

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria
de una matriz alimentaria adicionada con un pigmento recombinante”**

TESIS DE POSGRADO

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

L.C.N. Melanie Quijada Carretas

DIRIGIDO POR

Dr. Aldo Amaro Reyes

CODIRIGIDO POR

Dra. Ana Angelica Feregrino Pérez

**CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO.
NOVIEMBRE 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 la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con un pigmento recombinante”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

L.C.N. Melanie Quijada Carretas

Dirigido por

Dr. Aldo Amaro Reyes

Codirigido por

Dra. Ana Angelica Feregrino Pérez

Dr. Aldo Amaro Reyes

Director

Dra. Ana Angelica Feregrino Pérez

Codirectora

Dr. Carlos Regalado González

Sinodal

Dra. Rocío Campos Vega

Sinodal

Dra. Monserrat Escamilla García

Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre 2024

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD DE 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 reporto 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.

RESUMEN

Los colorantes son uno de los aditivos más utilizados por la industria alimentaria. Estos son empleados para conferir color a los productos que no lo tienen o cuya coloración natural se alteró durante su procesamiento, de modo que sean visualmente atractivos y apetitosos para los consumidores. Existen dos tipos de colorantes utilizados en alimentos y bebidas: artificiales y naturales. Los colorantes artificiales son sencillos de sintetizar y tienen mayor estabilidad, sin embargo, su uso se ve limitado debido a sus efectos adversos en la salud. Por otra parte, los pigmentos naturales provienen de diferentes tipos de microorganismos, los cuales, por su naturaleza, contienen compuestos bioactivos que pueden tener beneficios para la salud, como propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por lo tanto, se ha aumentado el interés en investigar su producción y aplicaciones. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de un pigmento recombinante obtenido mediante fermentación, a una matriz alimentaria sobre su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. La violaceína es un bisindol púrpura que se produce mediante la condensación de dos moléculas de triptófano que involucran 5 enzimas. El plásmido pAJM.336Vio, que contiene las enzimas para la producción de violaceína, fue extraído de un inoculo de *Escherichia coli* con un kit de extracción. Tras la extracción dicho plásmido se introdujo en células de *Pseudomonas chlororaphis* por electroporación. El pigmento microbiano se obtuvo de las células recombinantes de *P. chlororaphis* a través de un sistema de fermentación tradicional. La capacidad antioxidante del pigmento se cuantificó mediante ensayos de capacidad antioxidante de reducción férrica (FRAP) alcanzando 269.61 $\mu\text{mol/mL}$. En el ensayo de captación del radical DPPH se obtuvo un promedio de inhibición del radical de 65.83 % para la violaceína cruda y 48.76 % para la formulación en gelatina. En cuanto al ensayo antiinflamatorio, este alcanzó una estabilidad de membrana promedio de 81.6 %. El pigmento recombinante mostró propiedades antioxidantes y antiinflamatorias cuando se agregó en una matriz alimentaria de grenetina, permaneciendo estable en estas funciones durante siete días bajo condiciones controladas de temperatura. Una evaluación tecno-económica del proceso a gran escala permitirá determinar la viabilidad comercial del pigmento y facilitar su incorporación en productos industriales con propiedades bioactivas.

Palabras clave: violaceína, fermentación, colorantes, antioxidantes, antiinflamatorio.

ABSTRACT

Colorants play an important role in the food industry, as they provide color to products that either lack natural coloration or have lost it during production, making them more appealing and appetizing to consumers. Two types of colorants are used in food and beverages: artificial and natural. Artificial colorants are easier to synthesize and offer greater stability, though their use remains limited due to potential adverse effects on human health. In contrast, natural pigments, derived from various microorganisms, contain bioactive compounds that may offer health benefits, such as antioxidant and anti-inflammatory properties. Violacein, a purple bisindol is produced through the condensation of two tryptophan molecules involving five enzymes. Plasmid pAJM.336Vio, which contains the genes for violacein production, was extracted from an *Escherichia coli* inoculum using an extraction kit. The plasmid was introduced to *Pseudomonas chlororaphis* cells by electroporation (1.8 kV). The microbial pigment was subsequently obtained from the recombinant *P. chlororaphis* cells through a traditional fermentation system. The antioxidant capacity of the pigment was quantified using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, yielding a value of 269.61 $\mu\text{mol/mL}$. In the DPPH assay, the pigment demonstrated an average radical inhibition of 65.83 % for crude violacein and 48.76 % for the gelatin formulation. The anti-inflammatory assay indicated that the gelatin formulation maintained most of its efficacy over a 21-day shelf-life, reaching an average membrane stability of 81.6 %. The recombinant pigment showed antioxidant and anti-inflammatory properties when added to a gelatin-based food matrix, remaining stable in these functions for seven days under controlled temperature conditions. A techno-economic evaluation of the large-scale process will allow for determining the commercial viability of the pigment and facilitate its incorporation into industrial products with bioactive properties.

Key words: violacein, fermentation, colorants, antioxidant, anti-inflammatory.

DEDICATORIA

A mis padres, Janeth Carretas y Rosario Quijada, quienes nunca me dieron la idea de que no podía lograr lo que quisiera lograr, o ser quien yo quisiera ser. Su amor y apoyo incondicional, hace que todo lo que soy sea posible.

A mi hermana, Grecia, a quien con mucho cariño le dedico todo el esfuerzo puesto por la realización de este trabajo, Que tanto mis logros como mis errores te sirvan de aprendizaje.

A mi familia, por su constante presencia y amor en mi vida. Teniéndolos a ustedes sé que tengo todo un equipo detrás de mí.

A mí, por no rendirte.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro, por impulsar el desarrollo del conocimiento, brindando apoyo con infraestructura y vinculación. Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada (CVU 1198548).

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) por su aportación para la obtención de los bienes materiales necesarios para la realización del proyecto y contribuir a mi formación profesional. Folio de proyecto: FOPER-2023-FQU03562.

De igual manera, agradezco al Dr. José Utrilla Carreri y al Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Morelos, por abrirme las puertas y brindarme total apoyo durante mi estancia, realizada de febrero a abril de 2024. Su respaldo fue fundamental para llevar a cabo los experimentos necesarios y concluir con éxito este proyecto.

Especial agradecimiento a mi comité de sinodales, Dra. Ana Angelica Feregrino Pérez, Dr. Carlos Regalado González, Dra. Rocío Campos Vega y Dra. Montserrat Escamilla García, quienes compartieron sus conocimientos y brindaron apoyo siempre que lo necesité. Agradezco también el apoyo de mi tutora, Dra. Monserrat Hernández Iturriaga, quien siempre me escuchó y motivó con sus consejos.

Y principalmente, a mi director de tesis, Dr. Aldo Amaro Reyes, le agradezco profundamente por su dedicación, paciencia y confianza en mí. Su experiencia y apoyo constante fueron fundamentales para superar cada reto de este proyecto. Gracias por enseñarme a ver más allá de los límites.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Colorantes en la industria alimentaria	14
2.1.1. Colorantes microbianos	16
2.2. Violaceína	18
2.2.1. Biosíntesis	20
2.2.2. <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	21
2.2.2.1. Producción de violaceína por <i>P. chlororaphis</i>	22
2.2.2.2. Estabilidad de la violaceína producida por microorganismos..	22
2.3. Fermentación por microorganismos	23
2.4. Sistema bioelectroquímico	24
2.4.1. Electrofermentación	25
2.5. Regulación del uso de colorantes	27
2.6. Alimentos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria	27
2.6.1. Gelatina como matriz alimentaria	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Material biológico	34
5.2. Medio Nutritivo	34
5.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> p. Vio y extracción del plásmido pAJM.336Vio.....	35
5.4. Cultivo y transformación de <i>P. chlororaphis</i>	36
5.5. Siembra de la cepa transformada	37
5.6. Pre-inóculo	38
5.7. Fermentación tradicional	38
5.8. Sistema de electrofermentación	38
5.9. Extracción de violaceína	39
5.10. Métodos analíticos	39
5.10.1. Capacidad antioxidante	39
5.10.1.1. Ensayo de poder antioxidante reductor ferrico (FRAP)	39
5.10.1.2. Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)	40
5.11. Formulación de la gelatina	41

5.12. Vida de anaquel	41
5.13. Capacidad antiinflamatoria	42
5.13.1. Preparación de glóbulos rojos	42
5.13.2. Ensayo de estabilidad de membrana reactiva	43
5.14. Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1. Extracción del plásmido	45
6.2. Transformación de la bacteria	46
6.3. Modificación del medio nutritivo	48
6.4. Pruebas de sensibilidad al antibiótico	50
6.5. Fermentación tradicional	51
6.6. Producción del pigmento recombinante	54
6.7. Extracción del pigmento	56
6.8. Formulación de la gelatina	57
6.9. Evaluación de la capacidad antioxidante	59
6.10. Capacidad antiinflamatoria durante la vida de anaquel	62
6.11. Capacidad antioxidante durante la vida de anaquel	64
6.12. Análisis microbiológico	66
7. CONCLUSIONES	67
8. CONSIDERACIONES ETICAS	68
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
10. ANEXOS	79
10.1. Aprobación de CONBIOETICA	79
10.2. Carta responsiva	81
10.3. Consentimiento informado	84
10.4. Carta de revocación del consentimiento informado	89
10.5. Invitación para los participantes	91

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación por origen de colorantes sintéticos y los colores que manifiestan (Elaboración propia)	15
Tabla 2 Propiedades físicas, químicas y biológicas importantes de la violaceína (de Carvalho et al., 2006; Gómez-Gómez et al., 2019; Subramaniam et al., 2014)	20
Tabla 3 Ejemplos de alimentos con capacidad antioxidante y la cantidad del compuesto antioxidante que aportan (modif. de Batalla, 2007)	28
Tabla 4 Composición del medio N2XM9-10X	34
Tabla 5 Composición del medio M9	49
Tabla 6 Composición del medio modificado	49
Tabla 7 Capacidad antioxidante medida en mmol Trolox eq/mg de violaceína para diferentes muestras, incluyendo una gelatina comercial, pigmento recombinante diluido y dos formulaciones experimentales	59
Tabla 8 Porcentaje de inhibición del radical DPPH para diferentes muestras	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pigmentos microbianos con limitaciones en un círculo cromático representando los colores que producen y su estructura química (adaptado de Dufossé, 2018; Venil et al., 2020)	18
Figura 2. Estructura química de la violaceína (Ballantine et. al., 1958)	19
Figura 3. Biosíntesis de violaceína (modificado de Ahmed et. al., 2021)	21
Figura 4. Plásmido pAJM.336Vio (Sin publicar, proporcionado por Dr. José Utrilla Carreri, CCG-UNAM, Cuernavaca, Morelos, México)	22
Figura 5. Intercambio de electrones en un SBE (modif. de Moscoviz et al., 2016)	25
Figura 6. Comparación entre una fermentación tradicional y una electrofermentación (modif. de Moscoviz, 2016)	26
Figura 7. Justificación de la necesidad del estudio y producción de pigmentos naturales sobre pigmentos sintéticos	32
Figura 8. Panel A – Gel de agarosa 1 %, donde M representa el marcador y E las muestras d diferentes extracciones del plásmido. Panel B – Construcción del plásmido pAJM.336Vio productor de violaceína	46
Figura 9. Colonias de <i>P. chlororaphis</i> transformadas en agar LB	47
Figura 10. Resultado del estriado de las colonias <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio transformadas en agar LB crecidas durante 24 h a 30 °C	47
Figura 11. Biomasa inoculada en medio M9-10X después de una incubación de 18 h a 30 °C y 250 rpm	48
Figura 12. Panel A – estriado de <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio en agar con 40 µg/L de gentamicina. Panel B – estriado de <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio en agar con 50 µg/L de gentamicina	50
Figura 13. Matraces inoculados con biomasa de <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio al inicio y final del periodo de incubación de 18 h a 30 °C y 250 rpm	51
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio representada por la densidad óptica en función del tiempo	52
Figura 15. Producción de violaceína (mg/L) por <i>P. chlororaphis</i> pAJM.336Vio durante 92 h a 30 °C en medio N2XM9-10X fermentación tradicional, fermentación tradicional más inductor y el sistema de electrofermentación	56
Figura 16. Absorbancia de las formulaciones de las marcas comerciales	57
Figura 17. Muestras de gelatina formulada con violaceína	58
Figura 18. Gelatina formulada con violaceína en sólido	58
Figura 19. Porcentaje de estabilidad de membrana a lo largo de 3 semanas de evaluación	63
Figura 20. Capacidad antioxidante del ensayo FRAP durante un periodo de 3 semanas para la formulación experimental	65
Figura 21. Capacidad antioxidante del ensayo DPPH durante un periodo de 3 semanas para la formulación experimental	65

1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos son uno de los aditivos más utilizados en la industria alimentaria. Estos son empleados para lograr dar un color atractivo a los productos que naturalmente son incoloros o cuya coloración sufrió alteraciones durante el proceso de fabricación, de manera que sean más agradables a la vista y más apetecibles para el consumidor. Diversos estudios han demostrado que la mayoría de los seres humanos aceptan, o no, un producto dependiendo de la apariencia y el color que muestre (Spence & Piqueras-Fizman, 2016). Dado que los productos, ya sea por su naturaleza o proceso de producción, tienden a sufrir cambios en su coloración, la industria alimentaria ha optado por el uso de colorantes para lograr un mayor porcentaje de aceptación entre los consumidores, lo cual también resulta en mayores ganancias. Se estima que para el 2027, el mercado de pigmentos y colorantes alcance los 49.1 mil millones de dólares (Chatragadda & Dufossé, 2021). Existe una gran variedad de colorantes utilizados como aditivos para alimentos y bebidas, los cuales, dependiendo su origen, podemos clasificar en dos: artificiales y naturales. Los colorantes artificiales, a pesar de poder ser sintetizados de una manera más sencilla y con un comportamiento más estable, su uso/potencial es limitado por sus efectos adversos en la salud, y a que no son renovables y no son biodegradables. Por lo tanto, no pueden promoverse como colorantes seguros para el ambiente y el consumo humano (Mota et al., 2021). Por otro lado, los colorantes naturales se derivan de fuentes como plantas, insectos, animales y minerales, los cuales por sus compuestos bioactivos con potencial beneficio a la salud como efecto antioxidante, antiinflamatorio o conferir propiedades antimicrobianas, han aumentado el interés por el estudio de (Ramesh et al., 2019). Existe un espectro de colores naturales provenientes de las fuentes mencionadas, estos colores son exhibidos por varias moléculas orgánicas e inorgánicas y su absorción de luz en la región visible (Bhat, 2005).

