



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR *BACILLUS LICHENIFORMIS* RT4M10

Dichiara, Elisa Lourdes

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Biología Agrícola de
Mendoza. Universidad Nacional de Cuyo. 5505 Chacras de Coria.
Mendoza

<http://www.mendoza-conicet.gob.ar/portal/ibam/contacto>

Facultad de Ciencias Agrarias – 05 de Agosto 2019



FCA
FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS

I B A M

CONICET
U. N. C U Y O

PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR *BACILLUS LICHENIFORMIS* RT4M10

Autor: Dichiara, Elisa Lourdes

Francisco Laur 2080 Barrio Antonietti. CP: 5517

elilu_04_07@hotmail.com
elisalourdesdichiara@gmail.com

Tel cel.: (0261) 152576848
Tel. fijo: (0261) 4990704

Director: Cohen, Ana Carmen
Codirector: Pérez Rodriguez, María Micaela

Miembros del Comité:

Presidente: Prof. Brom. Elizabeth SFREDDO
Vocales: Lic. Carolina Torrez Palazzolo
Dra. Alejandra CAMARGO

RESUMEN

La siguiente Tesis tiene como objetivo la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento celular, identificación y cuantificación de los pigmentos carotenoides producidos por la bacteria *Bacillus licheniformis* Rt4M10, aislada de la rizósfera de plantas de vid. También se focaliza en evaluar el poder antioxidante *in vivo* de los carotenoides en las bacterias en presencia de un oxidante, y el poder antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos. Para ello se trabajó en presencia de difenilamina (DPA) 1 mM, un inhibidor de la síntesis de pigmentos carotenoides, para reducir la síntesis de estos compuestos y evaluar el rol biológico.

La determinación de las condiciones óptimas de crecimiento se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza y la identificación de los carotenoides se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía de la Estación Experimental Agropecuaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, a cargo de la Dra. Viviana Jofré.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio LB en presencia (+DPA) y ausencia de DPA (control). La identificación y cuantificación de los carotenoides se realizó cada 24 h hasta las 168 horas de iniciado el cultivo. El poder antioxidante *in vivo* se evaluó con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno a 1 y 3 horas de agregado del mismo. El poder antioxidante *in vitro*, de los extractos obtenidos en presencia y ausencia de DPA, se midió mediante fluorimetría, obteniendo el valor de ORAC hidrofílico y lipofílico.

La morfología de las colonias en medio sólido de Rt4M10 presentó colonias redondas, definidas y de color naranja intenso. La cinética de crecimiento en la fase exponencial se extendió hasta las 48 horas. La fase estacionaria duró 72 horas y la fase de declive comenzó a partir de las 168 horas. El tratamiento con DPA disminuyó el crecimiento de la bacteria y la mayor producción de carotenoides se dio a las 96 horas. En la identificación de los carotenoides por HPLC, se encontraron 18 carotenoides. Éstos en su mayoría pertenecían al grupo de los C50 y se desarrollaron durante la fase estacionaria de crecimiento. El cultivo de las bacterias en presencia de DPA disminuyó la producción de carotenoides, y se demostró una menor actividad antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* que en el tratamiento control.

La caracterización de la producción de los carotenoides por la cepa con actividad biológica Rt4M10, aporta las bases para futuras líneas de investigación. La síntesis biológica de pigmentos se considera sustentable y utiliza técnicas amigables con el medio ambiente, lo que la convierte en una alternativa idónea para la producción biotecnológica de carotenoides.

PALABRAS CLAVES

Carotenoides, *Bacillus*, actividad antioxidante, HPLC.

AGRADECIMIENTOS

Con este proyecto finalizo una etapa de mi vida pero también es el comienzo de otra, por eso quiero agradecer primero a Dios por ser el pilar fundamental en mi vida, que me ha dado todo lo que tengo, una familia que me sostiene me cuida y me enseña los valores en la vida, me forma en el respeto la responsabilidad la solidaridad, y en tantos otros valores que me ayudan a crecer como persona, estar hoy acá, poder realizar proyectos y objetivos personales, es gracias a ellos a su esfuerzo y dedicación para conmigo.

Quiero agradecer profundamente el don de la amistad que me permitió rodearme de personas que me aconsejan y brindan todo el apoyo y la compañía que necesito. Entre ellos está mi querida Directora y profesora Ana Cohen que me formó no solo profesional sino que personalmente, me guió y encaminó todo este tiempo. A Mica por su ayuda y compromiso conmigo y con el proyecto, y a todos los colaboradores que hicieron posible la finalización de mi Tesis. A todos mis compañeros, profesores y personal administrativo que estuvieron a lo largo de mi carrera y me transmitieron, cada uno a su manera, el amor, dedicación y compromiso con esta carrera que elijo y tanto quiero.

A todos y a cada uno de ellos, con especial cariño, dedico mi proyecto de Tesis.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: CONSIDERACIONES GENERALES.....	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1.1. Antecedentes	9
1.2. Importancia de los Carotenoides	10
1.3. Rol biológico de los carotenoides	10
1.4. Estructura y clasificación de los carotenoides	11
1.5. Síntesis de carotenoides en bacterias e importancia de la enzima fitoenodesaturasa	12
1.5.1. Inhibidor de la enzima fitoenodesaturasa	12
1.6. Producción de carotenoides por microorganismos	13
1.6.1. <i>Bacillus</i> spp.	13
1.6.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. ORGANISMO EMPLEADO.....	16
1.1 Cepa bacteriana.....	16
2. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LA BACTERIA	16
2.1. Evaluación del Crecimiento celular.....	16
2.1.1. Método Turbidimétrico	16
2.1.2. Método del Recuento de células viables	17
2.2. Cultivos para evaluar crecimiento y producción de carotenoides:.....	17
3. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES	19
3.1 Extracción de Carotenoides.....	19
3.2 Identificación de los diferentes carotenoides	20
4. EVALUACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE LOS CAROTENOIDES <i>IN VIVO</i> ...	21
4.1 Sensibilidad al Peróxido de Hidrógeno	21
4.1.1 Concentración de Peróxido de Hidrógeno.....	21
5. EVALUACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE LOS CAROTENOIDES <i>IN VITRO</i> .	23
5.1 Poder antioxidante de los carotenoides.....	23
5.2 ORAC Hidrofílico	23
5.3 ORAC Lipofílico	23
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES POR HPLC	28
2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VIVO: SENSIBILIDAD AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	35
3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	36
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

ABREVIATURAS

+DPA: agregado de difenilamina
μl: microlitro
μm: micrómetro
AUC: área bajo la curva
BHT: butil-hidroxitolueno
BL: *Bacillus licheniformis*
BRu: bacterioruberina
C40: cuarenta átomos de carbono
C50: cincuenta átomos de carbono
CAO: capacidad antioxidante
d: días
DAD: detector de arreglo de diodos
DO: densidad óptica
DPA: difenilamina
EI: estándar interno
GRAS: generalmente reconocido como seguro
h: horas
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HPLC: cromatografía líquida de alta precisión
IPP: isopentil difosfato
K: factor de retención
M: molar
MEOH: alcohol metílico o metanol
Min: minutos
mM: milimolar
nd: no detectado
nm: nanómetro
ORAC H: ORAC hidrofílico
ORAC L: ORAC lipofílico
ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
p/v: peso/volumen
PDS: enzima fitoenodesaturasa
Rt4M10: cepa de *Bacillus licheniformis*
seg: segundos
TE: trolox
TRo: Torularhodina
TRu: Z-Torulene
UV: ultravioleta
α: factor de separación

CAPÍTULO I: CONSIDERACIONES GENERALES

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Antecedentes

Los carotenoides pertenecen a un importante grupo de pigmentos naturales presentes en organismos de todos los reinos. Los carotenoides son estudiados por investigadores de diferentes áreas del conocimiento y constituyen la clase más grande y diversa de productos naturales conocidos. La gran abundancia de los mismos refleja la variedad de funciones biológicas que ellos poseen (absorción de energía lumínica, atracción de polinizadores, coloración de las diferentes especies y foto-protección). Además de las propiedades de absorción de la luz visible y ultravioleta (UV), una serie de funciones biológicas de gran importancia son asociadas a estas biomoléculas como sus propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana, ser precursores de la vitamina A y diferentes hormonas, la protección frente a las radiaciones UV y su uso como colorantes. Estas propiedades resaltan el interés comercial en su uso en la industria alimentaria, como colorantes y en suplementos de alimentos para animales.

Los carotenoides son metabolitos secundarios producidos por plantas superiores, algas y hongos que están constituidos por un esqueleto de 40 carbonos (C40). También son producidos por bacterias que tienen la capacidad de sintetizar carotenoides con una amplia variedad de esqueletos de C40 y C30 (Perez-Fons et al., 2011) y en pocas especies de C50 (Heider et al., 2014).

En las bacterias los carotenoides se localizan principalmente en la membrana plasmática y contrarrestan el daño foto-oxidativo (Krinsky, 1979). En *B. atrophaeus* los carotenoides proporcionan a la membrana resistencia al daño por luz UV-A (Moeller et al., 2005). En algunas cepas de *Azospirillum* tienen un importante rol en la protección del daño oxidativo contra la nitrogenasa (Nur et al., 1981). También son cruciales para los procesos de fijación biológica del oxígeno en condiciones deficientes del mismo (Hartmann and Hurek, 1988; Baldani et al., 2005). Se ha demostrado que también actúan como un factor de virulencia en patógenos como el *Staphylococcus aureus* (Liu et al., 2005) y *Mycobacterium spp.* (Gao et al., 2003; Provvedi et al., 2008) porque los protegen frente a los mecanismos de fagocitosis del organismo, al evitar la acción del peróxido de hidrógeno.

Los carotenoides producidos por algas se obtienen, por ejemplo, del alga verde halófila *Dunaliella salina*, que contiene principalmente isómeros E y Z de β -caroteno en diferentes proporciones. Los productos derivados en la síntesis de carotenoides por sistemas bacterianos son particularmente interesantes debido a su alta proporción de (Z)-isómeros (hasta 50%) y su liposolubilidad, lo que da como resultado una biodisponibilidad superior a la del β -caroteno obtenido por síntesis química. Sin embargo, la síntesis química del β -caroteno aún domina el mercado (Schweiggert and Carle, 2016)

En plantas los carotenoides se sintetizan y localizan exclusivamente en todo tipo de plastos (Lichtenthaler, 1999). Los carotenoides se unen a ciertas proteínas integrales de la membrana tilacoidal donde participan en los procesos de captación de luz y prevención del daño foto-oxidativo del aparato fotosintético (Demming-Adams et al., 1996; Baroli and Niyogi, 1999).

En animales, los carotenoides no se pueden sintetizar “de novo” y por ello, necesitan ser ingeridos en la dieta para la producción esencial de retinoides como retinol o vitamina A. La ingesta diaria de carotenoides (presentes en frutas, vegetales, salsa de tomate y otros alimentos) se correlaciona con el aumento de la respuesta inmune y con la prevención de: enfermedades coronarias, del envejecimiento, de ciertos tipos de cánceres y enfermedades degenerativas (Bertram, 1999; Demmig-Adams and Adams, 2002; Guerin et al., 2003; Stahl

and Sies 2005; Li et al., 2013). Además disminuye el riesgo de padecer cataratas y degeneración macular (Christen et al., 2003). Estos hechos cobran relevancia en países en vías de desarrollo, en donde el β -caroteno se encuentra ausente en la mayor parte de los alimentos que constituyen la dieta básica de la mayoría de la población causando, por ejemplo, una elevada incidencia de ceguera infantil. Pero sin duda, el mayor beneficio que presenta una dieta rica en carotenoides, es su papel como pro-vitamina A. Diversos estudios ponen en manifiesto que la vitamina A, sus ácidos y los carotenos, pueden hacer retroceder el desarrollo de células cancerosas por lo menos en sus estadios o fases iniciales, actuando en la indiferenciación de las células tumorales (Beyersdorff, 2003; Tang, 2012).

Existe una fuerte demanda en la producción de carotenoides debido a sus propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud humana y a sus propiedades colorantes empleadas en la industria (Fraser and Bramley, 2004). Sin embargo, las técnicas utilizadas hasta el momento, de síntesis química o extracción a partir de fuentes naturales, son insuficientes para cubrir su demanda. Debido a esto, se han intensificado los estudios relacionados a la obtención de pigmentos de origen natural con el objetivo de reemplazar a los colorantes sintéticos, los cuales además estarían asociados a efectos tóxicos en los alimentos (Mapari et al., 2005). Bajo este escenario, se propone una alternativa biotecnológica para incrementar la producción de carotenoides, basada en la extracción de estos pigmentos a partir de cultivos bacterianos. Por esto, resulta de interés evaluar los pigmentos producidos por la cepa *Bacillus licheniformis* Rt4M10 y las condiciones óptimas para su crecimiento cuando es cultivada *in vitro*.

1.2. Importancia de los Carotenoides

Los carotenoides, junto con los flavonoides y las clorofilas, son los pigmentos vegetales más distribuidos en la naturaleza. Juegan un importante papel como antioxidantes y factores pro-vitamínicos en muchos organismos, que deben incluirlos en su dieta debido a que sólo los organismos fotosintéticos, y ciertas bacterias y hongos, son capaces de sintetizarlos como se mencionó anteriormente. Sus aplicaciones en la industria agroalimentaria, cosmética y acuícola, así como sus ventajas nutricionales y terapéuticas se basan en su color y en su alta capacidad antioxidante (protección frente a radicales libres) (Richmond, 2000; Lorenz and Cysewski, 2000; Eonseon et al., 2003; Borowitzka, 1997). Además, pueden proporcionar beneficios adicionales para la salud. Por ejemplo, la luteína, puede reducir el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftalmológicas. Otros carotenoides presentan también acción anticarcinogénica, antimutagénica, estimuladora del sistema inmune y antiinflamatoria (Demming-Adams, 2002; Stahl and Sies, 2005), así también como reducción de la hipertensión, desintoxicación y reducción del colesterol. La ingesta de luteína y zeaxantina disminuye el riesgo de padecer cataratas y enfermedades degenerativas de la retina relacionadas con el envejecimiento (Guerin et al., 2003).

Estos compuestos se utilizan como aditivos farmacéuticos, nutraceúticos y alimentarios. Existen actualmente 800 carotenoides identificados y teniendo en cuenta su estructura, 50 de ellos serían precursores de la vitamina A. Desde el punto de vista tecnológico, en los últimos años los carotenoides producidos por bacterias han despertado un gran interés debido a su capacidad de controlar bacterias patógenas, por ser antioxidantes y por su potencial como carotenoides con mejor solubilidad para la industria.

1.3. Rol biológico de los carotenoides

La propiedad de los carotenoides de absorber la luz es debido a la presencia de enlaces dobles conjugados que conforman un cromóforo. Este contiene siete o más enlaces dobles conjugados que poseen la capacidad de absorber la luz en la región visible lo que nos permite observar colores que van del amarillo al rojo, incluyendo el naranja (Britton, 1995). Este mismo sistema poliénico hace a la molécula extremadamente sensible a la degradación

oxidativa y a la isomerización inducida por la luz, el calor y los ácidos (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995). Es por esto, y debido a que los carotenoides microbianos se encuentran embebidos en una matriz compacta, que su extracción se hace muy difícil. Las propiedades físicas y químicas de los carotenoides *in vivo* pueden modificarse por interacciones con otras moléculas en su microambiente, por ello las propiedades de los carotenoides libres o en solventes orgánicos son significativamente diferentes. Estas interacciones con otras moléculas, pueden ser cruciales en su función biológica (Britton 1995 and Karnauknov, 1990).

Los carotenoides tienen función como antioxidante en los organismos fotosintéticos y en muchos no fotosintéticos aerobios, participando en la desactivación de radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de la célula. La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, consecuentemente, en presencia de oxidantes fácilmente forman radicales libres de vida corta (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995). En microorganismos y plantas se ha demostrado que los carotenoides inactivan aniones superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere la energía de altos niveles de excitación a un triplete del carotenoide (Britton, 1995 and Karnauknov, 1990).

