



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Evaluación de las propiedades antioxidantes,  
antibacterianas y la estabilidad de la violaceína recombinante  
Obtenida bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”**

**TESIS**

**PRESENTA**

**I.B.T. RAQUEL DANIELA RAMÍREZ SANTIAGO**

**DIRIGIDO POR**

**DR. ALDO AMARO REYES**

**CO-DIRIGIDO POR**

**DR. JOSÉ UTRILLA CARRERI**

**CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO.**

**FEBRERO DE 2024**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## Facultad de Química

### Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

“Evaluación de las propiedades antioxidantes, antibacterianas y la estabilidad de la violaceína recombinante obtenida bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”

#### Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias y Tecnología de alimentos

#### Presenta

I.B.T. Raquel Daniela Ramírez Santiago

#### Dirigido por

Dr. Aldo Amaro Reyes

#### Co-dirigido por

Dr. José Utrilla Carreri

Dr. Aldo Amaro Reyes

Presidente

Dr. José Utrilla Carreri

Co-director

Dr. Carlos Regalado González

Vocal

Dra. Diana Issell Sandoval Cárdenas

Vocal

Dra. Rocío Campos Vega

Vocal

\_\_\_\_\_  
Dr. José Santos Cruz  
Director de la Facultad de Química

\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de Investigación y posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Febrero, 2024

## Resumen

Los colorantes se encuentran dentro de los aditivos más utilizados en la industria alimentaria. Se dividen en colorantes naturales y sintéticos, siendo estos últimos los más empleados por la industria gracias a su versatilidad. Sin embargo, se ha demostrado que son dañinos para la salud del consumidor y el ambiente, por lo que la industria biotecnológica ha buscado alternativas en fuentes naturales tales como vegetales, animales, minerales y algunos microorganismos. Los colorantes a partir de fuentes vegetales poseen limitaciones de disponibilidad mínima, tratamientos costosos e inestabilidad, por ello se ha considerado la producción de colorantes a partir de modelos bacterianos mediante técnicas que permiten el incremento de biomasa y una mayor estabilidad de los pigmentos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar las propiedades antioxidantes, antibacterianas y la estabilidad al pH, temperatura y luz de la violaceína recombinante (pAJM.336Vio) producida por *Escherichia coli* BW25113 bajo la influencia de un sistema de electrofermentación. Se estimó la relación entre la aplicación de distintos voltajes (0.0, 0.5, 3.0, 4.0 y 5.0 V) y concentración de mediador riboflavina (0 y 150 micromol) usando un diseño factorial completo sobre la producción de violaceína por *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo el efecto de un sistema de electrofermentación. La aplicación de 5 V en un sistema de electrofermentación produjo 243.03 mg de violaceína por litro. Se evaluaron las propiedades antioxidantes de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación mediante el método de ABTS dando como resultado 1763.24  $\mu$ M de Trolox equivalentes y un porcentaje de inhibición del radical de 55.38% siendo al menos 2 veces mayor que la violaceína obtenida bajo las mismas condiciones de fermentación sin la aplicación de voltaje. La actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* no mostró diferencia significativa entre la violaceína que la violaceína obtenida bajo las mismas condiciones de fermentación sin la aplicación de voltaje y el tratamiento. Se caracterizó la estabilidad de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación con respecto al pH, temperatura y luz. La violaceína producida bajo el efecto del sistema de electrofermentación mostró mayor estabilidad a pH ácidos así como a temperatura y la presencia de luz comparada que la violaceína obtenida bajo las mismas condiciones de fermentación sin la aplicación de voltaje. El sistema de electrofermentación moduló positivamente la producción así como la capacidad antioxidante y estabilidad de la violaceína recombinante por *Escherichia coli* BW25113.

**Palabras clave:** Violaceína, electrofermentación, ingeniería metabólica, antioxidante, bisindol.

## Abstract

Dyes are among the most widely used additives in the food industry. They are divided into natural and synthetic colorants, with the latter being more commonly used by the industry due to their versatility. However, it has been demonstrated that synthetic colorants are harmful to consumer health and the environment. As a result, the biotechnological industry has sought alternatives in natural sources such as vegetables, animals, minerals, and some microorganisms. Colorants derived from plant sources have limitations in terms of availability, expensive treatments, and instability. Therefore, the production of colorants from bacterial models using techniques that increase biomass and enhance pigment stability has been considered. The objective of this research was to evaluate the antioxidant and antibacterial properties, as well as the stability under different pH, temperature, and light conditions, of recombinant violacein (pAJM.336Vio) produced by *Escherichia coli* BW25113 under the influence of an electrofermentation system. The relationship between the application of different voltages (0.0, 0.5, 3.0, 4.0, and 5.0 V) and the concentration of the mediator riboflavin (0 and 150 micromol) was estimated using a complete factorial design on the production of violacein by *Escherichia coli* BW25113 transformed with the plasmid pAJM.336Vio under the effect of an electrofermentation system. The application of 5 V in an electrofermentation system produced 243.03 mg of violacein per liter. The antioxidant properties of recombinant violacein obtained under the effect of an electrofermentation system were evaluated using the ABTS method, resulting in 1763.24  $\mu$ M Trolox equivalents and a radical inhibition percentage of 55.38%. This was at least 2 times higher than the violacein obtained under the same fermentation conditions without the application of voltage. The antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* showed no significant difference between the violacein obtained under the same fermentation conditions without the application of voltage and the treatment. The stability of recombinant violacein obtained under the effect of an electrofermentation system with respect to pH, temperature, and light was characterized. The violacein produced under the electrofermentation system showed greater stability at acidic pH, temperature, and light compared to the violacein obtained under the same fermentation conditions without the application of voltage. The electrofermentation system positively modulated the production, antioxidant capacity, and stability of recombinant violacein by *Escherichia coli* BW25113.

**Key words:** Violacein, electrofermentation, metabolic engineering, antioxidant, bisindol.

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reportó detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



---

I.B.T Raquel Daniela Ramirez Santiago

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
INDICE DE CONTENIDO	ii
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUCCIÓN	10
2 ANTECEDENTES	12
2.1 Colorantes en la industria	12
2.1.1 Colorante sintético púrpura y sus alternativas animal y vegetal	12
2.2 Producción de pigmentos provenientes de microorganismos	15
2.3 Fermentación con microorganismos	18
2.3.1 Metabolismo bacteriano	19
2.3.2 Ingeniería metabólica	21
2.4 Bis-indoles alcaloides	21
2.4.1 Biosíntesis de los bis-indoles microbianos	22
2.5 Violaceína	23
2.5.1 Actividad antioxidante de la violaceína	26
2.5.2 Actividad antibacteriana de la violaceína	26
2.6 Crecimiento y metabolismo de <i>Escherichia coli</i>	28
2.6.1 Biología sintética y líneas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	29
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> BW25113	30
2.6.3 Plásmido pAJM.336Vio	31
2.6.4 Producción de violaceína a partir del plásmido pAJM.336Vio en <i>Escherichia coli</i> BW25113	32
2.7 Sistema de electrofermentación	34
2.7.1 Fermentación anódica	37

3	JUSTIFICACIÓN	40
4	OBJETIVOS	41
5	METODOLOGÍA	42
5.1	Material <b>biológico</b>	42
5.2	Pre-inóculo	42
5.3	Sistema de electrofermentación	43
5.4	Métodos analíticos	43
5.4.1	Extracción y determinación de violaceína	43
5.4.2	Determinación de biomasa	44
5.4.3	Actividad antibacteriana	44
5.4.4	Actividad antioxidante	44
5.4.5	Estudio de estabilidad de la violaceína	45
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1	Efecto de la aplicación de voltajes y concentración de mediador redox riboflavina sobre el rendimiento de violaceína por Escherichi coli transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.	46
6.2	Actividad antimicrobiana de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema electrofermentación.	50
6.3	Capacidad antioxidante de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.	52
6.4	Caracterización de la estabilidad de la violaceína recombinante a diferentes condiciones al pH, temperatura y luz, obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.	53
6.4.1	Estabilidad de la violaceína con diferentes pH, temperaturas y en ausencia y presencia de luz.	53
7	CONCLUSIÓN	57
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Combinaciones de colorantes sintéticos para la formación del color púrpura en productos alimenticios	16
Tabla 2.	Ingesta máxima recomendada y efectos en la salud	16
Tabla 3.	Colorantes provenientes de microorganismos	18
Tabla 4.	Optimización de la producción de pigmentos	19
Tabla 5.	Limitantes de las fermentaciones en pigmentos bacterianos	21
Tabla 6.	Microorganismos productores de violaceína y su actividad biológica	25
Tabla 7.	Medios de cultivo para la producción de violaceína un pigmento púrpura	27
Tabla 8.	Aplicaciones de la electrofermentación en la industria en microorganismos Aplicaciones de la electrofermentación en la industria en microorganismos	39
Tabla 9.	Niveles de la concentración de mediador redox y voltaje evaluados mediante diseño de superficie de respuesta para el sistema de electrofermentación.	48
Tabla 10.	Análisis de varianza del rendimiento de la violaceína con respecto a la riboflavina y el voltaje	49
Tabla 11.	Producción y rendimiento de violaceína por <i>Escherichia coli</i> BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio en un sistema de electrofermentación a diferentes voltajes y concentración de mediador redox.	50
Tabla 12.	Análisis de varianza de un experimento de superficie de respuesta.	50
Tabla 13.	Capacidad antioxidante de la violaceína obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación medida por el método de ABTS.	54

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Molécula de L-triptófano convirtiéndose en indol piruvato imina, adaptada de Alkhalaf <i>et al.</i> , (2016)	24
Figura 2.	Estructura molecular del ácido cromopirrólico adaptada de Alkhalaf <i>et al.</i> , (2016)	24
Figura 3.	Estructura de la violaceína adaptada de Choi <i>et al.</i> , (2015)	26
Figura 4.	Mecanismo antimicrobiano de la violaceína adaptada de Cauz <i>et al.</i> , (2019)	29
Figura 5.	Plásmido de la violaceína pAJM.336Vio	34
Figura 6.	Ruta metabólica de la violaceína en <i>Escherichia coli</i> BW25113 con el plásmido pAJM.336Vio	36
Figura 7.	Intercambio de electrones en un SBE, adaptada de Moscoviz <i>et al.</i> , (2016)	37
Figura 8.	Rendimiento de la violaceína producida por <i>Escherichia coli</i> BW25113 transformada por el plásmido pAJM.336Vio en un sistema de electrofermentación bajo el efecto del voltaje (0-5 V) y riboflavina (0 y 150 $\mu$ M). Los datos representan la media de los ensayos $\pm$ desviación estándar (n=3).	51
Figura 9.	Halos de inhibición de <i>Bacillus Subtillis</i> por la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema electrofermentación. Los datos representan la media de los ensayos $\pm$ desviación estándar (n=3).	53
Figura 10.	Porcentaje de degradación de la violaceína control recombinante a diferentes temperaturas (T°), pH y tiempo (h). Los datos representan la media de los ensayos (n=3).	56
Figura 11.	Porcentaje de degradación de la violaceína recombinante bajo un sistema de electrofermentación con el tratamiento de 5V a diferentes temperaturas (T°), pH y Tiempo (h). Los datos representan la media de los ensayos (n=3).	56

Figura 12. Estructura molecular del ácido cromopirrónico adaptada de Alkhalaf *et al.*, (2016) Efecto de la presencia y ausencia de la luz en los mejores parámetros para la estabilidad de la violaceína. En la gráfica (A) podemos observar el % de degradación la violaceína en presencia de luz. La grafica (B) muestra el % de degradación de la violaceína. 58

## **DEDICATORIA**

A mi Familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a la universidad Autónoma de Querétaro y a CONAHCYT, por el apoyo durante la elaboración de este proyecto. De igual manera agradezco a mis padres y hermanas, quienes me han dado su apoyo incondicional y a mis amigos; Kristell Sánchez, Diana Montoya, Yair Ovando, Odette Flores, Lizbeth Bravo y Rafael Madrigal, quienes estuvieron presentes durante los buenos y malos momentos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes representan frescura, seguridad y valor nutricional del producto. La procedencia de estos aditivos ha provocado que los consumidores cambien o dejen de consumir ciertos productos, ya que cada vez son más conscientes acerca de los beneficios o repercusiones que poseen (Sen *et al.*, 2019). El uso de colorantes en los alimentos es importante por varias razones, una de ellas es la compensación de la pérdida de color debido a la exposición a cambios de temperatura, luz, aire, humedad y condiciones de almacenaje. Otra de las razones es para corregir las variaciones naturales en el color y por último es agregar color a aquellos alimentos que son incoloros (Sigurdson *et al.*, 2017).

Dentro de los pigmentos empleados encontramos a dos clasificaciones de acuerdo con la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos por sus siglas en inglés): colores certificados y colores exentos de la certificación, los cuales provienen de fuentes naturales (Simon *et al.*, 2017). Los colores certificados se crean de manera sintética y son los más empleados en la industria debido a su versatilidad y bajo costo de producción los cuales se subdividen en: permitidos y no permitidos (Nigam & Luke, 2016; Rovina *et al.*, 2016). La obtención de pigmentos a partir de productos vegetales representa un reto para la industria de alimentos, ya que son costosos, inestables con otros aditivos y su calidad es deficiente en la mayoría de los casos. A este reto se le suma el hecho de que muy pocos colorantes son aprobados por la FDA. Es por esta razón que se deben de buscar alternativas para la producción de colorantes naturales (Sen *et al.*, 2019). Otras fuentes para la obtención de pigmentos naturales son: minerales y bacterias, siendo esta última la opción más atractiva para la producción de colorantes gracias a su cualidad fermentativa que permite generar grandes cantidades de biomasa a un bajo costo. Además, que los pigmentos bacterianos han demostrado tener actividad Biológica (Kumar *et al.*, 2018). Para obtener mayores beneficios de esta cualidad se necesita de herramientas como: la ingeniería metabólica y técnicas de fermentación (Choi *et al.*, 2015). Estas dos áreas de investigación se encargan de evaluar las rutas metabólicas biosintéticas, bajo distintas técnicas y condiciones para crear una buena fermentación, que significa obtener el producto deseado de manera

cualitativa y cuantitativa, en un sistema electroquímico (Schievano *et al.*, 2016; Sen *et al.*, 2019).

Es por esta razón que en este proyecto se evaluaron las propiedades antioxidantes, antibacterianas y la estabilidad al pH, temperatura y luz de la violaceína producida por *Escherichcia coli* transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo la influencia de un sistema de electrofermentación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Colorantes en la industria

El uso de colorantes como aditivos data de la época de los egipcios cuando se empleaban los colores naturales obtenidos de las plantas, minerales y los animales. El primer registro del uso de la pigmentación natural ocurrió en el año 300 A.C. con la coloración del vino (Coultate & Blackburn, 2018). En el año de 1856, el descubrimiento del primer tinte o colorante orgánico por William Henry Perkin; una sustancia purpura obtenida del árbol de quina y que denominó Mauve, incrementó el uso de colorantes sintéticos en la pigmentación (Chatragadda & Dufossé, 2021). El uso de colorantes naturales ha representado un desafío para la industria ya que sufren modificaciones en el color por exposición a la luz, calor y por reacciones indeseables al estar en contacto con otros aditivos alimentarios. Las principales fuentes de las que se obtienen colorantes naturales son las plantas, animales, y algunos derivados de minerales, lo que conlleva a la reciente problemática de la cosecha excesiva, que da lugar a la posible extinción del recurso natural. Una fuente natural poco conocida son los colorantes generados a partir de microorganismos como los carotenoides (Muhamad *et al.*, 2018).