La demanda de pigmentos provenientes de vías naturales ha aumentado, siendo las plantas y microorganismos las dos principales fuentes. Sin embargo, la

producción de pigmentos extraídos de plantas presenta su propia lista de limitaciones, como lo es su inestabilidad frente al calor, tipo de fermentación aplicada, pH, baja solubilidad en agua y sus fuentes de carbono y nitrógeno (Kumar, 2015). Por otro lado, los pigmentos microbianos presentan ventajas en términos de producción en comparación con los pigmentos similares obtenidos de vegetales o animales. Por lo tanto, se espera que la producción de pigmentos a través de bioprocesos que involucren microorganismos, con una alta tasa de crecimiento, sea más competitiva en términos de productividad industrial. En consecuencia, se está prestando una gran atención a la síntesis de biopigmentos, mediante el uso de microorganismos (Babitha, 2009; Panesar et al., 2015). En este trabajo se evaluó el efecto de la adición del pigmento recombinante sobre la capacidad antioxidante y antiinflamatoria, así como el efecto de un sistema bioelectroquímico sobre su producción, en una matriz alimentaria. Se espera proponer una alternativa para la producción de pigmentos microbianos naturales que puedan ser incorporados a matrices alimentarias y así contribuir al bienestar de la población.

2. ANTECEDENTES

2.1. Colorantes en la industria alimentaria

El principio del siglo XIX marcó el comienzo de la producción masiva y recuperación de colorantes sintéticos a partir de productos derivados del petróleo (Chaitanya, 2014). A medida que el procesamiento y conservación de alimentos comenzó a desarrollarse dentro del mundo industrial, la importancia del color de los alimentos aumentó. Como resultado del incremento en la atención y demanda del consumidor, se generó un incentivo estético y comercial para potenciar los colores de los alimentos procesados. Lo cual llevó a la industria a mejorar el atractivo de sus productos con materiales a los que pudieran acceder (Coultate & Blackburn, 2018).

Los aditivos alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos con el fin de cumplir diversas funciones tecnológicas, como el color, sabor, conservación, textura, humedad, entre otras. Los colorantes sintéticos son uno de los aditivos más utilizados, su propósito es otorgar color a los alimentos para varios fines, como ocultar colores no deseados, uniformizar el color, prolongar la duración del color específico, o intensificar o suavizar el color de los alimentos (Carocho et al., 2014). Los colorantes se pueden clasificar según su origen en cinco grupos distintos: compuestos azoicos, derivados quinofalónicos del amarillo de quinolina, triarilmetanos, xanteno y colorantes índigos (Tabla 1). Los compuestos azoicos presentan colores que varían desde el amarillo hasta el rojo. Los derivados quinofalónicos del amarillo de quinolina también muestran colores en el rango del amarillo al rojo. Los triarilmetanos se basan en la estructura del trifenilmetano para producir diferentes compuestos, mientras que los xantenos están compuestos exponen colores como amarillo fluorescente, rosa o azul. Por último, los colorantes índigos se derivan del tinte índigo y proporcionan una tonalidad azulada (Dossi et al., 2007; Sarıkaya et al., 2012).

Tabla 1. Clasificación por origen de colorantes sintéticos y los colores que manifiestan (adaptado de Carocho et al., 2014).

Clasificación	Color producido
Azoicos	Amarillo – rojo
Quinofalón	Amarillo – rojo
Triarilmetano	Verde, violeta
Xantenos	Amarillo, rosa, azul
Indigoides	Azul

Adicionalmente, este tipo de colorantes son más económicos, estables y vibrantes que aquellos de origen natural, dado sus ventajas la industria tiende a preferir su uso, pero presentan importantes riesgos para la salud. Se ha reportado que los colorantes representan una categoría de aditivos con mayores riesgos para la salud (Kobylewski & Jacobson, 2012).

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el interés en la posible toxicidad de los aditivos empleados en la industria alimentaria, especialmente en lo que respecta a los colorantes azoicos. Estos colorantes suelen presentarse en colores intensos y llamativos. No obstante, la principal preocupación que limita su uso se relaciona con la posible capacidad carcinogénica que pueden adquirir a través de la conversión de sus componentes por parte de la microbiota intestinal en metabolitos cancerígenos (Chung, 2016). Se teme que los aditivos alimentarios y sus combinaciones puedan afectar negativamente el desarrollo neurológico. Debido a cuestiones éticas, estos efectos solo pueden ser estudiados en animales, y un estudio en ratas hembra y sus crías encontró que la exposición prenatal a una mezcla de colorantes alimentarios tuvo un efecto perjudicial en la memoria de las ratas (Amchova et al., 2015). Además, se han observado alteraciones en las

expresiones de las densidades de los receptores de glutamato y acetilcolina (Ceyhan et al., 2013).

La literatura científica y estudios clínicos sugieren que, en el consumo normal, es poco probable que estos aditivos causen daño a la salud. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayoría de los estudios que evaluaron el impacto de los colorantes alimentarios en la salud se enfocaron en evaluar la ingesta de un solo colorante, en lugar de mezclas de estos, que es lo más común en las tendencias de alimentación de la población general (Amchova et al., 2015). En vista de las últimas investigaciones, resulta importante que los organismos reguladores e industrias desarrollen procesos sostenibles y económicamente eficientes para la producción de colorantes verdaderamente inocuos para el consumo humano.

2.1.1. Colorantes microbianos

En los últimos años, los consumidores han mostrado una fuerte demanda por productos más naturales, lo que ha llevado a una tendencia creciente de reemplazar colorantes sintéticos por pigmentos naturales. Estos pigmentos se han utilizado en muchos campos, incluyendo la producción de alimentos, textiles, papel, agricultura, ciencia y tecnología del agua. Los pigmentos naturales no solo mejoran la calidad de los productos, sino que también tienen propiedades biológicas beneficiosas, como la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana (Ahmad, et al., 2012). Por lo tanto, es importante explorar diversas fuentes naturales de colorantes alimentarios de calidad, incluyendo el uso de microorganismos. El uso de pigmentos naturales en alimentos procesados, por ser biodegradables, amigables con el ambiente y usar recursos renovables, son un área con gran potencial (Aruldass et al., 2018).

Consecuentemente, la industria alimentaria está mostrando un interés creciente en utilizar tecnologías microbianas para producir colorantes alimentarios, lo que puede ayudar a abordar la preocupación pública sobre los posibles efectos adversos de los colorantes sintéticos en la salud. Además de los beneficios para la salud

humana, el uso de colorantes naturales puede contribuir a la preservación de la biodiversidad (Tuli et al., 2015).

Los microorganismos son una opción favorable para la producción de biopigmentos debido a su mayor disponibilidad, estabilidad, eficiencia de costos, rendimiento y facilidad de procesamiento. Se han creado diversos biopigmentos utilizando microorganismos, logrando obtener una diversa gama de colores, tal como podemos observar en la Figura 1. Además de su uso en la industria cosmética y alimentaria como colorantes, muchos de estos pigmentos también presentan beneficios para la salud, como propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Duran, 2012). Se ha demostrado que la violaceína, un pigmento microbiano con múltiples usos puede proteger contra el daño oxidativo en la ulceración gástrica al estimular el mecanismo de defensa de la mucosa (Antonisamy & Ignacimuthu, 2010).

Los pigmentos microbianos son una valiosa fuente de colorantes naturales y ofrecen una amplia variedad de propiedades. Se necesitan esfuerzos más rigurosos para la utilización de sustratos orgánicos para el crecimiento de microorganismos productores de pigmentos. También es importante investigar cómo diversos parámetros del proceso afectan la tasa de producción de estos pigmentos.

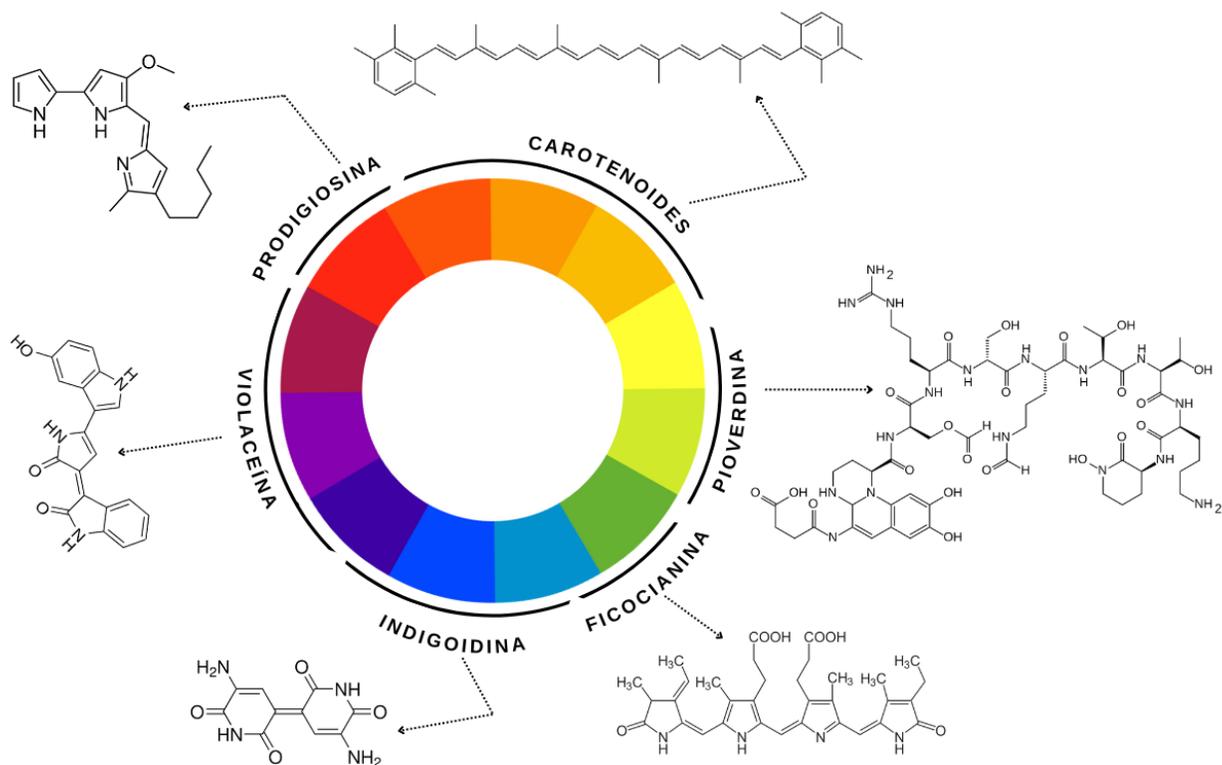


Figura 1. Pigmentos microbianos con limitaciones en un círculo cromático representando los colores que producen y su estructura química (adaptado de Dufossé, 2018; Venil et al., 2020).

2.2. Violaceína

La violaceína es un bisindol de color púrpura que se encuentra de forma natural en varias bacterias y se produce a través de la condensación de dos moléculas de triptófano (Gómez-Gómez et al., 2019). Su estructura química (Figura 2) consta de tres unidades estructurales diferentes, y se ha descubierto la ruta biosintética completa a partir de L-triptófano que involucra cinco enzimas (VioA, VioB, VioE, VioD y VioC) (Hoshino, 2011). Aunque la violaceína es un metabolito en respuesta a la señalización de quórum, también se ha demostrado que tiene múltiples propiedades biológicas, físicas y químicas (Tabla 2). Además, puede actuar de forma sinérgica con otros antibióticos. La violaceína tiene una gran importancia industrial y se utiliza en diversas áreas, como la cosmética, los textiles y la industria

no cancerosas, por lo que su uso clínico contra el cáncer dependerá de que sea más tóxica para las células cancerosas que para las células normales.

Tabla 2. Propiedades físicas, químicas y biológicas importantes de la violaceína.