En las últimas décadas se han realizado múltiples esfuerzos para manipular genéticamente microorganismos y plantas para enriquecerlos en la producción de carotenoides (Giuliano et al., 2008). La co-expresión de los genes bacterianos *crtB* (codifica a la enzima fitoeno sintasa) y *crtI* (codifica a la enzima PDS) en tubérculos de papa conlleva un aumento en los niveles de pigmentos (Diretto et al., 2007). Del mismo modo la co-expresión de ambos genes en endosperma de arroz induce la acumulación de β -caroteno, dando lugar al conocido "golden rice" o arroz amarillo (Ye et al., 2000).

1.4. Estructura y clasificación de los carotenoides

Como se mencionó anteriormente, los carotenoides son un grupo amplio de isoprenoides presentes en todos los organismos fotosintéticos y en algunos no fotosintéticos. La mayoría son poli-isoprenoides de 40 átomos que poseen una cadena hidrocarbonada que se podría considerar la espina dorsal de la molécula. Esta cadena puede presentar en los extremos estructuras cíclicas o anillos, en algunos casos complementados con grupos funcionales que contienen oxígeno. Los carotenoides que contienen exclusivamente carbono e hidrógeno en su estructura se conocen como **carotenos** (β -caroteno y licopeno) (Fig. 1a), y los que además de carbono e hidrogeno, contienen algún grupo sustituyente con oxígeno (hidroxi, ceto y epoxi) se conocen como **xantófilas** (luteína, zeaxantina, violaxantina, etc) (Fig. 1b). La estructura de un carotenoide determina en parte la función biológica del pigmento. Los máximos de absorción varían desde 450 a 490 nm. Su coloración tiene relación directa con su estructura debido a que la longitud de onda de la luz absorbida también aumenta con el número de dobles enlaces conjugados, confiriendo al carotenoide un color más rojizo. El número de insaturaciones puede variar de 3 a 15. Así, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango UV y es incoloro, el β -caroteno contiene 9 dobles enlaces conjugados y es de color naranja, mientras que el licopeno contiene 11 y es de color rojo.

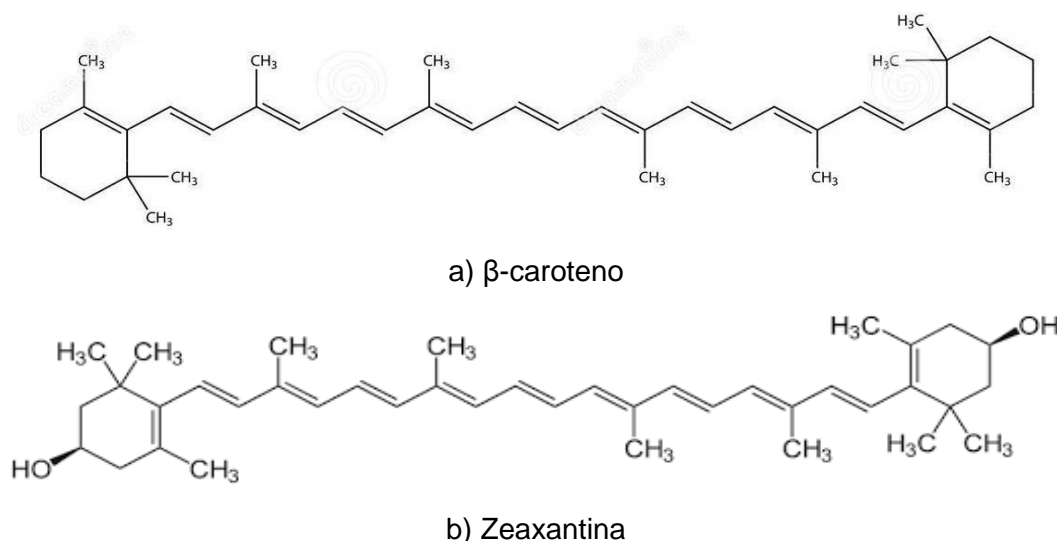


Figura 1- Estructura química de β -caroteno (caroteno) (a) y zeaxantina (xantofila) (b)

1.5. Síntesis de carotenoides en bacterias e importancia de la enzima fitoenodesaturasa

La presencia de carotenoides en las bacterias le confiere un efecto protector frente a la luz visible y el UV. Los carotenoides se localizan en la membrana plasmática y protegen a la célula de la fotooxidación. Todos los carotenoides contienen el grupo cromóforo característico constituido por una serie de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides son terpenos que se sintetizan a partir del isopentil difosfato (IPP, precursor de 5 carbonos) y su isómero di-alil-pirofosfato. Posteriormente se adicionan de manera consecutiva unidades de IPP que dan origen a precursores de C30, C40 o C50. De esta manera se origina el fitoeno (compuesto incoloro). El fitoeno sufre una serie de cuatro desaturaciones que resultan en la formación del fitoflueno y *cis*-caroteno en primer lugar, y neorospeno y prolicopeno a continuación. El prolicopeno formado debe ser isomerizado a all-trans licopeno por la enzima caroteno isomerasa.

La enzima fitoenodesaturasa (PDS) cataliza la desaturación del carotenoide fitoeno para producir el carotenoide licopeno (Ye et al., 2000; McLaren and Frigg, 2001). En bacterias y hongos es una sola proteína, codificada por el gen *crtl*, que cataliza las cuatro desaturaciones; mientras que en plantas las cuatro desaturaciones consecutivas están catalizadas por dos enzimas muy relacionadas, la PDS y la ζ -caroteno desaturasa. Sorprendentemente, todas las reacciones necesarias para la conversión de fitoeno en licopeno pueden ser llevadas a cabo por la PDS bacteriana, quien es capaz de realizar todas las reacciones de isomerización y desaturación antes mencionadas. Por esta razón, esta enzima bacteriana ha sido ampliamente utilizada en estudios de ingeniería genética para modificar y estudiar los niveles de carotenoides en diferentes especies de plantas (Fraser and Bramley, 2004). Luego, se producen reordenamientos moleculares, ciclizaciones, desaturaciones y la adición de grupos funcionales que dan origen al gran número de carotenos y xantófilas.

1.5.1. Inhibidor de la enzima fitoenodesaturasa

La difenilamina (DPA) es un inhibidor de la PDS (Sandmann and Fraser, 1993). Su aplicación en dosis bajas facilita la acumulación de diferentes intermediarios de la vía de desaturación. La PDS bacteriana es inhibida por la DPA pero al presentar poca similitud con

las desaturasas e isomerasas de carotenoides vegetales, no es inhibida por nurfurazón (Misawa et al., 1993), el cual si inhibe la actividad de la enzima PDS de plantas.

En medios de cultivo de *B. licheniformis* se observó un cambio en la coloración de los cultivos en presencia de DPA (Salvadores, 2012). Estos resultados indicaron de manera cualitativa que se modificaba la producción de carotenoides en presencia de este inhibidor.

1.6. Producción de carotenoides por microorganismos

Diversos estudios indican que existe una gran variedad de microorganismos productores de carotenoides. La producción biotecnológica de astaxantina se utiliza en cultivo optimizado de microalgas. La producción de licopeno de *B. trispora* es de alta pureza isomérica y permitió descartar los intentos de su síntesis química, debido a los isómeros que se producen en el proceso. Además, este organismo ya se está utilizando para la producción comercial de β -caroteno natural. La microalga *Dunaliella* también se ha aplicado para la producción de β -caroteno a gran escala y los sistemas de cultivo han sido optimizados durante las últimas décadas (Schweiggert and Carle, 2016). Las arqueas halófilas son organismos heterótrofos aeróbicos que requieren ciertas concentraciones de NaCl para desarrollarse (Madigan et al., 2014). Los carotenoides bacterioruberina, caroteno, licopeno, cantaxantina, 3-hidroxi-equinenona, licoperseno, fitoeno, fitoflueno y 2-isopentenil-3,4-deshidrorodopina ya se han identificado en arqueas halófilas. La bacterioruberina en arqueas halófilas actúa como refuerzo de la membrana celular aumentando la rigidez y disminuyendo la permeabilidad al agua (citado Calegari-Santo, 2016)

Las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la incidencia de luz, también pueden alterarse para mejorar la producción de carotenoides. Por lo tanto, estas estrategias combinadas con las metodologías de optimización pueden aplicarse en el cultivo de arqueas halófilas para obtener mayores rendimientos de carotenoides (Calegari-Santos et al., 2016).

Las bacterias formadoras de esporas en general se caracterizan por ser productoras de pigmentos. Por ello, se puede decir que los carotenoides existen en la mayoría de las cepas de *Bacillus*, aunque el efecto protector de los carotenoides contra la radiación UV en las esporas de *Bacillus* puede diferir significativamente entre especies (Khaneja et al., 2009) e incluso la composición de los carotenoides se puede utilizar para determinar su clasificación.

1.6.1. *Bacillus* spp.

Es un género clásico en microbiología y se encuentra entre los más estudiados. Fue descrito por primera vez por Cohn en 1872 a partir de un aislado obtenido de materia orgánica del suelo (Agritos-Martínez, 2011). Debido a su capacidad para formar esporas se encuentra presente en elevada concentración en la rizósfera de diversos cultivos vegetales. Esto le da una ventaja competitiva y de supervivencia muy importante en un ambiente como es el suelo (Calvo and Zúñiga, 2010; Stephens, 1998). Sin embargo, puede aislarse de diversas fuentes, incluido el aire, el agua, el intestino humano y animal, de los vegetales y otros alimentos. Incluso, en la actualidad es utilizado como probiótico suplementando algunas fórmulas alimenticias (Alou et al., 2015; Kotb, 2015).

En cuanto a sus condiciones de crecimiento, hay especies que son mesófilas con temperaturas óptimas que oscilan entre 30 y 45°C, pero el género también incluye otras especies que son termófilas con una temperatura óptima de crecimiento superior a 65°C (Todar, 2005).

El género *Bacillus* está estrechamente relacionado a *Lactobacillus* spp., el candidato más conocido como probiótico. Ambos comparten la misma clase, Bacilo en el filo *Firmicutes*. Sin embargo, los bacilos son más estables durante el procesamiento y almacenamiento tanto de

alimentos como de preparados farmacéuticos. Esta característica lo hace un ingrediente adecuado para estar presente en formulaciones para consumo. Además de ser aislados del cuerpo humano, las cepas de *Bacillus* con atributos probióticos se han aislado de alimentos fermentados y no fermentados (Adewumi et al., 2014; Rao et al., 2015) y se comercializan en una amplia gama de suplementos beneficiosos para la salud.

Bacillus spp. es utilizado para la producción de enzimas de grado alimentario como amilasa, glucoamilasa, proteasa, pectinasa y celulasa en diversos alimentos (Ghani et al., 2013; Ouattara et al., 2017). Diferentes especies de *Bacillus* se han utilizado para la producción de alimentos nutracéuticos, incluyendo vitaminas (por ejemplo, riboflavina, cobalamina e inositol) y carotenoides para la síntesis de varios suplementos de consumo humano (Mohammed et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Takano, 2016). Sin embargo, a pesar de los beneficios anteriores, estas cepas no han ganado mucha importancia y atención en la industria alimentaria actual debido a su relación con algunos patógenos humanos.

Estudios científicos respaldan el uso y consumo seguro de los formadores de esporas como posibles probióticos y como suplementos alimenticios debido a su importante capacidad de producir enzimas extracelulares.

1.6.2. *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis (BL) es una bacteria saprófita ampliamente distribuida. En los últimos años se ha utilizado para la producción industrial a gran escala de exoenzimas, antibióticos y productos químicos (Elshaghabee et al., 2017; Shu-Xu Du et al., 2018). Las cepas de BL son categorizadas por la Organización Mundial de la Salud como un organismo GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), siendo activo contra muchos patógenos y libre de toxinas.

Según estudios científicos, los probióticos aliviarían la diarrea o inflamación intestinal causada por la radioterapia en pacientes pediátricos con cáncer (Redman et al., 2014; Ki et al., 2014). El BL es considerado un probiótico *in vitro*, tiene un rol protector y es ampliamente utilizado en el tratamiento clínico de este tipo de pacientes. Puede equilibrar la flora gastrointestinal, en cuadros de enteritis aguda y crónica, diarrea y terapia de endotoxemia intestinal sin ninguna reacción adversa evidente (Nai-gang et al., 2013). Una parte de estos efectos podrían deberse a la producción de pigmentos del tipo carotenoide.

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden sobrevivir en el tracto gastrointestinal que juegan un papel importante manteniendo o restaurando el intestino, el balance de la flora intestinal y como barrera de defensa e inmunidad de la mucosa (Tojo et al., 2014). Los efectos de las formulaciones probióticas son cepa dependientes y están siendo desarrolladas y estandarizadas para el consumo humano y animal. Diferentes productos lácteos, alimentos funcionales, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas albergan cepas probióticas con diferentes beneficios en la salud humana. También se han encontrado ciertas aplicaciones en la alimentación animal, para la prevención de infecciones gastrointestinales, con un uso extensivo en las aves de corral y las industrias acuícolas (Hong et al., 2005).

Características morfológicas, bioquímicas y metabólicas:

- ✓ Bacilo Gram-positivo, aeróbico, de forma alargada.
- ✓ Móvil por sus flagelos peritricos (Figura 2).
- ✓ Tolera los ácidos gástricos y las sales biliares (Ranjana S., 2017)
- ✓ Tiene actividad antagonista contra patógenos gram positivas de la mucosa intestinal. (Ranjana S., 2017)
- ✓ Posee alta sensibilidad a los antibióticos (Ranjana S., 2017)

- ✓ Forman esporas durante la fase estacionaria de crecimiento. El proceso de esporulación no está inhibido por la presencia de oxígeno como en otros géneros, por ejemplo *Clostridium*, pero sí por la disponibilidad de la fuente de nitrógeno (Calvo y Zúñiga, 2010).
- ✓ Produce exoenzimas, antibióticos. y productos químicos (Elshaghabee et al., 2017)
- ✓ Alivia síntomas gastrointestinales y problemas inflamatorios relacionados a pacientes pediátricos sometidos a radioterapia (Du et al., 2017)



Figura 2 - Micrografía electrónica de *B. licheniformis* (Tomado de <https://www.indiamart.com>).

En esta tesis se utilizó una cepa de BL Rt4M10 que se aisló e identificó de raíces y suelo aledaño a plantas de vid implantadas en la provincia de Mendoza, Argentina (Salomon et al., 2014). Por las características de color de las colonias, se infiere que la cepa de interés produce carotenoides (Salvadores, 2012), sin embargo se desconoce la identidad química de los carotenoides producidos, el efecto que estos metabolitos cumplen en la bacteria y la actividad antioxidante que presentan luego de su extracción.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos anteriormente, se establece la siguiente hipótesis de trabajo:

“*B. licheniformis* Rt4M10 produce diferentes carotenoides con actividad antioxidante cuando es cultivada bajo condiciones controladas en medio de cultivo líquido”.

El **objetivo general** es:

“Evaluar la producción y capacidad antioxidante de los carotenoides producidos por *B. licheniformis* Rt4M10.

Los **objetivos particulares** del trabajo son:

Primer objetivo: evaluar el crecimiento celular y producción de carotenoides por *B. licheniformis* Rt4M10 en medio de cultivo líquido.

Segundo objetivo: identificar y cuantificar los diferentes carotenoides producidos por *B. licheniformis* Rt4M10 en medio LB líquido sin y con DPA.

Tercer objetivo: evaluar la actividad antioxidante *in vivo* mediante el estudio de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno en *B. licheniformis* Rt4M10.

Cuarto objetivo: evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto de los carotenoides producidos por *B. licheniformis* Rt4M10.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología, se dividió en tres etapas. La primera consistió en la determinación de las condiciones de crecimiento celular de la bacteria y producción de los carotenoides en medio con y sin el agregado de DPA. La segunda consistió en la extracción de los carotenoides con un solvente previamente seleccionado para su posterior identificación por espectrofotometría y por HPLC.

Por último se estudió el poder antioxidante *in vivo* de los cultivos crecidos con y sin la aplicación del inhibidor de la síntesis de carotenoides (DPA), para esto se observó el comportamiento de la bacteria frente a una sustancia oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). También se determinó el poder antioxidante de los extractos de carotenoides obtenidos mediante la técnica ORAC.