En este sentido, los colorantes sintéticos han ganado importancia en los últimos años, en la industria alimentaria predominan principalmente los pigmentos amarillo, rojo, azul, azul-violeta y rojo-violeta (Sun *et al.*, 2021). El abuso del uso de colorantes o pigmentos sintéticos posiciona a este aditivo como el más dañino para la salud. El reemplazo de los pigmentos rojos y amarillos es sencillo debido a su alta prevalencia y amplia diversidad química; caso contrario a lo que sucede con los pigmentos azul, azul-violeta, violeta y rojo-violeta debido a la poca prevalencia en la naturaleza y la alta inestabilidad lo que provoca que la intensidad generada sea menor a la de los colorantes sintéticos (Coultate & Blackburn, 2018).

Entre los efectos negativos de los colorantes sintéticos se encuentran la alteración del sistema inmune, presencia de compuestos carcinogénicos (4-aminobifenilo, 4-aminoazobenceno y bencidina), hipersensibilidad en niños, mal funcionamiento del hígado y disminución de la actividad de enzimas responsables de la degradación y

absorción de nutrientes. A pesar de los efectos que ocasionan en la salud humana, los colorantes sintéticos prevalecen en el mercado debido a su fácil empleo y accesible costo de producción (Amchova *et al.*, 2015).

Se estima que para el año 2023 el mercado de colorantes naturales alcanzará cifras alrededor de 5.12 billones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 5.7 %. Las principales causas del crecimiento del mercado están relacionadas al efecto de los colorantes sintéticos en la salud y el ambiente. (Rana *et al.*, 2021).

### 2.1.1 Colorante sintético púrpura y sus alternativas animal y vegetal

Los elaboradores (manufactureros) de comida emplean colorantes para mejorar la apariencia de sus productos. Este es un carácter tan importante que provocó el uso de colorantes sintéticos por encima de los naturales (Dilrukshi *et al.*, 2019). Estos compuestos sintéticos están formados por derivados de carbón y la mayoría posee un grupo azo (Rovina *et al.*, 2016).

Actualmente para que un colorante sea aditivo este debe de cumplir con dos principios: el aditivo no debe ser dañino para la salud y debe ser claro con respecto a sus compuestos para no confundir al consumidor (Wrolstad & Culver, 2012).

El color púrpura se encuentra dentro de la gama de tonalidades entre el azul y el rojo y es un color no definido en el espectro de luz visible. Los productos que más utilizan el pigmento púrpura son: productos de panadería, confitería, jaleas, mermeladas y bebidas como jugos tipo néctar y gaseosas, dulces y gelatinas (Sigurdson *et al.*, 2017). En la **Tabla 1** se observan los colorantes sintéticos que se emplean para la elaboración del color púrpura en productos con sabor a uva.



**Tabla 1.** Combinaciones de colorantes sintéticos para la formación del color púrpura en productos alimenticios

Producto	Colorantes artificiales
Jugo: Vida jugo sabor uva de Jumex	rojo allura (rojo 40, E123) y azul brillante (azul 1, E133)
Gaseosa: Fanta de uva de Coca-cola	rojo allura AC (rojo 17, E129) y azul brillante (azul 1, E133)
Dulce: Nerds de La compañía de dulces de Willy Wonka	azul brillante (azul 1, E133), Índigo carmín o 16 indigotina (azul 2, E132), rojo allura (rojo 40, E123)
Gelatina: Gelatina de uva de D' Gari	eritrosina (rojo 14, E127) y azul brillante (azul 1, E133)

En la **Tabla 2** muestran los efectos provocados al sobrepasar la ingesta máxima recomendada de los colorantes que se encuentran en la **Tabla 1**.

**Tabla 2.** Ingesta máxima recomendada y efectos en la salud

Colorante	Ingesta máxima recomendada	Efectos en la salud humana
Rojo allura (rojo 40, E123)	7 mg/kg por peso al día	Hipersensibilidad
Rojo allura AC (rojo 17, E129)	7 mg/kg por peso al día	Hipercinesia
Índigo carmín o indigotina (azul 2, E132),	5 mg/kg por peso al día	No muestra efectos dañinos a la salud
Azul brillante (azul 1, E133)	6 mg/kg por peso al día	Nefrocalcinosis

El ácido carmínico (E120) es un colorante natural de color púrpura o rojo, que se puede obtener a partir un insecto conocido como *Dactylopius coccus*, se recomienda ingerir 5 mg/kg por día (Meloan *et al.*, 1971).

El extracto del pigmento se da mediante extracción acuosa alcohólica adicionando aluminio o calcio. Esta técnica de extracción ha provocado que este pigmento ocasione hipersensibilidad como: angioedema, disnea y broncoespasmos (Silva *et al.*, 2022).

Las antocianinas son flavonoides responsables de generar colores como: el azul, rojo y morado que se logran apreciar en: flores, frutas, verduras y otros tejidos vegetales. Estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y su extracción proviene del tejido vegetal (Cira *et al.*, 2020). La obtención del pigmento púrpura es mediante los derivados de antocianinas acilados que se encuentran naturalmente en: repollo morado, papa y zanahoria moradas, al reaccionar con un pH de 5 (Li *et al.*, 2019). La interacción de antocianinas con iones metálicos en un medio ácido ha mostrado una intensificación de este pigmento, dando como resultado tonos violetas (Sigurdson *et al.*, 2017). A pesar de que este compuesto es una de las alternativas para la sustitución de los compuestos sintéticos que forman el color púrpura, sigue estando en desventaja, pues hay escasez de materia prima para estos flavonoides (Li *et al.*, 2019).

## 2.2 Producción de pigmentos provenientes de microorganismos

Los microorganismos que producen pigmentos naturales son: bacterias, micro algas y hongos. Los pigmentos obtenidos varían en la composición química, función, estabilidad y solubilidad, y se clasifican de acuerdo con sus variaciones (Chatragadda & Dufossé, 2021).

La biotecnología se ha encargado de evaluar la producción de pigmentos a partir de microorganismos mediante dos enfoques fundamentales, el primero de ellos; encontrar nuevas fuentes productoras de pigmentos y mejorar su capacidad de producción. El segundo, es obtener rendimientos mejorados y consistentes mediante el mejoramiento genético o por medio de la optimización de parámetros fermentativos de fuentes ya conocidas (Venil *et al.*, 2013).

En la **Tabla 3** podemos observar varios de los microorganismos que son capaces de producir pigmentación, ya sea de manera natural o con ayuda de la inserción de un gen codificante.

**Tabla 3.** Colorantes provenientes de microorganismos

<b>Pigmento</b>	<b>Color</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Microorganismo (M.O.)</b>
Cantaxantina	De naranja a rosa oscuro	Colorante alimentario para tinción de aves y salmón.	<i>Haloferax alexandrinus</i>
Astaxantina	Rojo anaranjado	Colorante aprobado para la tinción de pescados y otros alimentos.	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>
Prodigiosina	Rojo	Colorante alimentario aplicado en bebidas carbonatadas y algunos lácteos.	<i>Serratia marcescens</i>
Ficocianina	Azul	Colorante natural conocido como "Luna azul" empleado en confitería y helados.	<i>Pseudomonas</i>
Violaceína	Púrpura (morado)	Tiene potencial para ser empleado en las industrias: farmacéutica, textil y cosmética.	<i>Chromobacterium violaceum</i>
Riboflavina	Amarillo	Aplicación en cereales, comida para infantes y bebidas energéticas.	<i>Ashbya gossypii</i>
$\beta$ -caroteno	Rojo anaranjado	Se utiliza para teñir alimentos rojos o naranjas como jugos y dulces.	<i>Blakeslea trispora</i>

La producción de pigmentos en bacterias y la optimización del proceso, como se muestra en la **Tabla 4**, está sujeta a diversas limitaciones como: pH del medio, temperatura del proceso, agitación, aireación, sustrato y la relación de carbono y nitrógeno (C/N) (Lee & Kim, 2015; Venil *et al.*, 2020).

**Tabla 4.** Optimización de la producción de pigmentos

Microorganismo (M.O)	Pigmento	Parámetros responsables de la optimización de producto	Autor
<i>Dietzia natronolimnaea</i> HS-1	Cantaxantina	Cambios en; pH, concentración de sustrato (suero de leche) y adición de extracto de levadura aumentaron la producción de cantaxantina (2871± 76 µg/L).	(Khodaiyan <i>et al.</i> , 2007)
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosina	Fuente de carbono y energía: sacarosa y glicina la producción de prodigiosina aumento de 273.3 a 2423.39 mg/L.	(Gul <i>et al.</i> , 2020)
<i>Duganella</i> B2	Violaceína	Las concentraciones de nitrato de potasio, L-triptófano y del sustrato (jugo de carne) aumentaron 4.8 veces la producción de la violaceína.	(Wang <i>et al.</i> , 2009)

Las técnicas de extracción de pigmentos a partir de microorganismos son sumamente importantes. La selección de la técnica va desde la elección del solvente para la extracción hasta el análisis final del producto para medir su calidad y eficacia. A diferencia de las plantas los pigmentos obtenidos de bacterias son: más estables, rentables, no se ven afectados por los cambios de estación y son fáciles de extraer, y el medio de cultivo es más agradable con el medio ambiente (Chatragadda *et al.*, 2019).

Las desventajas que presentan la producción y aplicación de pigmentos o colorantes bacterianos son: dificultades económicas, ya que la elaboración de medios específicos para su producción es costosa, al igual que los métodos de fermentación (Venil *et al.*, 2020). Otra desventaja presente es, la inestabilidad de los compuestos debido a la exposición de luz, temperaturas altas, oxígeno y pH, siendo estos factores externos los culpables de la presencia de malos olores y sabores no deseados en el producto final (Sen *et al.*, 2019).

### 2.3 Fermentación con microorganismos

La fermentación es una de las técnicas más antiguas empleadas por el humano para la producción y conservación de alimentos (Narsing. *et al.*, 2017). Este proceso bioquímico es un proceso metabólico, en el cuál; compuestos orgánicos sirven tanto como donadores y aceptores de electrones. Esto sucede durante un proceso anaeróbico para mantener los niveles de ATP (Civelek *et al.*, 2019).

La tecnología de la fermentación de microorganismos ha cambiado de enfoque, de degradación a biosíntesis de metabolitos. Los microorganismos utilizan la síntesis de metabolitos para la acumulación de productos metabólicos como: ácidos orgánicos, vitaminas y bisindoles, entre otros compuestos (Feng *et al.*, 2018).

La versatilidad de esta técnica ha permitido que se aplique a casi todos los aspectos de la vida cotidiana, pues su aplicación va desde la producción de alimentos hasta el desarrollo de medicamentos (Rago *et al.*, 2019).

Las fermentaciones empleadas para la producción de pigmentos en bacterias son conocidas como: fermentación en estado sumergido (por sus siglas en inglés SmF) y fermentación en estado sólido (por sus siglas en inglés SSF).

La aplicación de estas tecnologías depende del tipo de cepa y el pigmento que se desea extraer (Heer & Sharma, 2017). Estas técnicas de fermentación poseen varias desventajas las cuales hacen difícil su aplicación y se pueden observar en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Limitantes de las fermentaciones en pigmentos bacterianos

<b>Fermentación en estado sumergido (SmF)</b>	<b>Fermentación en estado-sólido (SSF)</b>
Baja Productividad	No es fácil reproducir la técnica a nivel industrial
Alto costo de producción	Parámetros como: pH, humedad, calor y condición de nutrientes, son difíciles de controlar
Complejidad del medio (medios específicos)	Acumulación de calor.
	El producto final cuenta con muchas impurezas lo que incrementa el costo de recuperación

Los procesos actuales de fermentación en la industria se ven limitados a ser aplicados debido a sus elevados costos de producción. La mayoría de estas limitaciones se encuentran en las operaciones río arriba como: el mantenimiento de condiciones estériles y la obtención de sustancias purificadas sumando un total del 50 % del costo final (Rago *et al.*, 2019).

### 2.3.1 Metabolismo bacteriano

Las rutas metabólicas de la fermentación bacteriana dependen de varios parámetros como: la composición del medio, pH, temperatura y la acumulación de productos finales (Moscoviz *et al.*, 2016).

El metabolismo bacteriano involucra la degradación, crecimiento, reproducción, envejecimiento y finalmente la muerte del microorganismo.

Durante estas etapas existe la producción y alteración de metabolitos. El primer paso para llevar a cabo el metabolismo, consta en censar el ambiente en el que se encuentra la bacteria, para dar lugar a la señalización de síntesis de proteínas. Después los substratos se convierten en: nutrientes, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y azúcares, para el crecimiento del microorganismo (Narsing. *et al.*, 2017).

El metabolismo bacteriano está controlado por factores que incrementan los costos de producción, los cuales son fuentes de nitrógeno, vitaminas, minerales, amortiguadores, factores quelantes y agentes antiespumantes (Rago *et al.*, 2019). El incremento de productos metabólicos depende de la cantidad de microorganismos presentes. A la par de este proceso de producción, nacen vías metabólicas y se producen metabolitos secundarios como: pigmentos, antibióticos, toxinas y hormonas. Al controlar las condiciones fermentativas podemos obtener productos deseados a menor costo, mayor rendimiento y mejor calidad (Pailliè *et al.*, 2020).

El potencial oxido reductor (ORP por sus siglas en inglés) del medio o también conocido como ORP extracelular, es un factor que está relacionado con la regulación metabólica bacteriana (Civelek *et al.*, 2019). Este factor corresponde a reacciones termodinámicamente favorables y espontáneas, las cuales limitan la obtención del compuesto, mediante fermentaciones tradicionales (Bhagchandani *et al.*, 2020).

La producción de metabolitos secundarios como: fenoles, quinonas, bisindoles, flavonoides, policetonas, péptidos, terpenoides, esteroides y alcaloides. Estos compuestos muestran actividades terapéuticas como: anticancerígenos, inmunosupresores, antimicrobianos, antioxidantes y antitumorales (Numan *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Ingeniería metabólica

Cuando una bacteria genera algún tipo de pigmentación, es debido a un mecanismo de defensa para evitar el daño por los rayos UV. Muchos de estos pigmentos son conocidos por ser antioxidantes, lo que estimula la respuesta inmune y la inhibición

del cáncer. Estas características pueden ser sobre expresadas para su aprovechamiento en distintas industrias (Narsing R. *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2021). La ingeniería de vías metabólicas es una de las áreas de la biotecnología que se encarga de incrementar la producción de uno o más compuestos o cambiar una propiedad celular (Bilal *et al.*, 2018). La ingeniería metabólica estudia las rutas biosintéticas para la producción de pigmentos, logrando identificar los genes que bloquean o ayudan a generar el color deseado. Una vez identificado los genes responsables estos se clonan y con ayuda de la tecnología de ADN recombinante se incrementa la producción de pigmentos (Sigurdson *et al.*, 2017). Una estrategia para llevar a cabo la sobreexpresión de genes es mediante el entendimiento de las limitaciones en sistemas celulares. De esa forma se adicionan o eliminan genes en un medio determinado, ya que, los organismos tienden a responder ante el ambiente al que están expuestos mediante la señalización celular que regula las rutas metabólicas. Esta característica de adaptación permite que los recursos para determinadas tareas sean desviados de acuerdo con las necesidades del organismo. Este proceso tiene un costo proteómico y una forma para reducir este problema es mediante el uso y aplicación de modelo genómicos a escala acompañados con conjuntos experimentales para establecer un modelo teórico mínimo necesario para sostener el crecimiento en una condición específica (Lastiri *et al.*, 2020).

