-licopeno (27)	0,21	Amarillo claro	20,2	344, 422, 446, 476	62,5	49	581,12
cis-glicosil-apo-8'-licopeno (28)	0,21	Amarillo claro	21,02	342, 428, 448, 476	55,3	28,3	n.d.
cis-1-glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo (29)	0,34	Naranja	24,10	356, 436, 464, 492	<1	14,6	445,17, 624,90
1-glicosil-apo-8'-licopenoato de metilo (30)	0,34	Naranja	24,53	440, 466, 492	6,1	NA	625,06, 463,08, 445,09
cis-1-glicosil-apo-8'-licopeno (31)	0,38	Amarillo	25,87	342, 426, 450, 478	66,3	11,2	581,02
1-glicosil-apo-8'-licopeno (32)	0,38	Amarillo	27,08	428, 454, 484	64,2	NA	581,05, 419,06, 401,1

La comparación con las propiedades cromatográficas y espectrales de los diapocarotenoides hallados en *S. aureus* mostró que los carotenoides de *Bacillus* no eran derivados de diaponeurosporeno, pero era factible una similitud al glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopenonato de metilo de *P. maritimus*.

En conjunto, los datos sugieren que los carotenoides de *Bacillus* son derivados de apolicopeno. La polaridad aumentada tras el tratamiento de saponificación implica la presencia de ácidos grasos unidos por éster, no éter, supuestamente en restos de glicosilo. Además, la capacidad del producto de hidrólisis C467 de residir en la fracción ácida demuestra que porta un grupo ácido carboxílico adicional que está ausente en C455.

Tras CCF, se realizó un análisis por HPLC-PDA/EM. La figura 5 detalla los perfiles cromatográficos obtenidos con extractos no saponificados a 286 nm (A), 450 nm (B) y extractos saponificados a 450 nm (C). Las tablas 1 y 2 documentan los componentes cromatográficos, sus propiedades de espectros de masas y UV/Vis. En extractos no saponificados, se obtuvo un cromatograma complejo. A 286 nm, el pico predominante (1) a 9,8 min tenía un espectro de absorción típico de fitoeno (figura 5 D-1), y adyacente había un isómero geométrico aparente (pico 2). Estos compuestos no se cromatografiaron de manera conjunta con fitoeno C₄₀ auténtico pero presentaban propiedades idénticas a apofitoeno y sus isómeros aislados de *Planococcus* y *Hellobacteria*. La identificación de apofitoeno en los extractos bacterianos se confirmó mediante el espectro de masas de los picos 1 y 2 a 409,2 m/z (figura 6A), correspondientes a un [M+H]⁺ para el ión original de C₃₀H₄₀. Además de apofitoeno (1) y (2), se identificó menaquinona-7 (3) ([M+H]⁺ = 649,2).

El perfil cromatográfico a 450 nm de los extractos metanólicos no saponificados era complejo con más de 20 componentes (figura 5B). Estos picos podían categorizarse en varios grupos con espectros UV/Vis idénticos. El grupo II contenía los picos 4 a 11, que eluían entre 23 y 27,5 min. Estos componentes cromatográficos tenían todos un máximo en el espectro visible de 452 nm (figura 5D-II), con persistencia a 426 y 478 nm y picos cis pronunciados a 342 nm. La intensidad del pico cis se indicó mediante la razón de A_B/A_{II} proporcionada en la tabla 1. Parece que cuanto más alta es la razón y, por tanto, mayor es el grado de isomerización geométrica cis, más pronto es el tiempo de retención o más polar es el componente. Se halló una masa de 401,2 [M+H]⁺ correspondiente a un esqueleto de apolicopeno en todos estos componentes cromatográficos incluidos en el grupo II. También se observaron masas originales más altas, por ejemplo, de 749,2 [M+H]⁺ o 721,2 [M+H]⁺, pero la presencia de un azúcar de hexosa (por ejemplo, Δm/z de 162) y ácidos grasos (por ejemplo, Δm/z de 186 para ácido undecanoico) se reveló tras fragmentación en la fuente de los iones originales de masa más alta. Los restos de ácidos grasos hallados oscilaron entre los ácidos nonanoico, decanoico y undecanoico (tabla 1). Por tanto, los componentes del grupo II se denominaron glicósidos esterificados de apolicopeno que existen predominantemente en la configuración geométrica

cis.

Los picos cromatográficos 12 a 15, que eluían a de 28 a 29,5 min, representan el grupo III. Estos componentes cromatográficos tenían todos máximos de UV/Vis de 466 nm, se redujo la persistencia, con hombros presentes a 438 y 492 nm. Se determinó que la masa del carotenoide original hallado en estos picos era de 445,1 $[M+H]^+$ en vez de 401, lo que indica la presencia de un ácido carboxílico metilado. La aparición del grupo ácido o más precisamente, el grupo ceto, explica la persistencia reducida en los espectros y máximos de X aumentados. Las masas originales más altas de estos picos podían justificarse por la presencia de un azúcar de hexosa y derivados de ácido graso, puesto que se detectaron diferencias en masas de 162 (resto de hexosa) y 158-186 (ésteres $C_{9:0}$ - $C_{11:0}$) tras la fragmentación (tabla 1). Por ejemplo, el pico 15 se denominó 1-(6- $C_{11:0}$)-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopenoato de metilo (figura 2 B), derivado a partir de una masa original de 793,1 $[M+H]^+$, que porta un azúcar de hexosa ($\Delta m/z$ 162) esterificado a ácido undecanoico ($\Delta m/z$ 186) y unido a 445,1 $[M+H]^+$ deshidro-apo-8'-licopenoato. Alternativamente, este apocarotenoide original puede obtenerse a partir de 793,1 $[M+H]^+$ mediante la pérdida de un grupo hidroxilo como agua hasta 775,1, seguido por la retirada de azúcar de hexosa ($\Delta m/z$ 144 = hexosa-18) y ácidos grasos ($\Delta m/z$ 186 ($C_{11:0}$)) produciendo 463,1 a partir de lo cual la pérdida de otro grupo hidroxilo como agua dará como resultado 445,7 $[M+H]^+$ (figura 6 B).

Los picos (17 a 24) en el cromatograma (figura 5 B) se denominan grupo IV en el que no se produjo ninguna forma de ácido carboxílico metilado de apolicopeno, en su lugar, se halló el esqueleto de carotenoide apolicopeno con una masa de 401,2 $[M+H]^+$. Los espectros UV/Vis también fueron más persistentes y el máximo se redujo hasta 454 nm, lo cual era indicativo de que no había grupos ceto presentes. Usando el pico 19 como ejemplo, la molécula original presentaba un m/z de 749,2 $[M+H]^+$, lo que produjo el esqueleto de apocarotenoide de 401,2 m/z mediante la escisión de un componente glicosilo esterificado. Esta diferencia de masa de 348 m/z es equivalente a la suma de un azúcar (162 m/z) y ácido graso en este caso ácido undecanoico saturado (186 m/z) (figura 6D). Se realizó un análisis similar en los demás componentes amarillos cromatográficos detectados en el grupo IV, permitiendo la identificación de ocho ácidos grasos saturados esterificados diferentes que oscilan entre ácido octanoico ($C_{8:0}$) y pentadecanoico ($C_{15:0}$) (tabla 1). Varios componentes (por ejemplo, 21 y 22) mostraron propiedades espectrales idénticas pero diferentes tiempos de retención. Esto se debía probablemente a la presencia de isómeros geométricos o a que el ácido graso presente estaba ramificado (iso o anteiso) puesto que este tipo de ácidos grasos son típicos de los hallados en bacterias (24).

La saponificación redujo la complejidad del cromatograma (figura 5C). El agrupamiento cromatográfico de II, III y IV fue efectivamente idéntico al de la figura 5 B pero sin la presencia de restos de ácido graso en el apolicopeno y apolicopenoato glicosilados. Esto resultó claro a partir de los espectros de masas (figura 6C y E). Por ejemplo, los picos 30 y 32 presentaban $[M+H]^+$ de 625,1 (figura 6C) y $[M+H]^+$ 581,1 (figura 6E) respectivamente, pérdida de azúcar de hexosa ($\Delta m/z$ de 162) (que produce 445,1 $[M+H]^+$ para deshidro-apo-licopenoato de metilo y 401,2 $[M+H]^+$ para deshidro-apo-licopeno). Por tanto, resulta claro que los ácidos grasos están conectados al residuo de azúcar mediante enlaces éster, no éter.

2.3. Identificación de productos intermedios de ruta usando tratamiento con difenilamina (DPA).

Para identificar productos intermedios en la ruta de biosíntesis apocarotenoide de *Bacillus*, se usó el inhibidor conocido de desaturación de carotenoides, difenilamina (DPA). Se llevaron a cabo tratamientos sembrando placas de agar con DPA a lo largo de un intervalo de 0 a 100 μM . Se inocularon las placas con una alícuota (0,1 ml) de caldo de cultivo de *Bacillus* tomada en la fase de crecimiento exponencial medio. Tras 24 h de cultivo, se recogió la biomasa de las placas y se analizaron los carotenoides presentes en el material. La característica más drástica de los perfiles de HPLC (figura 7A) fue el aumento en apofitoeno (pico 1) y su isómero geométrico (pico 2). Además, el cromatograma registrado a 350 nm (figura 7B) indicó la presencia de picos cromatográficos únicos para el tratamiento con DPA. Se identificaron estos picos a partir de sus espectros UV/Vis y de masas características como apofitoflueno (picos 3-5) y apo- ζ -caroteno (pico 6). El apofitoflueno C_{30} tenía un espectro visible con dos picos persistentes a 350 y 365 nm, y un $[M+H]^+$ de 403 m/z , mientras que apo- ζ -caroteno con dos dobles enlaces conjugados adicionales tenía un $[M+H]^+$ de 405 m/z y un espectro UV/Vis con clara persistencia que daba lugar a dos picos a 400 y 425 nm. De manera interesante, la cantidad de carotenoides totales aumentó con la concentración de DPA más alta (figura 7C) aunque esto no fue estadísticamente significativo. Esto fue debido principalmente a la alta concentración de apofitoeno que se acumulaba hasta el 60% de los carotenoides totales, en comparación con el 1,2% en el tipo natural sin tratamiento con DPA ($p < 0,001$) (tabla 3).

Tabla 3: Cuantificación mediante HPLC-PDA de pigmentos coloreados glicosil-apolicopeno (amarillo) y glicosil-apolucopenoato de metilo (naranja) y el precursor incoloro apofitoeno tras tratamiento con difenilamina (DPA). PS: peso seco; A-N: amarillo/naranja; B: blanco cremoso.