1. ORGANISMO EMPLEADO

1.1 Cepa bacteriana

La cepa bajo estudio fue *Bacillus licheniformis* Rt4M10, en adelante "Rt4M10". Esta cepa fue previamente aislada de la rizósfera de plantas de vid e identificada molecularmente (Salomon et al., 2014). Para iniciar el cultivo se utilizó un tubo en pico de flauta con la cepa purificada que estuvo guardado en condiciones de asepsia. De este tubo se realizó un cultivo madre y se conservó en microtubos con medio sólido estéril un stock de la cepa para ser utilizado cada vez que se iniciara un pre-inóculo. Además se sembró la cepa en placas de Petri para comprobar la pureza y las características morfológicas de cada colonia.

2. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO DE LA BACTERIA

Para estudiar las condiciones de cultivo de la cepa, se utilizó la metodología puesta a punto en nuestro grupo de trabajo. Los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM-FCA) y en la cátedra de Química Orgánica, para mantener las condiciones de esterilidad la manipulación de los cultivos se llevó a cabo en un flujo laminar (Casiba HL®.Modelo HL1).

El pre-inóculo se realizó a partir de un microtubo con la cepa Rt4M10 que creció durante toda la noche, en un erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio líquido LB, hasta una densidad óptica de 0,8 a 560 nm (DO₅₆₀), de acuerdo a Salvadores (2012). A partir de este pre-inóculo se sembraron los cultivos para realizar las determinaciones. De esta manera se disminuyó la fase de latencia y nos permitió que todas las réplicas biológicas inicien el crecimiento con la misma cantidad de masa celular.

El crecimiento celular se evaluó de dos maneras:

2.1. Evaluación del Crecimiento celular

2.1.1. Método Turbidimétrico

Teniendo en cuenta que la turbidez es proporcional al número de células, se evaluó el crecimiento celular por espectrofotometría. Se utilizó un espectrofotómetro de UV-visible Varian (Modelo Cary 50 Conc) y se midió DO₅₆₀. Se utilizó medio LB estéril como blanco.

Cada 12 h se tomaron alícuotas de los cultivos bacterianos (control y con DPA). Se realizaron dos lecturas de cada muestra y se calculó el promedio del valor de absorbancia durante 7d. Se obtuvieron diferentes valores de DO los cuales fueron graficados en función del tiempo con el objeto de caracterizar la evolución de la turbidez.

2.1.2. Método del Recuento de células viables

Este método permitió conocer el aumento en la masa de células viables o unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) contando las colonias que crecieron en medio sólido como se detalla en la siguiente sección. Las muestras se tomaron en flujo laminar, y se realizaron diluciones sucesivas de tres réplicas biológicas cada 12 h de iniciado el cultivo, durante 7 d.

El medio de cultivo líquido y sólido en el que creció Rt4M10 fue Luria Broth Base, (LB) 25 g/L (Miller LB, Invitrogen), el mismo se esterilizó en autoclave durante 20 min (Figura 3)



Figura 3- Medio líquido Luria Broth Base, esterilizado en autoclave (a). Medio de cultivo Luria Broth Base en su presentación comercial (b).

2.2. Cultivos para evaluar crecimiento y producción de carotenoides:

Del pre-inóculo con Rt4M10, se tomaron 500 μL y se pasó a seis erlenmeyers (réplicas biológicas) con 50 ml de medio LB. El cultivo se mantuvo en estufa (Bioelectric) a 28-30°C en un agitador orbital (Boeco PSU-10i) a 130 rpm. Para estudiar el efecto del inhibidor DPA, se preparó una solución 0,25 M. Después de 4 h de la inoculación de los cultivos, se seleccionaron 3 erlenmeyers que permanecieron sin agregado del inhibidor (grupo control) y tres a los que se les agregó 200 μL de la solución 0,25M (grupo tratado con DPA). Posteriormente se continuaron agitando hasta completar los 7 d. Todos los cultivos fueron envueltos en papel aluminio para preservarlos de la luz y evitar la oxidación de los metabolitos producidos. El esquema de trabajo se muestra en la Figura 4.

Las alícuotas de las diluciones decrecientes del cultivo original (control y con DPA) (Figura 5), se sembraron en placas de Petri con medio sólido LB agar esterilizado con el objetivo de cuantificar el crecimiento celular. Las diluciones se realizaron transfiriendo 100 μL del cultivo bacteriano (0 h hasta el cultivo de 168 h) en un microtubo con 900 μL de NaCl 0,85%, obteniéndose una dilución 10^{-1} . Se mezcló la dilución con un agitador tipo Vortex. Se transfirieron 100 μL de la dilución 10^{-1} a un microtubo con 900 μL de NaCl 0,85%, obteniendo una dilución 10^{-2} . Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución 10^{-6} . Luego en dos placas de Petri, se sembraron 100 μL de cada dilución y se extendió el cultivo con una espátula Drigalsky. Cada una de las placas de Petri, correspondientes a las diferentes horas del cultivo, se incubaron invertida en estufa a 28-30°C durante 48-72 h. Luego de la incubación, cada unidad formadora de colonias dio origen a una colonia visible.

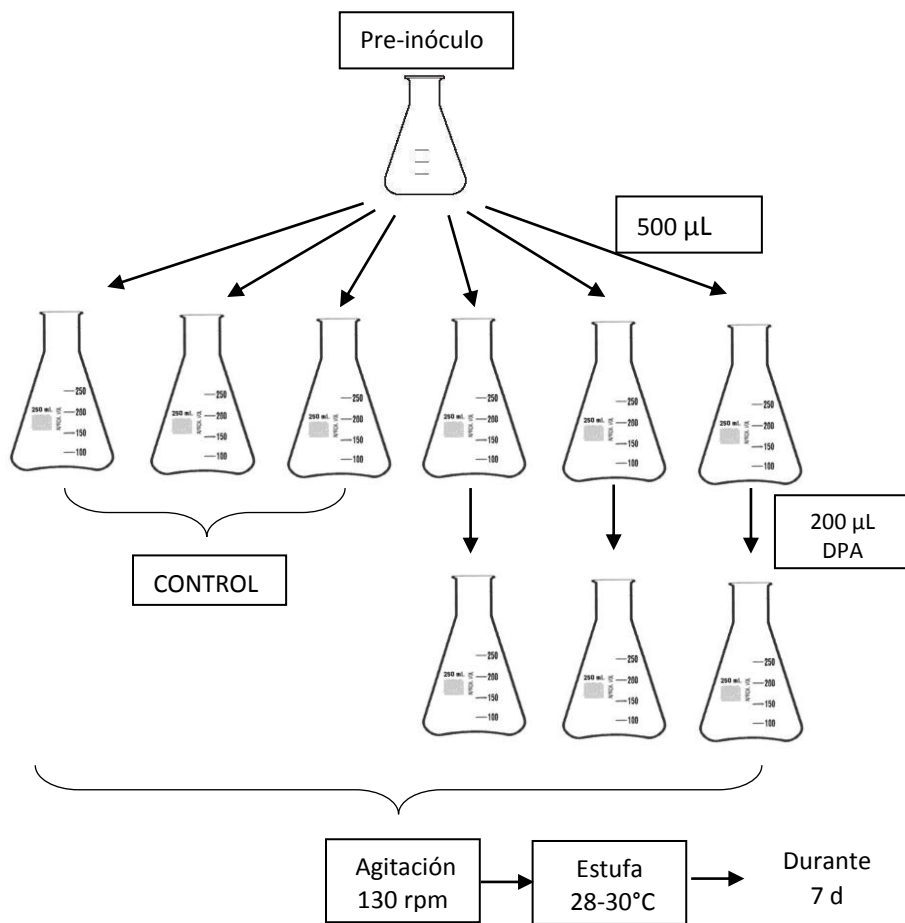


Figura 4- Procedimiento para obtener los tratamientos de los cultivos de la cepa bacteriana.

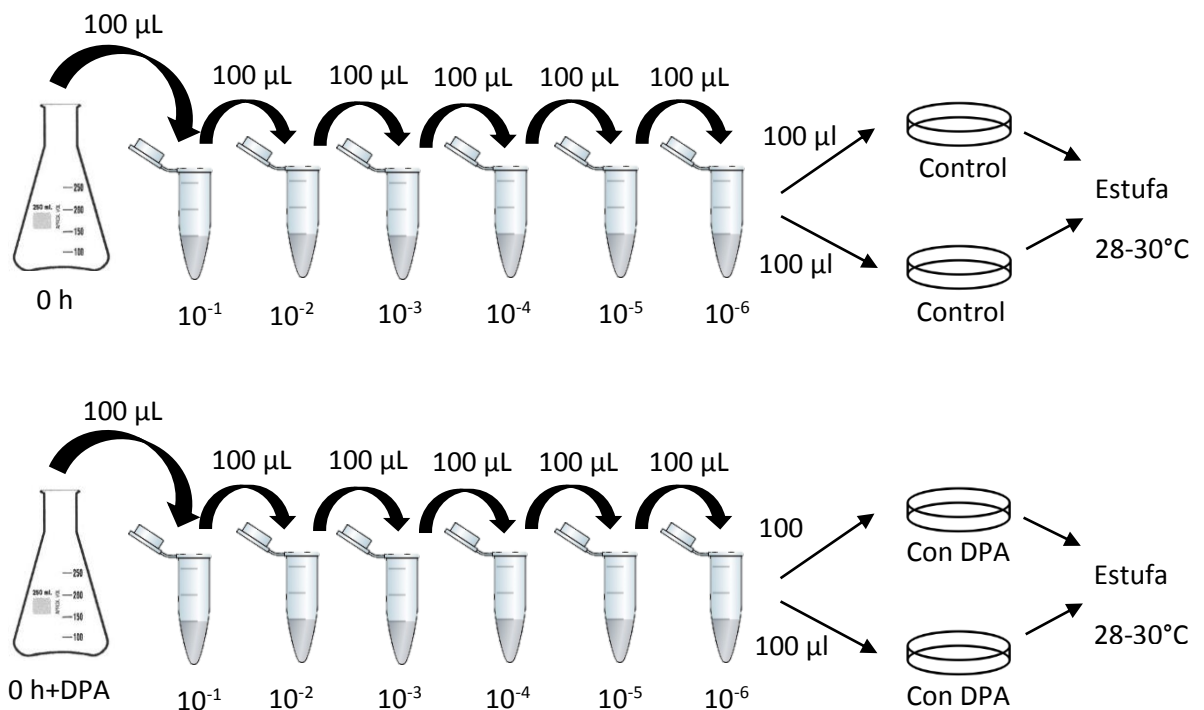


Figura 5- Diluciones seriadas del cultivo inicial con y sin el agregado de DPA y su posterior incubación en estufa.

Para determinar las UFC/mL se realizó el siguiente cálculo:

Se calculó un promedio entre el número de colonias de cada placa, a cada tiempo de muestreo y se reemplazó en la fórmula.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nro. de colonias} \times 100 \mu\text{L sembrados} \times \text{dilución}}{1000 \mu\text{L}}$$

Con los datos de UFC/mL se aplicó el logaritmo a los valores obtenidos anteriormente en los diferentes tiempos muestreados y se graficó la curva de crecimiento en función del tiempo.

3. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

Todos los procedimientos relacionados con la extracción de carotenoides se realizaron en ausencia de luz y a temperatura ambiente, trabajando expeditivamente para evitar la degradación o la oxidación de los mismos.

3.1 Extracción de Carotenoides

Para la extracción de carotenoides se utilizaron diferentes cultivos realizados de acuerdo a lo descrito anteriormente (Figura 4). Para cada muestra se utilizó un erlenmeyer con 50 ml de medio y se tomaron muestras cada 24 h hasta las 168 h. Cada una se colocó en tubos de polipropileno de 50 ml envueltos en papel aluminio. Se centrifugó cada tubo a 7000 rpm durante 15 min (en una centrifuga Hermle Z 326 K centrifuge, Hermle Labortechnik GmbH, Germany) y se descartó el sobrenadante. Se obtuvo el pellet celular correspondiente al tiempo estudiado.

Como solvente de extracción se utilizó una mezcla metanol:acetona (30:70), la misma había sido seleccionada en un trabajo previo por ser la que extrajo mayor cantidad de carotenoides (Salvadores, 2012). Se agregó 3 ml del solvente al pellet celular y luego se mezcló con un agitador Vortex durante 30 segundos (seg). La suspensión se dejó toda la noche en oscuridad a 4°C y posteriormente se ultrasonicó durante 15 min. Posteriormente, se centrifugaron los extractos a 7000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo limpio y se midió la absorbancia con espectrofotómetro en el rango de 200 a 800 nm (Figura 6). Finalmente, se seleccionaron los cultivos de 96 y 168 h que correspondieron a los momentos de inicio y fin de la fase estacionaria (según los datos obtenidos en las curva de crecimiento) y de acuerdo a otros autores sería el momento donde se sintetizarían la mayor concentración de los carotenoides.

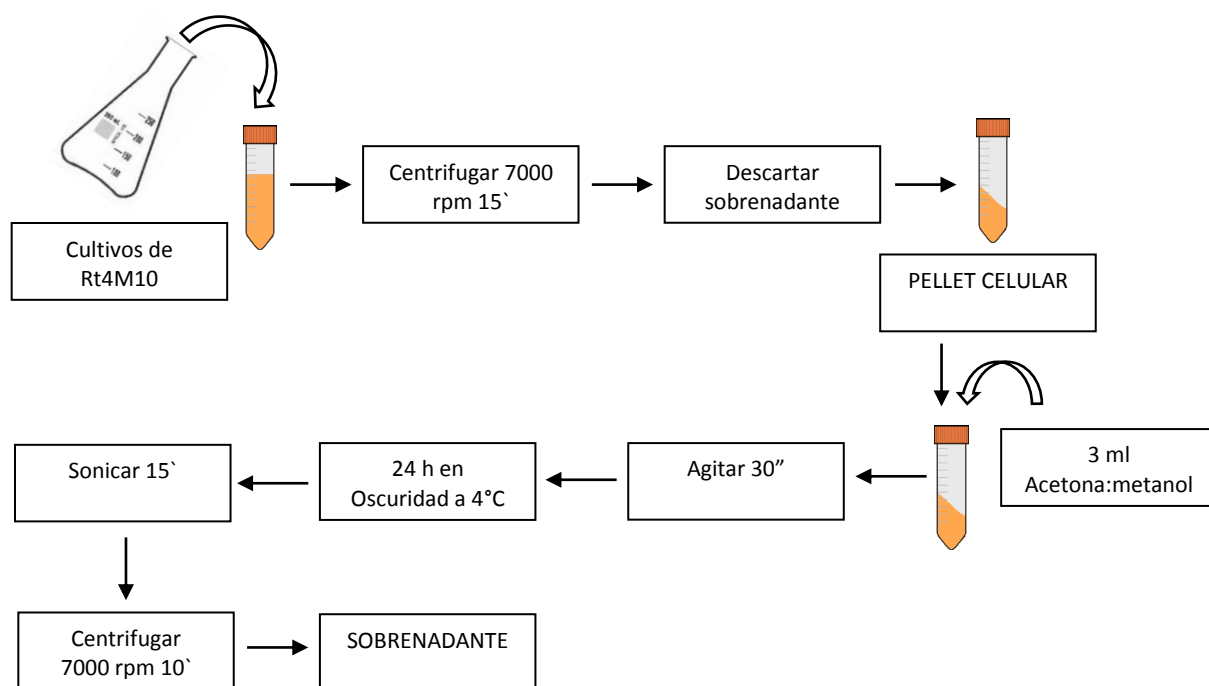


Figura 6- Técnica de extracción de Carotenoides según Salvadores 2012

Mediante espectrofotometría se comprobó la presencia de carotenoides y cómo se modificaba la curva en función del tiempo y la presencia o no del inhibidor. Este ensayo se repitió en las mismas condiciones y se preparó nuevamente el extracto para la identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC. Pevio al análisis se evaporaron los solventes de los extractos en un rotavapor con vacío (Spedd Vac concentrator. Thermo Scientific. Savant SPD111V), obteniendo los extractos secos en cada tiempo muestreado.