PROPIEDADES DE LA VIOLACEÍNA		
Físicas	Químicas	Biológicas
Hidrofóbico	Alcaloide	Antibacteriano
Absorción óptima a 575 nm	Soluble en compuestos orgánicos	Fotoquimoterapéutico
Coloración púrpura	Activo contra bacterias Gram + y -	Antioxidante

(de Carvalho et al., 2006; Gómez-Gómez et al., 2019; Subramaniam et al., 2014)

2.2.1. Biosíntesis

La vía biosintética de la violaceína, ejemplificada en la Figura 3, ha sido estudiada a profundidad. Se conoce, que se trata de cinco enzimas, VioA, B, C, D y E. Partiendo de L-triptófano (L-TRP), este se convierte en ácido indol 3-pirúvico (IPA) por la enzima VioA monooxigenasa triptófano-2 dependiente de flavina. IPA imina se dimeriza a un dímero de imina, que es catalizado por VioB. VioB actúa como una catalasa con hemo b como cofactor. VioE convierte el dímero de imina en ácido protoviolaceínico (PDVA) mediante el desplazamiento 1,2 de un anillo de indol. En ausencia de VioE, el dímero de imina inestable se convierte espontáneamente en ácido cromopirrólico (CPA). Luego, el PDVA se convierte en ácido protoviolaceínico (PVA) mediante una oxigenasa VioD dependiente de NADP al agregar un grupo hidroxilo en la posición C5 de un anillo de indol. El PVA se convierte en ácido violaceínico (VA) por otra oxigenasa VioC dependiente de NADP, al agregar un grupo hidroxilo en la posición C2 del otro anillo de indol, seguido de la formación del producto final, violaceína, a través de la descarboxilación oxidativa espontánea. La enzima VioC permite su uso de PDVA como sustrato y da como resultado la formación de desoxiviolaceína, el principal subproducto. Por lo tanto, normalmente

se obtiene una mezcla de violaceína y desoxiviolaceína cuando se expresa todo el operón *vioABCDE*, la cual se denomina "violaceína cruda" (Balibar & Walsh, 2006).

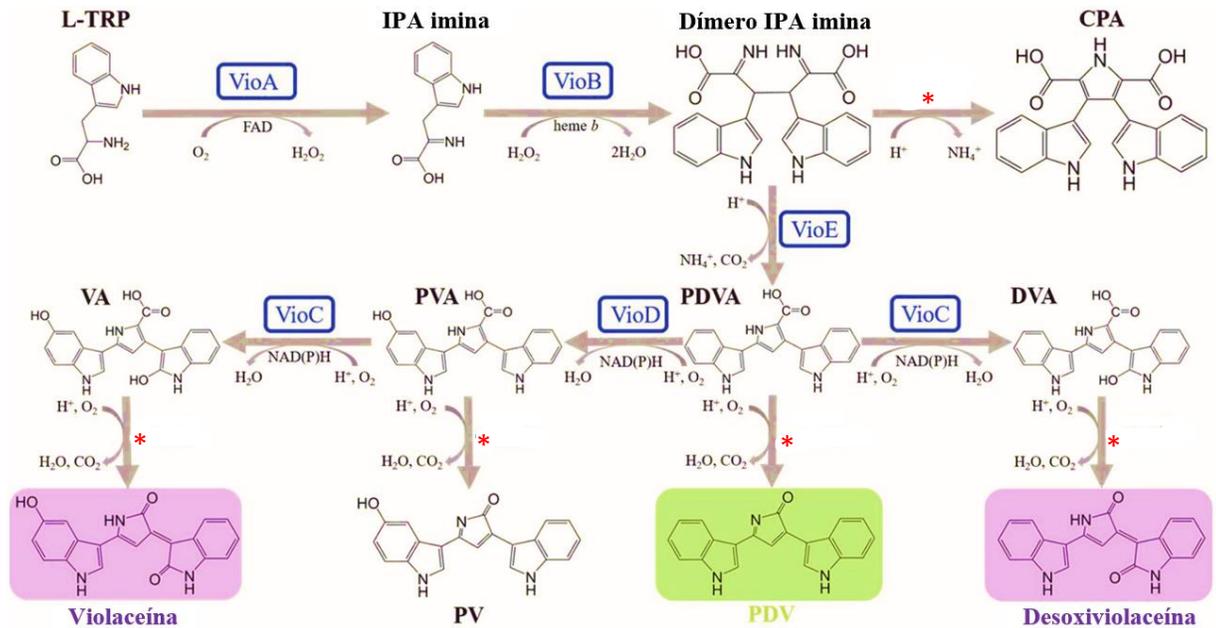


Figura 3. Biosíntesis de violaceína. *Espontáneo (modificado de Ahmed et al., 2021).

2.2.2. *Pseudomonas chlororaphis*

Pseudomonas chlororaphis se observa como una bacteria en forma de bastoncillo, Gram negativa, la cual no esporula y cuenta con uno o más flagelos en los polos. Su crecimiento se produce entre 24 y 48 h en un rango de temperatura de 27 a 32 °C, siendo un microorganismo estrictamente aerobio (Ghergab et al., 2021).

Durante la colonización, las *Pseudomonas* sufren estrés oxidativo que resulta en la formación de equivalentes reductores, específicamente NADPH, esto como mecanismo de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS). La bacteria logra esta producción de NADPH mediante la vía de las pentosas fosfato (VPF), a través de la cual canaliza el carbono y produce grandes cantidades de NADPH. Esta particularidad ha generado interés entre los investigadores, pues este mecanismo

después de 24 h, mostrando más del 90% de descomposición tanto en presencia como en ausencia de luz. Bajo condiciones altamente ácidas de pH 2, la violaceína mostró un nivel moderado de descomposición, dejando alrededor del 65% del pigmento remanente en la solución después de 30 días. En general, ajustar el pH de la solución a 5 – 9 tuvo el menor impacto en la intensidad del pigmento, según la cantidad de pigmento residual en la solución. Además, la violaceína en metanol, muestra buena estabilidad al calentarse durante 2 horas a temperaturas que oscilan entre 40 °C y 100 °C con pigmentos residuales en solución alrededor del 97 %. Esto puede indicar su potencial para aplicarse en diversas aplicaciones industriales (Ahmad, Yusof, et al., 2012).

2.3. Fermentación por microorganismos

La fermentación ha sido utilizada como un método de producción de alimentos desde tiempos antiguos, cuando los humanos comenzaron a desarrollar la civilización. Actualmente, la fermentación se ha convertido en una rama crucial de la bioingeniería y es un campo multidisciplinario que involucra áreas como la microbiología, ingeniería química, ingeniería genética, ingeniería celular, ingeniería mecánica e ingeniería de software y hardware. Con el desarrollo de la biotecnología moderna, la fermentación se ha aplicado en todos los aspectos de la vida, incluyendo la producción de alimentos fermentados, la industria y la salud humana, donde los microbios y los metabolitos juegan un papel crucial (Feng et al., 2018).

La fermentación ha sido clasificada en fermentación en estado sumergido (SmF) y en estado sólido (SSF) basado principalmente en el tipo de cepa y el pigmento que se desea extraer. La fermentación SmF aprovecha sustratos líquidos como caldos de flujo libre. Durante la fermentación, los compuestos bioactivos se liberan en el caldo. Dado que los sustratos se consumen rápidamente, es necesario reemplazarlos o complementarlos constantemente con nutrientes. Esta forma de fermentación es apropiada para microorganismos, como las bacterias, que

necesitan un alto contenido de humedad. Además, un beneficio adicional de esta técnica es que la purificación y refinamiento de los productos es más sencilla. SmF se utiliza principalmente para extraer metabolitos secundarios que requieren la forma líquida del sustrato (Behera et al., 2019).

Por otro lado, la técnica de fermentación SSF se basa en el uso de sustratos sólidos, como salvado, bagazo y pulpa. La principal ventaja de esta técnica es que los materiales ricos en nutrientes que son desechados pueden reciclarse fácil y eficientemente como sustratos. En este método, el mismo sustrato se puede utilizar durante períodos de fermentación prolongados y se libera de manera constante y gradual, lo que permite una liberación controlada de nutrientes. SSF es más adecuado para microorganismos como hongos que requieren un contenido limitado de humedad, pero no se puede utilizar en procesos de fermentación que involucren organismos que requieren un alto contenido de humedad (Behera et al., 2019).

2.4. Sistema bioelectroquímico

Un sistema bioelectroquímico (BES) es un tipo de biorreactor que combina procesos biológicos y electroquímicos, produciendo un intercambio de electrones (Figura 5) para generar productos de interés. Se les da diferentes nombres según el producto o servicio que proporcionan (Schröder, 2012). La investigación inicial en BES se centró en la producción de electricidad en celdas de combustible microbianas (MFC), pero a lo largo del tiempo se han utilizado en muchas otras aplicaciones, como la producción de hidrógeno en celdas de electrólisis microbiana (MEC), la reducción de CO₂ en procesos de electrosíntesis microbiana (MES) para la producción química (Venkata Mohan et al., 2014).

Basado en el conocimiento obtenido a través del uso de diversas tecnologías, se ha propuesto recientemente un nuevo tipo de BES que actúa como un medio innovador para el control y la estabilización del proceso de fermentación, superando las limitaciones metabólicas para una fermentación más eficiente y efectiva. Durante la

fermentación, ocurre una cascada de reacciones de oxidación y reducción que deben mantenerse en equilibrio. Es importante también, tener en cuenta que hay diferentes parámetros que afectan las vías fermentativas, incluyendo el tipo de inóculo microbiano, la composición del medio, el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulica en sistemas continuos y la acumulación de productos finales como la presión parcial de H_2 (Ghimire et al., 2015; Guo et al., 2010; Wong et al., 2014).

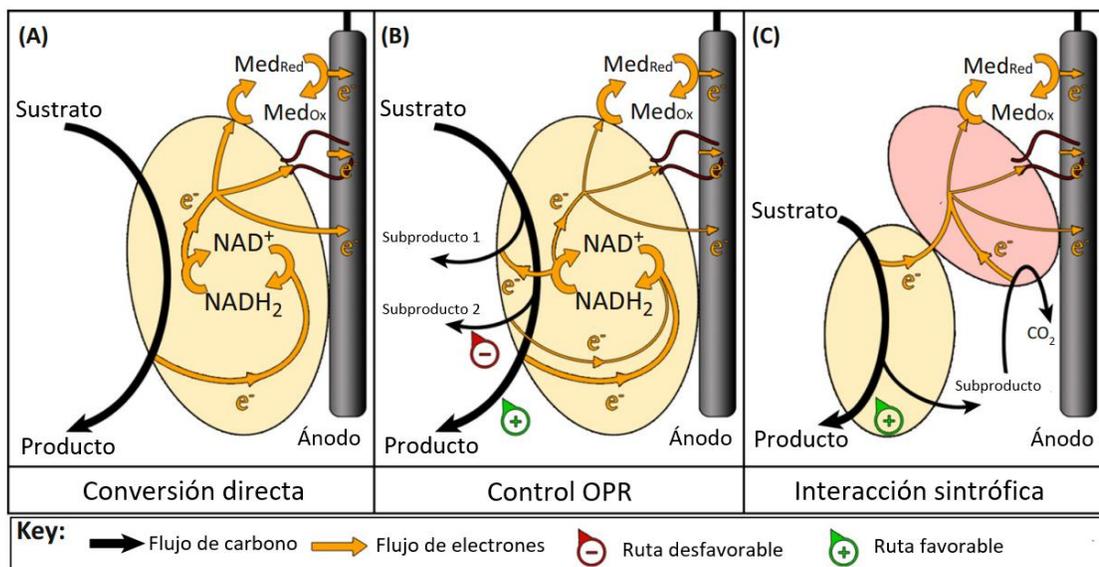


Figura 5. Intercambio de electrones en un SBE (modificado de Moscoviz et al., 2016).

2.4.1. Electrofermentación

La incorporación de electrodos permite el control y la optimización del ambiente de fermentación para generar productos de mayor pureza, así como promover el crecimiento y densidad de células microbianas (Agler et al., 2011). Esta técnica ha sido denominada como electrofermentación (EF). Fundamentalmente, la corriente eléctrica desempeña un papel crucial como fuente alternativa de poder reductor u

oxidante, que es potencialmente más sostenible que los sustratos convencionales (Rabaey & Rozendal, 2010).

Una forma de suministrar o extraer electrones del metabolismo de las células microbianas es a través de medios electroquímicos. Como se ejemplifica en la Figura 6, el uso de fermentación electrostática logra modificar positivamente el metabolismo de algunos microorganismos y se obtienen mejores rendimientos en metabolitos de interés a comparación con una fermentación tradicional (Rabaey et al., 2011). La eficacia del Sistema de Fuente de Electrones (EFS, por sus siglas en inglés) dependerá principalmente de tres factores: (a) las interacciones entre microorganismos, (b) los acoplamientos redox disueltos en el medio y (c) las interacciones entre los microorganismos y la superficie de los electrodos a través de mecanismos celulares de transferencia extracelular de electrones (Moscoviz et al., 2016).

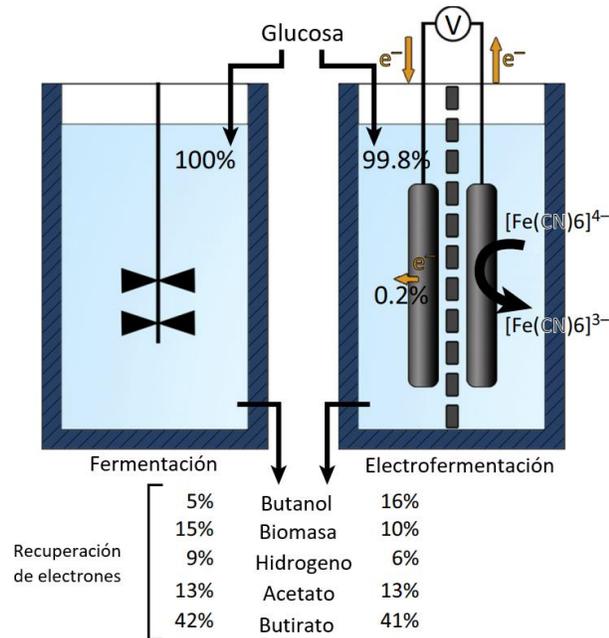


Figura 6. Comparación entre una fermentación tradicional y una electrofermentación (modificado de Moscoviz, 2016).