	Biomasa (mg de PS)	Color	Contenido en carotenoides (µg/g de PS)			
			Total	Amarillo	Naranja	Apo-8'-fitoeno
DPA 0 µM	48,9 ± 6,5	A-N	186,8 ± 46,4	78,2 ± 27,8	106,3 ± 19,5	2,3 ± 0,9
DPA 10 µM	40,8 ± 3,8	A-N	195,6 ± 2,9	83,8 ± 1,4	107,1 ± 5,2	4,6 ± 1,8
DPA 100 µM	43,7 ± 5,5	B	241,7 ± 24,1	20,7 ± 16,3	58,8 ± 16,3	152,1 ± 10,7

Se redujeron las cantidades de los pigmentos amarillo (1-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopeno) y naranja (1-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopenoato de metilo) hasta un nivel de aproximadamente la mitad del hallado en los no tratados, por ejemplo, aproximadamente el 24% del pigmento naranja se acumuló a DPA 100 µM en comparación con el 57% en el no tratado ($p < 0,05$). El aumento en la aparición de carotenoides totales en presencia de DPA se ha notificado en otros organismos, en los que se ha atribuido a la eliminación de regulación mediante inhibición por retroalimentación del producto final o alternatively es viable que los pigmentos experimenten catabolismo adicional en estas especies de *Bacillus*.

En algunas bacterias gram+, se forma escualeno a través de la condensación de dos moléculas difosfato de farnesilo (FPP) y es el precursor para 4,4'-diapofitoeno (10). El escualeno no fue detectable en las especies de *Bacillus* amarillas/naranjas sometidas a prueba, usando o bien CL-EM o bien CG-EM. Tras el tratamiento con DPA la acumulación de precursores no indicó escualeno detectable. La mayor similitud entre los apocarotenoides de *Bacillus indicus* HU36 y otras bacterias es claramente *Planococcus*, que a través de caracterización por RMN se ha demostrado que forma 8'-apocarotenoides. Por tanto, parecería que los apocarotenoides de *Bacillus* en estas cepas amarillas/naranjas son similares a los determinados en *Planococcus* y de naturaleza 8'-apo. Para formar 8'-apocarotenoides, deben usarse difosfato de geranilgeranilo (C₂₀) y difosfato de geranilo (C₁₀) como precursores en vez de FPP.

2.3. Formación de diapocarotenoides durante el desarrollo celular de *Bacillus* spp.

La capacidad de *Bacillus indicus* HU36 y otras especies naranjas/amarillas para formar esporas durante el desarrollo se ha notificado previamente [25] junto con un cambio de color simultáneo de amarillo a naranja. Por tanto, se llevó a cabo una secuenciación del desarrollo para definir la formación de pigmentos durante la esporulación. El cultivo en medios DSM reveló la presencia de células vegetativas en el día 1 exclusivamente, hacia el día 2 se había producido el 55% de esporulación, produciéndose una meseta hasta el día 3 (tabla 4).

Tabla 4: Cuantificación mediante HPLC-PDA de glicosil-apolicopeno (amarillo), glicosil-apolicopenoato de metilo (naranja) 8'-apofitoeno y el carotenoide no identificado que eluía a 8 min (UNK-8 min) en células HU36 que se hicieron crecer en medios o bien DSM o bien TY. LA eficacia de esporulación (% de esporulación) es igual a (u.f.c. de HRS/u.f.c. de células veg.)x100. PS: peso seco; u.f.c.: unidad formadora de colonias; HRS: esporas resistentes al calor; n.d: no detectado.

Medios	Tiempo (día)	% de esporulación	Biomasa (mg de PS)	Carotenoide (µg/g de PS)				
				Total	UNK-8 min	Glic-apo-8'-licopeno	Glic-apo-8'-licopenoato de metilo	Apo-8'-fetoeno
DSM	1	0	20,5	111,03 ± 13,8	1,23 ± 0,06	43,6 ± 13,7	66,23 ± 0,06	n.d
	2	50,7 ± 8,97	19,2	175,5 ± 41,5	1,96 ± 0,42	39,6 ± 1,8	133,8 ± 39,3	n.d
	3	60,2 ± 10,5	17,5	88,8 ± 2,01	1,58 ± 0,43	10,7 ± 0,4	76,5 ± 2,04	n.d
TY	1	0	37,3	123,1 ± 34,1	3,9 ± 0,9	110,03 ± 45,9	nd	18,1 ± 0,00
	2	0,03 ± 0,01	120	130,2 ± 3,3	15,9 ± 6,3	86,5 ± 2,5	14,1 ± 0,4	13,71 ± 0,04
	3	0,03 ± 0,005	69	34,1 ± 7,8	24,3 ± 0,3	34,1 ± 7,8	11,5 ± 2,8	12,2 ± 3,3

El contenido del pigmento amarillo 1-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopeno (compuesto 19) fue comparativamente constante a lo largo del desarrollo. Sin embargo, el pigmento naranja 1-glicosil-3-4-deshidro-apo-8'-licopenoato de metilo (compuesto 15) aumentó significativamente ($p < 0,05$) en aproximadamente el 43% con el comienzo de la esporulación (figura 8; tabla 4). En medios TY, no se produjo esporulación y, de manera interesante, el pigmento naranja 1-glicosil-3,4-deshidro-apo-8'-licopenoato de metilo (compuesto 15) no se acumuló (figura 9; tabla 4). Estos datos sugieren que la formación de apocarotenoides en estos *Bacilli* pigmentados está, en parte, en regulación de desarrollo con la formación del diapocarotenoide 1-glicosil-3,4-deshidroapo-8'-licopenoato de metilo relacionado estrictamente por este acontecimiento de desarrollo.

3. Conclusiones

Se ha usado una combinación de técnicas bioquímicas en el presente estudio para demostrar la presencia de derivados de apocarotenoides C_{30} en determinados *Bacillus* spp. pigmentados. El pigmento amarillo éster de 1-glicosil-3,4-deshidro-apolicopeno predomina en células vegetativas, mientras que la formación del pigmento naranja éster de 1-glicosil-3,4-deshidro-8'-apolicopenato de metilo se potencia durante la esporulación. Por tanto, parece que se produce regulación de desarrollo de la ruta de biosíntesis en estos *Bacillus* spp. Apofitoeno fue el primer carotenoide C_{30} auténtico detectado en estos *Bacillus* spp.

En resumen, se han caracterizado carotenoides útiles presentes en *Bacillus* spp. con pigmento amarillo/naranja tal como *Bacillus indicus* HU36 (NCIMB 41361).

5. Bibliografía

[1] G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander en Carotenoids, Birkhauser Verlag, Basel 2004.

[2] N. Barber, BJU Int 91 (2003) 307-9.

[3] E. Giovannucci, J Natl Cancer Inst 91 (1999) 317-31.

[4] E. Giovannucci, A. Ascherio, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, G.A. Colditz y W.C. Willett, J Natl Cancer Inst 87 (1995) 1767-76.

[5] J.A. Olson y N. Hayaishi, Proc Natl Acad Sci U S A 54 (1965) 1364-70.

[6] D.M. Snodderly, Am J Clin Nutr 62 (1995) 1448S-1461S.

[7] P.M. Bramley en (Johnson, I. and Williamson, G., eds.) Phytochemical functional foods, CRC Press, Boca Raton 2003, págs. 253-279.

[8] H. Kleinig y R. Schmitt, Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 37 (1982) 758-760.

[9] H. Kleinig, R. Schmitt, W. Meister, G. Englert y H. Thommen, Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences 34 (1979) 181-185.

[10] L. Tao, A. Schenzle, J.M. Odom y Q. Cheng, Appl Environ Microbiol 71 (2005) 3294-301.

[11] B.H. Davies y R.F. Taylor, Canadian Journal of Biochemistry 60 (1982) 684-692.

[12] S. Takaichi, K. Inoue, M. Akaike, M. Kobayashi, H. Oh-oka y M.T. Madigan, Arch Microbiol 168 (1997) 277-81.

[13] S. Takaichi, H. Oh-Oka, T. Maoka, D.N. Jung y M.T. Madigan, Arch Microbiol 179 (2003) 95-100.

[14] J.H. Marshall y G.J. Wilmoth, Journal of Bacteriology 147 (1981) 914-919.

[15] J.H. Marshall y G.J. Wilmoth, Journal of Bacteriology 147 (1981) 900-913.

[16] A. Pelz, K.P. Wieland, K. Putzbach, P. Hentschel, K. Albert y F. Gotz, Journal of Biological Chemistry 280 (2005) 32493-32498.

[17] H.A. Hong, J.M. Huang, R. Khaneja, L.V. Hiep, M.C. Urdaci y S.M. Cutting, J Appl Microbiol 105 (2008) 510-20.

[18] R. Khaneja, L. Perez-Fons, S. Fakhry, L. Baccigalupi, S. Steiger, E. To, G. Sandmann, T.C. Dong, E. Ricca, P.D. Fraser y S.M. Cutting, J Appl Microbiol (2009).

[19] W.L. Nicholson y P. Setlow, SPORULATION GERMINATION AND OUTGROWTH 1990.

[20] R.F. Taylor y B.H. Davies, Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology 61 (1983) 892-905.

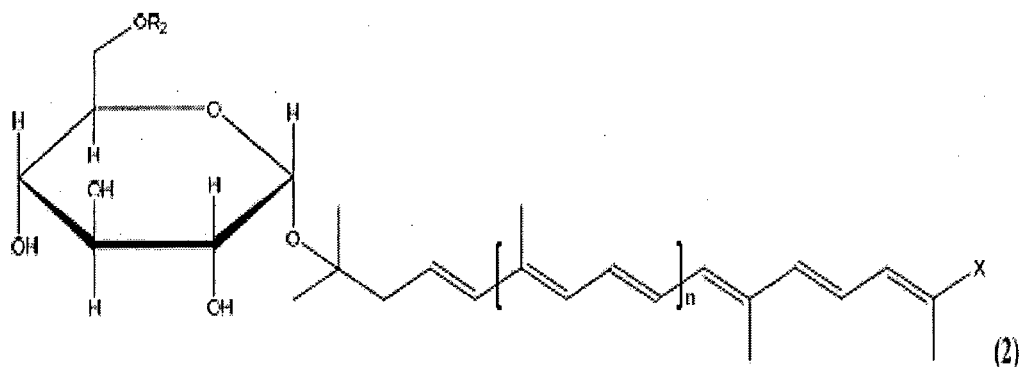
[21] P.D. Fraser, M.E. Pinto, D.E. Holloway y P.M. Bramley, Plant Journal 24 (2000) 551-8.

[22] A.J. Aasen, G.W. Francis y S. Liaaen-Jensen, Acta Chem Scand 23 (1969) 2605-2615.