## 2.4 Bis-indoles alcaloides

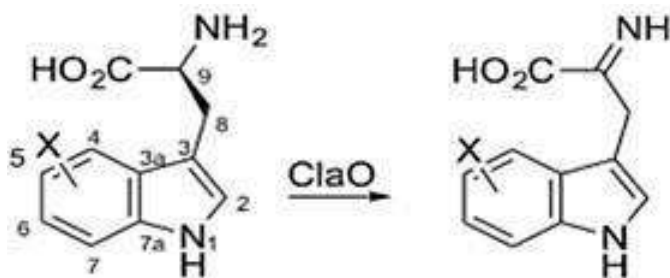
Los bisindoles son alcaloides provenientes del metabolismo bacteriano que se derivan de la dimerización oxidativa de dos monómeros de triptófano. Estos productos bacterianos son compuestos bioactivos, ya que poseen propiedades anticancerígenas, antibacterianas, antivirales y antioxidantes (Alkhalaf *et al.*, 2016).

### 2.4.1 Biosíntesis de los bis-indoles microbianos

Los primeros tres pasos para síntesis de los bisindoles a partir de L-triptófano se comparten entre diferentes vías.

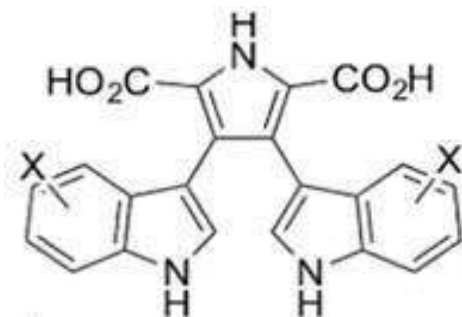


1.- En la **Figura 1** se observa el primer paso compartido de la ruta de producción de bisindoles. La molécula L- triptófano se oxida por la flavoproteína oxidasa (ClaO por sus siglas en inglés) generando indol piruvato imina (IPA por sus siglas en inglés) (Alkhalaf *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Molécula de L-triptófano convirtiéndose en indol piruvato imina, adaptada de Alkhalaf *et al.*, (2016)

2.- Consecutivamente, dos moléculas de enamina IPA se acoplan mediante la enzima con contenido de hemo (ClaD) para formar la **Figura 2** que es la molécula del ácido cromopirrónico (CPA por sus siglas en inglés). El CPA es un intermediario común de la ruta biosintética de los bisindoles (Alkhalaf *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Estructura molecular del ácido cromopirrónico adaptada de Alkhalaf *et al.*, (2016)

3.- Una vez concluidos los dos primeros pasos compartidos, las rutas se dirigen a todas las direcciones posibles (Alkhalaf *et al.*, 2016).

## 2.5 Violaceína

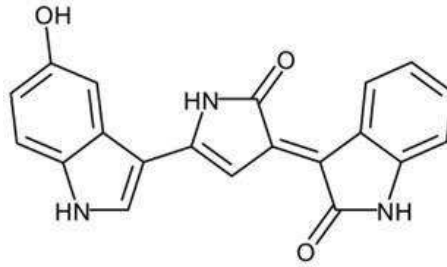
Recientemente se ha descubierto la producción de violaceína, un bisindol, en varios sistemas microbianos **Tabla 6**, este pigmento es de color morado, y su biosíntesis

es mediante la condensación de dos moléculas de triptófano en respuesta a la señalización *quorum* (Ahmed *et al.*, 2021). Este compuesto se aisló por primera vez de una bacteria Gram negativa anaeróbica facultativa *Chromocaterium violaceum*, la cual, se encuentra en el suelo y en aguas de áreas tropicales (Fang *et al.*, 2015). Este pigmento es soluble en agua, acetona, etanol, metanol y butanol y posee una estabilidad entre los pH de 1-11. Se han reportado pruebas en sistemas de modelos de yogurt y gelatinas a base de agar. La adición del colorante púrpura fue mediante un polvo obtenido por el método de secado por aspersión (Venil *et al.*, 2015). El pigmento se mantuvo estable durante más de un mes a una temperatura de 4 °C (Ahmed *et al.*, 2021). Otra de las características de este metabolito secundario son sus actividades biológicas como: antioxidantes, anticancerígenos y antibacterianas. Estas funciones no solo han llamado la atención de la industria alimentaria, sino que también de la farmacéutica (Vishnu & Palaniswamy, 2018).

**Tabla 6.** Microorganismos productores de violaceína y su actividad biológica

Pigmento	Color	Micorganismo (M.O)	Actividad biológica
Violaceína	Púrpura	<i>Janthinobacterium lividum</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> spp. <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Massila</i> , <i>Collimonas</i> y <i>Duganella</i> .	Antioxidante, antifúngico, antibiótico, antitumoral y antibacteriano

La estructura química de la violaceína **Figura 3** consiste en tres unidades estructurales un 5-hidroxiindol, un oxindo y un 2-pirrolidona (Sato *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Estructura de la violaceína adaptada de Choi *et al.*, (2015)

La producción de violaceína se ve afectada por el medio de cultivo, pH, temperatura, tiempo de incubación y agitación. En la **Tabla 7** muestra diferentes medios de cultivo provenientes de desechos industriales como posibles sustitutos de medios específicos. En esta **Tabla 7** podemos observar que la mejor opción es el bagazo de caña que muestra un rendimiento de 0.82 g/L mientras que el rendimiento del pigmento en medio LB es de 0.15 g/L. La violaceína es un metabolito secundario que posee varias de las actividades terapéuticas ya antes mencionadas, entre las más relevantes se encuentran: la actividad antioxidante y antimicrobiana (Ahmad *et al.*, 2012).

**Tabla 7.** Medios de cultivo para la producción de violaceína un pigmento púrpura

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Factores de producción de violaceína</b>	<b>Rendimiento de violaceína (g/L)</b>
<b>Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) un pH de 7.0± 0.2</b>	Temperatura: 30 °C Tiempo de incubación: 24 h Agitación: 200 rpm	0.15 g/L
<b>Bagazo de caña (BC) a diferentes concentraciones (1 %, 3 % y 5 % p/v) con 50 mL de 100 mg/L de L-triptófano a un pH de 7.0± 0.2</b>	Temperatura: 30 °C Tiempo de incubación: 24 h Agitación: 200 rpm	BC1 = 0.199 g/L BC 3 = 0.82 g/L BC 5 = 0 g/L
<b>Azúcar Morena (AM) a concentraciones de (0.4, 2.0 y 4.0 g/L con 50 mL de 100 mg/L de L-triptófano a un pH de 7.0± 0.2</b>	Temperatura: 30 °C Tiempo de incubación: 24 h Agitación: 200 rpm	AM 0.4 = 0.02 g/L AM 2.0 = 0.02 g/L AM 4.0 = 0.08 g/L
<b>Melaza (MEL) a concentraciones de (0.1 %, 0.5 % y 1 % v/v) con 50 mL de 100 mg/L de L-triptófano a un pH de 7.0± 0.2</b>	Temperatura: 30 °C Tiempo de incubación: 24 h Agitación: 200 rpm	MEL 0.1 % = 0.05 g/L MEL 0.5 % = 0.03 g/L MEL 1 % = 0.03 g/L
<b>Desechos sólidos de piña (DSP) a concentraciones de (1 %, 3 % y 5 % p/v) con 50 mL de 100 mg/L de L-triptófano a un pH de 7.0± 0.2</b>	Temperatura: 30 °C Tiempo de incubación: 24 h Agitación: 200 rpm	DSP 1 % = 0.01 g/L DSP 3 % = 0.07 g/L DSP 5 % = 0.03 g/L

### 2.5.1 Actividad antioxidante de la violaceína

La síntesis de violaceína solo se lleva a cabo en presencia de oxígeno por lo que también habrá producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) provenientes del metabolismo del microorganismo (Ahmed *et al.*, 2021). Durante la producción de ERO y ERN ocurre un desequilibrio en la producción provocadas por ciertas patologías poniendo en riesgo la vida del organismo (Zhu *et al.*, 1992).

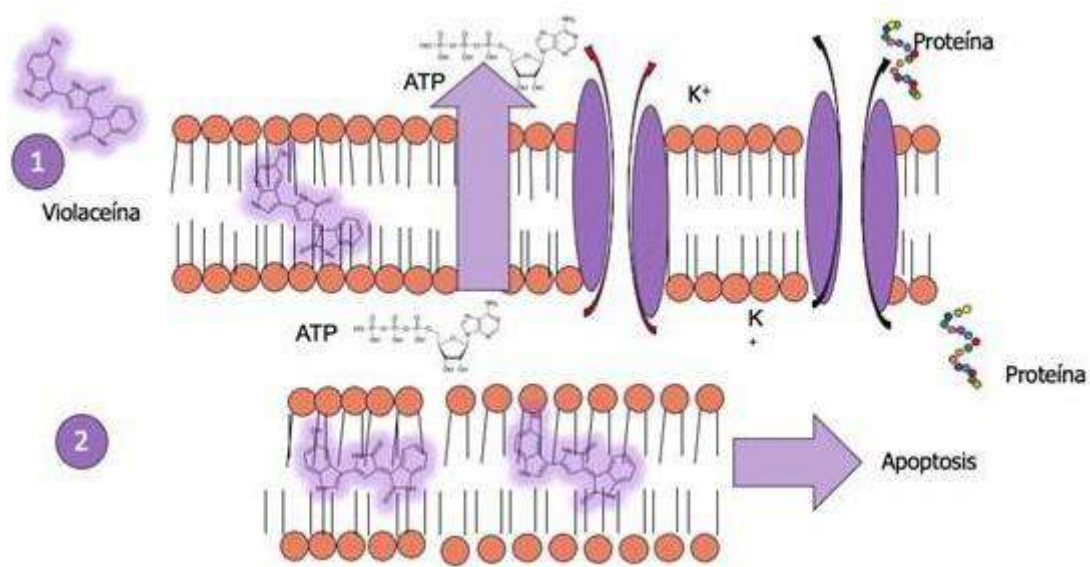
Las especies reactivas tienen como objetivo principal provocar alteraciones tanto en actividades enzimáticas como en las membranas celulares tales como; cambios en la fluidez y la permeabilidad, induciendo la peroxidación lipídica de membranas fosfolípidos dando como resultado la muerte celular. El mecanismo de defensa antioxidante ante la presencia de otros microorganismos puede llegar a ser enzimática o no enzimática. La defensa enzimática se lleva a cabo por la mieloperoxidasa, la cual se encarga de convertir el peróxido de hidrógeno en un oxidante microbicida lo que conlleva a la activación de los neutrófilos (Konzen *et al.*, 2006).

La actividad antioxidante de la violaceína se debe a que es una molécula orgánica conformada por un grupo hidroxilo y tres grupos amino como se muestra en la Figura 3. El mecanismo de acción de las moléculas de este tipo consta en la transferencia de átomos de hidrógeno mediada por la disociación energética de enlaces (DEE) y la transferencia de protones por acoplamiento controlado por el potencial de ionización (PI). Entre menor sean los valores de DEE y PI mayor será la transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno. El PI de la violaceína es de 146.88 kcal/mol con un valor similar al de la vitamina E que es un compuesto comúnmente utilizado por su actividad antioxidante cuyo PI es de 154.90 kcal/mol (Rivero Berti *et al.*, 2023).

### 2.5.2 Actividad antibacteriana de la violaceína

Una de las propiedades que hacen atractivo el uso de la violaceína como aditivo alimentario es su propiedad antibacteriana, ante patógenos Gram positivos. El mal uso de antibióticos ha generado resistencia ante ellos, provocando un incremento

de enfermedades infecciosas (Cao *et al.*, 2007). La violaceína actúa sobre las paredes gruesas de peptidoglicanos de las bacterias Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. La violaceína es efectiva contra patógenos resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Este compuesto penetra las células grampositivas y en conjunto presenta discontinuidad en la membrana citoplasmática, sin afectar la pared celular. La permeabilización de las células se debe a que la violaceína es capaz de alterar directamente las membranas de fosfolípidos, efecto relacionado con su estructura y solubilidad. El mecanismo antimicrobiano de la violaceína se debe a la ruptura de la membrana citoplasmática. La violaceína se une directamente a los liposomas que están en la membrana celular. La actividad antibacteriana de la violaceína consta de dos fases, esquematizadas en la **Figura 4**. La primera fase consiste en la permeabilización de la membrana citoplasmática por medio de la violaceína, provocando un aumento en la fuga de protones de las células junto con la de iones, ATP y proteínas. La segunda fase consiste en la pérdida del contenido intracelular que conduce a una alteración en el equilibrio osmótico de la célula, lo que eventualmente resulta en la inhibición del crecimiento o la muerte celular (Cauz *et al.*, 2019).



**Figura 4.** Mecanismo antimicrobiano de la violaceína adaptada de Cauz *et al.*, (2019)

## 2.6 Crecimiento y metabolismo de *Escherichia coli*

Una de las bacterias más empleadas en la industria biotecnológica es *Escherichia coli*, ya que es uno de los microorganismos más estudiados gracias a sus atributos. Entre sus características principales se encuentran: crecimiento rápido, transferencia genética horizontal, plasticidad genética y fácil escalamiento industrial (Rodrigues *et al.*, 2013).

*Escherichia coli* es una enterobacteria Gramnegativa con forma de bacilo con un crecimiento óptimo entre los 30 °C – 37 °C, tiene una capa de peptidoglicanos y una membrana extracelular que le permite ser resistente a algunos antibióticos como la penicilina (Tortora *et al.*, 2020). Crece en ambientes anaerobios como aerobios. Posee la habilidad de desarrollarse en diferentes sustratos y emplea la fermentación ácida mixta cuando se encuentra en anaerobiosis, la cual se encarga de degradar compuestos con seis carbonos en lactato, acetato, succinato, formiato, etanol, gases H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Ammar *et al.*, 2018).

El ciclo bacteriano de *E. coli* está dividido en tres etapas. La etapa B consiste en la finalización de la división bacteriana y el comienzo de la replicación de ADN. En el periodo C se lleva a cabo la replicación de ADN cromosómico. Finalmente, la etapa D concluye la replicación del ADN y la división celular, cuando el crecimiento de *E. coli* se acelera las etapas D y C ocurren de manera simultánea dando como resultado múltiples bifurcaciones de replicación de ADN y ciclos celulares superpuestos. *E. coli* se puede replicar de dos formas: replicación simultánea y asincrónica (Vinella & D'Ari, 1995). La replicación simultánea suele presentar un crecimiento de  $2^n$  (n=número de generaciones), mientras que la replicación asincrónica presenta un crecimiento menor o mayor a  $2^n$  ya que se presentan mutaciones en la proteína DiaA asociada al iniciador DnaA, que es la proteína que se encarga de reconocer el origen (oriC), el cual da inicio al ensamblaje de nucleoproteínas, para la replicación del ADN. *E. coli* se reproduce por fisión binaria, este es un proceso en el que se generan dos células idénticas a partir de una célula madre (Skarstad *et al.*, 1986). Este proceso se puede ver afectado por estrés celular como: estrés oxidativo, limitación de nutrientes, privación de oxígeno y temperatura

causando daños en la replicación celulares provocando envejecimiento celular y posteriormente muerte celular (Peebo *et al.*, 2015).