2.5. Regulación del uso de colorantes

Los colorantes alimentarios permitidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) se clasifican como sujetos a certificación o exentos de certificación, los cuales están sujetos a rigurosos estándares de seguridad antes de su aprobación y clasificación para uso en alimentos (FDA, 2018a).

Los colorantes sintéticos, aunque menos costosos, proveen una mayor facilidad para crear una variedad de tonos y necesitan ser sujetos a diferentes tipos de pruebas para lograr certificarse como seguros para el consumo humano. En general, estos colores son estables con respecto a la exposición al pH, la luz y el calor pues deben cumplir con estándares específicos. Los colores que están exentos de certificación generalmente incluyen los derivados de fuentes vegetales o minerales. Los colores exentos deben cumplir con las especificaciones de identidad y pureza y las limitaciones de uso en caso de que ya estén descritas. Los colores exentos de certificación no requieren pruebas adicionales, pero también deben ser evaluados minuciosamente (Pressman et al., 2017; FDA, 2018b).

2.6. Alimentos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria

Además de proporcionar nutrición y energía, los alimentos tienen la capacidad de proteger las estructuras corporales contra la formación de radicales libres pues existen alimentos capaces de actuar como antioxidante y/o antiinflamatorio (Tabla 3). La oxidación celular causada por estos radicales se relaciona con el envejecimiento y diversas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, degenerativas y diferentes tipos de cáncer. Los antioxidantes contenidos en los alimentos pueden prevenir algunos de estos procesos y también pueden retrasar la aparición de estas enfermedades (Batalla, 2007).

Tabla 3. Ejemplos de alimentos con capacidad antioxidante y la cantidad del compuesto antioxidante que aportan

Compuesto Antioxidante	Alimentos en los que está presente	Cantidad por 100 g
Vitamina E	Aceite de maíz	31 mg
	Germen de trigo	30 mg
	Almendras	25 mg
	Nueces	9 mg
Vitamina C	Kiwi	500 mg
	Pimiento rojo	204 mg
	Limón	80 mg
	Espinaca	60 mg
Vitamina A	Zanahorias	2,000 µg
	Mantequilla	970 µg
	Aceite de soya	583 µg
	Quesos	204 µg

(modificado de Batalla, 2007).

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, se han realizado estudios, como por ejemplo uno en el cual se estudió un aislado de suelo del desierto que produce un pigmento de color amarillo-anaranjado a partir de *Streptomyces sp. D25*, el cual demostró una actividad antioxidante notable (Radhakrishnan et al., 2016). Por otro lado, también se aisló una bacteria pigmentada marina, *Micrococcus sp.*, que presenta un gran potencial como agente cicatrizante y antiinflamatorio, debido a las propiedades antibacterianas del pigmento (Srilekah, 2017). Además, se ha reportado sobre otro carotenoide con actividad biológica, la fucoxantina, la cual es extraída de cianobacterias, que muestra propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antiobesidad (Safafar et al., 2015). En consecuencia, los pigmentos bioactivos exhibieron una marcada capacidad de promover la

cicatrización de heridas y podrían considerarse una valiosa fuente de compuestos antiinflamatorios (Venil et al., 2020).

2.6.1. Gelatina como matriz alimentaria

Derivado del colágeno, la gelatina se compone de una combinación heterogénea de péptidos, a través de procesos que involucran la ruptura de cadenas polipeptídicas y la ruptura parcial de los enlaces polipeptídicos. Si se somete a una degradación enzimática más profunda, se obtienen hidrolizados de gelatina. Los hidrolizados de gelatina y los péptidos derivados de la gelatina se pueden utilizar como posibles ingredientes funcionales por sus propiedades antioxidantes y crioprotectoras (Hou & Regenstein, 2006; Liu et al., 2015).

La gelatina se obtiene generalmente de fuentes de colágeno disponibles en cantidad y precio razonable para los fabricantes. Estas fuentes comerciales incluyen principalmente huesos de ganado desmineralizados y piel de bovino y cerdo. Durante la producción de gelatina, la hidrólisis del colágeno es el proceso fundamental. Aunque la gelatina carece de triptófano y tiene un bajo contenido de metionina, sus niveles de lisina (4%), su excelente digestibilidad la convierten en una buena fuente de proteínas, además es interesante destacar su bajo aporte calórico (3.5 kcal/g). Por esta razón, a menudo se utiliza como complemento de otras proteínas para aumentar su valor proteico más allá de los componentes individuales. (Johnston-Banks, 1990). Asimismo, por sus propiedades físicas, resulta un alimento de fácil deglución. Por esta característica, la gelatina es un alimento utilizado como tratamiento contra la desnutrición de aquellos pacientes que presentan problemas para deglutir, como lo son los pacientes con disfagia (Pérez-Cruz et al., 2018).

A medida que envejecemos, nuestro cuerpo experimenta cambios en la anatomía y en los mecanismos neuromusculares, lo que provoca una disminución en la capacidad funcional que puede afectar el proceso de la deglución de alimentos. La disfagia es un problema que afecta a una proporción considerable,

aproximadamente del 30 al 40%, de las personas mayores de 65 años (Clavé et al., 2004). La presencia de disfagia, especialmente en pacientes con trastornos neurológicos, es un síntoma crítico que conlleva una gran importancia debido al riesgo que representa para la nutrición del paciente, además de las complicaciones que pueden desencadenar y que pueden ser fatales en cualquier etapa de la enfermedad (Clavé & Shaker, 2015).

Igualmente podemos destacar el uso de la gelatina en guarderías e instituciones escolares, pues al ser un alimento económico, es fácilmente adquirido por las instituciones. Además, como se menciona anteriormente, la gelatina es de fácil deglución, lo cual es una característica importante considerando que los niños suelen presentar problemas al momento de masticar y deglutir. Por lo que resulta importante desarrollar conocimiento acerca de la adición de pigmentos microbianos sobre la gelatina, pues al lograr que el alimento cumpla con las expectativas visuales se aumenta el grado de aceptación por parte del consumidor.

3. JUSTIFICACIÓN

El interés por los pigmentos naturales ha aumentado en los últimos años debido a la creciente preocupación por las repercusiones a la salud y al deseo de alternativas más saludables y sostenibles a los pigmentos sintéticos (Jurić et al., 2022). Se ha reportado que el consumo de colorantes sintéticos está ligado a múltiples riesgos para la salud (Gao et al., 2011). Uno de los efectos asociados es un cambio significativo en los marcadores hepáticos y renales, esta variación en los marcadores se ve afectada en mayor medida al aumentar la cantidad de colorante consumido, pues estos inducen estrés oxidativo mediante la formación de radicales libres (Amin et al., 2010). Adicionalmente, también se le atribuyen problemas de conducta en niños cuyo consumo de colorantes sintéticos es constante o en grandes cantidades. Durante las últimas décadas se han realizado diversos estudios que exponen el impacto de los colorantes sintéticos sobre la conducta infantil; los resultados demuestran un rol importante en la manifestación de síntomas de déficit de atención e hiperactividad (Miller et al., 2022). Adicionalmente, algunos análisis han reportado que la ingesta de estos colorantes desencadena una respuesta inflamatoria, provocando activación y disrupción del sistema inmune.

Los pigmentos naturales en comparación con los pigmentos sintéticos, debido a su disponibilidad, no estacionalidad, escalabilidad, mayor rendimiento y procesamiento posterior, ofrecen una opción más segura (Dufossé, 2016). Además, los pigmentos naturales obtenidos por microorganismos producen una gran cantidad de compuestos bioactivos que pueden tener una amplia gama de actividades, como lo es su potencial antioxidante que estimula los mecanismos de defensa de la mucosa para proteger contra el daño oxidativo en las úlceras gástricas (Antonisamy & Ignacimuthu, 2010). Por otra parte, los pigmentos microbianos también ofrecen una gama de colores más amplia que los pigmentos sintéticos, lo que los convierte en una opción deseable para la industria.

La gelatina es un producto derivado del colágeno que se compone de una mezcla de péptidos, y puede ser degradada en hidrolizados de gelatina. Los péptidos

derivados de la gelatina tienen propiedades antioxidantes y crioprotectoras (Hou & Regenstein, 2006; Liu et al., 2015). Por estas propiedades, la gelatina es ampliamente utilizada en el sector salud como alimento para pacientes con disfagias y en guarderías e instituciones escolares para niños problemas de masticación y deglución. Además, la adición de pigmentos microbianos sobre la gelatina puede mejorar su apariencia visual y aumentar su aceptación por parte de los consumidores.

Por lo tanto, considerando los efectos adversos de los pigmentos sintéticos, el aumento en el interés de los consumidores por productos más naturales y el potencial de la producción de pigmentos microbianos, el presente trabajo busca evaluar el efecto de la adición de pigmento recombinante a partir de *Pseudomonas chlororaphis*, respectivamente, en una gelatina como alimentos modelo sobre la capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

La Figura 7 presenta la justificación para priorizar el estudio y producción de pigmentos naturales frente a los sintéticos, destacando los efectos secundarios de estos últimos en la salud. Se propone el desarrollo de procesos que favorezcan la producción masiva de pigmentos naturales, impulsada por la demanda, mejorando la validez de vida y promoviendo dietas más saludables.

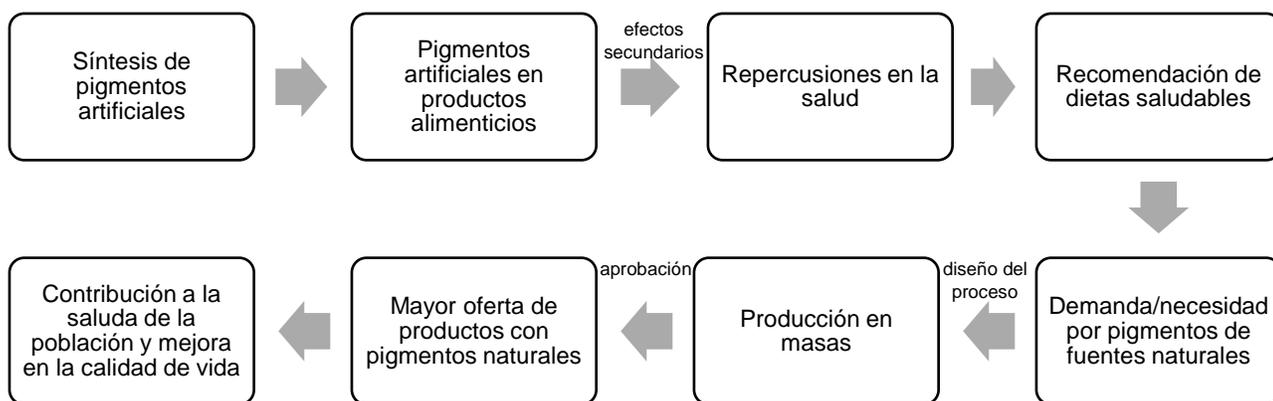


Figura 7. Justificación de la necesidad del estudio y producción de pigmentos naturales sobre pigmentos sintéticos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con un pigmento recombinante.

4.2. Objetivos específicos

- I. Expresar el plásmido pAJM.336Vio en *Pseudomonas chlororaphis* mediante electroporación para la obtención de pigmento recombinante.
- II. Evaluar el efecto de la aplicación de voltaje en un sistema de electrofermentación sobre la producción del pigmento recombinante.
- III. Determinar la concentración del pigmento microbiano recombinante que conduzca a la mayor capacidad antioxidante en la matriz alimentaria.
- IV. Evaluar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de la matriz alimentaria durante su vida de anaquel.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

En este estudio se utilizó la cepa de *Escherichia coli* para la extracción del plásmido pAJM.336Vio con el cual se realizó la transformación de la bacteria *Pseudomonas chlororaphis*. Los microorganismos fueron obtenidos de la colección de cepas del Centro de Ciencias Genómicas ubicado en la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Morelos, las muestras permanecieron preservadas en una suspensión con glicerol al 20% v/v a una temperatura de -70 °C hasta su utilización.

5.2. Medio nutritivo

Comenzando con 700 mL de agua estéril en un frasco Schott de 1 L, se agregaron 300 µL de CaCl₂, 1.5 mL de elementos traza, 1 mL de MgSO₄, 100 mL de la solución de sales N2XM9-10X, y finalmente 100 mL de solución de glucosa al 50%. Por último, se aforó a 1000 mL, recordando respetar el orden, y agitando bien después de la adición de cada uno de los componentes.

Tabla 4. Composición del medio N2XM9-10X

Medio N2XM9-10X	
CaCl ₂ 1 M	100 µL
Elementos traza	1.5 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
*Sales N2XM9-50 g/L	100 mL
Glucosa al 50 %	100 mL
* Sales N2XM9-50g/L (1 L)	
Na ₂ HPO ₄ – 7H ₂ O	113.25 mg
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	20 g

- I. **Objetivo específico 1:** Expresar el plásmido pAJM.336Vio en *Pseudomonas chlororaphis* mediante electroporación para la obtención de pigmento recombinante.