- [23] G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander, CAROTENOIDS HANDBOOK, Birkhauser Verlag Ag 2004.
- [24] T. Kaneda, J Bacteriol 93 (1967) 894-903.
- [25] L.H. Duc, P.D. Fraser, N.K.M. Tam y S.M. Cutting, Fems Microbiology Letters 255 (2006) 215-224.

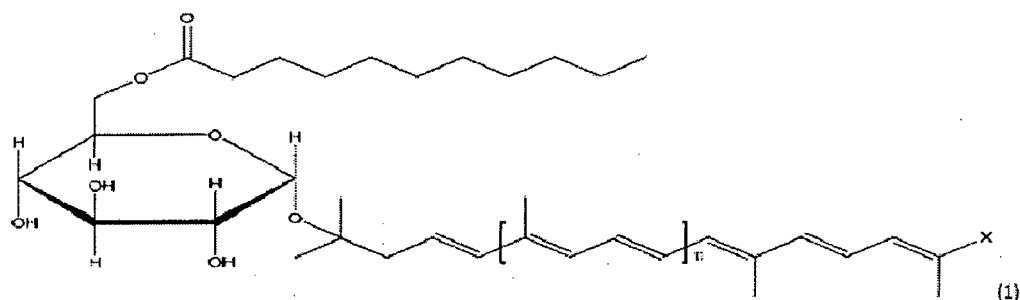
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de carotenoide de fórmula (2):



- 5 en la que X es metilo o COOR en el que R se selecciona independientemente de metilo, etilo, metiletilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y n se selecciona de cero, 1, 2 y 3; y R₂ se selecciona independientemente de ácido octadecanoico, ácido nonadecanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tetradecanoico y ácido pentadecanoico.

2. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula (1):



- 10 en la que X se selecciona independientemente de metilo y COOR en el que R se selecciona independientemente de metilo, etilo, metiletilo, prop-1-ilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y n se selecciona de cero 1, 2 y 3.

3. Compuesto según la reivindicación 2 en el que X es metilo y n es 3.

4. Compuesto según la reivindicación 2 en el que X es COOR y R se selecciona independientemente de metilo, etilo, metiletilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo; y n es 3.

- 15 5. Compuesto según la reivindicación 4 en el que R es metilo.

6. Uso de al menos un compuesto aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como agente colorante para un producto alimenticio.

7. Uso según la reivindicación 6 en el que el producto alimenticio es una bebida probiótica o un producto alimenticio no líquido.

- 20 8. Uso según la reivindicación 6 en el que el producto alimenticio se selecciona de barras de tentempié, cereales, bollos, magdalenas, galletas, tartas, pasteles, verduras procesadas, caramelos (golosinas), salsas procesadas, productos para untar y para extender, productos de confitería, formulaciones probióticas incluyendo yogures, bebidas, líquidos a base de aceites vegetales, líquidos a base de grasas animales, dulces congelados y quesos.

- 25 9. Uso según la reivindicación 6 en el que el producto alimenticio se selecciona de yogures, quesos, refrescos tales como zumos de frutas diluidos con agua (por ejemplo, naranja y limón), bebidas nutritivas y té.

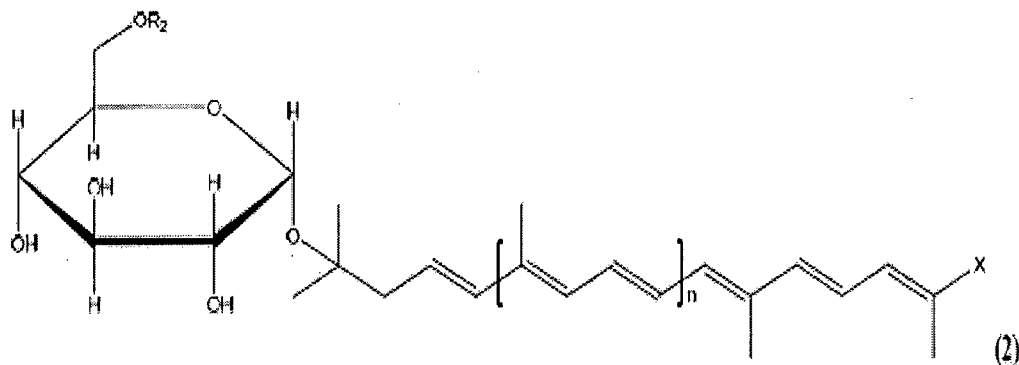
10. Uso de esporas de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un producto alimenticio como agente colorante.

11. Uso de esporas de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un producto alimenticio como antioxidante.

- 30 12. Uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 en el que el producto alimenticio es un producto alimenticio procesado.

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en el que el organismo de *Bacillus* es HU 36 (NCIMB 41361).

14. Uso de un compuesto de fórmula (2):



5 como agente colorante para un producto alimenticio en el que R_2 es H ; y X , $COOR$ y n son tal como se definieron según la reivindicación 1.

15. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una composición para su uso sobre la piel humana como cosmético o para su uso en un producto alimenticio como antioxidante, o una composición para su uso como cosmético sobre la piel humana, o un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como agente colorante en un producto alimenticio o un extracto de una especie de *Bacillus* que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como antioxidante en un producto alimenticio.

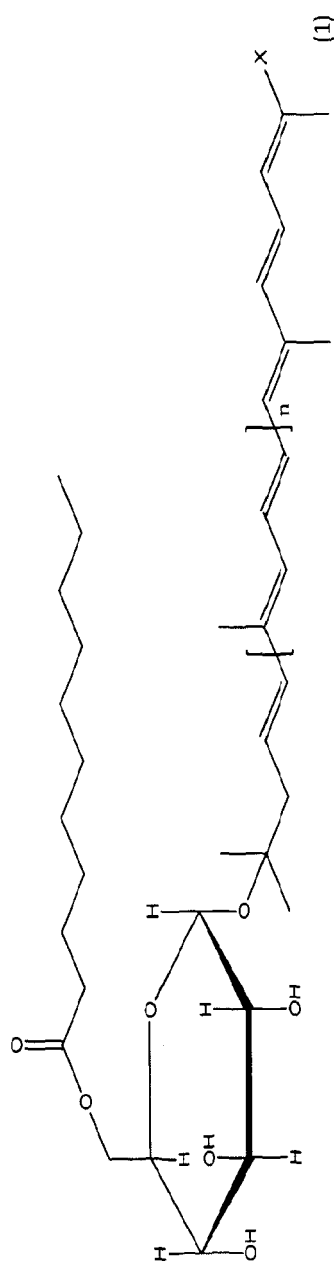


Fig 1

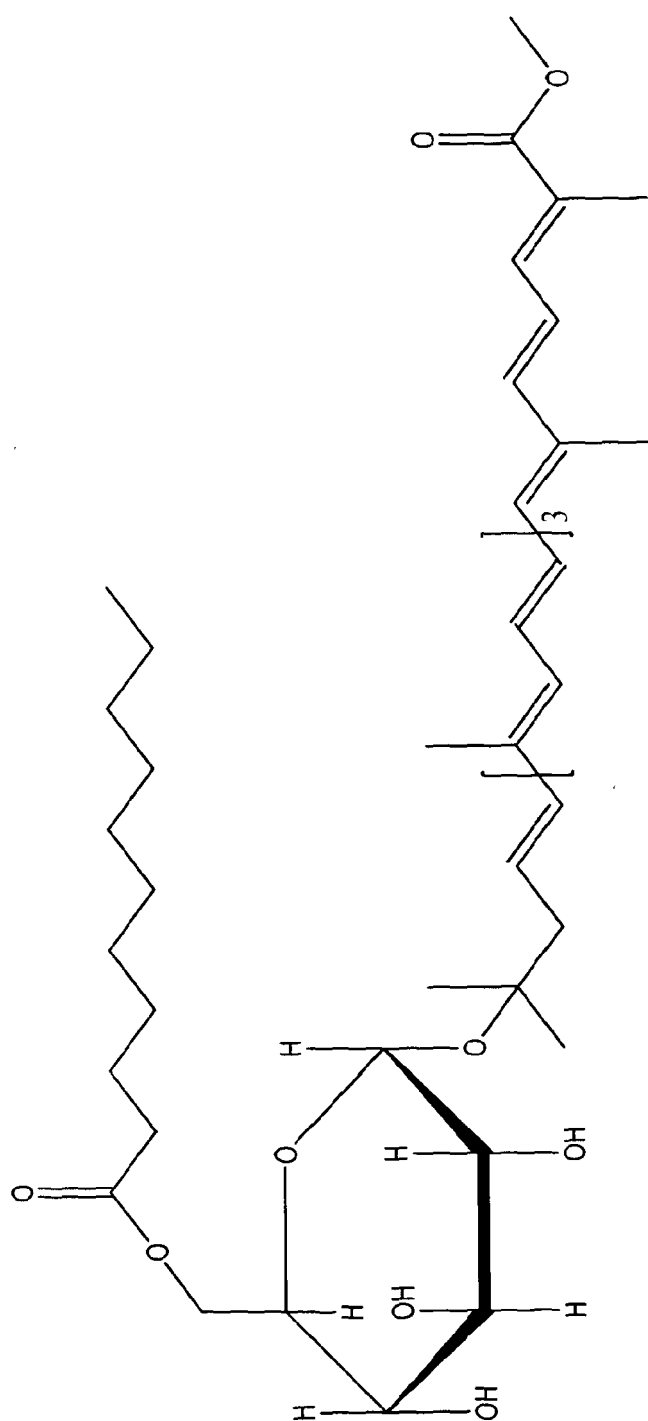


Fig 2

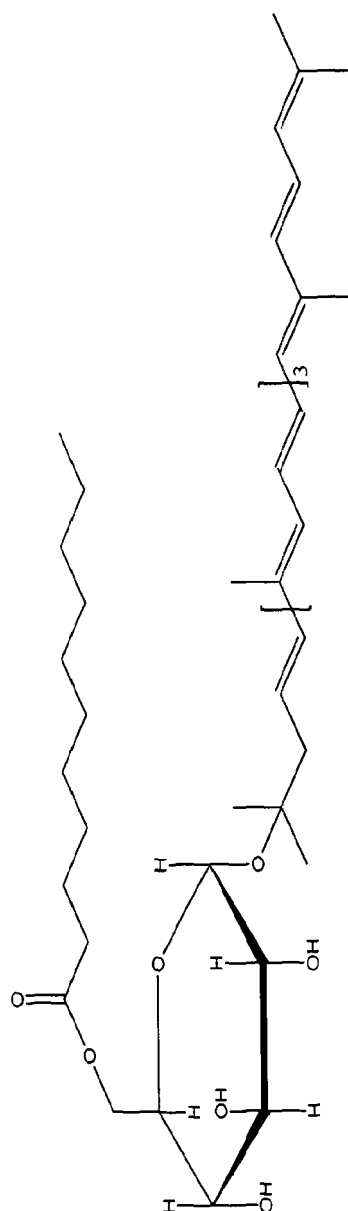


Fig 3

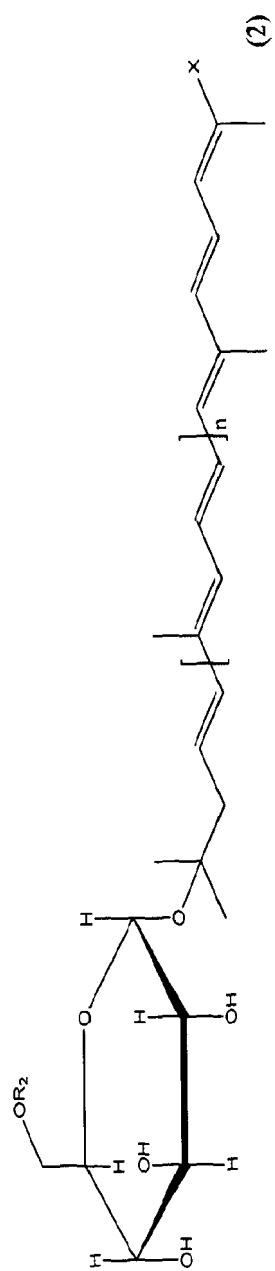


Fig 4

Fig.5a.