Los medios ricos con glucosa, fosfato de amonio monobásico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio dibásico fomentan el crecimiento y desarrollo de la *E. coli*. Entre los medios comerciales más empleados para su crecimiento se encuentra el caldo Lisogenia y Luria Bertani. El crecimiento y producción de biomasa de *E. coli* se puede llevar a cabo por la oxidación del piruvato, ácido fórmico, el hidrógeno, aminoácidos y por medio de sustratos reducidos como él; oxígeno, nitrato, fumarato y dimetilsulfóxido (Ma *et al.*, 2020).

El metabolismo de la *E. coli* se puede redirigir con el uso exclusivo del CO<sub>2</sub> como fuente de carbono para la producción de biomasa. La *E. coli* tiene tres rutas principales glicolíticas las cuales son: la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED), y pentosas fosfato. La ruta de la glucólisis (EMP) se lleva a cabo en el citoplasma de la célula en condiciones aerobias, durante este proceso se generan dos moléculas de piruvato, dos de ATP, bajo condiciones anaeróbicas el piruvato se convierte en dos moléculas NADH por molécula de glucosa. La vía de Entner-Doudoroff (ED), es una ruta alterna a la EMP y se activa para el crecimiento con gluconato. La ruta de las pentosas fosfato ocurre en forma paralela a la glicólisis y consta dos fases la primera fase es oxidativa, la cual genera dos moléculas de NADPH y la fase no oxidativa que se encarga de generar azúcares con cinco carbonos como: fructosa-6-fosfato (F6F) (Hollinshead *et al.*, 2016).

### 2.6.1 Biología sintética y líneas bacterianas de *Escherichia coli*

La biología sintética es la ciencia que se encarga de re-diseñar sistemas biológicos existentes para otorgarles nuevos propósitos o mejorar ciertas capacidades por medio de la edición genética (Beitz *et al.*, 2022). La biología sintética es la ciencia que se encarga de re-diseñar sistemas biológicos existentes para otorgarles nuevos propósitos o mejorar ciertas capacidades por medio de la edición genética. La eliminación de funciones no esenciales es una de las estrategias para diseñar fenotipos microbianos, lo que permite que los microorganismos reubiquen los



recursos dependiendo del ambiente en el que se encuentran para producir productos secundarios, genes recombinantes o bien para fomentar su crecimiento (Lastiri-Pancardo *et al.*, 2020).

La interacción del microorganismo con el ambiente depende de las vías de señalización celular, las cuales son robustas y evolucionales, permitiendo la adaptación del microorganismo ante ambientes extremos, afectando los estados celulares. Por otro lado, la solidez o robustez de las vías también provocan que el microorganismo involucre compensaciones intrínsecas como implementar estrategias para la reubicación de recursos (Lastiri-Pancardo *et al.*, 2020).

Esta característica permite diseñar plásmidos para observar la interacción del nuevo material genético en la célula huésped y así mejorar los diseños y permitir que las células bacterianas desempeñen una mejor función de acorde al ambiente en el que se encuentren (Baba *et al.*, 2006).

*Escherichia coli* en especial la cepa *E.coli* K-12 y sus derivados como: DH1, DH5alfa, MG1655, RV308 y W3110 son las responsables de generar un tercio de terapias recombinantes aprobadas por la Administración de alimentos y medicamentos de EE. UU y la Agencia Europea de Medicamentos gracias a su capacidad de producción de proteínas recombinantes. Estas cepas son conocidas por pertenecer a la colección de Keio la cual es conocida por eliminar genes no esenciales de *Escherichia coli* (Selas Castiñeiras *et al.*, 2018).

### 2.6.2 *Escherichia coli* BW25113

*Escherichia coli* BW25113, es una bacteria anaerobia facultativa patógena mesofílica de la familia de las enterobacterias. Esta es una cepa conocida por ser *lacI*<sup>+</sup> (Yang *et al.*, 2022).

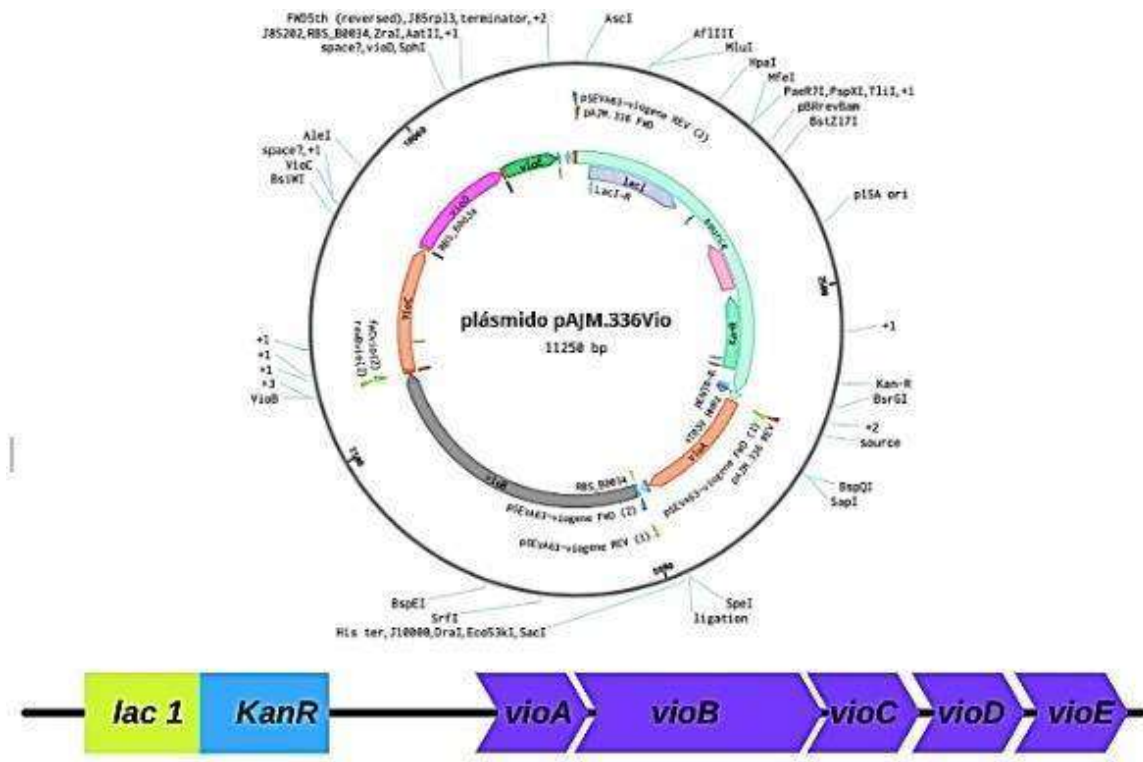
La síntesis de proteínas en *Escherichia coli* BW25113 requiere un suministro constante y abundante de alimentación de aminoácidos ya que las proteínas constituyen más del 50 % de la biomasa de. Gracias a esta característica este modelo bacteriano ha sido empleado para la producción de 5-aminolevulínico (ALA) el cual es un intermediario para la producción de tetrapirrol. Este compuesto ha

captado el interés de la industria gracias a sus posibles aplicaciones como en la agricultura, cosmética y como terapia cancerígena (Ye *et al.*, 2022).

La síntesis de proteínas requiere un suministro constante y abundante de alimentación de aminoácidos ya que las proteínas constituyen más del 50% de la biomasa de *Escherichia coli*. La bacteria *E.coli* sintetiza 20 aminoácidos protogénicos, sin embargo, dicha síntesis representa un gasto energético dependiendo del aminoácido producido. Los aminoácidos que representan un mayor gasto energético son los aromáticos como; fenilalanina, triptófano y la tirosina. (Yang *et al.*, 2022)

### 2.6.3 Plásmido pAJM.336Vio

En la **Figura 5** podemos observar el plásmido pAJM.336Vio fue diseñado con la finalidad de mejorar las funciones expresadas aprovechando la disponibilidad de recursos celulares. Este plásmido consiste en los cinco genes que se encargan de la producción de la violaceína, los cuales se encuentran acomodados en dos operones, uno de ellos consiste en el gen *vioA* expresados constitutivamente, mientras que el resto de la vía se encuentra codificada por los genes *vioBCDE*. La producción de la violaceína es a partir de triptófano e IPTG como inductor y una resistencia a kanamicina en *E.coli*. Este mismo plásmido posee diferentes cantidades de genes en cada módulo y se encargan de codificar las enzimas que son activamente metabólicas dando como resultado una biosíntesis diferencial de la violaceína en *Escherichia coli* BW25113, sin el precursor triptófano (Lastiri *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Plásmido de la violaceína pAJM.336Vio

El uso de antibióticos para la producción de violaceína tanto en organismos modificados como en nativos. Ha demostrado que aumenta la producción de este pigmento hasta un 25 %, empleando unidades subinhibitorias. Dentro de los antibióticos estudiados se encuentran: amikacina, eritromicina, gentamicina, kanamicina y tetraciclina. Hasta ahora el antibiótico más eficaz es la kanamicina, ya que ha mostrado aumentar la expresión génica de Cvil sintasa y los genes de policétido sintasa VioB (Durán *et al.*, 2016).

2.6.4 Producción de violaceína a partir del plásmido pAJM.336Vio en *Escherichia coli* BW25113

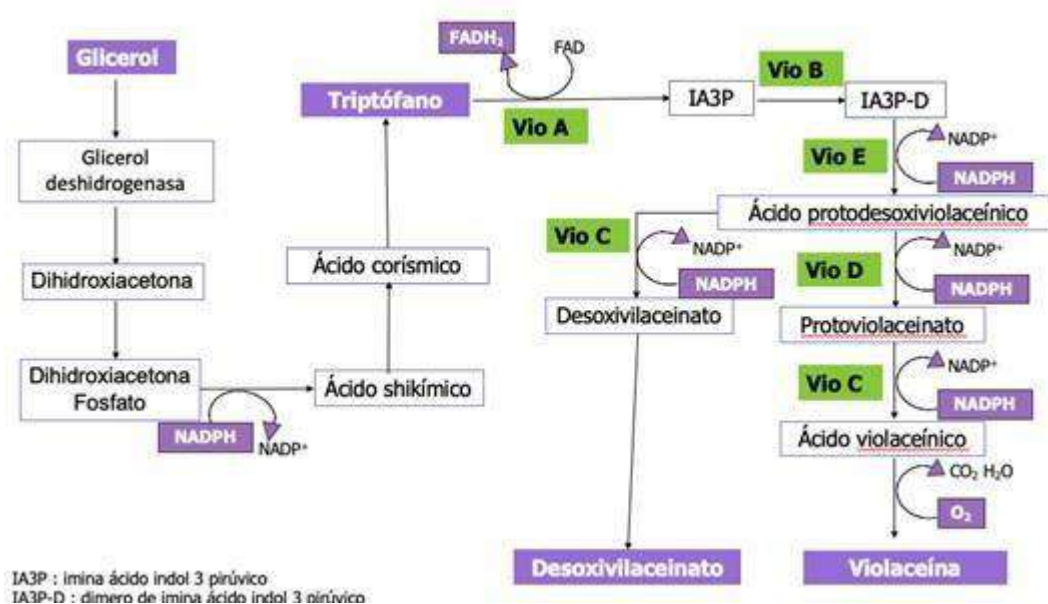
El sistema Quorum Sensing (QS), es un mecanismo de señalización característico de las bacterias Gramnegativas. QS se encarga de liberar moléculas en el medio para que interactúen con los receptores que modifican directa o indirectamente los

procesos celulares y vías biosintéticas que interfieren en los mecanismos de transcripción y traducción (Liu *et al.*, 2013). Las moléculas que se liberan son conocidas como moléculas señalizadoras difusibles, un ejemplo es la N-acil-homoserina-lactona (NAHL). Esta molécula es el resultado de la catálisis por medio de la CviI sintasa de ácidos grasos o de S- adenosil metionina. NAHL se une a CviR y forma un complejo e inicia la codificación del operón (*vio* ABCDE) (Kothari *et al.*, 2017a).

La producción de la violaceína se está directamente relacionada con la ruta metabólica del triptófano y son cinco enzimas las que llevan a cabo la síntesis de este metabolito secundario (Immanuel *et al.*, 2018).

La ruta metabólica de la violaceína **Figura 6** consta en la coordinación de la estructura de un operón de cinco genes que se encuentran en *Chromobacterium violaceum*, su productor nativo. El clúster de genes responsables de la síntesis de la violaceína son: *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* y *vioE* (Antonio & Creczynski-Pasa, 2004). Cada gen codifica las enzimas que degradan las dos moléculas de triptófano para dar lugar a la violaceína. El conjunto de enzimas VioA, VioC y VioD, son monooxigenasas dependientes de FAD. La VioB es una hemoproteína que contiene Fe<sup>2+</sup> por lo que es considerada una policétido sintasa. VioE es responsable de convertir la flavanona en isoflavona, esta reacción sólo sucede durante la síntesis de la violaceína (Durán *et al.*, 2012). El primer producto enzimático, VioA (triptófano 2-mooxigenasa dependiente de flavina) se encarga de catalizar la oxidación del triptófano en imina del ácido indol 3 pirúvico (IA3P) junto con la reducción del cofactor FAD. IA3P se transforma dímero más pequeño por medio de la VioB, el cual se transforma de manera espontánea en ácido cromo pirrólico, el cual está involucrado en la síntesis de indolcarbazol. El ácido cromopirrólico también se puede transformar en ácido protodesoxiviolaceínico por la intervención de VioE, que lleva a la biosíntesis de la violaceína. VioD produce proviolaceína mediante la hidroxilación en la quinta posición del ácido protodesoxiviolaceínico junto con la oxidación de NADPH en NADP. Finalmente, la proviolaceína se convierte en violaceína con la oxidación NADPH en NADP acompañada de la formación de agua y CO<sub>2</sub> bajo el control de VioC (Kothari *et al.*, 2017). En el diagrama de la **Figura 4**

muestra una ruta metabólica proveniente de una *E.coli* modificada con un plásmido productor de violaceína, empleando glicerol como fuente de carbono.



**Figura 6.** Ruta metabólica de la violaceína en *Escherichia coli* BW25113 con el plásmido pAJM.336Vio

## 2.7 Sistema de electrofermentación

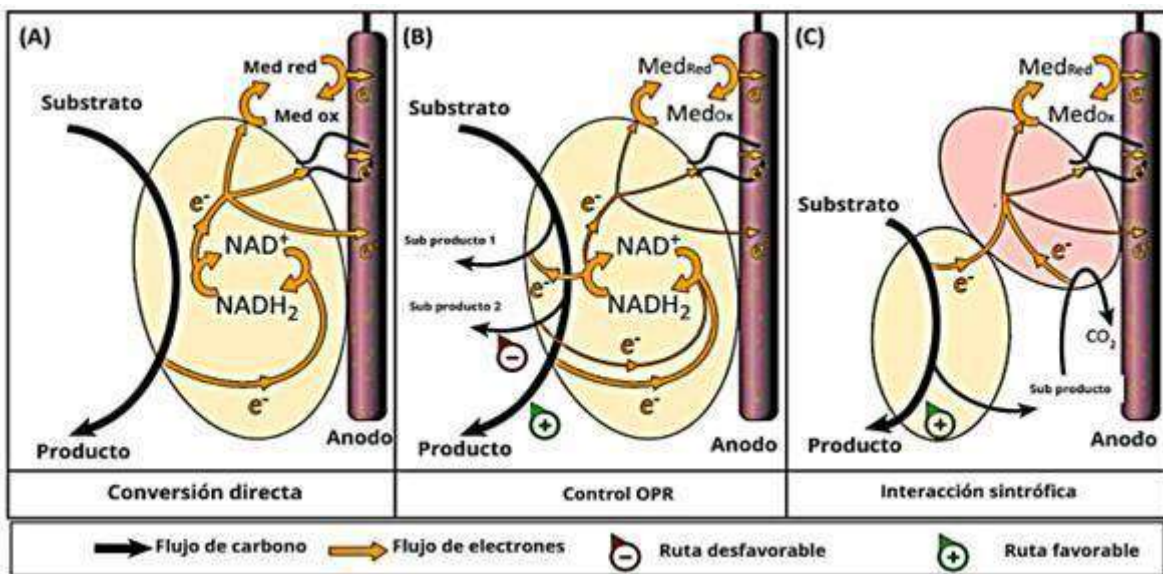
La electroestática es la rama de la física que estudia los efectos producidos entre cuerpos cargados eléctricamente que se encuentran en reposo. La catálisis electroestática se refiere al uso campos eléctricos estáticos para catalizar reacciones químicas. Esto consiste en una reorganización electrónica ocasionando la conversión de reactivos en productos. Se ha observado una respuesta predecible con respecto al flujo de reacciones redox con el cambio de voltaje en los electrodos (Zhang *et al.*, 2018).