Inicialmente, se contaba con el plásmido en la bacteria *E. coli*. Sin embargo, surgieron limitaciones al utilizar esta cepa como anfitriona. Principalmente, se trataba de una cepa que puede producir toxinas, lo cual requiere mayor procesamiento para su purificación y podría restringir su uso en aplicaciones seguras, especialmente al considerar su incorporación en una matriz alimentaria. Esto representaba un obstáculo importante ya que el riesgo asociado a su patogenicidad impedía una aplicación segura. Antes estas limitaciones, se decidió evaluar el sistema en la bacteria *P. chlororaphis* pues es una alternativa que ofrece ventajas significativas. *Pseudomonas chlororaphis* es una bacteria no patógena y ampliamente reconocida como segura (Anderson et. al., 2018; Kang et. al., 2007; Streeter et. al., 2023), lo cual facilitaba su potencial uso en entornos sensibles y matrices relacionadas con alimentos. Además, cuenta con características metabólicas y de expresión genética que hace posible la producción del pigmento mediante la inclusión del plásmido. Esta transición no solo elimina los riesgos asociados a la patogenicidad, sino que también ofrecía la posibilidad de un sistema más adaptable para aplicaciones biotecnológicas.

5.3. Cultivo de *E. coli* p. Vio y extracción del plásmido pAJM.336Vio

A partir de un criovial almacenado a -70°C se realizó la siembra por estría en una caja Petri con agar LB conteniendo el antibiótico correspondiente, la cual se incubó a 37°C durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h se inoculó una asada en 5 mL de medio LB el cual contiene (g/L) triptona 10, extracto de levadura 5, NaCl 10, con un pH final de 7.0 ± 0.2 , más la adición gentamicina para posteriormente incubar a 37°C , 250 rpm, 24 h. Pasado el periodo de incubación, se procedió a la extracción del plásmido mediante un kit de la marca Jena Bioscience siguiendo las instrucciones del mismo.

Para ello, se cosechó el cultivo de células bacterianas mediante la centrifugación a 3,600 rpm de 1 mL de inóculo en tubos Eppendorf. Las células bacterianas en el sedimento se resuspendieron con 300 μ L de amortiguador de lisis usando un agitador tipo vortex durante 1 minuto. A la muestra se añadieron 300 μ L de amortiguador de neutralización que contenía RNasa A y se mezclaron suavemente invirtiendo el tubo 4-6 veces. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en una microcentrífuga. Posteriormente, se colocó una columna de unión en un tubo de recolección de 2 mL para después añadir 100 μ L de amortiguador de activación a la columna de unión. Se centrifugó a 10,000 g durante 30 segundos en una microcentrífuga. Finalizada la centrifugación, se transfirió el sobrenadante del paso anterior a la columna de unión activada. Esto se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos y se descartó el filtrado. Se colocó la columna de unión con el ADN cargado en el tubo de 2 mL usado. Se aplicaron 500 μ L de amortiguador de lavado (que contenía etanol) a la columna de unión. Se centrifugó a 10,000 g durante 30 segundos y se descartó el filtrado. Se colocó la columna de unión en un microtubo limpio de 1.5 mL. Se añadieron 50 μ L de amortiguador de elución al centro de la membrana de la columna. Finalmente, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para eluir el ADN. Finalmente, se confirmó la presencia del plásmido corriendo 2 μ L del plásmido extraído en un gel de agarosa al 1% p/v (Ausubel, 1994).

5.4. Cultivo y transformación de *P. chlororaphis*

A partir de una criovial almacenado a -70 °C se realizó la siembra por estría en una caja Petri con agar LB, la cual se incubó a 37 °C durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h se inoculó una asada en 5 mL de medio LB para posteriormente incubar a 37 °C, 250 rpm, 24 h. Se transfirieron 1.5 mL del medio inoculado a microtubos para centrifugar a 3,600 rpm durante 2 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante para así mantener únicamente las células, las cuales después se lavaron 2 veces con 1 mL de sacarosa 300 mM. Finalmente, las células se re-suspendieron en 50

μL de la misma solución. Se agregaron 2 μL del plásmido previamente obtenido a 500 μL de células. Por último, a esta mezcla se le aplicó un pulso eléctrico de 1.8 kV durante 4 milisegundos en cuvetas de electroporación de 0.1 cm. Las células fueron recuperadas en medio SOC (g/L): 10 peptona, 5 levadura, 0.5 NaCl, 20 glucosa, 2.5mM MgCl_2 , 10mM CaCl_2 a 30 °C, 250 rpm, 2 h.

Finalizado el periodo de recuperación de las células, se vertieron de 8-10 perlas de vidrio a una caja Petri con agar LB y gentamicina en una concentración de 30, 40 y 50 $\mu\text{g/L}$. Se agregaron 150 μL de las células transformadas y se procedió a realizar la siembra moviendo las perlas alrededor de la caja. Posteriormente, se descartaron las perlas para permitir el secado de la caja y finalmente se llevó a incubación a 30 °C durante 24 h.

5.5. Siembra de la cepa transformada

A partir de las cajas con la siembra de las células transformadas, se seleccionaron las colonias con el color más intenso para así realizar siembra por estría en caja Petri con agar LB más gentamicina. Por último, se dejaron incubar a 30 °C durante 24 h y se realizaron crioconservas.

- II. **Objetivo específico 2:** Evaluar el efecto de la aplicación de voltaje en un sistema de electrofermentación sobre la producción del pigmento recombinante.

Al lograr la correcta transformación de la cepa, se procedió a evaluar el impacto de la aplicación de voltaje en un sistema de electrofermentación sobre la producción de un pigmento recombinante de interés. La electrofermentación es una técnica que integra procesos de fermentación microbiana con un estímulo eléctrico controlado, lo cual tiene el potencial de modificar la actividad metabólica de los microorganismos y, en consecuencia, su producción de compuestos bioactivos (Rabaey & Rozendal, 2010). Para determinar el efecto de esta técnica, se comparó la producción del pigmento en el sistema de electrofermentación con una fermentación tradicional sin voltaje aplicado.

El objetivo principal fue determinar cuantitativamente cómo la aplicación de voltaje influye en la eficiencia y el rendimiento en la producción del pigmento recombinante en comparación con el método de fermentación convencional. Este enfoque podría ofrecer una estrategia de producción alternativa para compuestos de alto valor industrial, aprovechando la interacción entre la corriente eléctrica y el metabolismo microbiano.

5.6. Pre-inóculo

De la siembra por estría realizada, se tomó toda la biomasa posible para inocular en un matraz de 250 mL, 50 mL de medio N2XM9-10X con 50 μ L de gentamicina a 30 μ g/L, lo cual se incubó a 30 °C, 250 rpm durante aproximadamente 16-18 h, esto para evitar que el crecimiento llegara a su fase estacionaria.

5.7. Fermentación tradicional

Para arrancar con la fermentación tradicional, se agregaron los 50 mL de inóculo a 450 mL de medio N2XM9-10X más 500 μ L de gentamicina en un matraz de 2000 mL. El matraz se llevó a incubación a 30 °C, 300 rpm.

5.8. Sistema de electrofermentación

El sistema empleado para *P. chlororaphis*, constó de frascos de cristal con un diámetro de 6 cm y una altura de 10 cm, con un fondo plano y capacidad para contener 100 mL medio inoculado. Estos frascos contenían electrodos de acero inoxidable suspendidos desde un tapón de hule #12 en la parte superior del recipiente y conectados a una fuente de voltaje de corriente continua modelo GPS-3030DD y un amperímetro (Mut-33, Truper). El cable y los electrodos estaban conectados a la fuente de voltaje. Los frascos contaban un volumen de 90 mL de medio N2XM9-10X más 10 mL de inóculo. El sistema se mantuvo bajo condiciones de 30 °C con agitación magnética de 150 rpm y se aplicó corriente eléctrica continua de 0.8 V. El voltaje fue determinado por resultados obtenidos en experimentos preliminares.

5.9. Extracción de la violaceína

Para la extracción del pigmento recombinante, se transfirió el contenido de la fermentación a tubos Falcon de 50 mL con 25 mL cada uno, para llevarlos a centrifugación 10,000 g a temperatura ambiente y decantar el sobrenadante. La pastilla obtenida se resuspendió en etanol precalentado a 75° C para centrifugar nuevamente a las mismas condiciones. Finalmente se separó el sobrenadante para llevarlo a rotaevaporación (45 °C + 50 rpm + en atmósfera de baja presión) y así obtener el pigmento en seco. Se cuantificó la producción de pigmento recombinante para la fermentación tradicional y para el sistema de electrofermentación durante 92 h.

- III. **Objetivo específico 3:** Determinar la concentración del pigmento microbiano en la matriz alimentaria que conduzca a la mayor capacidad antioxidante.

Para este objetivo, se determinó la concentración óptima del pigmento en la matriz alimentaria para maximizar su actividad antioxidante. Para evaluar esta actividad, se utilizaron dos métodos ampliamente reconocidos: el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y el ensayo de captación del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). Estos ensayos permiten medir la capacidad antioxidante del pigmento desde diferentes enfoques, proporcionando una evaluación integral de su potencial. El objetivo fue identificar la concentración que conduzca a la mayor actividad antioxidante, lo cual es crucial para optimizar la utilización del pigmento producido y lograr un balance entre cantidad y eficiencia.

5.10. Métodos analíticos

5.10.1. Capacidad antioxidante

5.10.1.1. Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Se preparó el reactivo FRAP, el cual consiste en una solución de tampón de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6) con 2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) 10 mM en 40 mM de HCL y hexahidrato de cloruro de hierro (III) 20 mM. Se calentaron 3 mL

del reactivo FRAP a 37 °C y se le agregaron 100 µL de muestra junto con 300 µL de agua desionizada. Luego se midió la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresan como micromoles equivalentes de Fe⁺² por cada 100 g de muestra, utilizando la curva de calibración de Fe⁺² como referencia.

5.10.1.2. Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

Respecto a la preparación del reactivo se pesaron 0.0015 mg del radical DPPH en un matraz aforado y este mismo se disolvió en 25 mL de metanol. Para la realización del ensayo se tomaron 20 µL de muestra y 180 µL de reactivo para posteriormente leer la absorbancia a 517 nm después de 30 minutos. El potencial antioxidante se calculó de acuerdo con la Ecuación 1. (1)

$$\% \text{ eliminación del radical DPPH} = 100 \times \frac{[Ar - (Am - As)]}{Ar}$$

donde *Ar* es la absorbancia del reactivo DPPH sin muestra, *Am* es la absorbancia de la muestra con el reactivo DPPH y *As* es la absorbancia de la muestra sin agregar el reactivo. La actividad antioxidante fue expresada como el porcentaje de eliminación del radical DPPH.

IV. **Objetivo específico 4:** Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria durante la vida de anaquel de la matriz alimentaria.

Como último paso, se evaluó la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de la matriz alimentaria a lo largo de su vida de anaquel. La matriz fue una gelatina experimental diseñada para ser comparable con productos comerciales del mercado, lo que permite analizar su desempeño en condiciones similares a las de consumo real. Para medir la actividad antiinflamatoria, se realizaron los ensayos en distintos puntos temporales (días 0, 7, 14 y 21), evaluando como se mantiene esta propiedad con el tiempo.

Simultáneamente, se llevaron a cabo ensayos antioxidantes mediante los métodos FRAP y DPPH previamente descritos, en los mismos intervalos de tiempo. Estas pruebas permitieron analizar el comportamiento de la actividad antioxidante en la matriz, observando posibles variaciones en su capacidad para reducir especies reactivas u neutralizar radicales a medida que transcurre su almacenamiento. Los resultados de estos experimentos ofrecen una visión más completa de la estabilidad de las propiedades funcionales del pigmento recombinante cuando es añadido a una matriz alimentaria. Proporcionando datos para el desarrollo de productos alimentarios con beneficios antioxidantes y antiinflamatorios sostenibles en el tiempo.

5.11. Formulación de la gelatina

Respecto a la elaboración de la gelatina, se preparó una mezcla de grenetina cristalina comercial (K'nox) de acuerdo con las instrucciones del producto, a la cual se le añadió el pigmento obtenido previamente. A la mezcla de grenetina se le añadieron 3 concentraciones del pigmento diferentes: bajo (1 mg/g), medio (100 mg/g) y alto (300 mg/g) y una vez gelificada se cuantificó su capacidad antioxidante. Se seleccionó la gelatina con la concentración de pigmento que mostró la mayor capacidad antioxidante para evaluar su capacidad antiinflamatoria y antimicrobiana durante su vida de anaquel.

Los rangos de concentración de los pigmentos se determinaron en ensayos preliminares comparando la concentración encontrada en 2 preparaciones comerciales de gelatinas con colores similares.