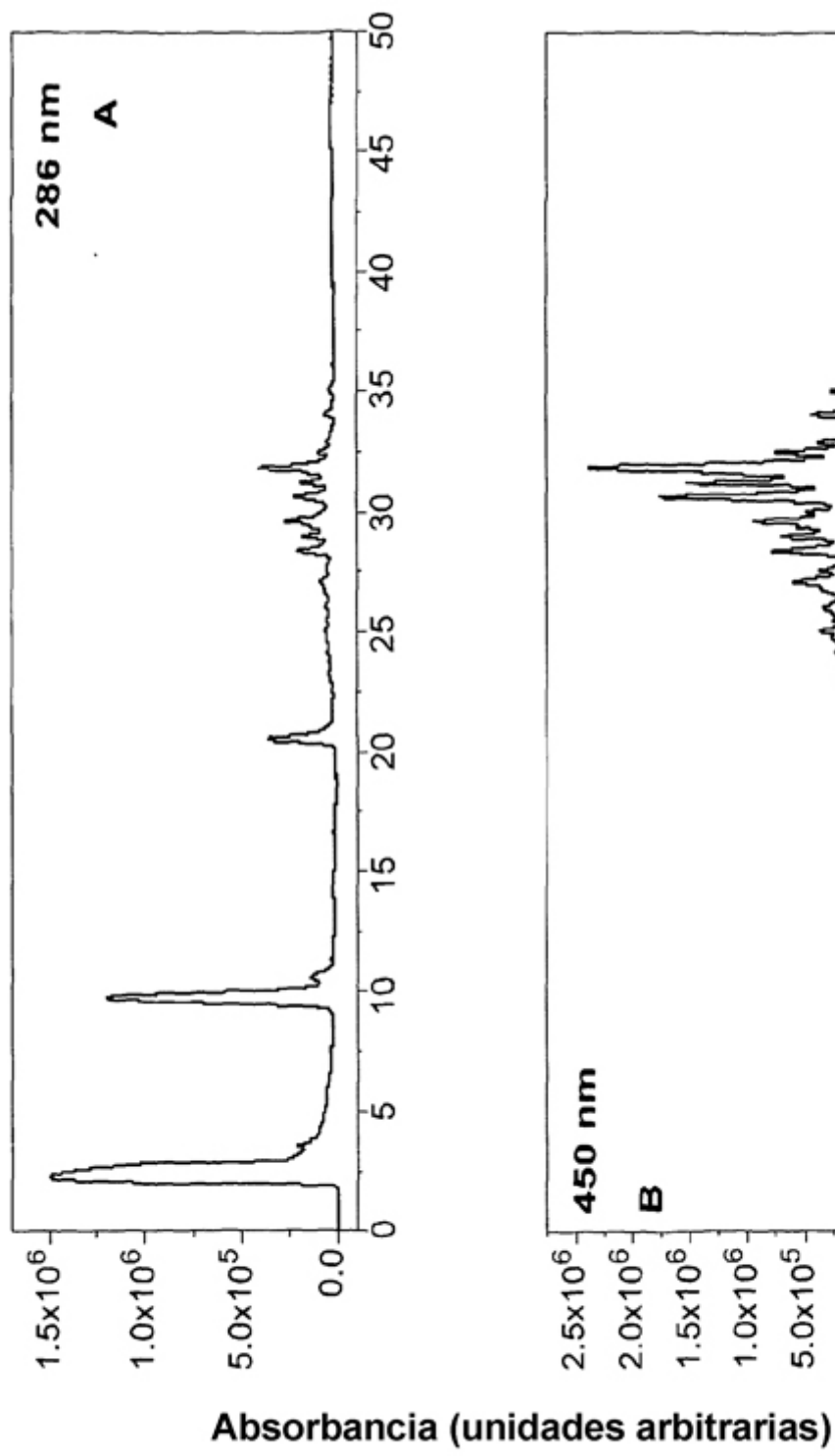


Fig.5b.

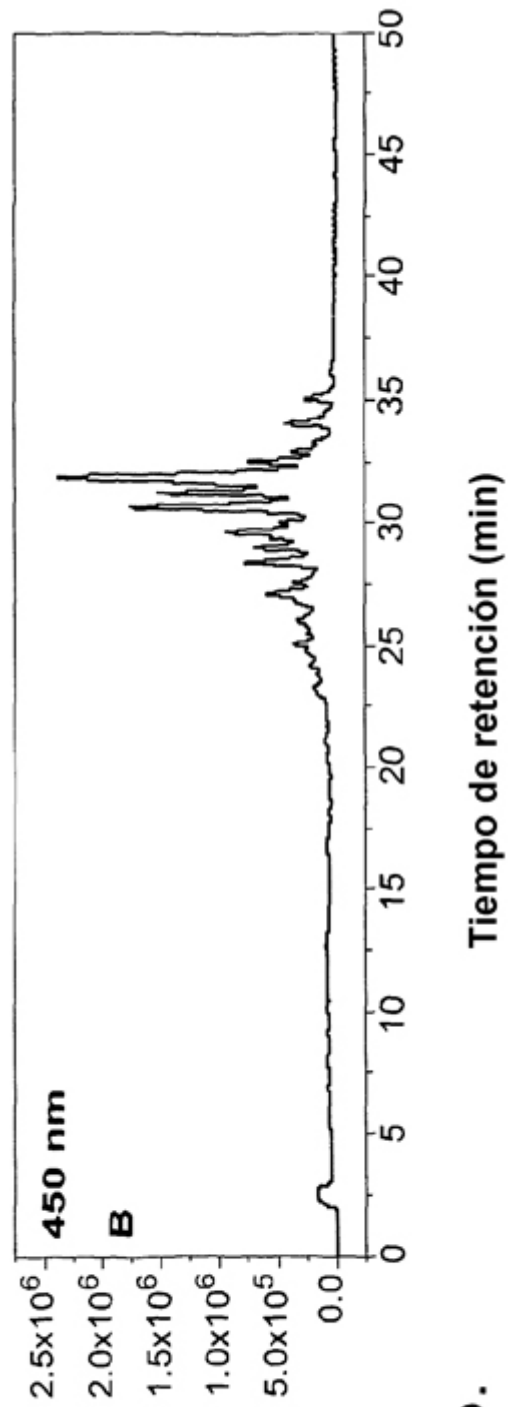


Fig.5c.

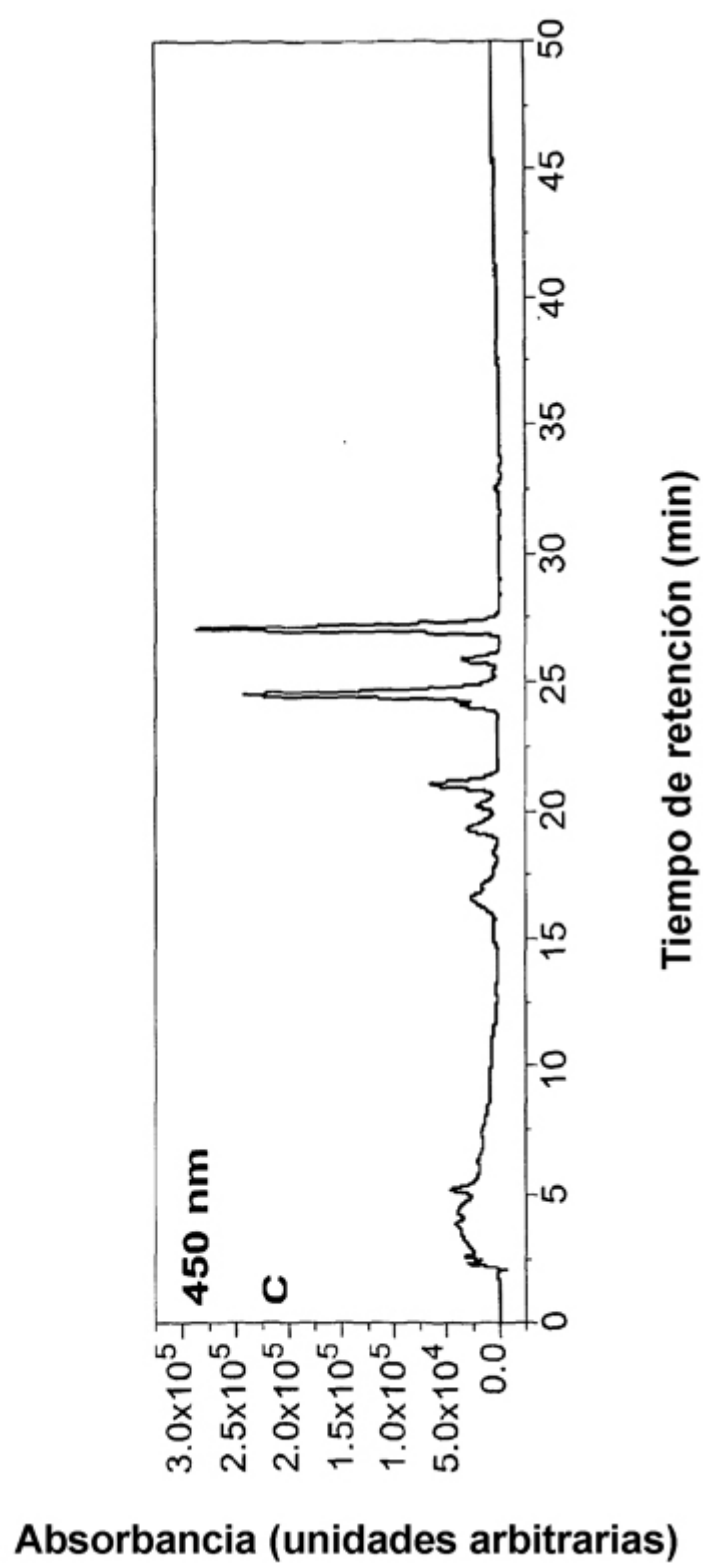


Fig.5d.