Los microorganismos bajo condiciones anaeróbicas obtienen energía de la transferencia de electrones de las reacciones redox, las cuales se pueden llevar a cabo mediante un sistema electroquímico, (Sasaki *et al.*, 2011). Las tecnologías electroquímicas microbianas utilizan reactores bioeléctricos, para regular el factor ORP extracelular (Moscoviz *et al.*, 2016).

En los sistemas bioelectroquímicos (SBE) hay una transferencia de electrones bidireccional entre los microorganismos o las biomacromoléculas que catalizan los

procesos de intercambio. Este intercambio de electrones se lleva a cabo por materiales conductores sólidos como: materiales de carbono y grafeno debido a su alta conductividad, estabilidad y bajo costo (Rago *et al.*, 2019).

La electrofermentación es una nueva área que es capaz de controlar el metabolismo de microorganismos. Como se muestra en la **Figura 7**, mediante la utilización de electrodos como mediadores de electrones en la que la terminal anódica es empleada como aceptor de electrones utilizando una solución amortiguadora y la terminal catódica, como donante de electrones que emplea una fuente de carbono (Zhang *et al.*, 2018).



**Figura 7.** Intercambio de electrones en un SBE, adaptada de Moscoviz *et al.*, (2016)

La homeostasis del par redox a nivel celular es de suma importancia para el funcionamiento óptimo del metabolismo celular. Las enzimas reguladoras metabólicas detectan cambios en el ORP extracelular e intracelular, y ajustan el flujo de electrones en el metabolismo a través de la estabilización de la relación NADH/NAD<sup>+</sup>. El ORP extracelular influye al ORP intracelular mediante un equilibrio de NADH/NAD<sup>+</sup> (Moscoviz *et al.*, 2016). Un sistema convencional bioelectroquímico consiste en una celda con cátodo y otra con un ánodo, generalmente separados por una membrana. Los electrodos que se encuentran en las celdas están rodeados de una solución electrolítica las cuales pueden ser: tionina, rojo neutro, metil viológeno, riboflavinas y ácidos húmicos (Civelek *et al.*, 2019). Todos los microorganismos

requieren un donador y aceptor de electrones, estos se encuentran en la solución presente. Estos microorganismos son conocidos como: litotrófico, litheterótrofo o litoautotóxicos ya que utilizan CO<sub>2</sub> u otros compuestos orgánicos como fuente de carbono (Rago *et al.*, 2019).

Los beneficios que ha presentado la electrofermentación son: la estabilización y optimización del metabolismo fermentativo mediante el control del desequilibrio redox y de pH ocasionado por la pureza del substrato y la acumulación del subproducto, algunos ejemplos de este tipo de estudios se muestran en la Tabla 8. Otros beneficios son: la estimulación de la ruptura o elongación de cadenas de carbón dependiendo de las condiciones oxidantes o reductoras, aumento de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) el cual mejora el rendimiento de la biomasa microbiana (Rago *et al.*, 2019).

**Tabla 8.** Aplicaciones de la electrofermentación en la industria en microorganismos

Microorganismos	Producto	Parámetros de un SBE	Resultados	Autor
<i>Clostridium thermocellum</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	Voltajes evaluados: -0.75, -1.5, -3.0 y -5.0 V con electrodos de grafito.	Fermentación de etanol a partir de celulosa. Se obtuvo un incremento del 61 % a - 1.5 V de etanol.	Shin <i>et al.</i> , (2002)
<i>Zymomonas mobilis</i>		Mediador redox: rojo neutro y electrodos de grafito	Obtención de etanol es proporcional al balance de NADH/NAD+ aumentado por la reacción redox del rojo neutro. Se obtuvo un rendimiento del 50 % a una concentración de 100 µM de rojo neutro.	Jeon & Park, (2010)
<i>Escherichia coli</i>	Succinato	Electrodos de platino y mediador rojo neutro.	Se obtuvo un rendimiento de succinato de 1.10 mol/mol	Wu <i>et al.</i> , (2019)
<i>Monascus purpeus</i>	Colorante Amarillo-(Y-Ms) (por sus siglas en inglés)	Electrodos de grafito y 10 mA	Aumento del porcentaje de rendimiento de Y-Ms de 8.9	Liu <i>et al.</i> , (2021)

### 2.7.1 Fermentación anódica

El balance redox es una reacción fundamental para mantener en equilibrio la transferencia de electrones y protones a través de la membrana celular. La transferencia de NADH y FADH<sub>2</sub> se lleva a cabo por la cadena transportadora de electrones la cual está conformada por cuatro complejos proteicos. Este es un proceso exergónico que conduce a la producción de adenosín trifosfato (ATP). En condiciones aerobias el flujo de electrones finaliza con una molécula de oxígeno



como la aceptora de electrones, mientras que en condiciones anaeróbicas la molécula aceptora de electrones es el sulfato (Lehninger, 2002).

El transporte de electrones en microorganismos eucariotas se lleva a cabo en la membrana intracelular de las mitocondrias mediante cadena transportadora de electrones. La mayoría de los organismos eucariotas producen ATP a partir de reacciones con oxígeno, productos del ciclo del Krebs, al igual que de los metabolismos de ácidos grasos y aminoácidos (Tymoczko *et al.*, 2009).

La anaerobiosis conduce a reacciones redox mediante la fermentación de compuestos de carbono. El equilibrio redox se puede manipular con ayuda de la electrofermentación anódica, la cual se encarga de potenciar la respiración en condiciones anaeróbicas, el electrodo funge como ánodo, se encarga de ser el aceptor de electrones (Vassilev *et al.*, 2021). Este tipo de procesos es uno de los más atractivos para la industria ya que su costo de producción es menor a los procesos tradicionales que emplean técnicas aeróbicas y también alcanza mejores tasas de rendimiento (Weusthuis *et al.*, 2011).

El proceso anaeróbico conduce a la fermentación del piruvato endógeno en ácidos orgánicos y alcoholes al igual que la producción de: nitrato, sulfato, dióxido de carbono y metales inorgánicos como hierro III, manganeso IV y moléculas orgánicas como el ácido fumárico. La fermentación anódica utiliza como aceptores de electrones a los electrodos que pueden ser de carbono y de acero inoxidable (Förster *et al.*, 2017).

Los organismos emplean al ánodo como aceptor final de electrones, gracias a su capacidad electroactiva y su interacción con el electrodo. Los electrones son transportados a través de la membrana interna y externa a partir del gradiente generado por el ánodo vía deshidrogenasas primarias, quinonas, reductasas terminales y la cadena del complejo del citocromo c encargado del transporte de electrones en las bacterias gramnegativas (Kracke *et al.*, 2015).

La generación de energía juega un papel importante en el crecimiento bacteriano y en muchas ocasiones influye en la síntesis de productos secundarios. Durante el proceso de fosforilación oxidativa, los electrones son transportados mediante la cadena transportadora de electrones desde un donante de bajo potencial a un

aceptor con un potencial redox más positivo. La diferencia de energía termodinámica entre la molécula aceptora de electrones y la donadora se utiliza para promover la síntesis de ATP mediante quimiosmosis. Los sistemas bacterianos que se encuentran en condiciones aeróbicas prefieren el O<sub>2</sub> como aceptor terminal de electrones, ya que suele tener la mayor diferencia de potencial con respecto al donante de electrones. Este proceso de obtención de energía resulta en una alta producción de biomasa, la cual en muchas ocasiones disminuye el rendimiento de productos secundarios que no se encuentran relacionados con la producción de biomasa (Vassilev *et al.*, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La concientización acerca de los componentes que forman parte de los productos alimenticios, ha crecido de manera exponencial desde la última década generando interés en los consumidores en modificar sus hábitos alimenticios. Haciendo tendencia la búsqueda de productos con colorantes naturales como aditivos. La producción, desarrollo y empleo de colorantes naturales a partir de materiales vegetales, minerales y animales, han mostrado ser compuestos inestables, de baja concentración y costosos. Es por esta razón que los colorantes sintéticos aún permanecen en el mercado, sin embargo, estos ocasionan daños a la salud como: hipersensibilidad, hipercinesia y nefrocalcinosis. La búsqueda de su sustitución ha captado el interés de la industria en la producción de pigmentos naturales a partir de microorganismos. Recientes estudios han demostrado que los colorantes a partir de microorganismos son una alternativa para producir pigmentos naturales. Además, que pueden presentar propiedades nutracéuticas atractivas tanto para el productor como para el consumidor final. Las limitantes principales de las técnicas fermentativas en la industria para la producción de colorantes microbianos es el costo operacional y la inestabilidad redox. Dentro de la restricción operacional se encuentran el uso de sustratos puros, específicos, la separación y refinación del producto. A pesar de que el sustrato sea específico o puro este no garantiza un mayor rendimiento del producto deseado, debido al desequilibrio redox, relacionado con el cofactor reducido/oxidado de NAD (NADH/NAD<sup>+</sup>). Una alternativa a las técnicas actuales es la electrofermentación, mediante un sistema el cual, modifica los estados redox intracelulares mediante materiales inorgánicos capaces de actuar como donadores y aceptores de electrones. La producción del compuesto se llevará a cabo en un sistema de electrofermentación debido a que tiene potencial para modular el metabolismo de los microorganismos. Son estas razones por las cuales en este presente trabajo expone acerca de un compuesto alterno para el colorante púrpura conocido como: violaceína el cual es un producto a partir de una bacteria Gram negativa *Escherichia coli* BW25113 modificada con el plásmido pAJM.336Vio inducido por kanamicina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades antioxidantes, antibacterianas y la estabilidad de la violaceína recombinante (pAJM.336Vio) producida por *Escherichia coli* BW25113 bajo la influencia de un sistema de electrofermentación.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Estimar la relación entre la aplicación de distintos voltajes y concentración de mediador redox riboflavina que conduzca a la mayor producción de violaceína por *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.
2. Evaluar las propiedades antibacterianas y antioxidantes de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.
3. Caracterizar la estabilidad de la violaceína recombinante a diferentes condiciones al pH, temperatura y luz, obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Material biológico

Se cultivó *Escherichia coli* BW25113 pAJM.336Vio en caldo de cultivo Terrific a 35°C con una agitación de 200 rpm por 24 h en un sistema de electrofermentación el cual consistió en seis bioreactores bioelectroquímicos con una capacidad de 225 mL tapones de hule y electrodos de acero inoxidable. Se evaluaron diferentes concentraciones del mediador redox (riboflavina) 0 y 150 µM y diferentes voltajes (0, 0.5, 3.0, 4.0 y 5.0 V).

El sistema bacteriano que se empleó en este trabajo es *Escherichia coli* una transformada con el plásmido pAJM.336Vio, donada por el Dr. José Utrilla Carreri del Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

### 5.2 Pre-inóculo

Se activó una conserva preservada en ultracongelación inoculando 20 mL de medio líquido Terrific (triptona 11.8 g/L, extracto de levadura 23.6 g/L, fosfato de hidrógeno dipotásico 9.4 g/L, fosfato de dihidrógeno de potasio 2.2g/L pH final 7.0±0.2 a 25 °C) suplementado con kanamicina 30 µg/mL e IPTG como inductor 0.0002 g/L. Posteriormente se aislaron colonias recombinantes en cajas Petri con medio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se incubaron durante 48 h a 35 °C. Consecutivamente se tomó una unidad formadora de colonias (UFC) definida y se inoculó en 15 mL de medio líquido LB, por 24 h a 35 °C y 200 rpm.

Para la preservación de la cepa, ésta se mantuvo en crioconservación (- 80 °C) con glicerol al 20 % v/v y 80 % v/v el inóculo de la *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio, en medio Terrific. (Banerjee *et al.*, 2017).

### 5.3 Sistema de electrofermentación

El sistema constó de frascos de cristal con diámetro de 6 cm y 10 cm de altura con fondo plano, con una capacidad de 200 mL. Los electrodos de grafito se encontraron suspendidos de un tapón de hule #12 del recipiente y conectado a la fuente de voltaje. El cable, así como los electrodos se conectaron a una fuente con voltaje en corriente continua modelo GPS-3030DD y un amperímetro (Mut-33, Truper, China). El frasco tuvo un volumen de 50 mL de caldo de cultivo Terrific inoculado con la bacteria *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo condiciones de 35 °C a pH neutro a una agitación magnética de 180 rpm. En el cual se evaluaron los voltajes 0.085, 0.5, 1.5, 2.5 y 2.9, V aplicando la corriente eléctrica de forma continua y variando la concentración del mediador riboflavina 5.14, 30, 90, 150 % p/v.

### 5.4 Métodos analíticos

#### 5.4.1 Extracción y determinación de violaceína

El pigmento de violaceína se extrajo del caldo Terrific según (Sasidharan *et al.*, 2015).

Se llevó a cabo la determinación de violaceína con espectrofotometría adaptada de (Cheng *et al.*, 2022). Se tomaron 5 mL, de un cultivo de 24 h, posteriormente se centrifugaron a 4,500 x *g* por 25 min. Al finalizar el tiempo de centrifugación, se descartó el sobrenadante y se hicieron tres lavados celulares utilizando 1mL de agua destilada por cada lavado. Al terminar el tercer lavado se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al sedimento, el cual fue previamente calentado a 50 °C y se agitó con vortex por 30s y se centrifugó a 5,500 x *g* por 25 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante usando el espectrofotómetro a 575 nm, para medir la concentración de violaceína. Mediante el coeficiente de extinción de 56.01 L / (g-cm).

#### 5.4.2 Determinación de biomasa

Se adaptó la determinación de biomasa en peso seco según (Kanelli *et al.*, 2018). Al finalizar la extracción y determinación de la violaceína, la pastilla celular sobrante se resuspendió con 1 mL de agua destilada. Previamente se colocaron en el horno cazuelas por 48 h a 100°C. Las cazuelas se sacaron al finalizar las 48 h y se colocaron por media hora en un desecador y se pesaron antes de colocar la muestra. Los cálculos se realizarán de acuerdo con la Ecuación 1 y 2

$$X = P_2 - P_1 \quad (1)$$

$P_2$  = Peso de la cazuela vacía a peso constante

$P_1$  = Peso de la cazuela con la muestra

$X$  = Peso final de la muestra.

$$\text{Contenido en extracto seco \%} = \frac{P'}{P} \quad (2)$$

$P'$  = peso en gramos de la muestra después de la desecación

$P$  = peso en gramos de la muestra antes de la desecación

#### 5.4.3 Actividad antibacteriana

Se empleó una técnica de difusión en placa conocida como: método de difusión en disco adaptada de (Cheng *et al.*, 2022). Se inoculó y sembró sobre la superficie de agar nutritivo. Se usaron discos de papel filtro Whatman N°4 y se impregnaron de 10 a 25  $\mu$ L del extracto de violaceína por triplicado y se colocaron sobre la superficie del agar. Después se incubaron las cajas Petri invertidas a  $30 \pm 2$  °C por 24 h y se midieron los diámetros de halo de inhibición. Las bacterias empleadas para esta técnica serán *Bacillus subtilis* como microorganismo sensible a la violaceína y *Escherichia coli* como control negativo.