3.2 Identificación de los diferentes carotenoides

Los extractos secos se retomaron con 1 mL de una mezcla metanol:acetona (MeOH: AcEt) 4:1 y butil hidroxitolueno (BHT) 0,1% p/v, se filtraron con una membrana de politetrafluoroetileno de 0,2 μm (Herts, UK). Al filtrado se le agregó 2 μL del estándar interno β -apocaroteno-8-al (200 ng/ μL). Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 μm (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Suiza). Finalmente, el extracto se inyectó a un HPLC Elmer serie 200, equipado con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT).

La separación e identificación de los diferentes carotenoides se realizó en el Laboratorio de Cromatografía de la estación experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, según la técnica puesta a punto por la Dra. Viviana Jofré. Se utilizó una columna YMC30 (250 x 4,6 mm; tamaño de partícula 5 μm) de YMC Europe (Schermbeck, Alemania) para la separación de los componentes. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La separación de los compuestos se realizó a 25 $^{\circ}\text{C}$ (según Aschoff et al., 2015). Los estándares utilizados para la cuantificación fueron: zeaxantina, β -caroteno, violaxantina, neoxantina y luteína, (Sigma-Aldrich Co)

Los datos obtenidos permitieron identificar 22 carotenoides y cuantificarlos. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros UV-visibles con los estándares internos. La cuantificación se obtuvo comparando el área bajo la curva de los picos de las muestras con el área de los picos de los estándares de referencia con una concentración conocida. Debido a la falta de estándares comerciales de origen bacteriano para algunos carotenoides, los compuestos se identificaron tentativamente con el factor de retención (k) y la comparación de las características espectrales de acuerdo a la bibliografía

consultada con la colaboración de la Dra. Viviana Jofré (Weber et al., 2007; Mandelli et al., 2012; Steiger et al., 2012; Aschoff et al., 2015; Yang et al., 2015).

4. EVALUACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE LOS CAROTENOIDES *IN VIVO*

Los cultivos de la cepa Rt4M10 descritos anteriormente se utilizaron para evaluar la respuesta de ambos tratamientos ante la presencia de un oxidante como el H₂O₂. (Carbonneau et al., 1989 con modificaciones).

4.1 Sensibilidad al Peróxido de Hidrógeno

Para evaluar la capacidad antioxidante de los carotenoides *in vivo* se seleccionó un tiempo específico de la curva de crecimiento de Rt4M10, correspondiente al momento de mayor producción de carotenoides, según resultados obtenidos en determinaciones anteriores.

4.1.1 Concentración de Peróxido de Hidrógeno

Para determinar la concentración inhibitoria de H₂O₂, se tomaron muestras del cultivo de la bacteria a las 96 h con el agregado de DPA (+DPA) y sin el agregado de DPA (Control). Se transfirieron 500 µL de los cultivos a 10 tubos eppendorf de 1ml, rotulados según el tratamiento. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de solución buffer (CINa 0,85%), se mezclaron con un agitador Vortex y se adicionaron soluciones crecientes de H₂O₂ en las siguientes concentraciones 0 - 0,025 - 0,05 - 0,075 y 0,1 M. Todas las muestras se mantuvieron en oscuridad y a 4°C. Se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10⁻⁶ desde el momento inicial, 1 h y 3 h después del agregado del H₂O₂. Se sembraron 100 µL en placas de Petri con medio LB sólido y se llevaron a incubar a 30°C, invertidas, durante 48-72 h. Se realizó el recuento de las colonias y se graficaron las curvas correspondientes a cada tiempo muestreado (Figura 7). Se seleccionó la concentración mínima de H₂O₂ que inhibía la supervivencia de la bacteria en un porcentaje mayor al 50% a las 3 h de exposición al peróxido.

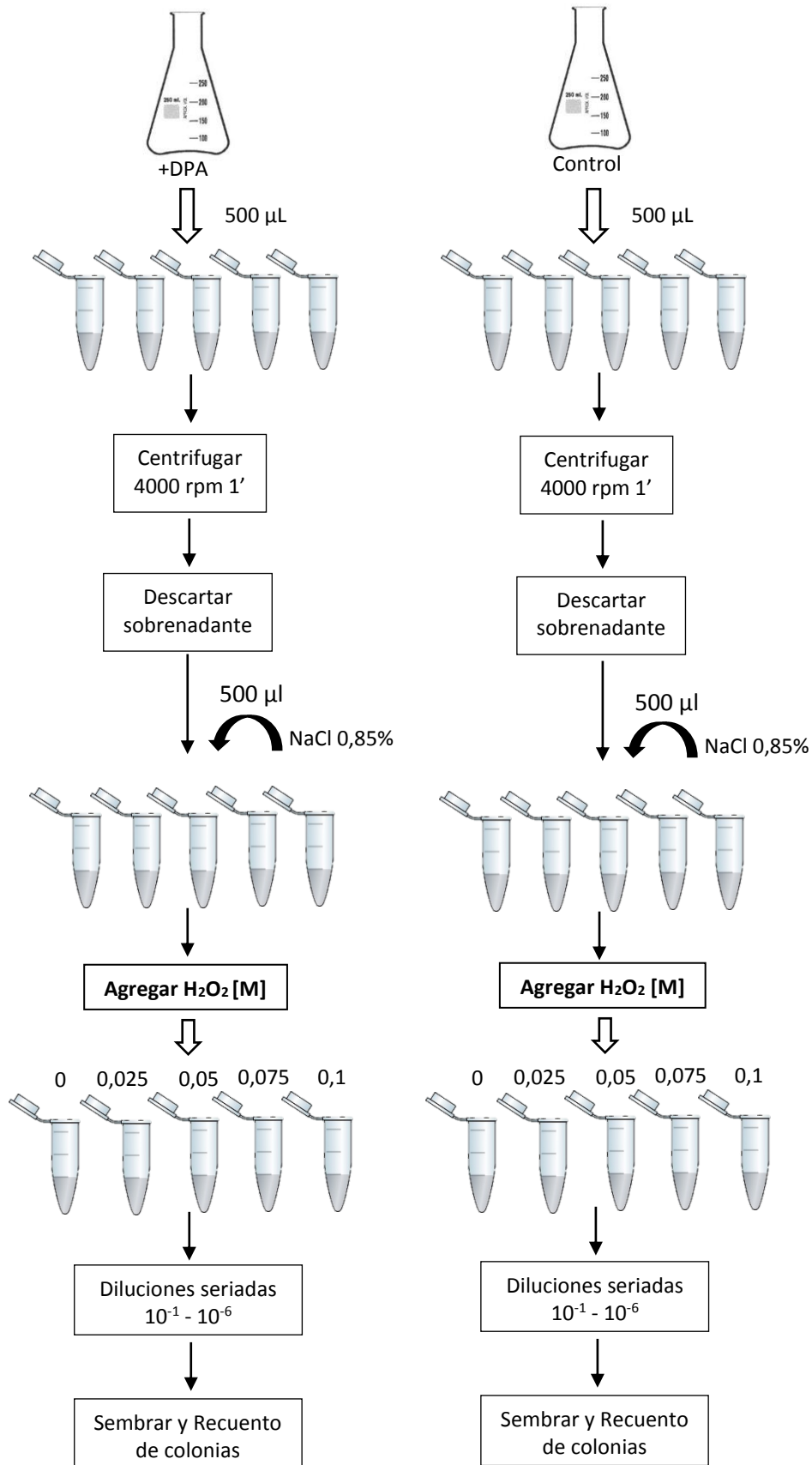


Figura 7- Sensibilidad de Rt4M10 a diferentes concentraciones de H₂O₂ *in vivo* con y sin el agregado de DPA.

5. EVALUACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE LOS CAROTENOIDES *IN VITRO*

5.1 Poder antioxidante de los carotenoides

Una técnica utilizada para cuantificar el poder antioxidante de un compuesto es mediante el método de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés *oxygen radical absorbance capacity*). Esta técnica determina la capacidad global que tienen todos los antioxidantes presentes en una muestra para “neutralizar” los radicales peroxilo generados en un ensayo *in vitro*. Los radicales peroxilo son especies reactivas derivadas del oxígeno comparable a las biológicamente generadas en el organismo. Esta técnica emplea fluoresceína como sonda fluorescente y es una de las metodologías más utilizadas para evaluar capacidad antioxidante. La cuantificación en los ensayos de ORAC combina en un solo valor el tiempo de inhibición y el porcentaje de inhibición del radical libre, neutralizado por el antioxidante.

En este estudio se midió la actividad antioxidante tanto para compuestos hidrofílicos como para lipofílicos seleccionando dos momentos del crecimiento bacteriano (fase exponencial y fase estacionaria) a las 48 y 168 h de iniciado el cultivo en presencia y ausencia de DPA, según Prior et al., 2003 con algunas modificaciones.

5.2 ORAC Hidrofílico

El cultivo de 48 y 168 h se colocó en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se envolvió en papel aluminio para preservarlo de la luz, almacenándolo a - 80°C hasta su posterior procesamiento.

El pellet se descongeló y se realizó la metodología descrita para la extracción de los carotenoides con acetona:metanol y posterior evaporación del solvente. El extracto seco se resuspendió en 10 mL de acetona:agua:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) y se agitó durante 30 seg, se ultrasonicó por 5 min y luego se centrifugó a 4600 rpm por 15 min.

Luego se prosiguió según la técnica de ORAC descrita por Prior et al., 2003 y Antonioli et al., 2015. El sobrenadante se transfirió a un matraz y se enrasó a 25 ml con H₂O destilada. Se almacenó en un frasco color caramelo. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 de la muestras en solución buffer de fosfato de sodio NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (75 mM, pH 7.0). Se utilizaron diferentes concentraciones de Trolox (0-50 µM), preparadas en una solución buffer pH 7. Se incorporaron 50 µL de las muestras y 50 µL de las diferentes concentraciones de Trolox en placas de 96 pocillos. Luego se agregó 100 µL de fluoresceína (20 nM) y se incubó a baño maría 37°C durante 7 min. Por último, se agregó a cada pocillo 50 µL de AAPH (140 nM) como generador de radicales peroxilos.

La fluorescencia se determinó monitoreando la excitación a 485 nm y la emisión a 538 nm cada 1 min durante 90 min con un fluorómetro de placas (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE). Para la expresión de los resultados, se calculó el área bajo la curva de la emisión de la fluoresceína y las unidades se expresaron como µmol equivalentes de Trolox por L de muestra (µM TE)

5.3 ORAC Lipofílico

El extracto obtenido a las 48 y 168 h se disolvió en 250 µL de acetona y se diluyó con 750 µL de β-ciclodextrina 7% en una mezcla de acetona: H₂O destilada (1: 1 v / v) y se adicionaron 50 µL de esta solución a los 96 pocillos. La β-ciclodextrina se utiliza como blanco y en las diluciones de estándar de Trolox en las cantidades detalladas para compuestos hidrofílicos.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el programa InfoStat/P (UNC). En aquellos casos en donde se observó diferencias significativas, se utilizó un test a posteriori LSD Fisher.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La morfología de las colonias de *B. licheniformis* Rt4M10 se observó en placas con medio LB sólido. Las mismas presentaron colonias definidas, de tamaño pequeño, cremosas y de un color naranja que se intensificó desde las 48 a las 168 h (Figura 8). Se observó la pigmentación característica en esta especie. En medio líquido también se evaluó cómo se modificaba la coloración ámbar del medio LB hasta el naranja, que se intensificó a medida que el cultivo entraba en fase estacionaria. También se observó que en el medio donde se incorporó el inhibidor DPA, la coloración ámbar se mantuvo mientras aumentaba la turbidez. Sin embargo, se pudo observar una leve coloración en los cultivos con DPA a las 168 h (Figura 9), posiblemente debido a que cuando se aplicó el inhibidor, RT4M10 se encontraba en fase exponencial.



Figura 8- Colonias de la cepa Rt4M10 crecida en medio LB en estufa a 28-30 °C durante 168 h.

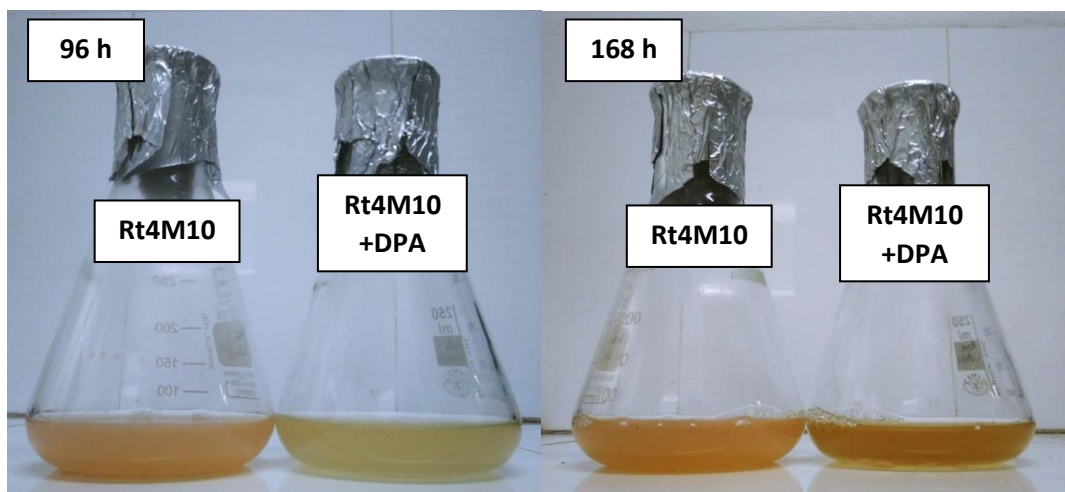


Figura 9- Comparación de color entre cultivos de Rt4M10 en medio LB líquido, sin y con el agregado de DPA, a dos tiempos de incubación diferentes.

En algunas oportunidades en las cuales se detuvo el agitador, se observó la decantación de Rt4M10 durante su incubación (Figura 10). En este caso se pudo observar que los pigmentos estaban en el fondo del erlenmeyer y no en el medio de cultivo.



Figura 10- cultivo decantado de Rt4M10 en medio LB líquido.

Para evaluar las condiciones de crecimiento de la cepa Rt4M10 se realizaron curvas de crecimiento celular, tanto por el método turbidimétrico (DO_{560}) como por el recuento de células viables en medio sólido (UFC/mL), permitiendo caracterizar las diferentes fases de crecimiento de la bacteria a lo largo del tiempo, con y sin el agregado del inhibidor de la producción de carotenoides.

En la figura 11 se observa la cinética de crecimiento de los cultivos. Debido a que el pre-inóculo que se utilizó se encontraba en la fase exponencial de crecimiento, los cultivos inoculados presentaron una fase de latencia relativamente corta (0-8h). Sí se distingue la fase exponencial, la fase estacionaria y el inicio de la fase de declive o muerte celular.

La fase exponencial se estableció entre las 8 y 48 h de iniciado el cultivo. Entre las 48 y 120 h se observó la fase estacionaria, debido al agotamiento de nutrientes o a la acumulación de productos del metabolismo, y a partir de las 120 h el cultivo comenzó con la fase de declive o senescencia, hasta que dejó de multiplicarse a partir de las 168 h dando inicio a la fase de muerte celular. En la gráfica de densidad óptica (Figura 12), se demostró que al iniciar el cultivo la suspensión tenía un valor de DO de 0,5. A partir de ese momento comenzó con la fase de crecimiento exponencial, donde se produjo un aumento progresivo de la masa celular que llegó hasta un valor de DO de 2,5 a las 120 h de iniciado el cultivo. Entre las 120 y 168 h no se observó aumento de la masa celular y las bacterias entraron en la fase de declive y muerte celular.

En ambos gráficos (Figuras 11 y 12), se evidenció que hay una variación en el crecimiento de las bacterias con el agregado de DPA a partir de las 24 h, ya que se observa una disminución del crecimiento a lo largo del tiempo. Los valores de DO y del recuento de células viables fueron menores respecto a los cultivos sin DPA, sin embargo las UFC para ambos tratamientos fueron similares a las 24 y 72 h.