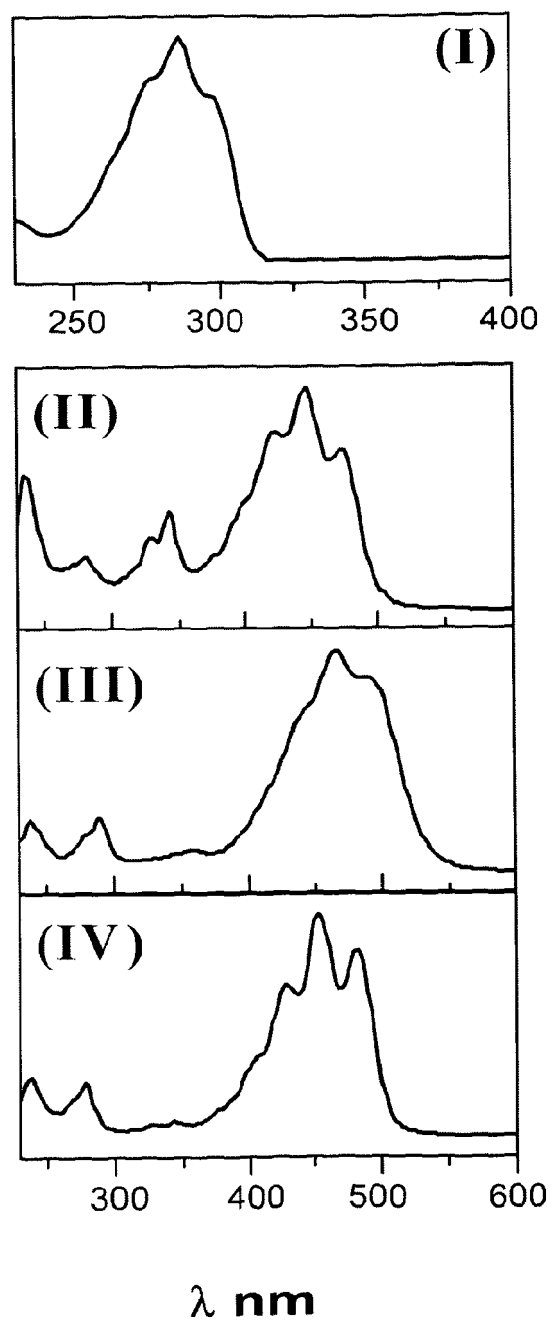


Fig. 6a.

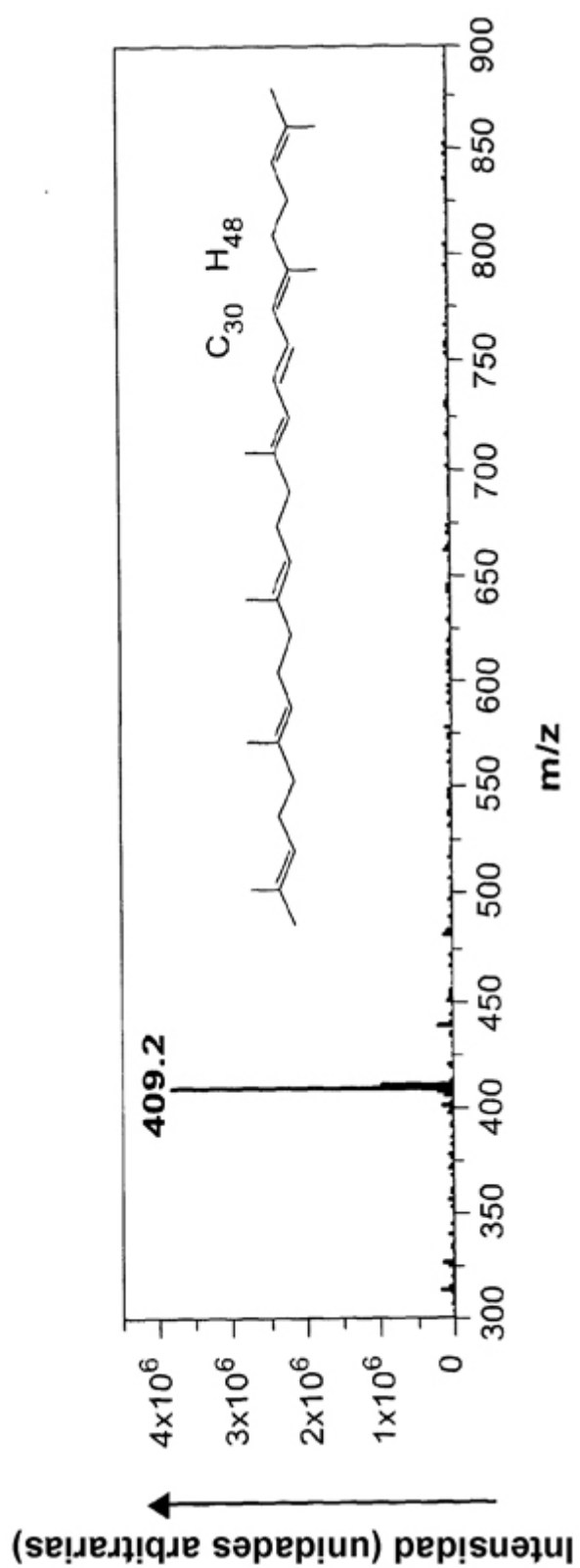
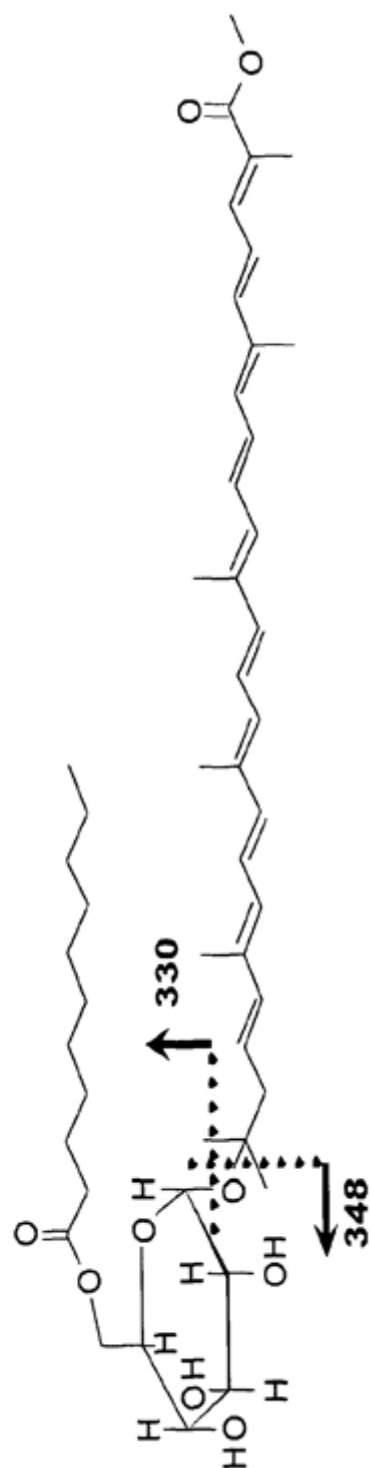
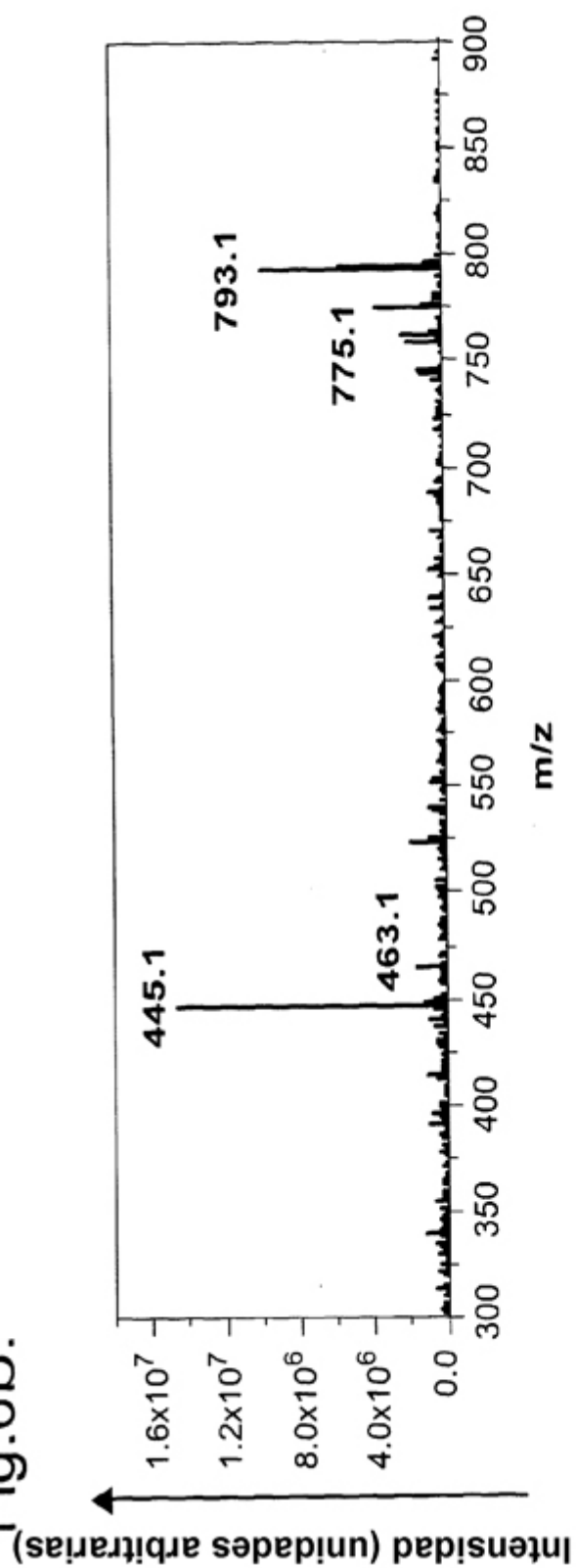


Fig.6b.