#### 5.4.4 Actividad antioxidante

##### Método ABTS

La capacidad de eliminación de radicales libres de la violaceína se midió por el método de ABTS (Patkar *et al.*, 2021) con unas leves modificaciones. Se preparó

una solución madre; de ABTS+ mezclando volúmenes iguales de persulfato de potasio 2.45 mM en agua destilada y se incubó a temperatura ambiente por 12 h en ausencia de luz para generar radicales ABTS+. Posteriormente la solución de ABTS+ se diluyó en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.6 ( $\pm$  0.02) a 734 nm. Se colocaron 20  $\mu$ L de la muestra a 300  $\mu$ L de la solución ABTS+ en una placa de 96 pocillos. Se midió la absorbancia a 734 nm cada 6 minutos por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se empleó como muestra control y blanco DMSO ya que con este se extrajo la violaceína de *Escherichia coli* pAJM.336Vio las muestras fueron examinadas por triplicado. La actividad eliminadora de radicales ABTS+ se calculó con la Ecuación 3.

$$\left\{ \frac{(Ac - (As - Ab))}{Ac} \right\} * 100 \quad (3)$$

ABTS Actividad eliminadora de radicales libres (%)

Ac es la absorbancia de la solución ABTS+ sin muestra, As es la absorbancia de la solución ABTS+ y la muestra, y Ab es la absorbancia de la muestra sin la solución ABTS+.

#### 5.4.5 Estudio de estabilidad de la violaceína

La determinación de estabilidad de la violaceína se realizó de acuerdo con lo descrito por (Venil *et al.*, 2015) y dependerá de factores como pH, temperatura y luz.

El efecto del pH se evaluó en tubos Eppendorf de 2.0 mL utilizando tres soluciones amortiguadoras, el primero fue un amortiguador de citratos 0.1 M para los pH de 2.5 - 6.0, el segundo fue un amortiguador de potasio 0.1 M para los pH de 6.5 - 7.5 y el tercero fue un amortiguador de glicina 0.1 M para los pH de 8.0 - 10.0. Los cambios en la absorbancia de la violaceína fueron medidos en un espectrofotómetro UV-Vis a 575 nm. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la violaceína se evaluó en tubos Eppendorf de 2.0 mL cubiertos con Parafilm a temperaturas de 4 °C, 25 °C, 50 °C y 75 °C. Finalmente se evaluó el efecto de la luz sobre la estabilidad, las



muestras fueron sometidas a ambientes con ausencia y presencia de luz y se tomaron lecturas en un espectrofotómetro UV-Vis a 575 nm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto de la aplicación de voltajes y concentración de mediador redox riboflavina sobre el rendimiento de violaceína por *Escherichia coli* transformada con el plásmido pAJM.336Vio bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.

Se evaluó el efecto del voltaje y la concentración de mediador redox (riboflavina) buscando un mayor rendimiento de violaceína por *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio en un sistema de electrofermentación la producción fue evaluada con un diseño de superficie respuesta como se muestra en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Niveles de la concentración de mediador redox y voltaje evaluados mediante diseño de superficie de respuesta para el sistema de electrofermentación.

Concentración del mediador riboflavina ( $\mu\text{M}$ )	Voltaje (V)	Número de corridas	Producción de violaceína (mg/L)	Rendimiento de violaceína por biomasa (mg/mg)
5	1.5	3	26.61 $\pm$ 2.25	90.86 $\pm$ 47.77
30	0.5	3	100.84 $\pm$ 4.47	69.08 $\pm$ 24.58
	2.5	3	102.67 $\pm$ 5.60	51.75 $\pm$ 19.38
90	1.5	18	27.14 $\pm$ 5.60	26.92 $\pm$ 7.81
	0.085	3	75.95 $\pm$ 4.21	101.13 $\pm$ 4.91
	2.914	3	81.80 $\pm$ 12.64	56.66 $\pm$ 3.00
150	0.5	3	62.03 $\pm$ 35.20	37.18 $\pm$ 12.35
	2.5	3	76.31 $\pm$ 13.65	40.68 $\pm$ 2.48
175	1.5	3	27.84 $\pm$ 4.27	81.12 $\pm$ 37.19

El análisis de varianza que se muestra en la **Tabla 10** señala que el voltaje es un factor significativo en cuanto al rendimiento de la violaceína ya que su valor P es

menor a 0.05. El efecto principal de la riboflavina, el cuadrático tanto del voltaje como de la riboflavina, así como la interacción de los factores no mostró diferencia significativa. El coeficiente de regresión cuadrática fue de 98 %. En el ANOVA **Tabla 11** hay diferencia estadística significativa tanto como en efectos principales como cuadráticos de los factores evaluados.

**Tabla 10.** Análisis de varianza del rendimiento de la violaceína con respecto a la riboflavina y el voltaje

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
<b>Modelo</b>	6	2270522	378420	3.34	0,010
Bloques	1	731626	731626	6.46	0.016
<b>Lineal</b>	<b>2</b>	<b>1011015</b>	<b>505508</b>	<b>4.47</b>	<b>0.019</b>
Voltaje (V)	1	775936	775936	6.85	0.013
<b>Riboflavina (mM)</b>	<b>1</b>	<b>235079</b>	<b>235079</b>	<b>2.08</b>	<b>0.158</b>
Cuadrado	2	337553	168776	1.49	0.239
<b>Voltaje (V)*Voltaje (V)</b>	<b>1</b>	<b>77221</b>	<b>77221</b>	<b>0.68</b>	<b>0.414</b>
Riboflavina (mM)*Riboflavina (mM)	1	280997	280997	2,48	0,124
<b>Interacción de 2 factores</b>	<b>1</b>	<b>190327</b>	<b>190327</b>	<b>1,68</b>	<b>0,203</b>
Voltaje (V)*Riboflavina (mM)	1	190327	190327	1,68	0,203

Todas las determinaciones del diseño experimental central compuesto son reportadas como la media de los ensayos  $\pm$  desviación estándar

Debido a la variabilidad de los resultados se planteó un diseño factorial completo ampliando los rangos de voltaje y reduciendo los de la riboflavina. Se evaluaron diferentes concentraciones del mediador redox riboflavina (0 y 150  $\mu$ M) y diferentes voltajes (0, 0.5, 3.0, 4.0 y 5.0 V) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Producción y rendimiento de violaceína por *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio en un sistema de electrofermentación a diferentes voltajes y concentración de mediador redox.

<b>Voltaje</b>	<b>Riboflavina (µM)</b>	<b>Producción de violaceína (mg/L)</b>	<b>Rendimiento de violaceína por biomasa (mg/mg)</b>
0	0	31.67 ± 8.29	18.65 ± 5.64
0	150	11.32 ± 1.63	36.15 ± 9.58
0.5	0	28.75 ± 0.3	20.54 ± 0.21
0.5	150	24.98 ± 0.17	19.07 ± 2.89
3.0	0	0.64 ± 0.16	0.21 ± 0.04
3.0	150	28.58 ± 1.02	14.88 ± 1.17
4.0	0	5.47 ± 0.33	1.29 ± 0.12
4.0	150	255.26 ± 2.74	68.42 ± 2.29
5.0	0	243.03 ± 9.79	150.3 ± 10.00
5.0	150	143.26 ± 15.21	65.42 ± 7.39

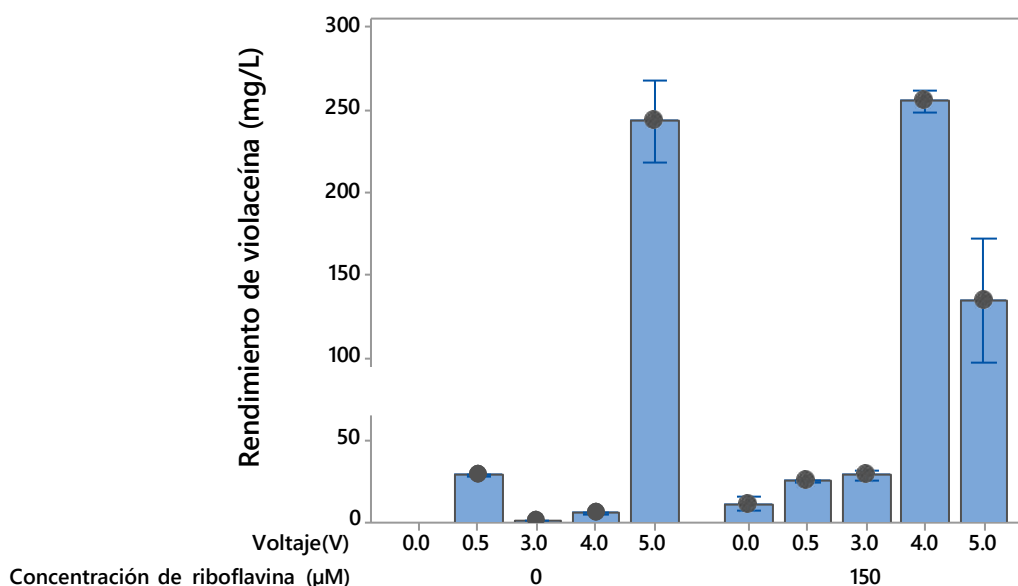
**Tabla 12.** Análisis de varianza de un experimento de superficie de respuesta.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Modelo</b>	9	37792	4199.08	70.16	0.000
Lineal	5	21834	4366.82	72.96	0.000
<b>Voltaje (V)</b>	<b>4</b>	<b>16234</b>	<b>4058.43</b>	<b>67.81</b>	<b>0.000</b>
Riboflavina (mM)	1	5600	5600.40	93.58	0.000
<b>Interacción de 2 factores</b>	<b>1</b>	<b>280997</b>	<b>280997</b>	<b>66.66</b>	<b>0.000</b>
Voltaje (V)*Riboflavina (mM)	1	190327	190327	66.66	0.000
<b>Error</b>	<b>20</b>	<b>1197</b>	<b>59.85</b>		
Total	29	38989			

Todas las determinaciones del diseño de superficie de respuesta son reportadas como la media de los ensayos ± desviación estándar

En la **Figura 8**, se puede apreciar la violaceína obtenida bajo un sistema de electrofermentación con una máxima producción de 243 mg/L con el tratamiento de 5 V en ausencia de riboflavina en 24 h. se presenta una gráfica de barras con sus

respectivos intervalos de confianza para determinar el rendimiento de la violaceína de acuerdo con los diferentes tratamientos.



**Figura 8.** Rendimiento de la violaceína producida por *Escherichia coli* BW25113 transformada por el plásmido pAJM.336Vio en un sistema de electrofermentación bajo el efecto del voltaje (0-5 V) y riboflavina (0 y 150 µM). Los datos representan la media de los ensayos  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los datos de la **Figura 8** muestran al tratamiento de 4 V con una concentración 150 µM de riboflavina como el mejor, sin embargo, el rendimiento obtenido no corresponde a la violaceína debido a la presencia de características distintas como consistencia espesa y coloración marrón, los cambios en las propiedades podrían adjudicarse a la interacción del electrodo con el mediador redox (Khoo *et al.*, 2020). La cepa *Escherichia coli* BW25113 transformada con el plásmido pAJM.336Vio produjo 243 mg/L de violaceína en 24 h utilizando el sistema de electrofermentación en caldo Terrific. Este rendimiento presenta diferencia con lo reportado por Zhou *et al.* (2018) quienes emplearon la cepa *Escherichia coli* B8/pTRPH1-pVio-VioE la cual produjo 250 mg/mL. Esta diferencia se atribuye a la alteración genética, que implica la acumulación de triptófano a partir de glucosa y la sobreexpresión de los cinco genes responsables de la producción de violaceína (Vio A, Vio B, Vio C, Vio D y Vio

E). Esta modificación genética favorece la utilización de glucosa como fuente de carbono en el metabolismo. Así, arriba Rodríguez *et al.* (2013) también reportaron resultados relevantes con *Escherichia coli* TOP10 en un lote alimentado, obteniendo un rendimiento máximo de 0.024 mg/L.

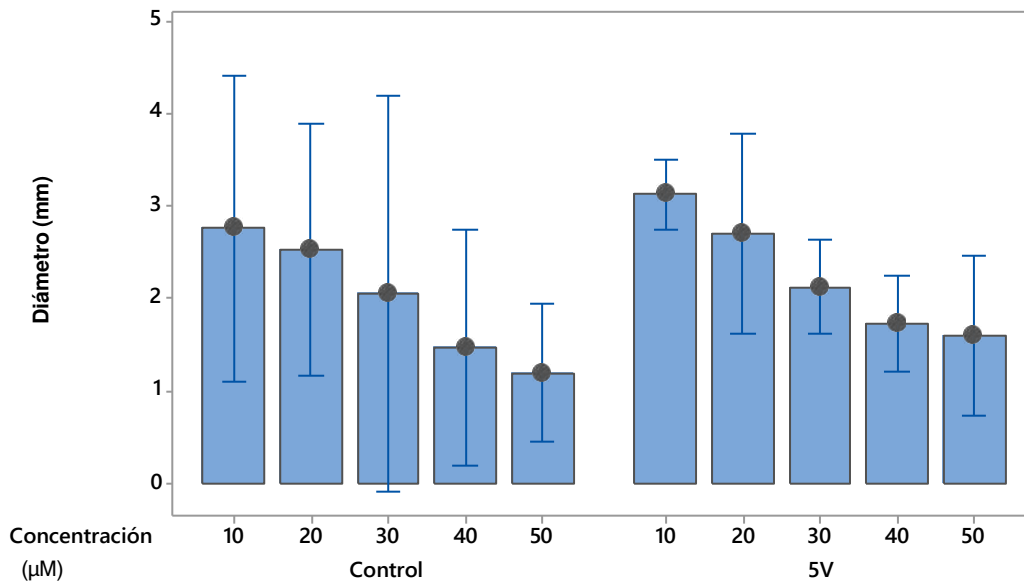
La producción de violaceína implica una ruta oxidativa que utiliza la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), una molécula donante de electrones esencial en bacterias. Esta ruta contribuye tanto a las reacciones anabólicas como al equilibrio redox. La producción observada (243 mg/L en 24h) en *Escherichia coli* BW25113 modificada genéticamente sugiere que el sistema de electrofermentación influyó positivamente en el balance redox.

Diversos estudios han evidenciado que la electrofermentación beneficia el equilibrio redox en la producción de subproductos. Por ejemplo, Richter *et al.* (2015) aplicaron la fermentación anódica para regular la fermentación del glicerol y generar etanol en una cepa de *Escherichia coli* modificada. Esta modificación incluyó genes (CymA-MtrA-STC) relacionados con el citocromo, esencial para el traslado de electrones a través de la membrana, utilizando el azul de metileno como mediador redox. Similarmente, Forster *et al.* (2017) utilizaron una cepa modificada de *Escherichia coli* y glucosa para producir acetoina, también con el auxilio del azul de metileno como mediador redox.