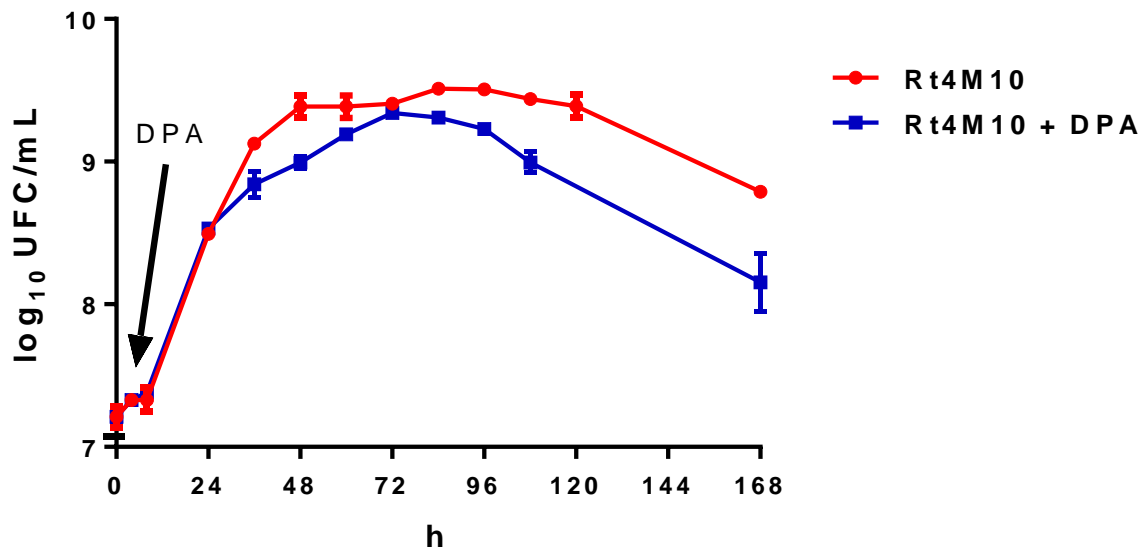


Figura 11- Curva de crecimiento de Rt4M10 expresada como \log_{10} UFC/mL de 0 a 168 h. RT4M10 se cultivó en un medio sin DPA (círculos rojos) y con DPA (cuadros azules). La flecha indica el momento que se aplicó DPA.

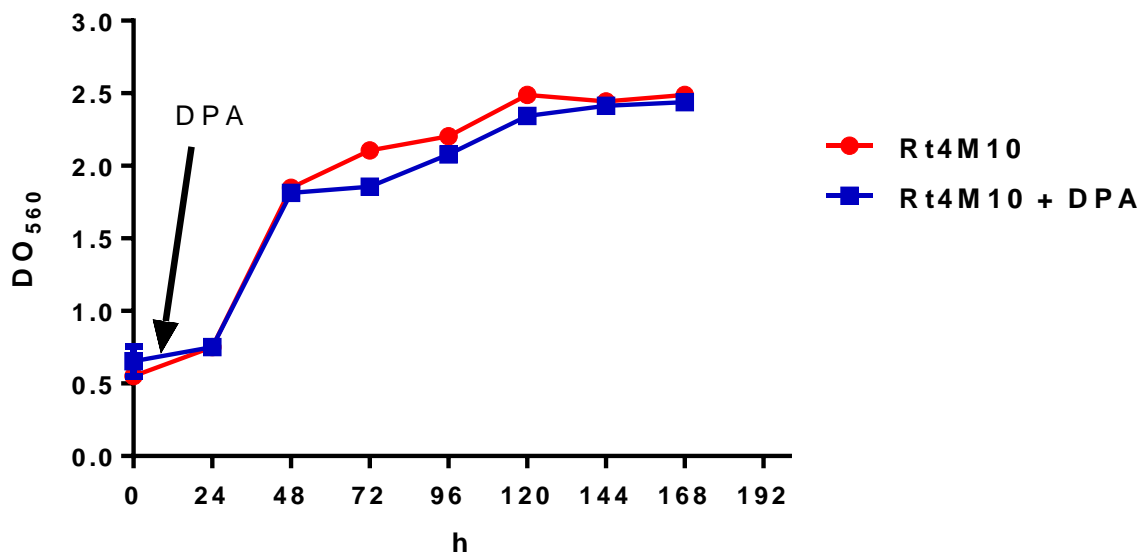


Figura 12- Curva de crecimiento de Rt4M10 expresada como DO_{560} de 0 a 168 h. RT4M10 se cultivó en un medio sin DPA (círculos rojos) y con DPA (cuadros azules). La flecha indica el momento en que se agregó DPA.

Según los diferentes tiempos muestreados el pellet celular fue intensificando el color naranja a partir de las 24 h. Esto se puede observar en la Figura 13, los pellets celulares que presentaron mayor intensidad de color fueron los comprendidos entre las 96 y 168 h aproximadamente. Con el agregado de DPA se observó que el pellet celular disminuyó la intensidad de su coloración a lo largo del tiempo. De los resultados antes mencionados, surgió la necesidad de determinar si la cantidad e identidad de los pigmentos producidos por Rt4M10 se modificaban, se mantenían o se cambiaban en los tiempos muestreados. Hasta el momento, hay poca información sobre carotenoides producidos por cepas de BL. Sólo una cepa de BL aislada de algas marinas ha sido informada como productora del pigmento

carotenoide diadinoxantina (C40), aunque en la base de datos de carotenoides procarióticos, no se ha reportado ningún carotenoide para esta cepa en particular (Nupur et al., 2016).

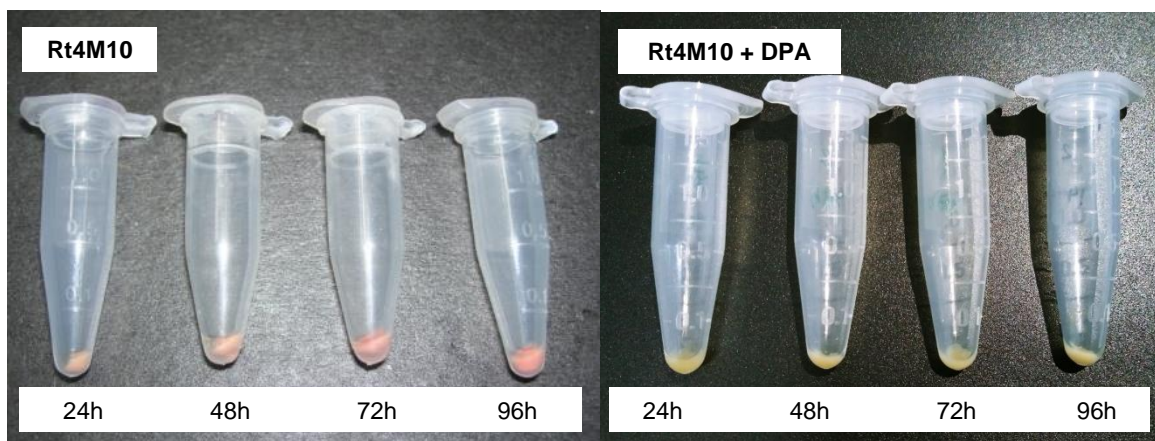


Figura 13- Coloración del Pellet celular de cultivos de Rt4M10 en medio LB sin y con el agregado de un inhibidor de la producción de carotenoides.

Se evaluó la producción de los pigmentos mediante espectrometría UV-visible a las 96 y 168 h, en las mismas condiciones que Salvadores (2012). Los espectros de absorción obtenidos (Figura 14 a y b) presentaron picos de absorción máximos característicos de pigmentos carotenoides. También se observó que de los dos tiempos muestreados, la mayor producción de carotenoides de acuerdo a las curvas obtenidas en el espectrofotómetro, se encontró a las 96 h (Figura 14 a). De forma cualitativa el área bajo la curva de los tres picos característicos de los carotenoides fue mayor a las 96 h respecto a las 168 h. Esto se confirmó después con los datos del HPLC.

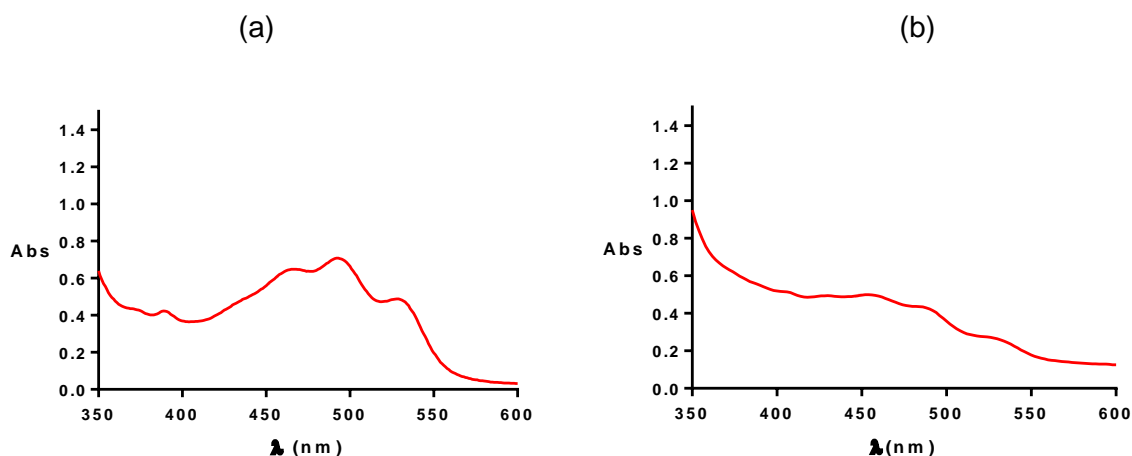


Figura 14- Espectro de absorción UV-vis del extracto acetona:metanol (7:3) de *B. licheniformis* Rt4M10. cultivo de 96 h (a); cultivo de 168 h (b).

1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES POR HPLC

El análisis por cromatografía líquida de alta precisión de los extractos de los cultivos a las 96 y 168 h arrojó diferentes perfiles cromatográficos (Figura 15 a y b). La presencia del inhibidor modificó los perfiles, obteniéndose también diferentes cromatogramas a las 96 y 168 h respecto a los observados en los apartados a y b de la Figura 15, posiblemente por la inhibición de la síntesis de precursores de carotenoides (Figura 15 c y d).

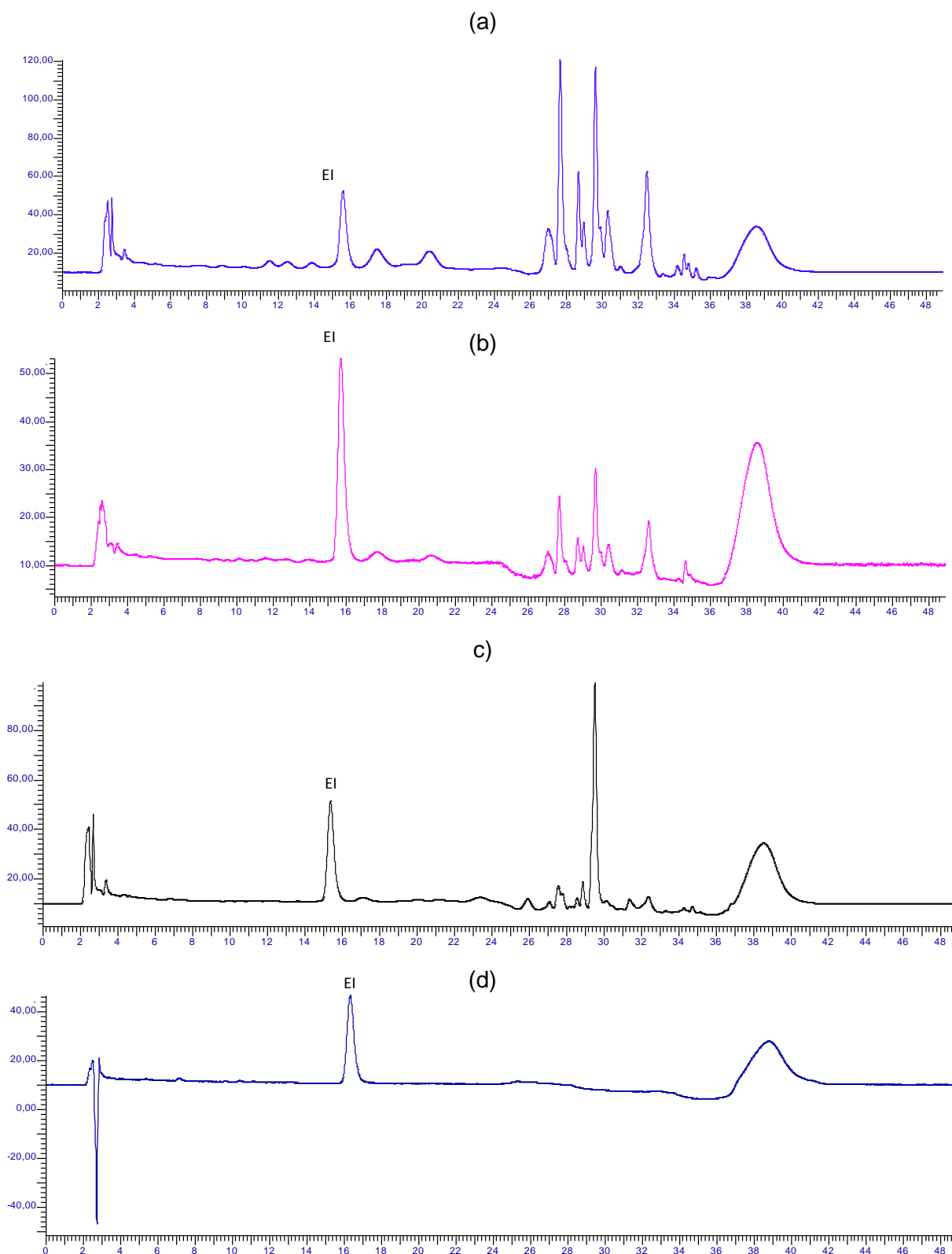


Figura 15- Cromatograma de HPLC del cultivo de *B. licheniformis* Rt4M10 a las 96 h (a); 168 h (b); 96 h+DPA (c); 168 h+DPA (d).

En colaboración con la Dra. Viviana Jofré, se analizaron los datos obtenidos para todos los tiempos muestreados (24, 48, 72, 96, 168 h) de las muestras crecidas sin y con el agregado de DPA. La identificación de los carotenoides por HPLC se muestra en la tabla 1. El análisis de los resultados permitió la identificación de 22 carotenoides provisionales con características espectrales definidas: (1) Epóxido de luteína, (2) Neocromo, (3) Luteoxantina, (4) Desconocido I, (5) Plectanixantina, (6) Fitoeno, (7) 13-Z-bacterioruberina, (8) Z-

criptoxantina, (9) 9-Z-violaxantina (diéster), (10) 2-hidroxitularodina, (11) Torularodina, (12) 9-Z-bacterioruberina, (13) Z-toruleno, (14) Bacterioruberina monoglicósido, (15) E-toruleno, (16) Bacterioruberina diglicósido, (17) Esferoidenona, (18) Espiriloxantina, (19) Desconocido II, (20) C50 - β -caroteno (Z), (21) Desconocido III, (22) Desconocido IV y el β -apocaroteno-8-al como estándar interno (EI). En la Figura 16 se observa el cromatograma por HPLC con la caracterización de cada pico del cultivo de Rt4M10 a las 96 h sin y con DPA.

Los compuestos identificados mostraron valores para el factor de retención (k) comprendidos entre 1,97 y 15,50. El factor de separación (α) varió hasta un 0,61 con respecto al valor normal. Los máximos de absorción del espectro identificados para cada pico corresponden a valores típicos de pigmentos carotenoides.

Tabla 1- Parámetros de la identificación cromatográfica de los carotenoides producidos por Rt4M10.