5.12. Vida de anaquel

Las pruebas de vida de anaquel se realizaron a las muestras con la concentración del pigmento microbiano recombinante que mostró la mayor capacidad antioxidante en la matriz alimentaria. Dichas muestras fueron expuestas a refrigeración y se les evaluó nuevamente la capacidad antioxidante y antiinflamatoria durante el día 0, 7, 14 y 21. Esto con el objetivo de analizar el comportamiento o pérdida de la

capacidad antioxidante y antiinflamatoria de los pigmentos una vez incorporados a la matriz alimentaria. Además, se realizaron análisis microbiológicos de hongos y levaduras. Dicho análisis se llevó a cabo de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Para ello, se preparó un medio de cultivo de agar papa dextrosa, una solución reguladora de fosfatos y una solución estéril de ácido tartárico al 10 % p/v. Para la siembra, la cual se realizó por triplicado y también se mantuvo un control, se colocó 1 mL de la muestra líquida en cajas Petri. Después, se vertió de 15 – 20 mL de agar mantenido a 45 ± 1 °C en las cajas Petri y se mezcló cuidadosamente. Se dejó solidificar, y posteriormente las cajas invertidas se dejaron incubar a 25 ± 1 °C. Después de 3, 4 y 5 días, se contaron las colonias de cada placa.

5.13. Capacidad antiinflamatoria

5.13.1. Preparación de glóbulos rojos

Se tomó una muestra de sangre (aprobado por CONBIOETICA No. de oficio CBQ23/064b, ver Anexo 1) mediante la carta responsiva (ver Anexo 2) de 10 individuos sanos de entre 20 y 30 años, con previo consentimiento firmado (ver Anexo 3), el cual tuvieron oportunidad de revocar en cualquier momento de no desear continuar con su participación en el estudio (ver Anexo 4). Se consideró este número de participantes para tener una muestra representativa de la población, así mismo, con esta cantidad de participantes se generó la cantidad (mL) para la realización de las pruebas y réplicas necesarias. El reclutamiento de los participantes se llevó a cabo mediante un cartel (ver Anexo 5) que fue distribuido mediante redes sociales.

La toma de muestra sanguínea tuvo una duración estimada de 5 – 10 min, realizada por personal capacitado de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los sujetos no consumieron medicamentos antiinflamatorios en las dos semanas previas al estudio. La muestra se colocó en un anticoagulante (tubo vacutainer BD Plus de 2.7 ml con tapón color azul). La sangre recolectada se centrifugó a 2,500 rpm por 5

minutos a 37 °C y se eliminó el sobrenadante. El paquete de glóbulos rojos humanos (HRBC) se suspendió en una solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9 % p/v) y se centrifugó de nuevo hasta obtener un sobrenadante claro (este proceso se repetirá varias veces). Posteriormente, se preparó una suspensión al 10% de HRBC utilizando una solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9 % p/v).

El manejo de residuo peligrosos biológico infecciosos se llevó a cabo con base en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, en donde, como se indica, los objetos punzocortantes se envasaron en recipientes rígidos de polipropileno color rojo y los residuos no anatómicos como tubos contenedores de sangre y torundas con sangre se colocaron en bolsas de polietileno color rojo. Ambos tipos de envases se marcaron con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda de Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI). Para el almacenamiento temporal se designó un área especial a temperatura menor a 4°C dentro del laboratorio. Para la recolección y transporte de los residuos se contó con un prestador de servicios externo (Wess corporate, El Marqués, Querétaro, México.).

Las valoraciones médicas fueron tomadas por personal del módulo de atención medica “Su salud” UAQ. La toma de muestra es un procedimiento rutinario que no representa riesgo para la salud, sin embargo, pueden presentarse molestias tales como: mareos, moretones, desmayos, disminución de presión arterial, por lo cual, de requerir atención medica esta sería proporcionada por personal médico del módulo.

5.13.2. Ensayo de estabilidad de membrana reactiva

La prueba constó en una solución hiposalina (0.25 % p/v de NaCl, 2 mL), un tampón de fosfato de sodio pH 7.4 (0.15 mol/L, 1 mL), extracto (1 mL), suspensión de eritrocitos (2 % v/v, 0.5 mL) y isosalina [0.85 % (p/v) NaCl] para un volumen final de 4.5 mL. Además, se preparó un control de sangre (4.5 mL) con un contenido de 1.0 mL de solución salina isotónica en lugar de extracto y un control positivo (4.5 mL) que contenía naproxeno (200 µg/mL, 0.5 mL) y solución isotónica en lugar de

glóbulos rojos. Las muestras se incubaron a 56 °C durante 30 minutos y luego se enfriaron antes de la centrifugación a 3,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a 560 nm en comparación con el blanco. Los cálculos para el porcentaje de estabilidad de la membrana se obtuvieron a partir de la Ecuación 2.

$$\% \text{ estabilidad de membrana} = 100 - \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs del control} \times 100}{\text{Abs sangre control}} \quad (2)$$

El material de desecho biológico fue consignado al RPBI correspondiente.

5.14. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron reportados como la media aritmética de las réplicas independientes \pm la desviación estándar. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas considerando un $p < 0.05$ utilizando el programa Minitab 13.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- I. **Objetivo específico 1:** Expresar el plásmido pAJM.336Vio en *Pseudomonas chlororaphis* mediante electroporación para la obtención de pigmento recombinante.

Para este objetivo, se describe el proceso de optimización para la producción de violaceína en un sistema de fermentación. Primero, se extrajo y verificó la presencia del plásmido para la transformación en *P. chlororaphis* mediante electroporación. Debido a dificultades en la selección de bacterias transformadas, se ajustaron las concentraciones de nutrientes y antibiótico en el medio para mejorar su crecimiento y viabilidad. Con las condiciones optimizadas, se monitoreó el crecimiento de biomasa en fermentación para confirmar la efectividad de los ajustes realizados.

6.1. Extracción del plásmido

Una vez realizado el proceso de extracción del plásmido de la cepa de *E. coli*, se procedió a cuantificar una alícuota de 2 μ L en un gel de agarosa al 1% p/v con el objetivo de verificar la presencia y la integridad del plásmido en las muestras. Se cargaron cuatro muestras en el gel (E1-E4) y se sometieron a electroforesis. Tras la visualización bajo luz UV (Figura 8 – panel A), se pudo confirmar la presencia del plásmido en las muestras etiquetadas como E1 y E4. Estas muestras mostraron bandas de intensidad correspondiente al tamaño esperado del plásmido (Figura 8 – panel B) y por ello se seleccionaron para los siguientes pasos experimentales, incluyendo la transformación de la cepa competente que se utilizó en el desarrollo del proyecto. Este proceso de verificación y selección fue crucial para asegurar que sólo se utilicen muestras con plásmidos confirmados, lo que incrementó las probabilidades de éxito en las etapas subsiguientes del experimento, ya que solo aquellas muestras con plásmidos íntegros y presentes serían capaces de generar transformaciones eficientes y reproducibles en los siguientes pasos del protocolo.

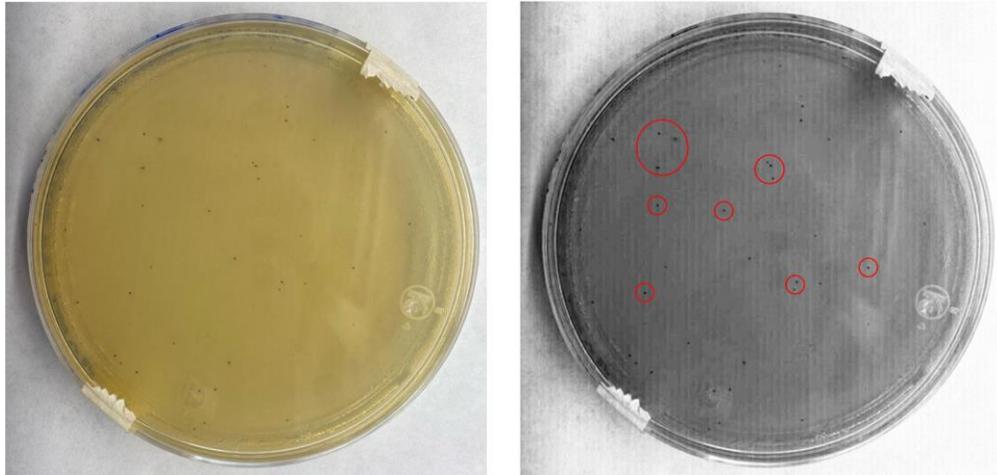


Figura 9. Colonias de *P. chloraphis* transformadas en agar LB.

Debido a la alta densidad de crecimiento bacteriano y la dificultad para distinguir y aislar las colonias transformadas de manera directa, no fue posible inocular directamente las colonias transformadas para los experimentos posteriores. En respuesta a esta situación, se seleccionaron y picaron las colonias moradas, que fueron reconocidas como transformadas, y se procedió a estriar nuevamente en nuevas placas de agar (Figura 10).

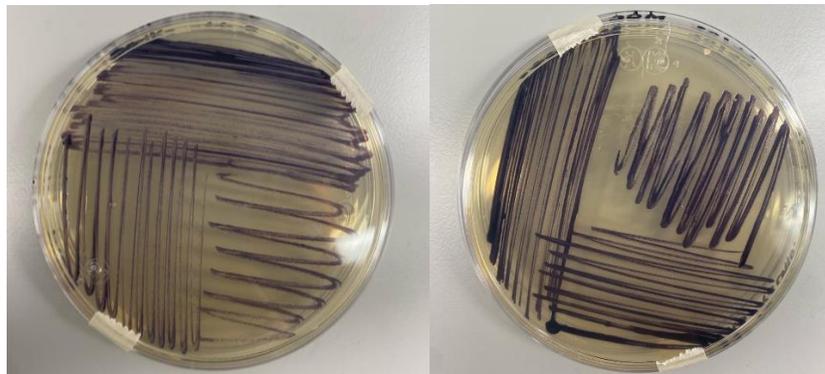


Figura 10. Resultado del estriado de las colonias *P. chloraphis* pAJM.336Vio transformadas en agar LB crecidas durante 24 h a 30 °C.

De este cultivo, se observó que, aunque se presentó la pigmentación, al inocular en medio líquido M9-10X (Figura 11) y dejar en incubación, no se alcanzó la densidad celular deseada. Después del período de incubación de 18 h, se determinó la absorbancia a 575 nm dando un promedio de 0.130 unidades, evidenciando una deficiencia en el crecimiento celular. Cualitativamente, la turbidez del medio fue baja indicando una baja concentración de células. Como resultado, la fermentación de 450 mL de medio M9-10X con este inóculo de 50 mL no fue exitosa, ya que no se logró la producción y acumulación de biomasa necesaria para los objetivos del experimento.

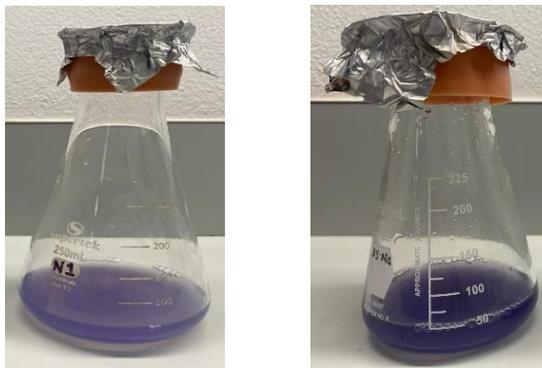


Figura 11. Biomasa inoculada en medio M9-10X después de una incubación de 18 h a 30 °C y 250 rpm.

6.3. Modificación del medio nutritivo

En este punto, se determinó que era necesario modificar las concentraciones de nitrógeno y carbono en el medio M9-10X (Tabla 5) para proporcionar un suministro de nutrientes adecuado para la bacteria. La hipótesis era que el medio inicial no estaba satisfaciendo las necesidades nutricionales de la bacteria, lo que limitaba su crecimiento y por lo tanto su capacidad de fermentación. Además, se consideró fundamental realizar pruebas de sensibilidad a antibiótico, probando diferentes concentraciones de este (30 µg/L, 40 µg/L y 50 µg/L), para evaluar el impacto del

antibiótico en el crecimiento bacteriano y optimizar su concentración en el medio de cultivo.

Tabla 5. Composición del medio M9.

Medio M9 (1 L)	
CaCl ₂ 1M	100 µL
Elementos traza (FeSO ₄ , ZnSO ₄ , MnSO ₄)	1.5 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
*Sales M9	100 mL
Sacarosa 20 %	100 mL
*Sales M9	
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	113.25 mg
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

Tabla 6. Composición del medio M9 modificado (N2XM9-10X).

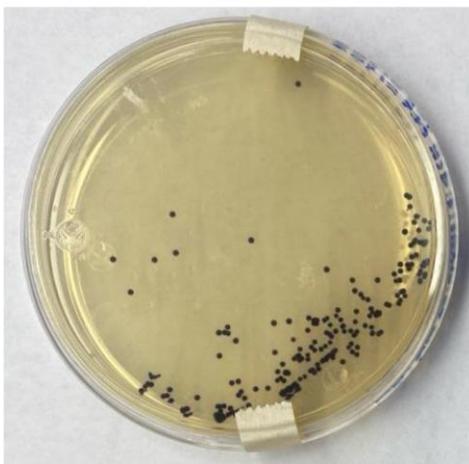
Medio N2XM9-10X (1 L)	
CaCl ₂ 1M	100 µL
Elementos traza (FeSO ₄ , ZnSO ₄ , MnSO ₄)	1.5 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
*Sales M9	100 mL
Sacarosa 50 %	100 mL
*Sales N2XM9-10X	
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	113.25 mg
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	20 g

Estos ajustes en la composición del medio de cultivo fueron consideradas cruciales para optimizar el crecimiento y la viabilidad de las bacterias, asegurando así el éxito de futuras fermentaciones. Determinando el medio N2XM9-10X (Tabla 6) como el que se utilizaría para los experimentos posteriores. La modificación de las concentraciones de nitrógeno y carbono tuvo como objetivo mejorar la disponibilidad de nutrientes esenciales (Qiao et. al., 2024), mientras que las pruebas de sensibilidad a antibióticos buscan identificar las concentraciones óptimas que no inhiban el crecimiento bacteriano.