#### 6.2 Actividad antimicrobiana de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema electrofermentación.

La actividad antimicrobiana de la violaceína obtenida bajo un sistema de electrofermentación en caldo Terrific a 37 °C, fue evaluada después de 24 h de crecimiento. La extracción de la violaceína fue llevada a cabo con DMSO y posteriormente se evaluaron a diferentes concentraciones (1.13, 2.26, 3.39, 4.52 y 5.65 mg/mL). En la **Figura 9** se puede observar a grandes rasgos que la violencia obtenida bajo el sistema de electrofermentación presentó tener más actividad inhibitoria contra *Bacillus subtilis* a diferencia del control. La concentración de 5.65

mg/mL presentó mayor actividad inhibitoria generando un halo de inhibición de  $3.13 \pm 0.1$  mm.



**Figura 9.** Halos de inhibición de *Bacillus Subtilis* por la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema electrofermentación. Los datos representan la media de los ensayos  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los resultados son similares a los presentados por Huang et., al 2023, quienes emplearon concentraciones (2.5, 1.5, 1.0, 0.5 y 0.13 mg/L) e hicieron la extracción de violaceína cruda en etanol absoluto después de 24 h de crecimiento a una temperatura de 37°C de una *E.coli* modificada con el plásmido VioABCDE-SD en caldo LB. La concentración cuyo resultado fue similar al presente estudio fue de 0.5 mg/L ya que obtuvo un halo de inhibición de  $2.00 \pm 0.4$  mm en *Bacillus subtilis*. Por otro lado, Cheng et al., (2022) reportó un halo de inhibición de  $9.6 \pm 0.4$  mm con una concentración de 0.13 g/L. sobre *B. subtilis* empleando violaceína extraída con DMSO de *Chromobacterium violaceum* cultivada en un caldo nutritivo por 48 h a una temperatura de 25°C. Según lo reportado por Rütten et al. (2022) el área o zona de inhibición se ve afectada por: la temperatura del cultivo, la adición de muestras a la placa con el microorganismo, el espesor del agar y la composición del medio, por lo que los resultados de los estudios presentan una gran variabilidad obtenidos por el método de difusión de disco.

Hasta ahora la microscopia fluorescente ha sido la única técnica reportada que ha permitido visualizar el mecanismo de acción de la violaceína ante microorganismos Grampositivos como lo es *Bacillus subtilis*. Cauz *et al.*, (2019), utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* (PY79) que expresa la proteína verde fluorescente en la membrana citoplasmática. Esta cepa fue tratada con violaceína a una concentración de 0.8µM y posteriormente se tiñó con el marcador de membrana (FMI - 43) y yoduro de propidio, lo que permitió que se observara una discontinuidad en la membrana citoplasmática a causa de la actividad antimicrobiana de la violaceína. Esta ruptura de membrana provoca la pérdida de ATP y otros contenidos celulares provocando la muerte del microorganismo. *Escherichia coli* no presentó halos de inhibición lo que concuerda con Rodrigues *et al.*, (2014), lo cual atribuye a su doble membrana lipídica.

### 6.3 Capacidad antioxidante de la violaceína recombinante obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.

La capacidad antioxidante de la violaceína obtenida bajo un sistema de electrofermentación fue medida con el método ABTS. Nuevamente la violaceína obtenida bajo un sistema de electrofermentación fue la que presentó 2.7 veces más capacidad antioxidante (1763 µM de Trolox equivalentes) con un porcentaje de inhibición del radical de 55.38 % a diferencia del control que presentó un 32.08 % como se muestra en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Capacidad antioxidante de la violaceína obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación medida por el método de ABTS.

	<b>ABTS (µM de Trolox equivalentes)</b>	<b>% de inhibición de radical</b>
<b>Control</b>	638.44 ± 59.90	32.04 ± 3.33
<b>Tratamiento 5V</b>	1763.24 ± 212.85	55.39 ± 7.11

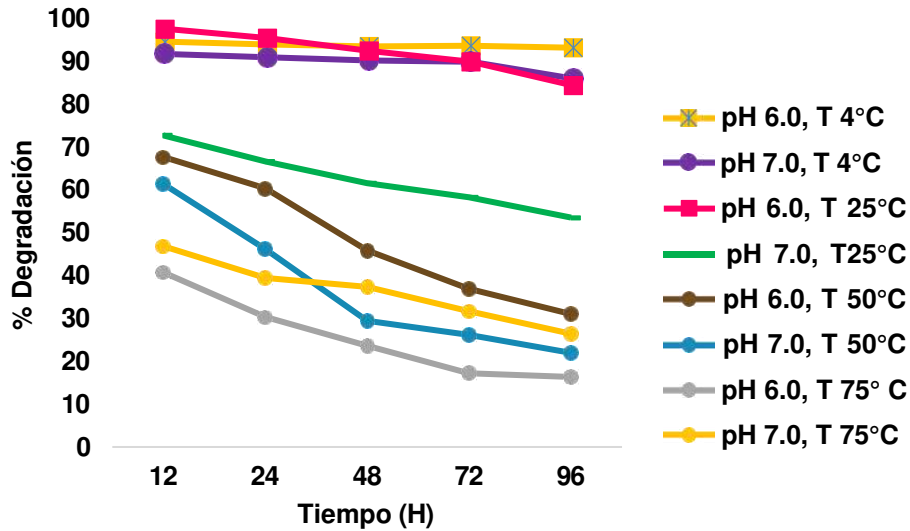
Cheng *et al.*, 2022 muestran la actividad antioxidante de la violaceína con respecto a la concentración de trolox de 0.0936 g/ L cuya capacidad antioxidante fue menor a la capacidad antioxidante de la violaceína estándar. También concluyen que el cambio en el aumento de la inhibición de radicales libres por la violaceína se asocia con la purificación de este compuesto después de haber pasado por un proceso de purificación.

#### 6.4 Caracterización de la estabilidad de la violaceína recombinante a diferentes condiciones al pH, temperatura y luz, obtenida bajo el efecto de un sistema de electrofermentación.

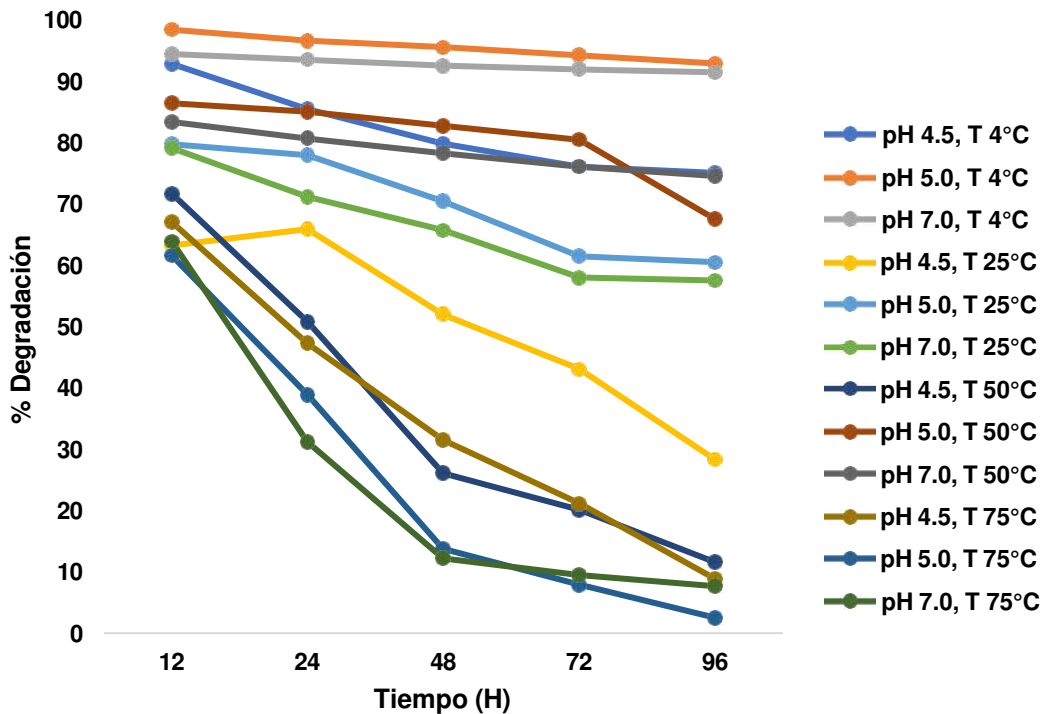
##### 6.4.1 Estabilidad de la violaceína con diferentes pH, temperaturas y en ausencia y presencia de luz.

Inicialmente, se realizó un análisis exploratorio donde se evaluó el pH y la temperatura durante un período de 96 horas. Se realizó un análisis de varianza donde se obtuvieron los factores significativos que contribuyen a la estabilidad de la violaceína. Encontramos que los pH de 6.0 y 7.0 favorecen la estabilidad de la violaceína recombinante como se muestra en la **Figura 10** control mientras que los pH de 4.5, 5.0 y 7.0 favorecieron a la estabilidad de la violaceína recombinante tratada con un voltaje de 5V bajo un sistema de electrofermentación como se muestra en la **Figura 11**. En ambas muestras la temperatura mostro un efecto negativo sobre la estructura de la violaceína. En la literatura Venil *et al.*, (2015) reportaron una estabilidad de la molécula entre pH de 1 a 11 y temperaturas de 25° y 30°C por un periodo de 678 h. Huang *et al.*, (2022) reportaron una estabilidad entre pH de 3 a 9 y temperaturas de -80°, -20° y 4°C por un periodo de tiempo de 720 h. Ambos autores evaluaron la estabilidad de la violaceína en presencia y ausencia de luz





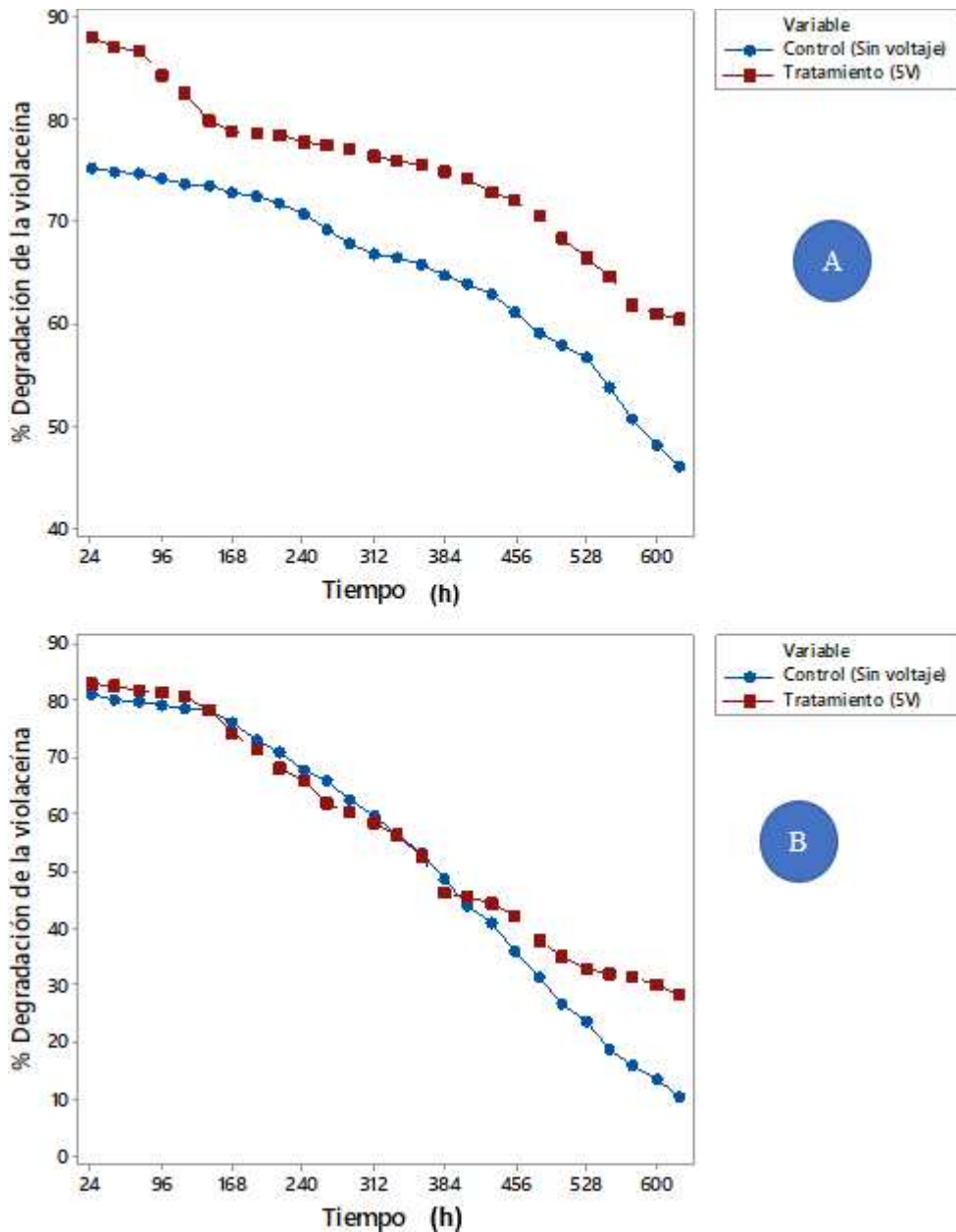
**Figura 10.** Porcentaje de degradación de la violaceína control recombinante a diferentes temperaturas ( $T^\circ$ ), pH y tiempo (h). Los datos representan la media de los ensayos ( $n=3$ ).



**Figura 11.** Porcentaje de degradación de la violaceína recombinante bajo un sistema de electrofermentación con el tratamiento de 5V a diferentes temperaturas ( $T^\circ$ ), pH y Tiempo (h). Los datos representan la media de los ensayos ( $n=3$ ).

Gracias a los resultados anteriores se logró determinar los mejores parámetros para favorecer la estabilidad de la violaceína. El pH 7.0 fue significativo tanto en la muestra control como en el tratamiento (5V) al igual que la temperatura de 4°C por 96 horas. Finalmente, los parámetros más prometedores fueron examinados bajo condiciones de luz y oscuridad durante un periodo adicional de 25 días como se muestra en la **Figura 12** (A) y (B). Podemos observar que la violaceína llega a un porcentaje de degradación de 57.4% en la hora 557 a pH 7.0 resguardo en una temperatura de 4°C.

Las condiciones que presentaron menor estabilidad en la violaceína fueron en pH 2.5 - 3.5 y de 8.5 a 10.0 color tanto en pH ácidos como alcalinos. En condiciones alcalinas el exceso de iones hidróxido (OH) del hidróxido de sodio (NaOH) desprotona el grupo fenólico del hidroxindol y el grupo amina del oxoindol, lo que provoca la formación de aniones y cambios estructurales en la violaceína. La violaceína al ser un pigmento natural tiende a degradarse ante la exposición de altas temperaturas. Este cambio de pigmentación conocido como copigmentación es un fenómeno en el cual los pigmentos o colorantes naturales cambian su estructura dependiendo de las interacciones que tenga con el medio, ya sea por cambio de pH, temperatura y luz (Aruldass *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Efecto de la presencia y ausencia de la luz en los mejores parámetros para la estabilidad de la violaceína. En la gráfica (A) podemos observar el % de degradación la violaceína en presencia de luz. La grafica (B) muestra el % de degradación de la violaceína.