COMPONENTE	k	α	Picos de absorción máx/mín del espectro UV-Vis (nm)			%III/II	Q-radio	
Epóxido de luteína	1,97	1,61		417	444	468	20	
Neocromo	3,16	1,56		401	425	450	75	
Luteoxantina	4,94	1,50		400	424	450	90	
Desconocido I	7,43	1,14		444	468	498	71	
Plectanixantina	8,44	1,07		450	480	508	20	
Fitoeno	9,02	1,00		276	286	297	10	
13-Z-bacterioruberina	9,04	1,19	386	463	488	520	38	0,75
Z-criptoxantina	10,77	1,01	400	422	448	476	10	0,52
9-Z-violaxantina (diéster)	10,88	1,03	394	416	438	467	97	0,34
2-hidroxitularodina	11,16	1,01	389	468	495	528	49	0,13
Torularhodina	11,25	1,03		470	495	528	45	
9-Z-bacterioruberina	11,61	1,02	386	464	487	520	46	0,25
Z-toruleno	11,79	1,02	386	461	485	517	33	0,72
Bacterioruberina monoglicósido	12,05	1,02	389	465	492	527	39	0,14
E-toruleno	12,24	1,02	387	463	489	520	69	0,25
Bacterioruberina diglicósido	12,43	1,06	387	465	492	523	45	0,19
Esferoidenona	13,23	1,01		458	483	516	77	
Espiriloxantina	13,40	1,05	388	468	493	526	49	0,12
Desconocido II	14,04	1,01		457	484	514	47	
C 50 - β -caroteno (Z)	14,21	1,01	387	465	498	522	45	0,15
Desconocido III	14,31	1,08		458	485	517	48	
Desconocido IV	15,50	1,01		455	486	517	80	
β -apocaroten-8-al (EI)	7,05			462				

k: Factor de retención

α : Factor de separación

III/II: Relación de la absorbancia del pico III, y la del pico de absorción medio, designado II, tomando el mínimo entre los dos picos como línea de base.

Q-radio: Cociente entre la banda de picos cis (Z) y la banda II

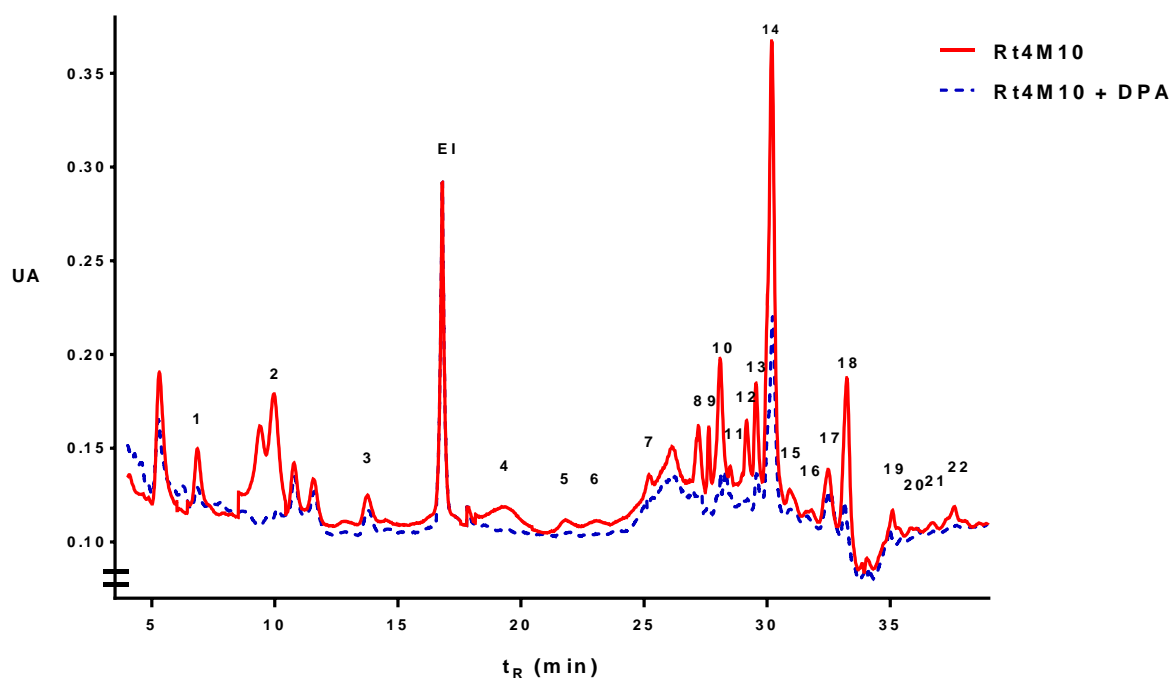


Figura 16- Cromatograma de HPLC del cultivo de *B. licheniformis* Rt4M10 a las 96 h sin DPA (línea roja) y con DPA a las 96 h (línea azul).

En la identificación de los carotenoides ciertos componentes no fueron detectados (nd) y otros fueron detectados (d) pero la concentración está por debajo del límite de cuantificación de la técnica analítica utilizada (Tabla 2). Del total de los compuestos identificados, 18 se encontraban en las muestras de los cultivos sin DPA, y solo 8 fueron detectados en las muestras con DPA.

La concentración de los carotenoides fue variando a lo largo del tiempo. La mayor cantidad y diversidad de compuestos identificados, se encontró a las 96 h (ver tabla 2). Luego del agregado de DPA, se observó una disminución en la concentración de cada componente para los mismos tiempos de muestreo, posiblemente por la inhibición de la fitoeno desaturasa, como era de esperarse.

La luteoxantina y la bacterioruberina monoglicósido son dos de los componentes que se detectaron a todos los tiempos muestreados, en ambos tratamientos. De los cuales el carotenoide que predominaba era la bacterioruberina monoglicósido, perteneciente al grupo bacterioruberina (BRu) de los C50, con concentraciones que van desde los 958 a los 1682 $\mu\text{g/L}$. Solo 4 picos no pudieron ser identificados (I-IV).

Tabla 2- Concentración de Carotenoides de Rt4M10 a todos los tiempos muestreados sin y con el agregado de DPA.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/L}$									
	24h	24h +DPA	48h	48h +DPA	72h	72h +DPA	96h	96h +DPA	168h	168h +DPA
Epóxido de luteína	nd	nd	nd	nd	205,04	nd	178,64	nd	170,45	nd
Neocromo	nd	nd	nd	nd	nd	nd	165,65	nd	158,25	nd
Luteoxantina	121,16	nd	134,39	115,82	152,53	125,04	156,56	88,27	160,33	86,15
Desconocido I	8,24	nd	13,71	nd	23,14	nd	53,6	nd	nd	nd
Plectaniaxantina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10,18	nd	nd	nd
Fitoeno	nd	nd	6,44	nd	13,71	nd	15,7	nd	nd	nd
13-Z-bacterioruberina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	44,1	nd	nd	nd

Z-criptoxantina	nd	nd	10,3	7,33	d	nd	42,94	nd	nd	nd
9-Z-violaxantina (diéster)	nd	nd	104,11	nd	137,85	nd	251,57	nd	237,81	nd
2-hidroxitolarodina	427,07	nd	422,45	nd	342,14	nd	978,39	61,47	453,90	26,52
Torularhodina	329,45	nd	340,7	92,01	d	nd	d	nd	nd	nd
9-Z-bacterioruberina	283,17	nd	226,05	nd	107,18	nd	362,27	nd	295,15	nd
Z-toruleno	nd	nd	170,33	nd	255,69	123,97	315,41	207,12	198,62	101,78
Bacterioruberina monoglicósido	958,66	117,73	1053,07	605,31	1094,87	1075,65	1529,63	1175,49	1682,05	904,02
E-torulene	nd	nd	nd	nd	77,16	nd	82,53	nd	60,12	nd
Bacterioruberina diglicósido	98,01	nd	108,28	nd	156,27	nd	329,59	50,24	405,58	10,04
Esferoidenona	112,1	nd	149,85	nd	207,44	nd	450,98	nd	462,31	nd
Espiriloxantina	nd	nd	485,23	nd	859,68	nd	1043,85	481,64	998,08	207,98
Desconocido II	nd	nd	nd	nd	nd	nd	158,64	nd	178,08	nd
C 50 -β-caroteno (Z)	nd	nd	nd	nd	145,67	nd	245,98	nd	308,12	nd
Desconocido III	nd	nd	nd	nd	62,6	nd	149,5	nd	162,89	nd
Desconocido IV	nd	nd	nd	nd	nd	nd	225,32	nd	245,31	nd

Los isómeros 13-Z-bacterioruberina y 9-Z-bacterioruberina fueron identificados a las 96 h en concentraciones de 44 µg/L y de 107 a 362 µg/L respectivamente. Este último se encontró en todas las fases de crecimiento bacteriano.

Las formas conjugadas de BRu fueron encontradas como BRu monoglicósido y diglicósido, aumentando progresivamente su concentración de las 24 a las 168 h. Carotenoides glicosilados, como BRu monoglicósido y BRu diglicósido, aumentan la rigidez de la membrana bacteriana y por lo tanto disminuye la permeabilidad al agua (Falb et al., 2008).

Z-Toruleno (TRu) fue identificado en ambos tratamientos, durante diferentes intervalos de tiempo, excepto a las 24 h. La forma E-TRu se detectó solo en ausencia de DPA, y en la fase estacionaria de crecimiento (72-168 h). Además, el derivado carboxilado de TRu, Torularhodina (TRo), se determinó en ausencia de DPA y al inicio del crecimiento bacteriano (24 y 48 h; 329 µg/L y 341 µg/L, respectivamente). En contraste con el tratamiento con DPA, TRo se encontró solo a las 48 h tal vez por el retraso en el crecimiento debido al agregado de DPA. Estudios de toxicidad realizados en ratas demostró que β-caroteno, TRo y TRU producidos por la levadura *Rhodotorula glutinis* podrían utilizarse como aditivos alimentarios inocuos (Latha et al., 2012).

Dentro de las xantófilas pertenecientes al grupo de C40 y en el tratamiento sin DPA, se encontraron: luteoxantina y esferoidenona a partir de las 24 h; Z-criptoxantina, 9-Z-violaxantina (diéster) y espiriloxantina a las 48 h; epóxido de luteína a partir de las 72 h y neocromo y plectaniaxantina a las 96 h, respectivamente. En la producción de carotenoides las xantófilas se vieron menos afectadas por el DPA.

En la figura 17 se graficó la distribución de los diferentes carotenoides de manera relativa a lo largo del tiempo. Esto demostró que la mayor diversidad de carotenoides se da a las 96 h y que, con el agregado de DPA, disminuyó la producción de ciertos carotenoides, pero con una producción constante en el tiempo de bacterioruberina monoglicósido.

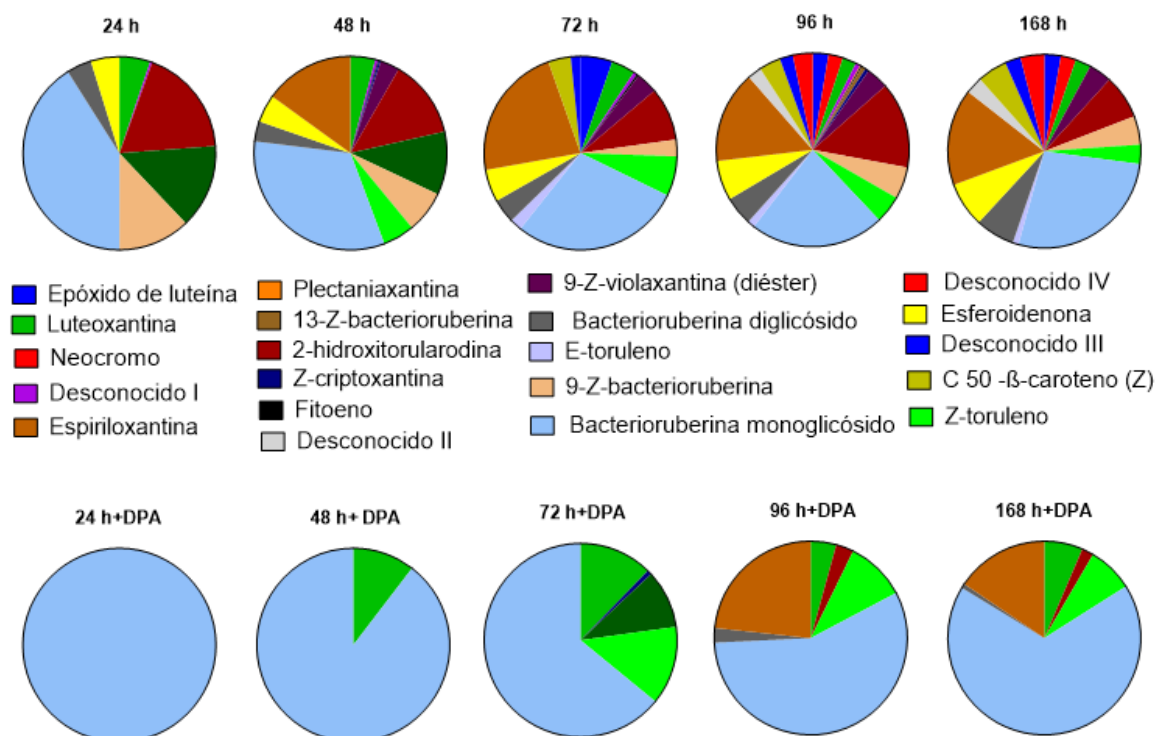


Figura 17- Cantidades relativas de los diferentes carotenoides producidos por Rt4M10, según los tiempos muestreados sin y con el agregado de DPA.

La Figura 18 muestra la cantidad total de cada compuesto para cada tratamiento a las 96 h, tiempo en el cual las bacterias presentaron la mayor producción de carotenoides. El tratamiento con DPA disminuyó un 70% la producción de carotenoides. Los componentes predominantes en el tratamiento control fueron: 2-hidroxitorularodina (978.39 µg/L), bacterioruberina monoglicósido (1529.63 µg/L), espiriloxantina (1043.85 µg/L).

Comparando dos de los tiempos muestreados (Figura 19), los carotenoides identificados a las 96 h se encontraban en mayor cantidad que a las 168 h exceptuando ciertos compuestos como la bacterioruberina monoglicósido, la bacterioruberina diglicósido y C50 β-caroteno (Z). Algunos de los componentes producidos a las 96 h no fueron detectados a las 168 h.