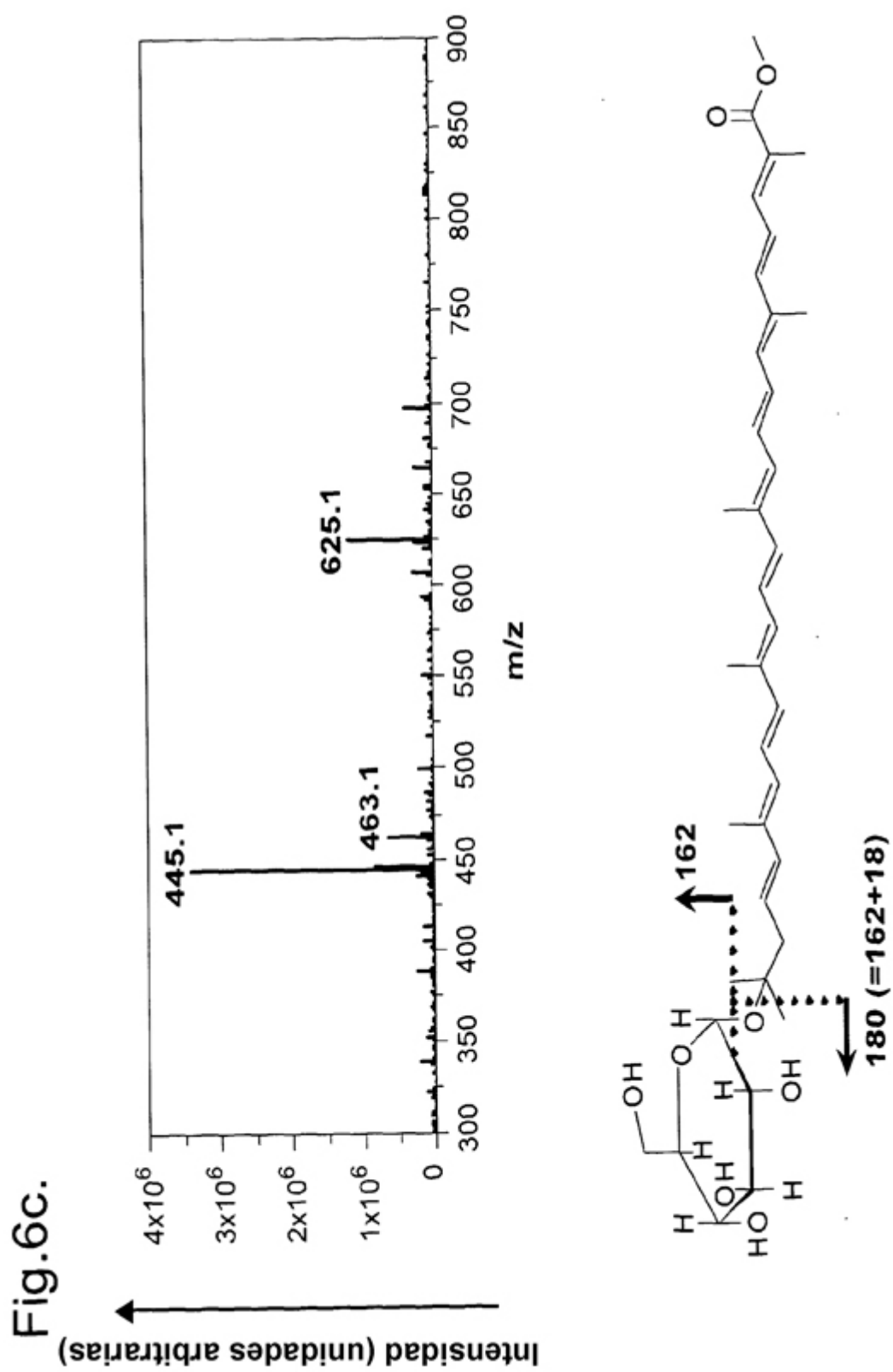


Fig. 6d.

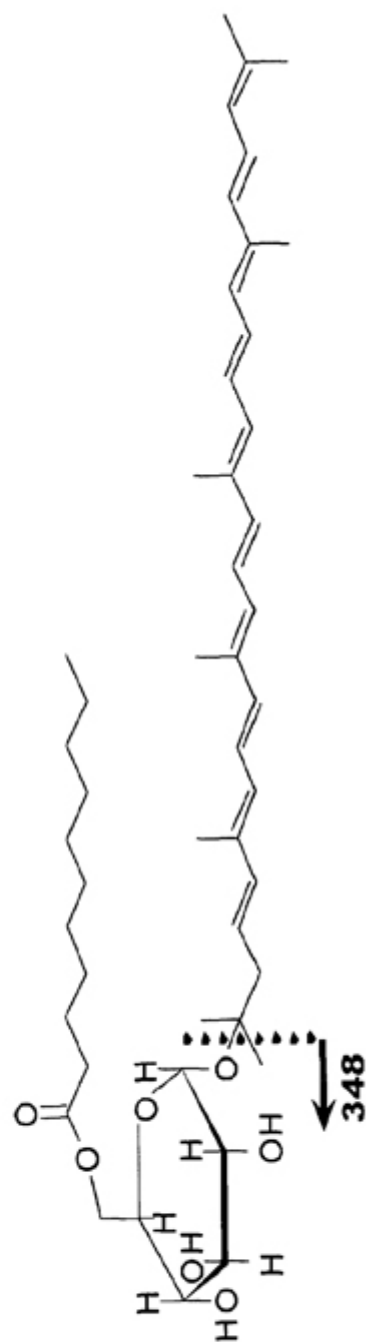
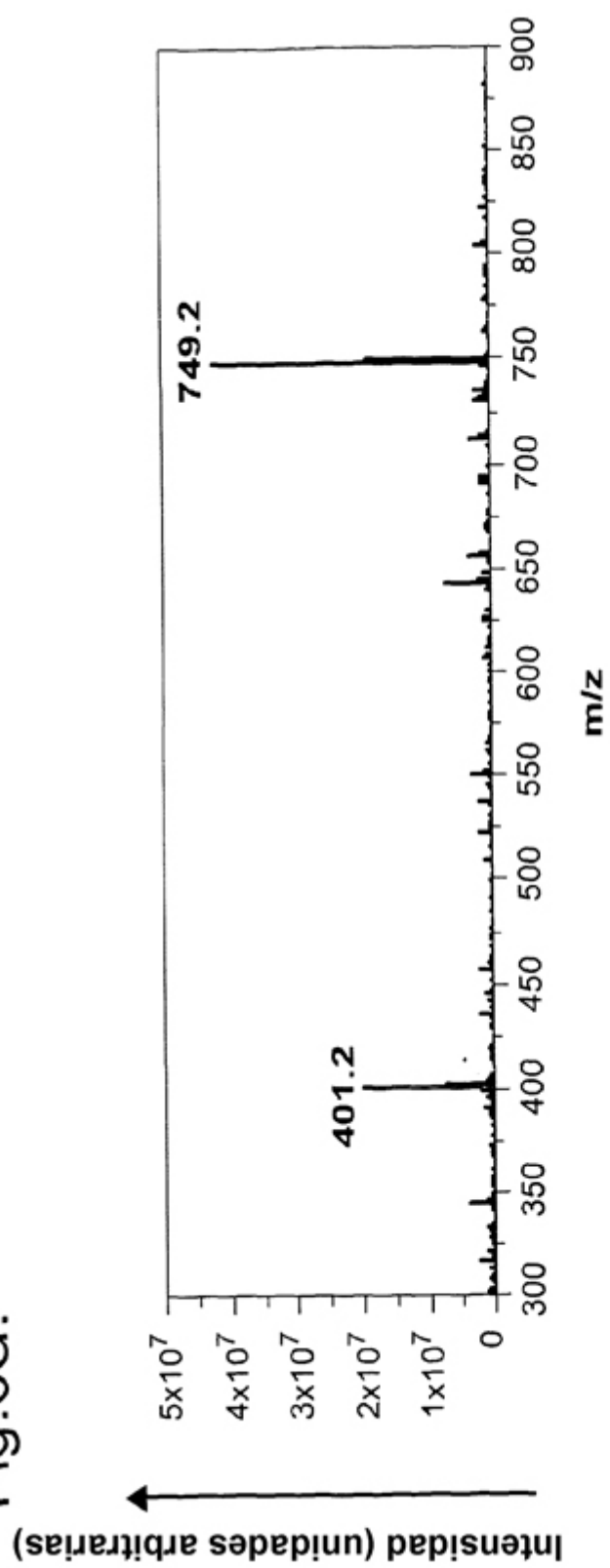


Fig.6e.