6.4. Pruebas de Sensibilidad a Antibiótico

De las pruebas de sensibilidad a antibiótico, se observó que la concentración de 30 $\mu\text{g/L}$ no exhibió crecimiento, esto resultó en una ausencia total de colonias en las placas, indicando que el antibiótico era efectivo a este nivel, pero no permitía la supervivencia de las bacterias transformadas. En contraste, a una concentración de 40 $\mu\text{g/L}$ (Figura 12 – panel A), comenzaron a aparecer colonias transformadas, aunque en una cantidad limitada. Estas colonias no alcanzaron la biomasa necesaria para inocular el medio líquido de manera efectiva, lo que indica que esta concentración aún no era óptima para un crecimiento suficiente de las bacterias.

(A)



(B)

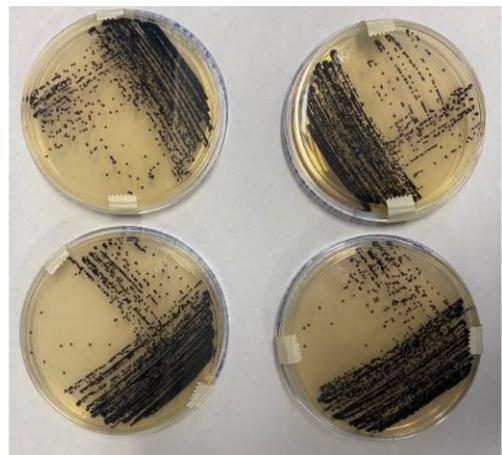


Figura 12. Panel A – estriado de *P. chlororaphis* pAJM.336Vio en agar con 40 µg/L de gentamicina. Panel B – estriado de *P. chlororaphis* pAJM.336Vio en agar con 50 µg/L de gentamicina.

Finalmente, a una concentración de 50 µg/L (Figura 12 – panel B), se observó una notable mejora en los resultados. Las colonias mostraron una buena intensidad en el color, lo cual es indicativo de una expresión adecuada del plásmido transformado. Además, el tamaño de las colonias fue adecuado y hubo una cantidad suficiente de biomasa para proceder con los experimentos posteriores. Esta concentración de 50 µg/L permitió un equilibrio entre la efectividad del antibiótico para seleccionar las bacterias transformadas y la viabilidad de estas para crecer y formar colonias. Por lo que se identificó esta concentración como la más adecuada para las condiciones experimentales, facilitando así la continuidad del trabajo y avanzar a la realización de las fermentaciones para la producción de la violaceína.

6.5. Fermentación tradicional

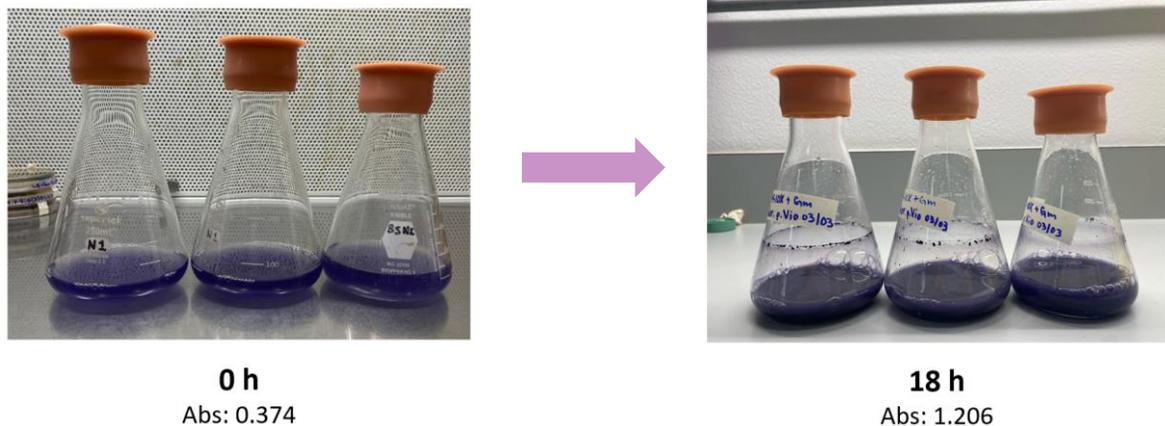


Figura 13. Matracas inoculados con biomasa de *P. chlororaphis* pAJM.336Vio al inicio y final del periodo de incubación de 18 h a 30 °C y 250 rpm.

En la fermentación tradicional, se utilizó la biomasa obtenida de una caja completa para inocular 50 mL de medio N2XM9-10X, al cual se le añadió la proporción

correspondiente de antibiótico. Se logró un crecimiento pues pasó de una absorbancia inicial de 0.374 a 1.206, es decir, 3.22 veces más después de un periodo de incubación de 18 h (Figura 14). Posteriormente, el inóculo fue transferido a 450 mL de medio adicional, alcanzando un volumen de trabajo total de 500 mL. A este volumen se le agregaron 500 μ L de gentamicina 0.5 μ M. El cultivo se sometió a incubación, y se tomaron muestras aproximadamente cada 12 h para medir la absorbancia y así monitorear la producción de biomasa a lo largo del proceso (Figura 15).

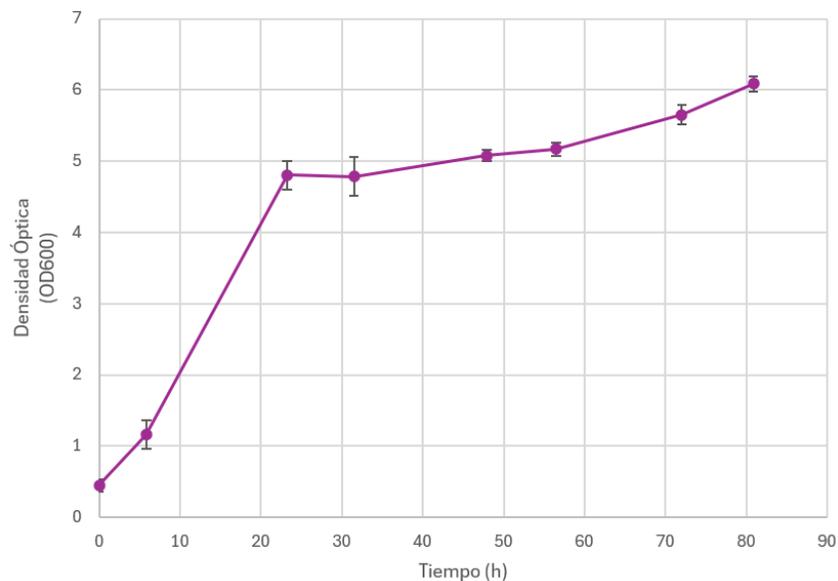


Figura 14. Curva de crecimiento de *P. chlororaphis* pAJM.336Vio representada por la densidad óptica en función del tiempo (horas).

La curva de crecimiento mostrada en la gráfica evidencia un incremento inicial acelerado en la densidad óptica (OD600) durante las primeras horas, alcanzando un valor cercano a 5 después de aproximadamente 10 h. Este incremento sugiere una fase exponencial de crecimiento de la biomasa. La tasa específica de crecimiento (μ) durante esta fase exponencial es de 0.151 h^{-1} , lo que refleja un crecimiento significativo. A partir de este punto, la curva se estabiliza, indicando una fase estacionaria, en la que la tasa de crecimiento disminuye significativamente.

Posteriormente, se observa un ligero aumento en la densidad óptica hasta alcanzar un valor máximo de aproximadamente 6 unidades hacia las 72 h. Estos resultados sugieren que el cultivo alcanza una capacidad máxima de crecimiento antes de estabilizarse, y cualquier variación posterior puede deberse a una adaptación de la biomasa o a una acumulación de productos por lisis celular. Las barras de error en la gráfica indican una consistencia en las mediciones realizadas, lo que refuerza la confiabilidad de los datos obtenidos.

La transformación de *P. chlororaphis* con genes biosintéticos para producir violaceína implica una compleja interacción entre la maquinaria celular, los recursos metabólicos y los retos de producción comunes en sistemas de expresión de proteínas recombinantes (Kent & Dixon, 2020; Gupta & Shukla, 2016). Al introducir genes foráneos en *Pseudomonas*, las células deben destinar recursos significativos para transcribir, traducir y plegar las proteínas exógenas que conforman las enzimas necesarias para la biosíntesis de violaceína. Este proceso puede verse limitado por la disponibilidad de recursos y el estrés celular, factores que impactan en el rendimiento y estabilidad del pigmento recombinante (Song et. al., 2015).

La vía metabólica de biosíntesis de violaceína en *Pseudomonas* implica una secuencia de cinco enzimas clave que catalizan la conversión del triptófano. Cada una de estas enzimas necesita recursos sustanciales para su expresión, desde aminoácidos hasta ribosomas, lo que representa una alta demanda de energía y materiales que la célula debe satisfacer (Kent & Dixon, 2020). En condiciones de alta expresión, estas enzimas pueden competir con las proteínas celulares nativas por los mismos recursos, lo que puede generar una sobrecarga metabólica. Esto significa que el sistema celular debe redirigir recursos hacia la síntesis del pigmento recombinante, dejando menos disponibilidad para sus propias funciones esenciales (Song et. al., 2015).

Este fenómeno conocido como carga metabólica, puede llevar a una desaceleración en el crecimiento de las células y, a una reducción de su viabilidad. Por lo tanto,

podríamos decir que la alta demanda de recursos también puede inducir estrés celular, ya que el mecanismo de transcripción y traducción trabaja a niveles máximos para sostener la producción de violaceína. Como consecuencia, si la célula no logra compensar esta demanda, el rendimiento del pigmento puede verse comprometido. Para superar estos desafíos, se considera crucial optimizar las condiciones de cultivo, para equilibrar la carga metabólica con el crecimiento y viabilidad de las células transformadas.

Los resultados indican varias áreas de mejora y próximos pasos para optimizar la producción del pigmento recombinante. La eficiencia de transformación obtenida es prometedora y representa un avance respecto a estudios anteriores. Sin embargo, la saturación en el medio de cultivo y la falta de selectividad inicial destacan la necesidad de ajustar las concentraciones de antibiótico, con el fin de asegurar la selectividad sin comprometer el crecimiento bacteriano. Esto permitirá equilibrar adecuadamente la selección y viabilidad de las células transformadas. Además, es fundamental optimizar el medio de cultivo, en particular las fuentes de nitrógeno y carbono, para alcanzar la densidad celular requerida. Estos ajustes contribuirán a mejorar la producción de biomasa y asegurar una expresión eficiente de la célula recombinante en experimentos futuros.

II. **Objetivo específico 2:** Evaluar el efecto de la aplicación de voltaje en un sistema de electrofermentación sobre la producción del pigmento recombinante.

6.6. Producción del pigmento recombinante

En términos de productividad (Figura 15) se muestra que, en todos los casos, la concentración de violaceína aumenta durante las primeras 40 h de fermentación. Sin embargo, se observa que la presencia de un inductor no tuvo un impacto significativo en la concentración final de violaceína. Adicionalmente, en el proceso

de electrofermentación, se alcanzó una menor concentración de violaceína, la cual disminuyó rápidamente después de alcanzar su pico máximo. Puesto que la electrofermentación ofrece un metabolismo híbrido en el que, mediante un campo eléctrico, los electrones se intercambian con electrodos sólidos como equivalentes alternativos de oxidación/reducción, influyendo en el entorno de fermentación y el metabolismo microbiano de manera reductora u oxidativa (Schievano et al., 2016). Se considera que la abrupta disminución de la concentración de violaceína podría estar relacionada con la naturaleza química del compuesto, que, al contener dobles enlaces podría ser susceptible a reacciones de reducción debido a la aplicación de voltaje y la presencia de electrones en el medio (Mao et. al., 2024). Por otro lado, la producción de violaceína recombinante en *P. chlororaphis* en el sistema de electrofermentación podría estar relacionada en el efecto del potencial de reducción-oxidación sobre el equilibrio de NAD^+/NADH durante la fermentación. Este equilibrio redox juega un papel clave en la regulación celular y en la eficiencia de la producción de metabolitos, ya que las variaciones en el estado redox de la célula influyen en la actividad de las enzimas clave de las rutas biosintéticas (Moscoviz et al., 2016). La literatura sobre sistemas de electrofermentación reporta efectos biológicos variados, en algunos microorganismos la exposición a campos ha incrementado la actividad celular, afectando la tasa de crecimiento y la cinética metabólica; mientras en otros estudios se han reportado efectos negativos o ningún efecto (Beretta et al., 2019). Es por ello que hay que entender con mucho más detalle la forma en que el potencial eléctrico y la corriente inciden en el metabolismo del organismo de interés, qué cepas microbianas y metabolitos pueden beneficiarse de estos sistemas de electrofermentación (Schievano et al., 2016).

Considerando estos hallazgos, junto con los resultados observados en las gráficas de crecimiento y producción, y las limitaciones de tiempo para producir la cantidad necesaria de violaceína, se decidió continuar la producción del pigmento utilizando el método de fermentación tradicional.