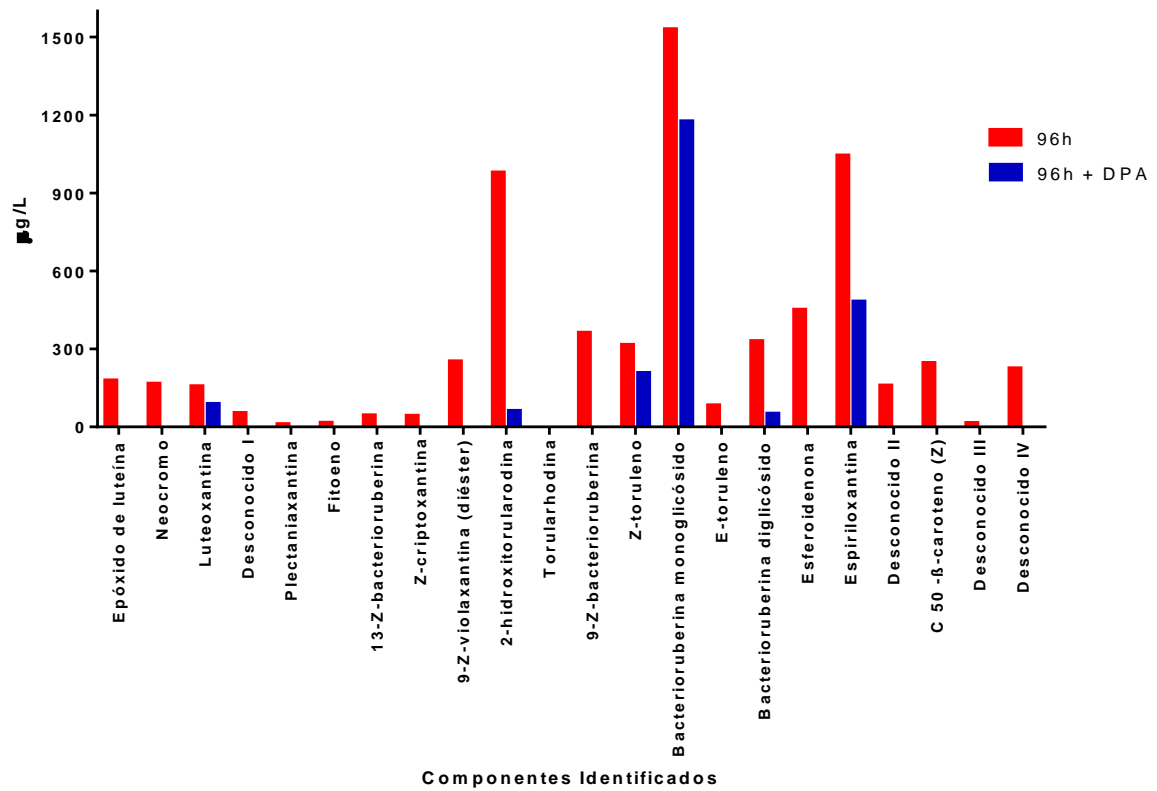


Figura 18- Concentración e identificación de los componentes en Rt4M10, por HPLC a las 96 h con y sin el agregado del inhibidor DPA

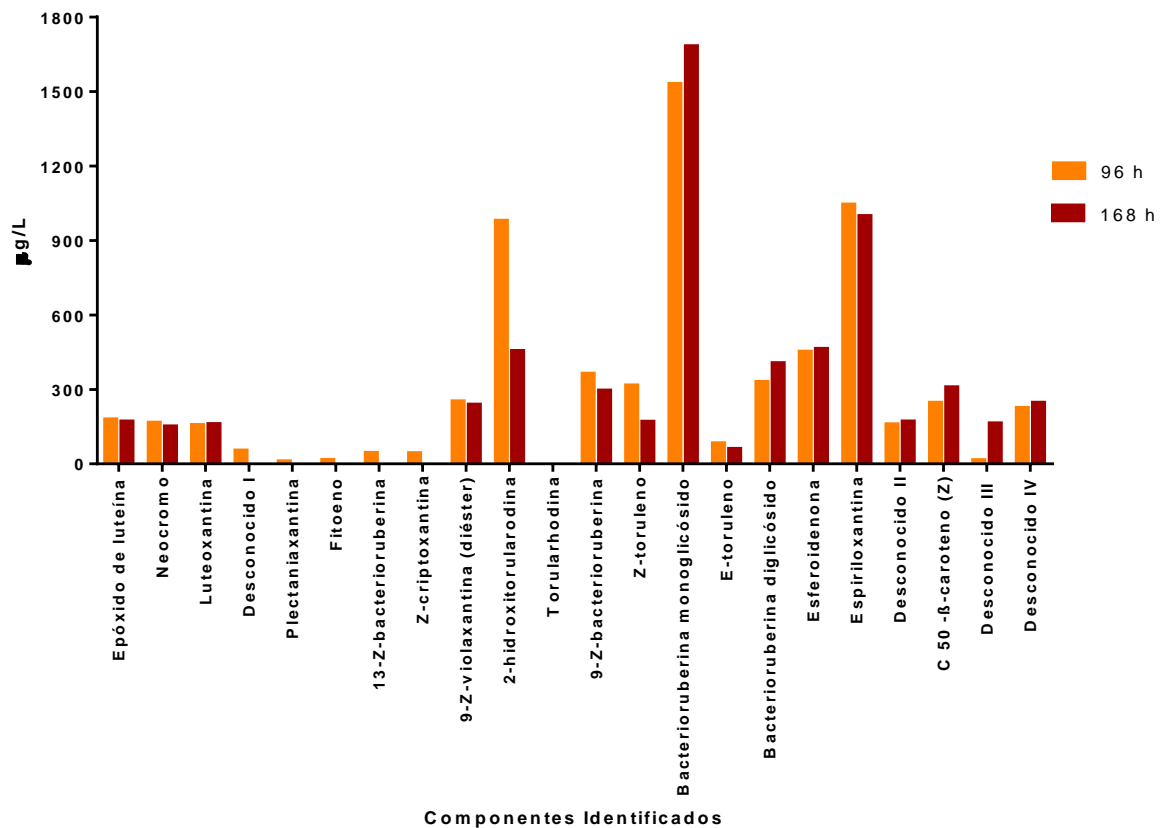


Figura 19- Concentración de los diferentes carotenoides identificados a las 96 y 168 h del cultivo de Rt4M10

2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VIVO*: SENSIBILIDAD AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La Figura 20 describe el comportamiento de la cepa a las 96 h, expresada como la cantidad de UFC/mL que sobrevivieron después de 1 y 3 h de exposición a las diferentes concentraciones de H_2O_2 (0 - 0,025 - 0,05 - 0,075 y 0,1 M). Luego de 1 h, el tratamiento control demostró la mayor cantidad de UFC/mL en todas las concentraciones de H_2O_2 , a las 3 h disminuyó el número de UFC/mL pero la variación no fue significativa. La supervivencia en el tratamiento de los cultivos con DPA disminuyó considerablemente en los dos momentos muestreados, resultando a las 3 h en niveles menores a las 2×10^5 UFC/mL. A concentraciones de H_2O_2 entre 0 y 0,025 M la supervivencia en los tratamientos control (1h y 3h) y con el inhibidor a 1h de exposición no demostró una variación significativa pero si hay una variación en el caso del tratamiento con DPA a las 3h. A partir de una concentración de 0,025 M comienza una disminución de las UFC/mL luego de 1h de exposición en el tratamiento con DPA. Sin embargo, en la concentración de H_2O_2 0,05 M la supervivencia (UFC/mL) disminuyó notablemente en los tratamientos con el inhibidor a 1h y 3h de exposición mientras que a partir de las 3h Rt4M10 no sobrevivió. Por lo tanto se seleccionó esta concentración como el valor mínimo a partir del cual Rt4M10 veía afectado su desarrollo después de 1 h de exposición al H_2O_2 . Esto se puede observar en el gráfico 21 donde se compara la supervivencia de Rt4M10 con y sin DPA y con la incorporación del peróxido a la 1 h y 3 h.

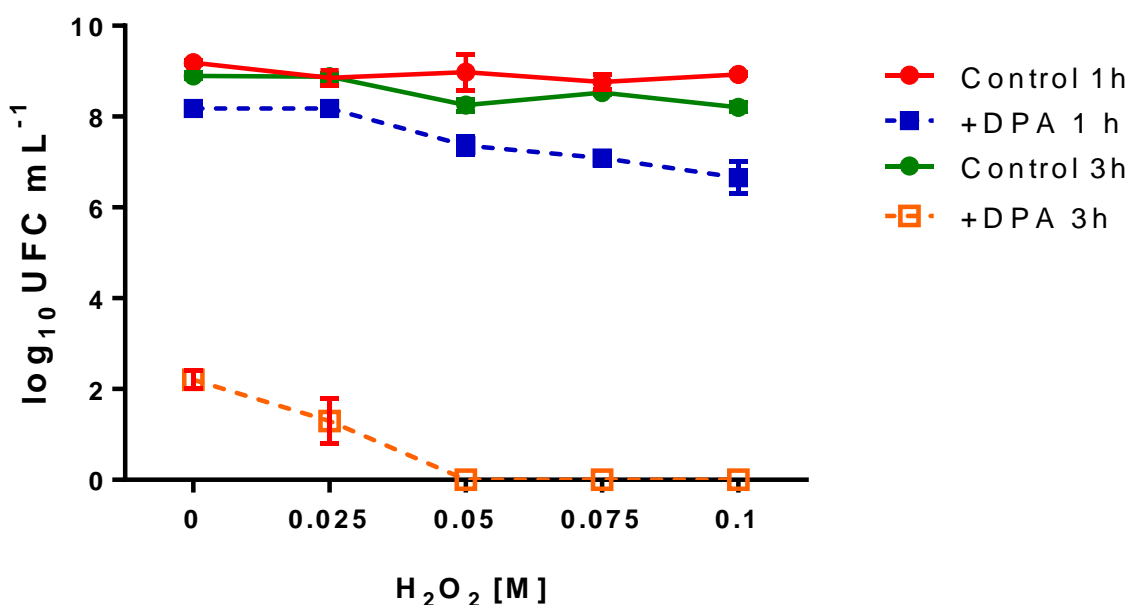


Figura 20- Supervivencia de Rt4M10 en presencia de concentraciones crecientes de H_2O_2 a 1 h y 3 h después del agregado del oxidante.

Los valores del recuento en placa (UFC/mL) luego del agregado de H_2O_2 0,05 M, a las 96 h de iniciado el cultivo, se muestran en la Figura 21. Allí se observa una disminución en la supervivencia de Rt4M10 a la 1 h y 3 h del agregado de H_2O_2 y en el tratamiento con el inhibidor de la producción de carotenoides las UFC/mL disminuyen notablemente demostrando una actividad protectora de los carotenoides frente al estrés oxidativo, para un desarrollo normal de Rt4M10.

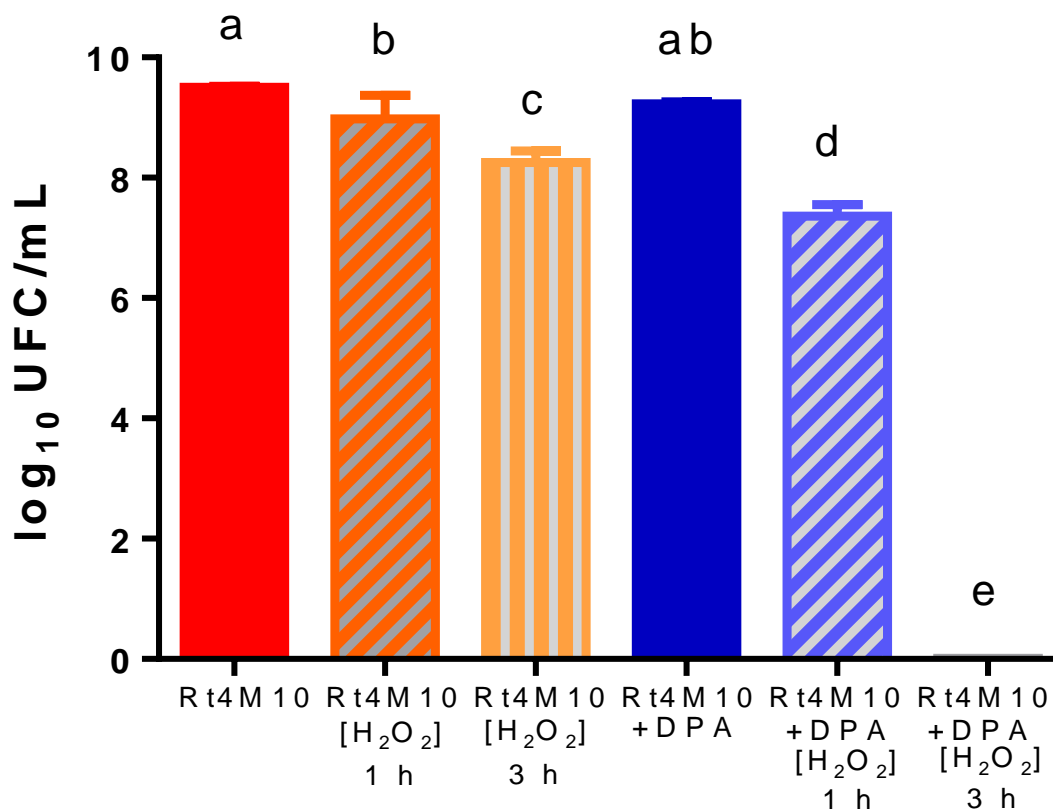


Figura 21- Supervivencia de Rt4M10 a las 96 h (barra roja) con el agregado de DPA (barra azul) y, en presencia de 0,05 M de H₂O₂ (barras rayadas)

3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

La cuantificación de la capacidad antioxidante (CAO) de los compuestos totales extraídos a las 48 y 168 h, momento en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento bacteriano, en cultivos con DPA y sin DPA. Por la técnica de ORAC Hidrofílico (ORAC_H Figura 21 a) para el tratamiento control, a las 48 y 168 h, la CAO fue de 2036±288 y 1251±18 μM TE, respectivamente. Mientras que los valores de CAO para el tratamiento con DPA fueron de 96±14 y 4.6±2.2 μM TE, a los dos tiempos propuestos.

Luego en el tratamiento control la CAO por ORAC lipofílico (ORAC_L Figura 22 b), arrojó valores de 4369±20 y 2408±119 μM TE a las 48 y 168 h, respectivamente. Para el tratamiento con DPA los resultados fueron 1350±189 y 1807±531 μM TE, a las 48 y 168 h. Estos resultados muestran que los extractos lipofílicos e hidrofílicos con DPA poseen una menor capacidad antioxidante contra el radical peroxilo que aquellos que no tienen el inhibidor. Aunque la DPA es capaz de inhibir la síntesis de carotenoides, al incorporarla en un momento exponencial de crecimiento, las bacterias tuvieron la posibilidad de sintetizar compuestos carotenoides, en menor concentración que los cultivos control, lo que causaría la actividad antioxidante observada en estas muestras.

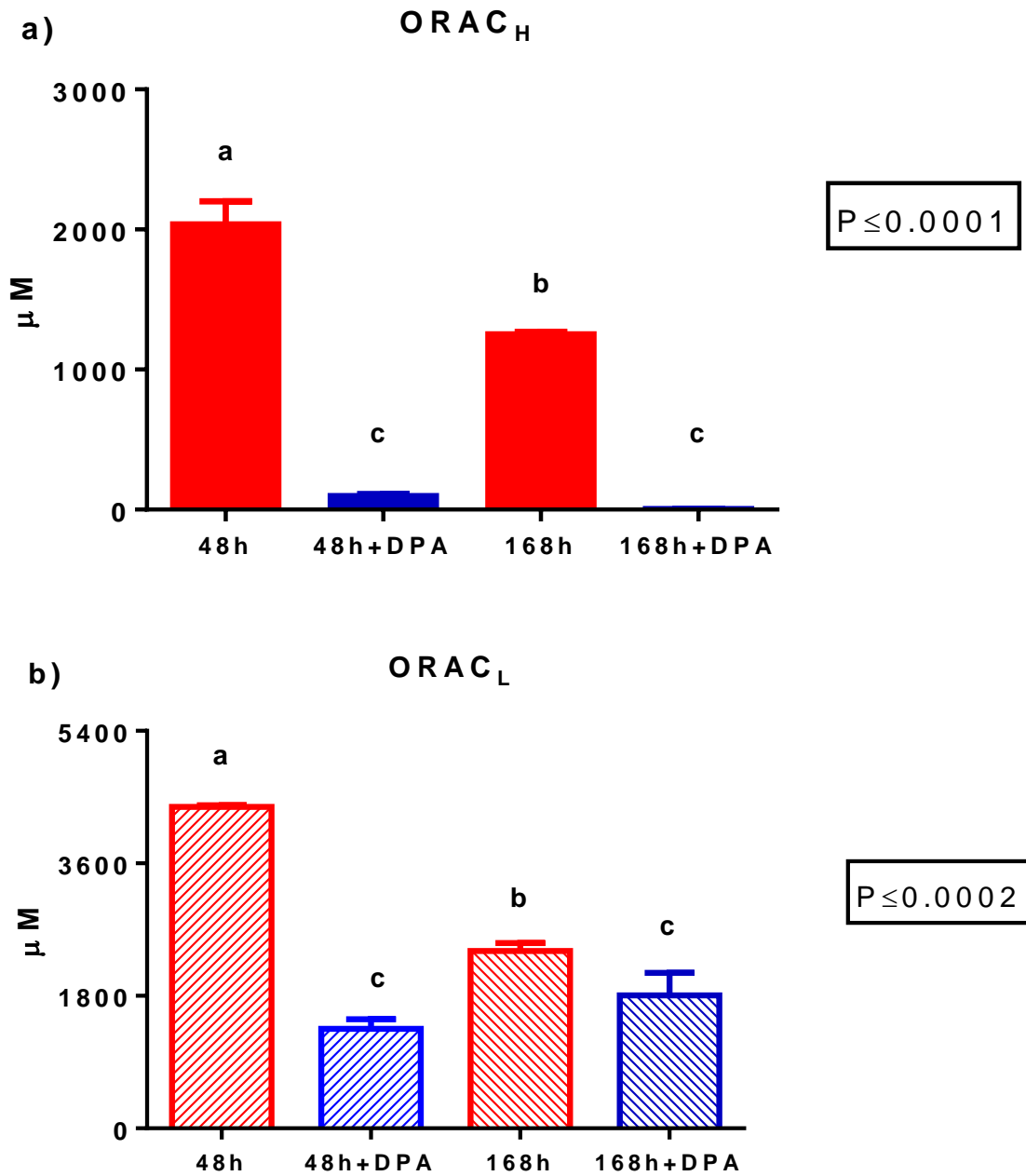


Figura 22- Capacidad antioxidante de los carotenoides de Rt4M10 a las 48 y 168 h sin y con el agregado de DPA para compuestos hidrofílicos (a) y para compuestos lipofílicos (b).