## 7. CONCLUSIÓN

La violaceína producida bajo el efecto del sistema de electrofermentación mostró mayor estabilidad a pH ácidos así como a temperatura y la presencia de luz comparada con el control. El sistema de electrofermentación moduló positivamente la producción de la violaceína recombinante por *Escherichia coli* BW25113. La riboflavina como mediador redox no mostró efecto positivo sobre la producción de la violaceína. La capacidad antioxidante de la violaceína recombinante por *Escherichia coli* BW25113 bajo un sistema de electrofermentación se mejoró. El sistema de electrofermentación tuvo un impacto positivo en la capacidad antioxidante, estabilidad de la violaceína a diferentes valores de pH, temperatura y presencia de luz en la violaceína recombinante producida por *Escherichia coli* BW25113.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, W. A., Yusof, N. Z., Nordin, N., Zakaria, Z. A., & Rezali, M. F. (2012). Production and characterization of violacein by locally isolated *Chromobacterium violaceum* grown in agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1220-1234. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9553-7>
- Ahmed, A., Ahmad, A., Li, R., Al-Ansi, W., Fatima, M., Mushtaq, B. S., Basharat, S., Li, Y., & Bai, Z. (2021). Recent advances in synthetic, industrial and biological applications of violacein and its heterologous production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1465-1480. <https://doi.org/10.4014/jmb.2107.07045>
- Alkhalaf, L. M., Du, Y.-L., & Ryan, K. S. (2016). Synthetic biology approaches to new bisindoles. *Methods in Enzymology*, 575, 21-37. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.02.017>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 73(3), 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Ammar, E. M., Wang, X., & Rao, C. V. (2018). Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-glucose sugars: arabinose, lactose, and xylose. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18704-0>

- Antonio, R. V., & Creczynski-Pasa, T. B. (2004). Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 3(1), 85-91.
- Aruldass, C. A., Rubiyatno, R., Venil, C. K., & Ahmad, W. A. (2015). Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *RSC Advances*, 5(64), 51524-51536. <https://doi.org/10.1039/c5ra05765e>
- Asano, Y., Yasuda, T., Tani, Y., & Yamada, H. (1982). A new enzymatic method of acrylamide production. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(5), 1183-1189.  
<https://doi.org/10.1080/00021369.1982.10865240>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Banerjee, D., Parmar, D., Bhattacharya, N., Ghanate, A. D., Panchagnula, V., & Raghunathan, A. (2017). A scalable metabolite supplementation strategy against antibiotic resistant pathogen *Chromobacterium violaceum* induced by NAD<sup>+</sup>/NADH<sup>+</sup> imbalance. *BMC Systems Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0427-z>

- Beitz, A. M., Oakes, C. G., & Galloway, K. E. (2022). Synthetic gene circuits as tools for drug discovery. *Trends in Biotechnology*, 40(2), 210-225. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.06.007>
- Bhagchandani, D. D., Babu, R. P., Sonawane, J. M., Khanna, N., Pandit, S., Jadhav, D. A., Khilari, S., & Prasad, R. (2020). A comprehensive understanding of electro-fermentation. *Fermentation*, 6(3), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030092>
- Bilal, M., Wang, S., Iqbal, H. M. N., Zhao, Y., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2018). Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7759-7773. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9222-z>
- Browning, D. F., Hobman, J. L., & Busby, S. J. W. (2023). Laboratory strains of *Escherichia coli* K-12: things are seldom what they seem. *Microbial Genomics*, 9(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000922>
- Cao, W., Chen, W., Sun, S., Guo, P., Song, J., & Tian, C. (2007). Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *Theochem*, 817(1-3), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2007.04.022>
- Cauz, A. C. G., Carretero, G. P. B., Saraiva, G. K. V., Park, P., Mortara, L., Cuccovia, I. M., Brocchi, M., & Gueiros-Filho, F. J. (2019). Violacein

targets the cytoplasmic membrane of bacteria. *ACS Infectious Diseases*, 5(4), 539-549. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00245>

Chatragadda, R., & Dufossé, L. (2021). Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments. *Microorganisms*, 9(3), 637. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030637>

Chávez Alberto Cira, L., García-Barrientos, R., Elisa Gassos Ortega, L., Dublan Garcia, O., & Isabel Estrada Alvarado, M. (2020). Natural vs synthetic colors. In *Flavonoids - A Coloring Model for Cheering up Life*. IntechOpen.

Cheng, K.-C., Hsiao, H.-C., Hou, Y.-C., Hsieh, C.-W., Hsu, H.-Y., Chen, H.-Y., & Lin, S.-P. (2022). Improvement in violacein production by utilizing formic acid to induce quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050849>

Choi, S. Y., Kim, S., Lyuck, S., Kim, S. B., & Mitchell, R. J. (2015). High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 5(1), 15598. <https://doi.org/10.1038/srep15598>



- Civelek Yoruklu, H., Oguz Koroglu, E., Demir, A., & Ozkaya, B. (2019). The electromotive-induced regulation of anaerobic fermentation. In *Microbial Electrochemical Technology* (pp. 739-756). Elsevier.
- Coultate, T., & Blackburn, R. S. (2018). Food colorants: their past, present and future. *Coloration Technology*, 134(3), 165-186.  
<https://doi.org/10.1111/cote.12334>
- Dilrukshi, P. G. T., Munasinghe, H., Silva, A. B. G., & De Silva, P. G. S. M. (2019). Identification of synthetic food colours in selected confectioneries and beverages in Jaffna district, Sri Lanka. *Journal of Food Quality*, 2019, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2019/7453169>
- Durán, M., Ponezi, A. N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, M. F. S., Justo, G. Z., & Durán, N. (2012). Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research: An International Journal for Rapid Communications on Design and Mechanisms of Action of Biologically Active Agents*, 21(7), 1524-1532.  
<https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>
- Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G. R., & Nakazato, G. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1030-1045.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>

- Fang, M.-Y., Zhang, C., Yang, S., Cui, J.-Y., Jiang, P.-X., Lou, K., Wachi, M., & Xing, X.-H. (2015). High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0192-x>
- Feng, R., Chen, L., & Chen, K. (2018). Fermentation trip: amazing microbes, amazing metabolisms. *Annals of Microbiology*, 68(11), 717-729. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1384-5>
- Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F., & Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0745-9>
- Hollinshead, W. D., Rodriguez, S., Martin, H. G., Wang, G., Baidoo, E. E. K., Sale, K. L., Keasling, J. D., Mukhopadhyay, A., & Tang, Y. J. (2016). Examining *Escherichia coli* glycolytic pathways, catabolite repression, and metabolite channeling using  $\Delta$ pfk mutants. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0630-y>
- Immanuel, S. R. C., Banerjee, D., Rajankar, M. P., & Raghunathan, A. (2018). Integrated constraints based analysis of an engineered violacein pathway in *Escherichia coli*. *Bio Systems*, 171, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2018.06.002>

- Jeon, B. Y., & Park, D. H. (2010). Improvement of ethanol production by electrochemical redox coupling of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 94-100.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.0904.04029>
- Kanelli, M., Mandic, M., Kalakona, M., Vasilakos, S., Kekos, D., Nikodinovic-Runic, J., & Topakas, E. (2018). Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. *Frontiers in Microbiology*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01495>
- Khodaiyan, F., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. A. (2007). Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using response surface methodology. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(15), 2544-2552.  
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.2544.2552>
- Khoo, K. S., Chia, W. Y., Tang, D. Y. Y., Show, P. L., Chew, K. W., & Chen, W.-H. (2020). Nanomaterials utilization in biomass for biofuel and bioenergy production. *Energies*, 13(4), 892.  
<https://doi.org/10.3390/en13040892>
- Konzen, M., De Marco, D., Cordova, C. A. S., Vieira, T. O., Antônio, R. V., & Creczynski-Pasa, T. B. (2006). Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal*

*Chemistry*, 14(24), 8307-8313.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.013>

Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation – the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6, 575.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00575>

Lastiri-Pancardo, G., Mercado-Hernández, J. S., Kim, J., Jiménez, J. I., & Utrilla, J. (2020). A quantitative method for proteome reallocation using minimal regulatory interventions. *Nature Chemical Biology*, 16(9), 1026-1033. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0593-y>

Lehninger. (2002). *The principles of biochemistry* (3rd ed.). Worth.

Liu, J., Wu, J., Cai, X., Zhang, S., Liang, Y., & Lin, Q. (2021). Regulation of secondary metabolite biosynthesis in *Monascus purpureus* via cofactor metabolic engineering strategies. *Food Microbiology*, 95(103689), 103689.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103689>

Ma, J., Pan, X., Zhong, X., Bai, Q., Liu, G., & Yao, H. (2020). Preferential use of carbon central metabolism and anaerobic respiratory chains in porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* during bloodstream infection. *Veterinary Microbiology*, 249, 108830.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108830>

- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., & Yau, S.-T. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 5(1), 15713. <https://doi.org/10.1038/srep15713>
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: How to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 856-865. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>
- Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W.-J. (2017). Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>
- Nawaz, H., Gul, S., Shad, M., Arshad, R., Ali, A., Altaf, A., Gul, T., & Iqbal, W. (2020). Response surface optimization of prodigiosin production by mutagen-treated *Serratia marcescens* in different growth media. *Pharmacognosy Magazine*, 16(68), 99. [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_430\\_19](https://doi.org/10.4103/pm.pm_430_19)
- Nigam, P. S., & Luke, J. S. (2016). Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
- Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., Shinwari, Z. K., & Al-Harrasi, A. (2018). Therapeutic applications of

bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3 Biotech*, 8(4), 207. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1227-x>

Pailliè-Jiménez, M. E., Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Natural pigments of microbial origin. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.590439>

Park, H., Park, S., Yang, Y.-H., & Choi, K.-Y. (2021). Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(6), 879-901. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1892579>

Peebo, K., Valgepea, K., Maser, A., Nahku, R., Adamberg, K., & Vilu, R. (2015). Proteome reallocation in *Escherichia coli* with increasing specific growth rate. *Molecular bioSystems*, 11(4), 1184-1193. <https://doi.org/10.1039/c4mb00721b>

Rago, L., Pant, D., & Schievano, A. (2019). Electro-fermentation—microbial electrochemistry as new frontier in biomass refineries and industrial fermentations. In *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts* (pp. 265-287). Elsevier.

Rana, B., Bhattacharyya, M., Patni, B., Arya, M., & Joshi, G. K. (2021). The realm of microbial pigments in the food color market. *Frontiers in*

*Sustainable Food Systems*, 5.

<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.603892>

Rivero Berti, I., Gantner, M. E., Rodriguez, S., Islan, G. A., Fávoro, W. J., Talevi, A., Castro, G. R., & Durán, N. (2023). Potential biocide roles of violacein. *Frontiers in Nanotechnology*, 5.

<https://doi.org/10.3389/fnano.2023.1186386>

Rovina, K., Siddiquee, S., & Shaarani, S. M. (2016). Extraction, analytical and advanced methods for detection of Allura Red AC (E129) in food and beverages products. *Frontiers in Microbiology*, 7, 798.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00798>

Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., Korneli, C., de Souza Lima, A. O., Porto, L. M., Sprenger, G. A., & Wittmann, C. (2013). Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metabolic Engineering*, 20, 29-41.

<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.08.004>

Sasaki, K., Hirano, S.-I., Morita, M., Sasaki, D., Matsumoto, N., Ohmura, N., & Igarashi, Y. (2011). Bioelectrochemical system accelerates microbial growth and degradation of filter paper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 449-455. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2972-x>

- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., Rabaey, K., & Pant, D. (2016). Electro-fermentation - merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 866-878. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., & Smith, D. C. (2018). *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. *FEMS Microbiology Letters*, 365(15). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny162>
- Sen, T., Barrow, C. J., & Deshmukh, S. K. (2019). Microbial pigments in the food industry-challenges and the way forward. *Frontiers in Nutrition*, 6, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007>
- Shin, H. S., Zeikus, J. G., & Jain, M. K. (2002). Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 476-481. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0923-2>
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 261-280. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>



Silva, M. M., Reboredo, F. H., & Lidon, F. C. (2022). Food colour additives: A synoptical overview on their chemical properties, applications in food products, and health side effects. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(3), 379. <https://doi.org/10.3390/foods11030379>

Simon, J. E., Decker, E. A., Ferruzzi, M. G., Giusti, M. M., Mejia, C. D., Goldschmidt, M., & Talcott, S. T. (2017). Establishing standards on colors from natural sources: Establishing standards on colors. *Journal of Food Science*, 82(11), 2539-2553. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13927>

Skarstad, K., Boye, E., & Steen, H. B. (1986). Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *The EMBO Journal*, 5(7), 1711-1717. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04415.x>

Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., Kerzenmacher, S., & Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource Technology*, 186, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.116>

Sun, L., Xin, F., & Alper, H. S. (2021). Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances*,

47(107694), 107694.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107694>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. (2020). *Microbiology: An introduction, global edition* (13th ed.). Pearson Education.

Tymoczko, J. L., Berg, J. M., & University Lubert Stryer. (2009). *Biochemistry: A Short Course*. W. H. Freeman.

Vassilev, I., Aversch, N. J. H., Ledezma, P., & Kokko, M. (2021). Anodic electro-fermentation: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. *Biotechnology Advances*, 48(107728), 107728. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107728>

Venil, C. K., Aruldass, C. A., Abd Halim, M. H., Khasim, A. R., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2015). Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.006>

Venil, C. K., Dufossé, L., & Renuka Devi, P. (2020). Bacterial pigments: Sustainable compounds with market potential for pharma and food industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00100>

- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 48(7), 1065-1079. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>
- Vinella, D., & D'Ari, R. (1995). Overview of controls in the *Escherichia coli* cell cycle. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 17(6), 527-536. <https://doi.org/10.1002/bies.950170609>
- Vishnu, & Palaniswamy. (2018). Systematic approach on evaluating the in vitro antioxidant activity of violacein; Novel isolate *Chromobacterium vaccinii* CV5. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 11(2), 703-709. <https://doi.org/10.13005/bpj/1423>
- Wang, H., Jiang, P., Lu, Y., Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X.-H., Lou, K., & Wei, D. (2009). Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.008>
- Weusthuis, R. A., Lamot, I., van der Oost, J., & Sanders, J. P. M. (2011). Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends in Biotechnology*, 29(4), 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.007>

- Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 59-77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>
- Wu, Z., Wang, J., Liu, J., Wang, Y., Bi, C., & Zhang, X. (2019). Engineering an electroactive *Escherichia coli* for the microbial electrosynthesis of succinate from glucose and CO<sub>2</sub>. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1067-3>
- Yang, Y., Yu, Q., Wang, M., Zhao, R., Liu, H., Xun, L., & Xia, Y. (2022). *Escherichia coli* BW25113 competent cells prepared using a simple chemical method have unmatched transformation and cloning efficiencies. *Frontiers in Microbiology*, 13, 838698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838698>
- Ye, C., Yang, Y., Chen, X., Yang, L., Hua, X., Yang, M., Zeng, X., & Qiao, S. (2022). Metabolic engineering of *Escherichia coli* BW25113 for the production of 5-Aminolevulinic Acid based on CRISPR/Cas9 mediated gene knockout and metabolic pathway modification. *Journal of Biological Engineering*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00307-7>
- Zhang, L., Laborda, E., Darwish, N., Noble, B. B., Tyrell, J. H., Pluczyk, S., Le Brun, A. P., Wallace, G. G., Gonzalez, J., Coote, M. L., & Ciampi, S. (2018). Electrochemical and electrostatic cleavage of

alkoxyamines. *Journal of the American Chemical Society*, 140(2), 766-774. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11628>