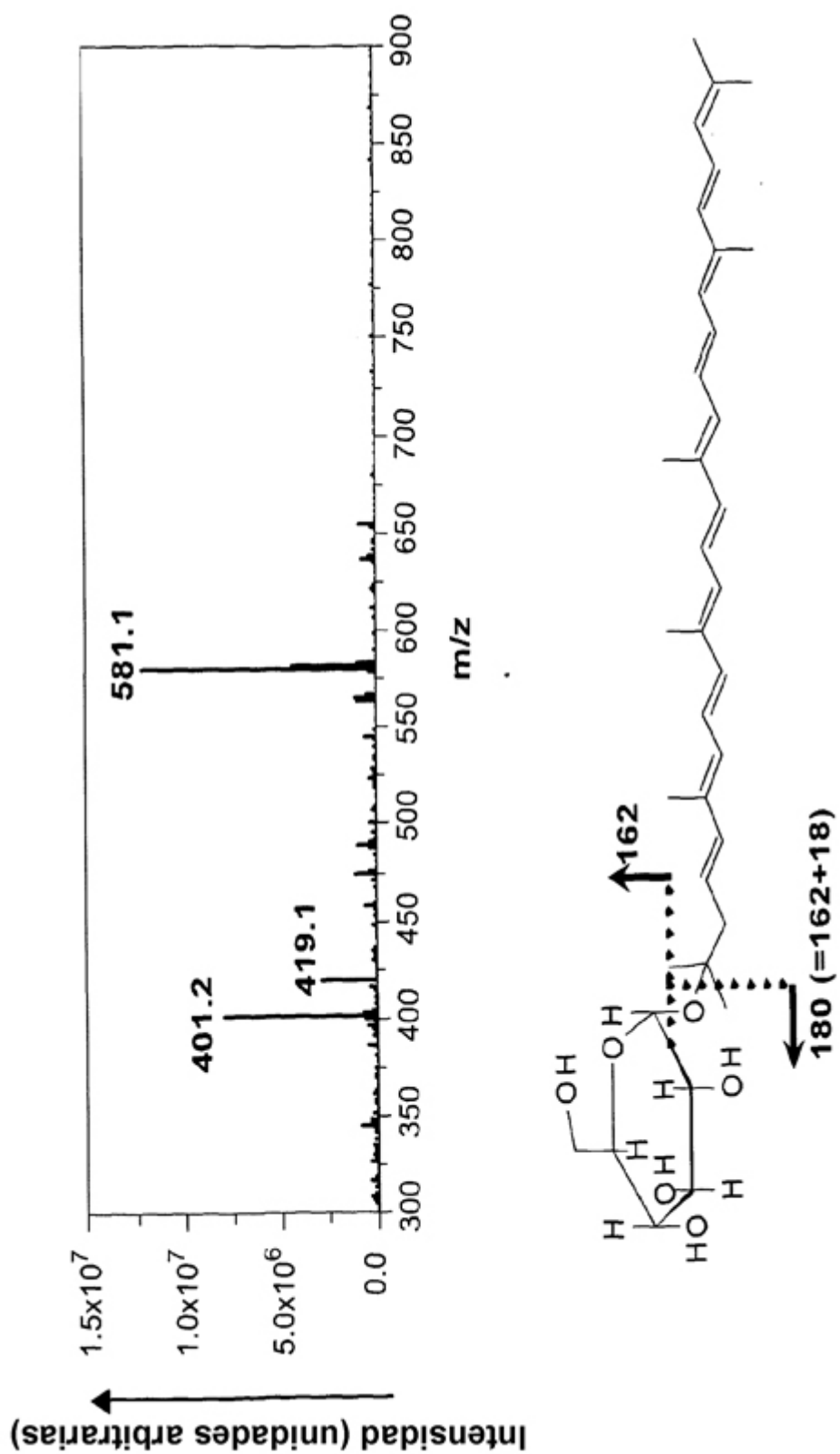


Fig.7a.

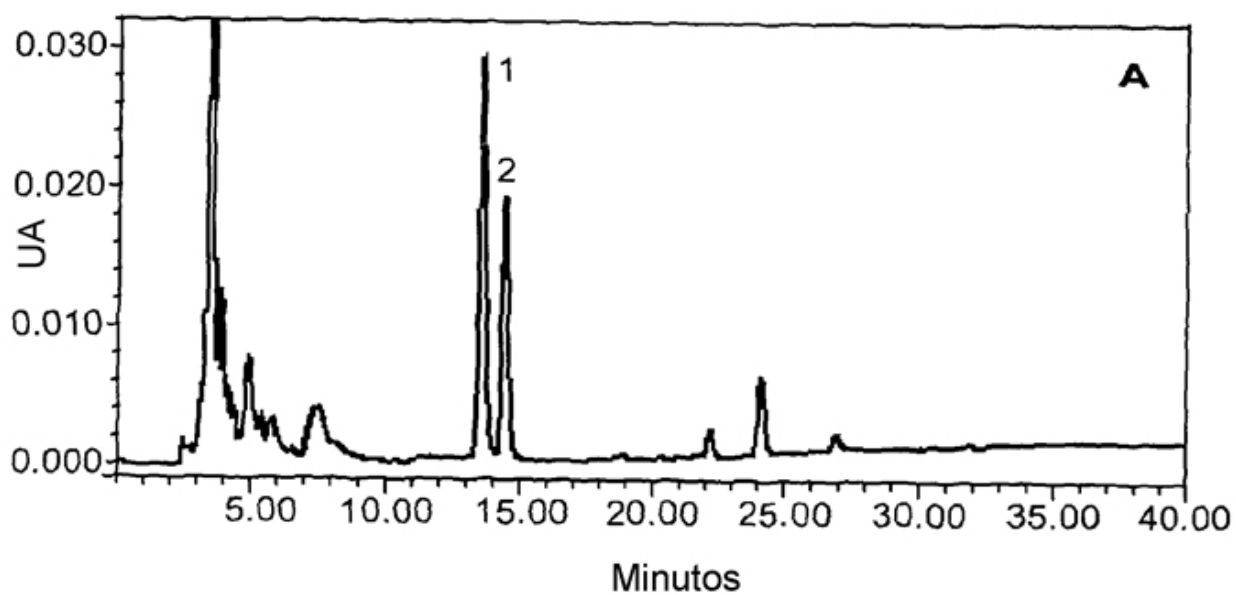


Fig.7b.

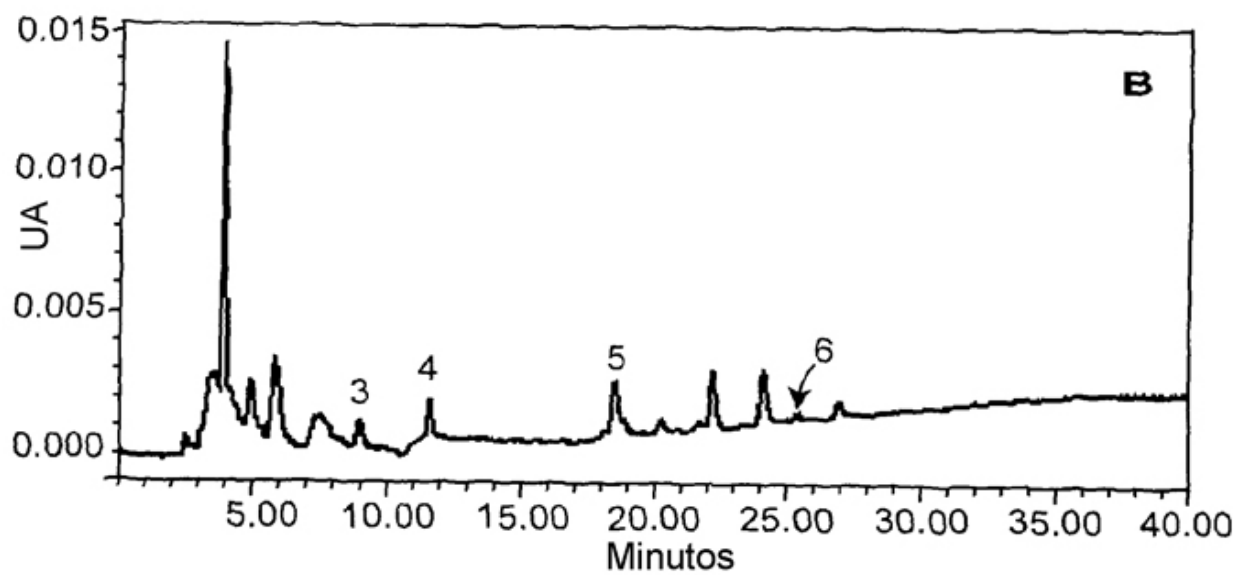


Fig.7c.

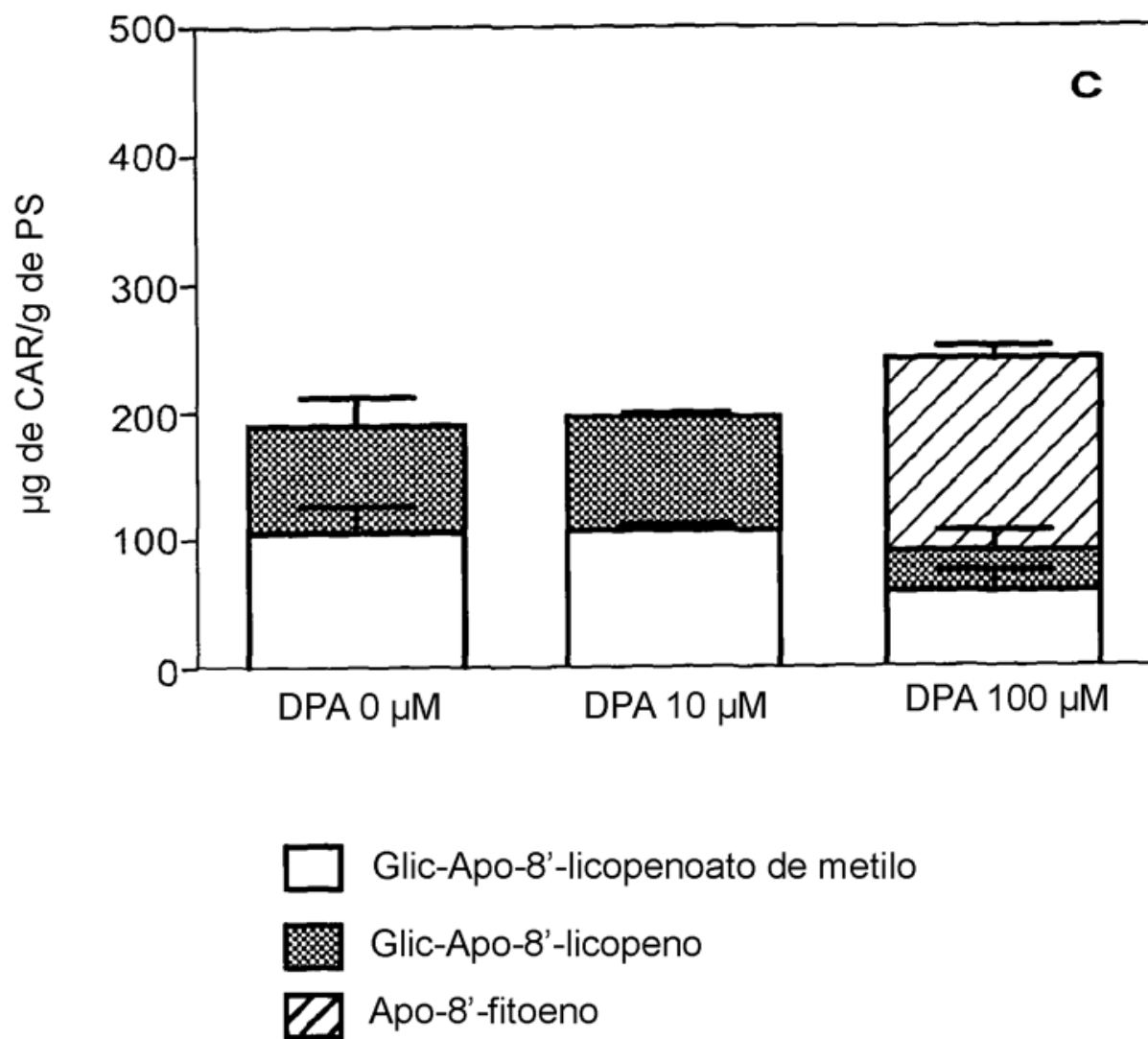


Fig. 8a.