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

Los resultados de la tesis permitieron confirmar la hipótesis planteada: *B. licheniformis* Rt4M10, cultivada en medio de cultivo líquido bajo condiciones controladas produce carotenoides con actividad antioxidante.

Se identificaron los carotenoides producidos por Rt4M10 mediante HPLC en las condiciones experimentales utilizadas. Se encontraron pigmentos carotenoides que en su mayoría pertenecen al grupo de los C50, pero también se encontraron carotenoides de C40, lo que sugiere que la vía de síntesis se bifurca a partir del fitoeno. Estos compuestos, se produjeron principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo se requieren más estudios sobre la identificación de carotenoides producidos por Rt4M10 con técnicas como la Espectrometría de masas o la Espectrometría de resonancia magnética nuclear. La aplicación de DPA afectó la producción de carotenoides y también el crecimiento celular de Rt4M10. Este inhibidor nos permitió evaluar el rol de los carotenoides tanto *in vitro* como *in vivo*.

La cepa Rt4M10 *in vivo* demostró la actividad antioxidante de los carotenoides intracelulares frente a un oxidante débil como el H₂O₂. La capacidad antioxidante *in vitro* de los carotenoides podría tener gran importancia para la industria alimentaria. Los resultados obtenidos permiten comprender otro mecanismo presente en Rt4M10 que aumenta su potencial biotecnológico y permite continuar con otras líneas de investigación.

Estos resultados fueron obtenidos en el marco de una beca para alumnos avanzados del consejo interuniversitario (CIN) con el tema: Producción de carotenos con capacidad antioxidante por *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Bacillus licheniformis* Rt4M10. Finalmente fueron publicados con título "Carotenoid profile produced by *Bacillus licheniformis* Rt4M10 isolated from grapevines grown in high altitude and their antioxidant activity". Ana C. Cohen, Elisa Dichiara, Viviana Jofré, Andrea Antonioli, Rubén Bottini, Patricia Piccoli. International Journal of Food Science & Technology 2018. 53: (12) 2697-2705

BIBLIOGRAFÍA

- ADEWUMI, G. A., OGUNTOYINBO, F. A., ROMI, W., SINGH, T. A., AND JEYARAM, K. (2014). Genome subtyping of autochthonous *Bacillus* species isolated from Iru, a fermented *Parkia biglobosa* seed. *Food Biotechnol.* 28, 250–268. doi: 10.1080/08905436.2014.931866
- AGRITOS-MARTÍNEZ J. M. (2011). Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis* Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis doctoral.
- ALOU, M. T., RATHORED, J., KHELAIPIA, S., MICHELLE, C., BRAH, S., DIALLO, B. A., ET AL., (2015). *Bacillus rubiinfantis* sp. nov. strain mt2T, a new bacterial species isolated from human gut. *New Microbes New Infect.* 8, 51–60. doi: 10.1016/j.nmni.2015.09.008
- ANTONIOLLI, A., FONTANA, A., PICCOLI, P., BOTTINI, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry* 178. p 172-178
- ASCHOFF, J.K., KAUFMANN, S., KALKAN, O., ET AL., (2015). In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, p 578–587.
- BERTRAM J. S. (1999) Carotenoids and gene regulation. *Nutr Rev* 57: p 182–191
- BEYERSDORFF D. (2003) La medicina natural en la lucha contra el cáncer, 1ª Ed.
- BOROWITZKA MA. (1997). Algae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
- BRITTON, G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9: 551-558
- CALEGARI-SANTOS, R., DIOGO R. A, DOMINGOS FONTANA J., BORDIN BONFIM T. M. (2016). Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions. p 9 doi:10.1007/s00284-015-0974-8
- CALVO P. Y ZÚÑIGA D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1). ISSN 1726-2216.
- CARBONNEAU, M.A., MELIN, A.M., PERROMAT, A. & CLERC, M. (1989). The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 275, p 244–251.
- CHRISTEN W. G., MANSON J. E., GLYN R.J., GAZIANO J. M., SPERDUTO R.D., BURING J. E. Y HENNEKENS, C. H. (2003) A randomized trial of beta carotene and age-related cataract in US Physicians. *Arch Ophthalmol*, 121: p 372-378.
- COHEN A. C., BOTTINI R., PICCOLI P. (2011). Diphenylamine, Tungstate and Nitrogen modified ABA production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from roots of *Vitis Vinifera*. *Biocell.* p 113
- CORRALES RAMÍREZ, L.C., SÁNCHEZ LEAL, L.C., ARÉVALO GALVEZ, Z.Y., MORENO BURBANO, V.E. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*; 12 (21): p 165–178

- DEMMIG-ADAMS B. Y ADAMS III W.W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298: p 2149-2153.
- DEMMING-ADAMS B., GILMORE AM., ADAMS III WW. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: p 2149-2153.
- DIRETTO G., AL-BABILI S., TABAZA R., PAPACCHIOLI V., BEBER P. Y GIULIANO G. (2007). Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini- pathway. *PLoS One*, 2, p 350.
- DOBBELAERE S., CROONENBORGH S., THYS A., PTACEK D., OKON Y., VANDERLEYDEN J. (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fert. Soils* 36: p 284-297
- ELSHAGHABEE FMF, ROKANA N, GULHANE RD, SHARMA C AND PANWAR H (2017) *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 8: p 1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490
- EONSEON J., POLLE JEW., LEE HK., HYUN SM. Y CHANG M. (2003). Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application. *Microbiol. Biotechnol.* 13(2): p 165-174.
- FALB, M., MÜLLER, K., KÖIGSMAYER, L., ET AL. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12, p 177–196.
- FRASER P. D. Y BRAMLEY P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 43: p 228-265
- GAO, L.Y., GROGER, R., COX, J.S., BEVERLEY, S.M., LAWSON, E.H. AND BROWN, E.J. (2003) Transposon mutagenesis of *Mycobacterium marinum* identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival. *Infect Immun* 71, p 922–929.
- GHANI, M., ANSARI, A., AMAN, A., ZOHRA, R. R., SIDDIQUI, N. N., AND QADER, S. A. U. (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak. J. Pharm. Sci.* 26, p 691–697
- GIULIANO G. TRABAZA R., DIRETTO G., BAYER P. Y TAYLOR M. A. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol*, 26, p 139-145.
- GUERIN M., HUNTLEY M. E., OLAIZOLA M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotech.* 21(5): p 210-216
- HARTMANN A., HUREK T. (1988) Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Gen Microbiol*, 134: p 449-455.
- HEIDER S. A. E, PETERS-WENDISCH P, WENDISCH V. F., BEEKWILDER J., BRAUTASET T. (2014) Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: p 4355-4368
- HONG, H. A., DUC LE, H., AND CUTTING, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, p 813–835. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.001
- KARNAUKNOV, V. N. (1990). Carotenoids: Recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B p 1-20
- KHANEJA, R. ET AL., (2009). Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology.* p 1-2 doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04590.

KI, Y., KIM, W., CHO, H., AHN, K., CHOI, Y., KIM, D. (2014). The effect of probiotics for preventing radiation-induced morphological changes in intestinal mucosa of rats. *J Korean Med Sci*; 29: p 1372–8.

KOTB, E. (2015). Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, p 34–43. doi: 10.1134/S000368381501007

KOZDROJ, J., TREVOR, J. T. y VAN ELSAS, J. D. (2004) Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem* 36: p 1775-1784.

KRINSKY, N. I. (1979) Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl Chem*, 51: p 649-660

LATHA, B.V. & JEEVARATANM, K. (2012). Thirteen-week oral toxicity study of carotenoid pigment from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50, p 645–651.

LI, H., DENG, Z., LIU, R., LOEWEN, S., TSAO, R. (2013) Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H₂O₂-induced cell death in H9c2. *Food Chemistry* 136 (2): p 878-888

LICHTENTHALER, H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: p 47-65

LIU, G.Y., ESSEX, A., BUCHANAN, J.T., DATTA, V., HOFFMAN, H.M., BASTIAN, J.F., FIERER, J. AND NIZET, V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* 202, p 209–215.

LORENZ, R.T. y CYSEWSKI, G.R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: p 433-435.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, STAHL DA, CLARK DP (2012) Archaea. In: Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP (eds) *Brock biology of microorganisms*, 13th edn. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, p 556–583

MANDELLI, F., MIRANDA, V.S., RODRIGUES, E., MERCADANTE, A.Z. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, p 1781–1790.

MAPARI, S. A. S., NIELSEN, K. F., LARSEN, T. O., FRISVAD, J. C., MEYER, A. S., THRANE, U. (2005) Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigment as potential natural food colorants. *Curr. Op. in Biotech.* 16: p 231-238

MCLAREN, D.S. y FRIGG, M. (2001). Sight and life manual on vitamin A deficiency disorders (VADD). Task Force SIGHT AND LIFE. Basel, Switzerland. [Grupo de Trabajo "Ver y Vivir". Basilea, Suiza.] <http://www.sightandlife.org> p 6.

MISAWA, N., YAMANO, S., LINDEN, H, DE FELIPE, M. R., LUCAS, M., IKENAGA, H. y SANDMANN, G. (1993). Functional expresión of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosíntesis gene crtI in transgenis plants showing an increase of beta- carotene biosynthesis activity and resistance to the bleaching herbicide norflurazon. *Plant J.*, 4, p 833-840.

MOELLER, R., HORNECK, G., FACIUS, R. AND STACKEBRANDT, E. (2005) Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol* 51, p 231–236.

- MOHAMMED, Y., LEE, B., KANG, Z., AND DU, G. (2014). Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Microb. Cell Fact.* 13, p 102. doi: 10.1186/s12934-014-0102-7
- NAI-GANG, R., WEI, C, BO, P, MECHANISM LX. (2013) clinical application of live *Bacillus licheniformis* preparation. *Chin J Clin Pharmacol*; 29: p 716–7.
- NIYOGI, K.K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: p 333-359.
- NUPUR, L.N.U., VATS, A., DHANDA, S.K., RAGHAVA, G.P., PINNAKA, A.K. & KUMAR, A. (2016). ProCarDB: a database of bacterial carotenoids. *BMC Microbiology*, 16, 96.
- NUR, I., STEINITZ, Y. L., OKON, Y., HENIS, Y. (1981) Carotenoid composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. *J Gen Microbiol*, 122: p 27-32
- OUATTARA, H. G., REVERCHON, S., NIAMKE, S. L., AND NASSER, W. (2017). Regulation of the synthesis of pulp degrading enzymes in *Bacillus* isolated from cocoa fermentation. *Food Microbiol.* 63, p 255–262. doi: 10.1016/j.fm.2016. 12.004
- PEREZ-FONS, L., STEIGER, S., KHANEJA, R., BRAMLEY, P. M., CUTTING, S. M., SANDMANN, G., FRASER, P. D. (2011) Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Bioch Biophys Acta (BBA) - Molec Cell Biol of Lipids* 1811(3): p 177-185
- PRIEST F, G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41: p 711–753
- PRIOR, R.L., HOANG, H.A., GU, L., ET AL., (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, p 3273–3279.
- PROVVEDI, R., KOCINCOVA, D., DONA, V., EUPHRASIE, D., DAFTE, M., ETIENNE, G., MANGANELLI, R. AND REYRAT, J.M. (2008) SigF controls carotenoid pigment production and affects transformation efficiency and hydrogen peroxide sensitivity in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 190, p 7859–7863.
- RANJANA, S. y NIVEDITA, S. (2017) Probiotic potential of *Bacillus licheniformis* isolated from indigenous traditional fermented beverage. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. Vol. 16(1), p 153-157
- RAO, K. P., CHENNAPPA, G., SURAJ, U., NAGARAJA, H., RAJ, A. C., y SREENIVASA, M. Y. (2015). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghumbased traditional fermented food. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, p 146–156. doi: 10.1007/s12602-015-9186-6
- REDMAN, M.G., WARD, E.J., PHILLIPS, R.S. (2014). The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. *Ann Oncol*; 25: p 1919–29.
- RICHMOND, A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. Appl. Phycol.* 12: p 441-451.
- ROY, R. N., MISRA, R. V., MONTANEZ, A. (2002) Decreasing reliance on mineral nitrogen yet more food. *Ambio* 31: p 177-183
- SALOMON, M.V., BOTTINI, R., DE SOUZA FILHO, G.A., COHEN, A.C., ET AL., (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*, 151, p 359–374.

- SALVADORES, C. (2012). Estudio del gen *Ctrl* en *Pseudomonas fluorescens*". Argentina: Tesis de Lic. Biología Molecular, UNSL, San Luis.
- SANDMANN, G. y FRASER, P.D. (1993) Differential inhibition of phytoene desaturase from diverse origins and analysis of resistant cyanobacterial mutants. *Z Naturforsch* 48c, p 307–311.
- SCHIEDT, K. y LIAAEN-JENSEN, S. (1995). Isolation and analysis. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.). *Carotenoids Vol. 1A: Isolation and Analysis*, p 81-103. Birkhauser Verlag, Basel.
- SCHWEIGGERT, R. M. y CARLE, R. (2016) Carotenoid Production by Bacteria, Microalgae, and Fungi. *Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology*, First Edition. Edited by Agnieszka Kaczor and Malgorzata Baranska. Cap. 12 p 234
- SHU-XU DUA, YONG-RUI JIAB, SI-QI RENA, XIAO-JUN GONGA, HONG TANGA, WAN-SHUI WUA, LI-MING SUNA. (2018). The protective effects of *Bacillus licheniformis* preparation on gastrointestinal disorders and inflammation induced by radiotherapy in pediatric with central nervous system tumor. *Advances in Medical Sciences* 63. p 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.09.005>
- STAHL, W. y SIES, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease Carotenoids and Dietary Lipids*. 1740 (2): p 101-107.
- STEIGER, S., PEREZ-FONS, L., FRASER, P.D., SANDMANN, G. (2012). Biosynthesis of a novel C30 carotenoid in *Bacillus firmus* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 113, p 888–895.
- STEPHENS, C. (1998). Bacterial sporulation: A question of commitment?. *Current Biology*. 8: p 45-48.
- TAKANO, H. (2016). The regulatory mechanism underlying light-inducible production of carotenoids in non phototrophic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, p 1264–1273. doi: 10.1080/09168451.2016.1156478
- TANAKA, K., TAKANAKA, S., y YOSHIDA, K. I. (2014). A second-generation *Bacillus* cell factory for rare inositol production. *Bioengineered* 5: p 331–334. doi: 10.4161/bioe.29897
- TANG, F.Y. (2012) The silver bullet for cancer prevention: Chemopreventive effects of carotenoids *BioMedicine (Netherlands)* 2(3): p 117-121
- TODAR, K. (2005). *Todar's online textbook of bacteriology: The genus Bacillus*. Department of Bacteriology, University of Wisconsin.
- TOJO, R., SUAREZ, A., CLEMENTE, M.G., DE LOS, R.C., MARGOLLES, A., GUEIMONDE, M., ET AL., (2014). Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*; 20: 15163–76.
- WEBER, R.W., ANKE, H., DAVOLI, P. (2007). Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi). *Journal of Chromatography A*, 1145, p 118–122.
- YANG, Y., YATSUNAMI, R., ANDO, A., ET AL., (2015). Complete biosynthetic pathway of the C50 carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaea on *Haloarcula japonica*. *Journal of Bacteriology*, 197, p 1614–1623.

YE, X., AL-BABILI, S., KLOTI, A., ZHANG, J., LUCCA, P., BEYER, P. y POTRYKUS, I. (2000). Engineerin the provitamin A (beta- carotene) biosinthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science, 287, p 303-305.