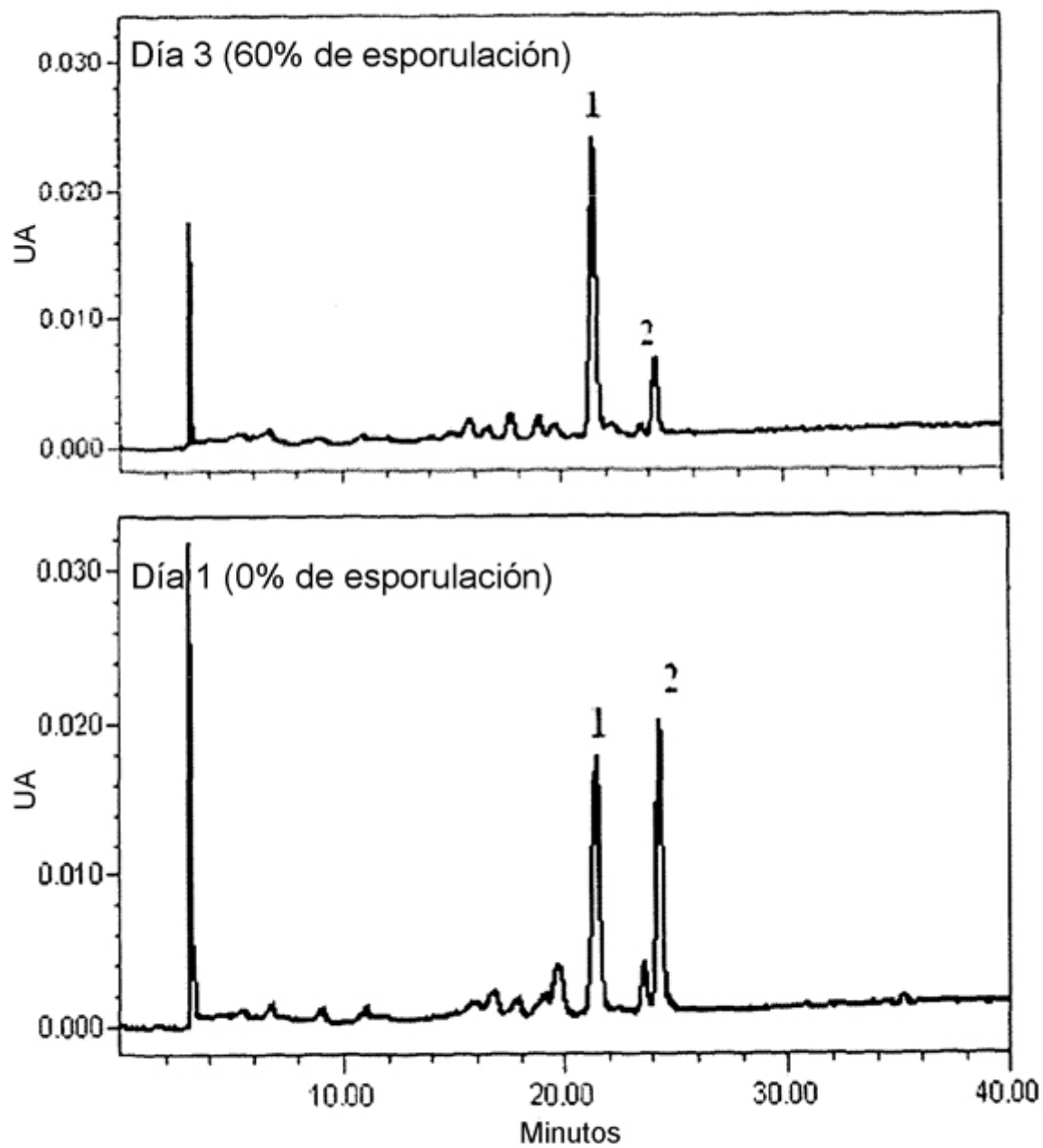


Fig. 8b.

Fig. 8c.

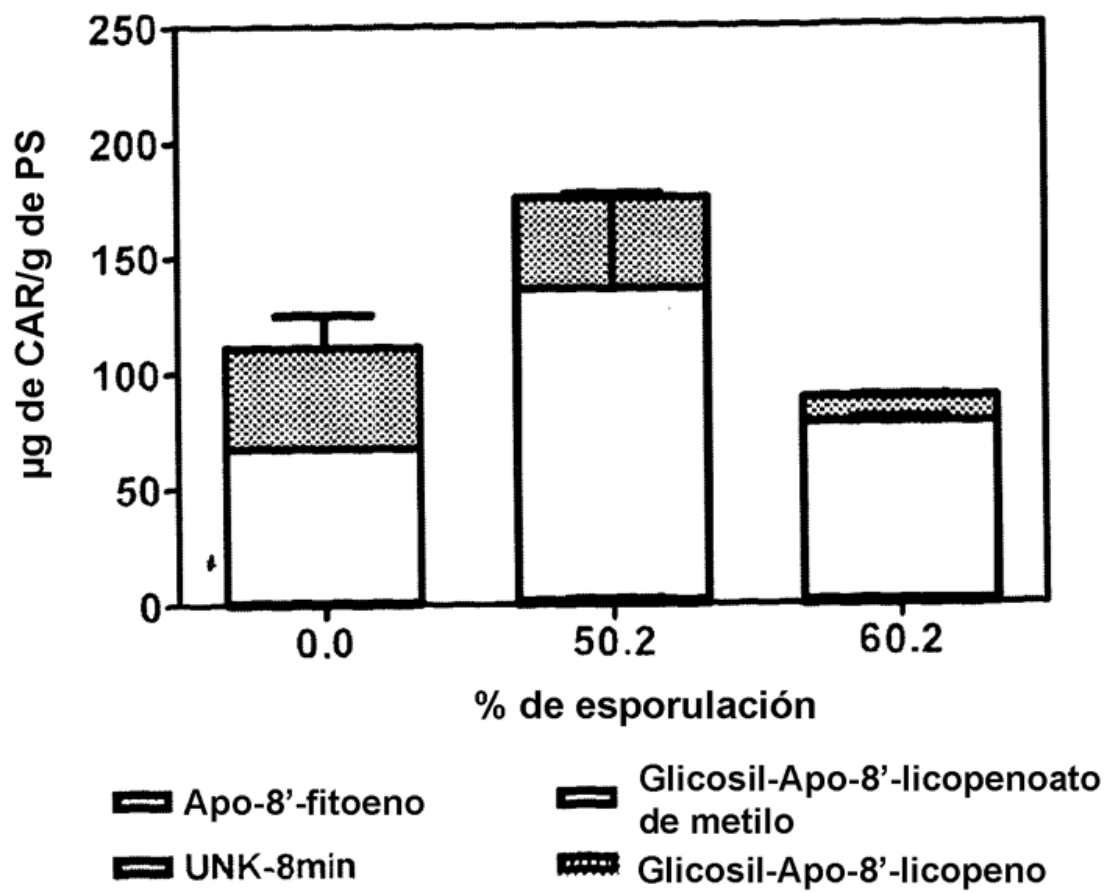


Fig. 9a.

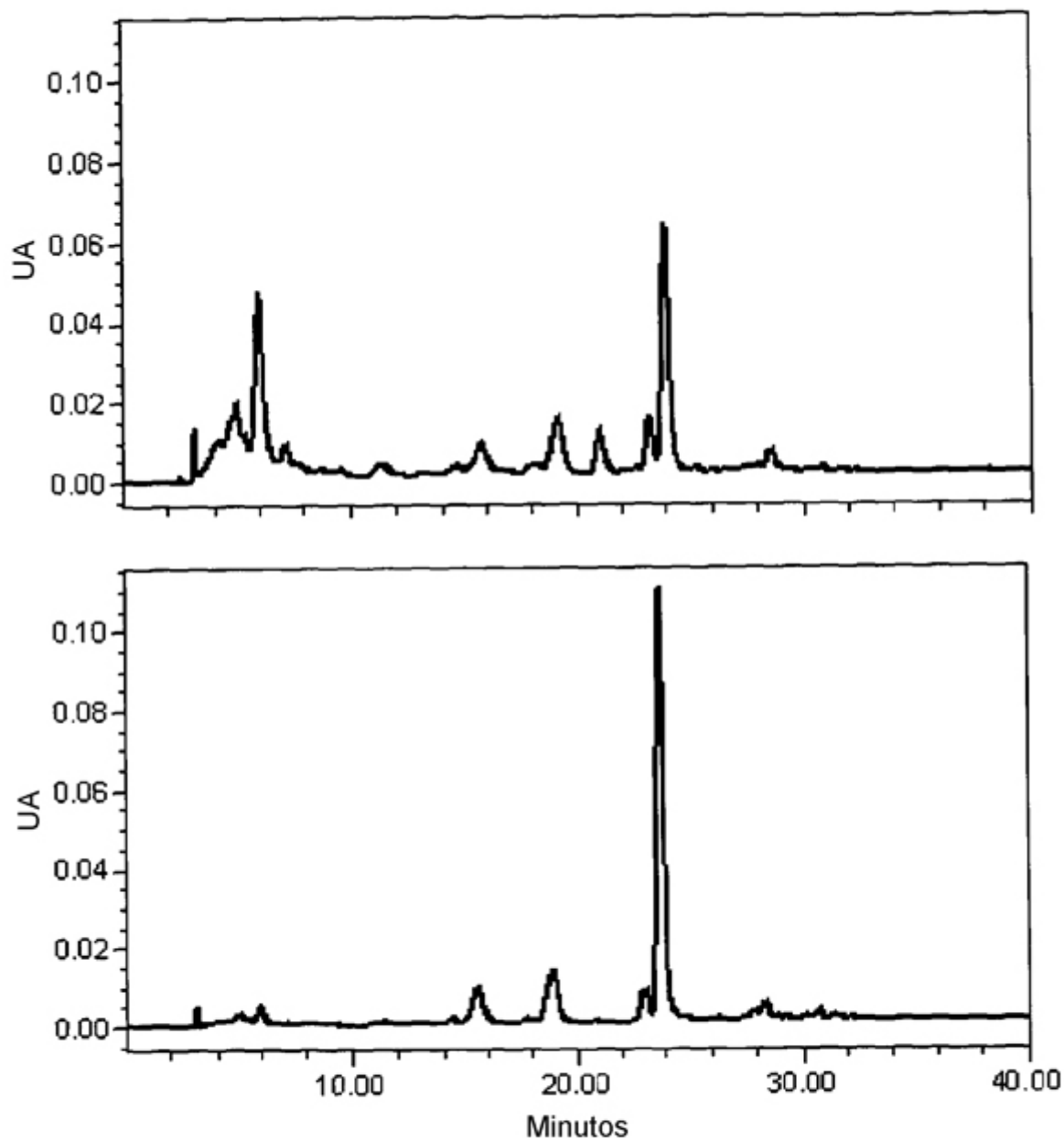


Fig. 9b.

Fig. 9c.