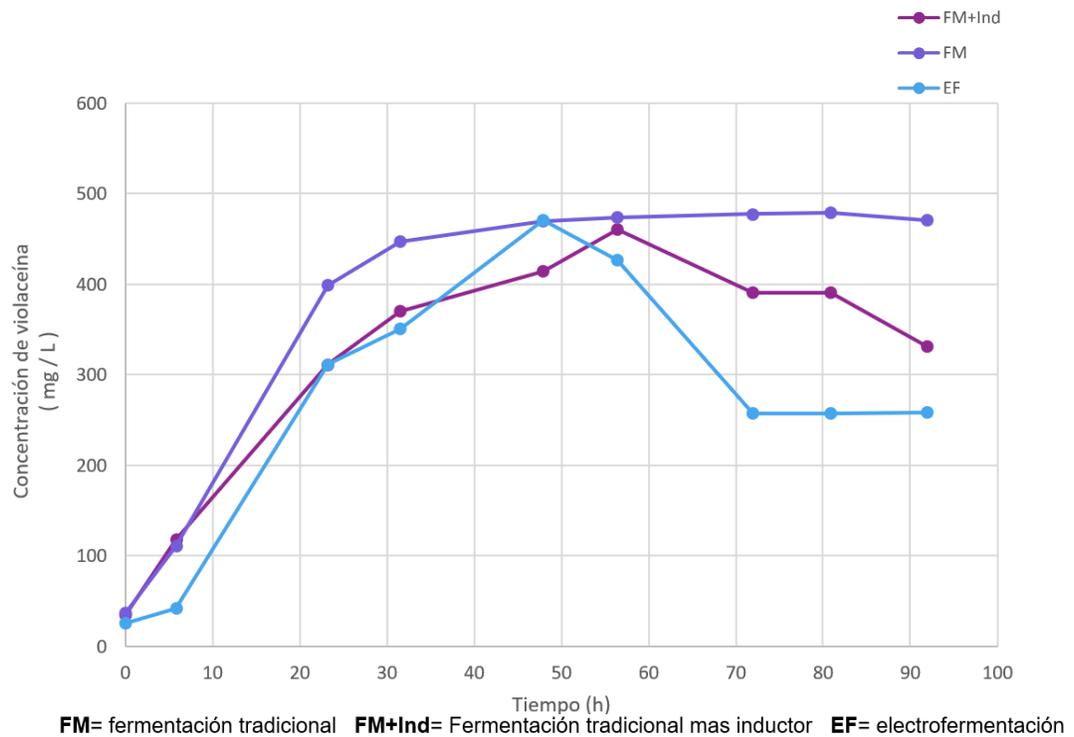


Figura 15. Producción de violaceína (mg/L) por *P. chlororaphis* pAJM.336Vio durante 92 h a 30 °C en medio N2XM9-10X fermentación tradicional, fermentación tradicional más inductor (concentración del inductor) y el sistema de electrofermentación con 0.8 V.

6.7. Extracción del pigmento

Una vez terminada la fase de producción de violaceína se realizó la extracción del pigmento mediante extracción con etanol y su posterior concentración mediante rotaevaporación. Observando nuevamente la Figura 15, es destacable que en la hora 48 se obtuvieron 470.11 g de violaceína. Estos valores son comparables a los rendimientos de producción obtenidos por Park et. al., donde probaron glicerol y arabinosa como fuentes de carbono y alcanzaron rendimientos de 1.6 y 0.71 g/L respectivamente.

Estos resultados ofrecen varias perspectivas importantes para la optimización de la producción de violaceína. La comparación entre las condiciones de fermentación mostró que la fermentación tradicional fue la más efectiva, ya que ni la inducción con IPTG ni la electrofermentación aumentaron significativamente la concentración

final de violaceína. La electrofermentación, además, afectó negativamente la estabilidad del compuesto. A partir de estos hallazgos, se recomienda continuar con el trabajo de investigación hacia la búsqueda de los parámetros experimentales para mejorar la producción y estabilidad del pigmento en futuras aplicaciones.

III. **Objetivo específico 3:** Determinar la concentración del pigmento microbiano recombinante que conduzca a la mayor capacidad antioxidante en la matriz alimentaria.

6.8. Formulación de la gelatina

Previo a la formulación de la gelatina, se estableció un rango de absorbancia para evaluar si el pigmento producido alcanzaba la intensidad de color ofrecida en el mercado. Para ello, se seleccionaron dos marcas comerciales de gelatina (M1 y M2), y se prepararon 10 mL de cada una siguiendo las instrucciones proporcionadas. A partir de estas preparaciones, se transfirió 1 mL de cada muestra y se tomó su absorbancia para determinar la intensidad del color en comparación con el estándar de mercado (Figura 16). De manera que se determinó un rango de absorbancia desde 0.225 hasta 0.925 unidades.

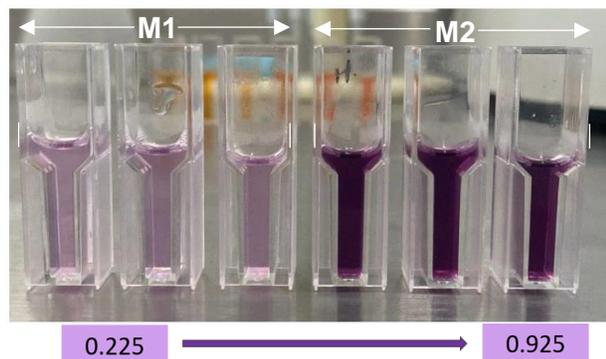


Figura 16. Absorbancia de las formulaciones de las marcas comerciales.

Una vez determinado el rango de absorbancia (0.225-0.925 unidades) se formuló la gelatina probando con diferentes concentraciones de violaceína por gramo de grenetina (Figura 17). Las muestras de las diferentes concentraciones se analizaron espectrofotométricamente, así como también se prepararon para obtener una muestra solida de las gelatinas (Figura 18). Aunque el rango de absorbancia establece un parámetro objetivo para comparar la intensidad de color, este también puede influir en la percepción visual y sensorial del consumidor. Ya que concentraciones fuera de este rango podrían resultar en una intensidad de color no deseada, afectando la aceptación visual. Dos de las concentraciones se eligieron para la realización de los experimentos posteriores, dado que los resultados del análisis espectrofotométrico indican estar dentro del rango establecido por las muestras comerciales. Se determinaron estas concentraciones como *Formulación 2*: 100 mg/g y *Formulación 3*: 300 mg/g.

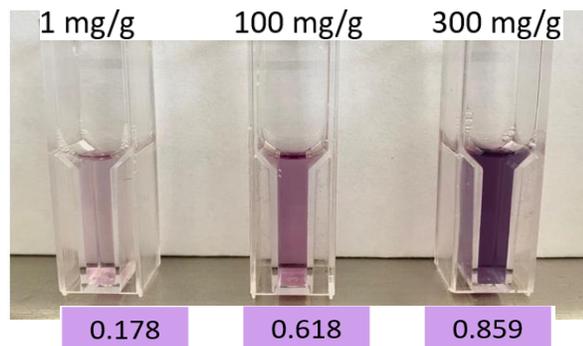


Figura 17. Muestras de gelatina formulada con violaceína

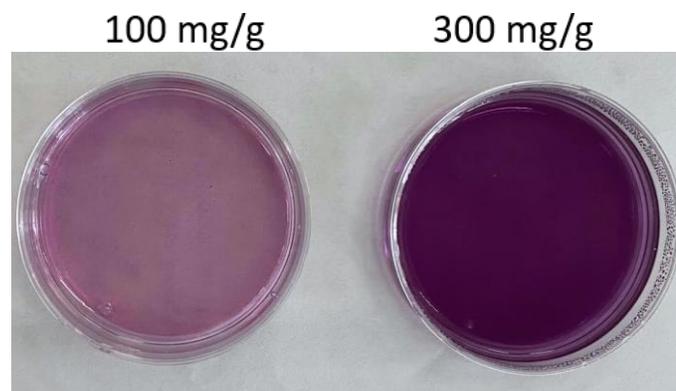


Figura 18. Gelatina formulada con violaceína en sólido.

6.9. Evaluación de la capacidad antioxidante

Los resultados de los ensayos FRAP, el cual mide la capacidad de un antioxidante para reducir un ion férrico (Fe^{3+}) a un ion ferroso (Fe^{2+}) en presencia de TPTZ, se muestran en la Tabla 7. La capacidad antioxidante se cuantificó en mmol de Trolox equivalente por mg de violaceína, revelando que la muestra comercial alcanzó un promedio de 105.25 ± 0.85 mmol Trolox eq/mg, mientras que el pigmento recombinante obtuvo un promedio de 606.52 ± 0.74 mmol Trolox eq/mg. Aunque la muestra comercial exhibe una mayor capacidad antioxidante, es importante considerar que nuestra formulación se compone únicamente de gnetina y pigmento, en contraste con la gelatina comercial que incluye ácido cítrico y ácido málico los cuales contienen propiedades antioxidantes (Zhang et-al-, 2020). A pesar de esto, nuestra formulación con el pigmento logró aproximadamente la mitad de la capacidad antioxidante con la Formulación 1 contra la muestra comercial.

Tabla 7. Capacidad antioxidante medida en mmol Trolox eq/mg de violaceína para diferentes muestras, incluyendo una gelatina comercial, pigmento recombinante diluido y dos formulaciones experimentales.

Muestra	Concentración (mmol Trolox eq/mg Vio*)
Comercial	105.25 ± 0.85 ^B
Pigmento recombinante	606.52 ± 0.74 ^A
Formulación 1 (100 mg/g)	57.94 ± 0.88 ^D
Formulación 2 (300 mg/g)	92.22 ± 0.793 ^C

Los datos representan la media de tres réplicas independientes \pm la desviación estándar. *Violaceína. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

De los ensayos de DPPH y cómo podemos observar en la tabla 8, el pigmento recombinante alcanzó un promedio de 65.80 ± 0.41 % de inhibición, con una desviación estándar relativamente baja lo que indica una alta consistencia en los resultados. Este valor es considerablemente alto en comparación con las otras muestras evaluadas, lo que sugiere que el pigmento recombinante posee una notable capacidad antioxidante, probablemente debido a su capacidad para donar electrones (Cao et. al., 2007). O bien, por su hidrofobicidad la interacción directa con membranas celulares es altamente probable (de Souza et al., 2017).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del radical DPPH para diferentes muestras (ND= no detectable).

Muestra	% de inhibición
Comercial	9.06 ± 0.22 ^C
Pigmento recombinante	65.80 ± 0.41 ^A
Formulación 1 (100 mg/g)	ND
Formulación 2 (300 mg/g)	46.72 ± 1.06 ^B

Los datos representan la media de tres réplicas independientes \pm la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Por otro lado, la formulación de gelatina que incorporó el pigmento microbiano (Formulación 2) mostró un promedio de inhibición del radical del 46.72 ± 1.06 %, lo que implica una mayor variabilidad en los resultados. A pesar de esta variabilidad, esta formulación demostró un efecto antioxidante considerable, aunque menor que el del pigmento recombinante puro.

En contraste, la gelatina comercial evaluada como control de mercado tuvo un promedio de inhibición significativamente más bajo, alcanzando solo un 9.06 ± 0.22 % de inhibición. La baja capacidad antioxidante de esta muestra refuerza la idea de que los ingredientes antioxidantes presentes en la gelatina comercial no son muy eficientes en la neutralización de radicales DPPH. Esto podría deberse a que estos antioxidantes actúan a través de otros mecanismos, como la quelación de metales, en lugar de la neutralización directa de radicales libres (Abrahamson et al., 1994).

Como se menciona anteriormente, el método FRAP mide la capacidad de reducir el hierro férrico, mientras que el método DPPH evalúa la capacidad de neutralizar el radical libre DPPH, similar a la acción antioxidante en células humanas. Aunque ambos métodos son útiles, el DPPH es más representativo de los mecanismos celulares, ya que refleja la interacción con radicales libres en el cuerpo.

De manera general, los resultados muestran que el pigmento recombinante tiene un efecto antioxidante significativo, que se reduce moderadamente al integrarse en la formulación de gelatina, mientras que la gelatina comercial tiene una capacidad antioxidante muy limitada. Esto sugiere que los pigmentos microbianos podrían ser una valiosa adición en productos alimenticios para mejorar sus propiedades antioxidantes, aunque su efectividad puede depender de la interacción con otros ingredientes en la formulación. Se sugiere, que un área de oportunidad para trabajos posteriores sería explorar cómo las interacciones entre el pigmento y la matriz afectan su estabilidad. Ya que estas interacciones podrían influir en el comportamiento y la preservación de las propiedades antioxidantes del pigmento en productos alimenticios.

IV. **Objetivo específico 4:** Evaluar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria durante la vida de anaquel de la matriz alimentaria.

6.10. Capacidad antiinflamatoria durante la vida de anaquel

Como se mencionó anteriormente, las muestras de gelatina con el pigmento recombinante Formulación 2 fueron expuestas a temperatura de refrigeración (4 °C), y se evaluó tanto la capacidad antioxidante como la antiinflamatoria durante un período de 3 semanas para analizar el comportamiento o la pérdida de las actividades biológicas a lo largo del tiempo. La Figura 19 muestra los porcentajes promedio de estabilidad de la membrana proporcionada por la gelatina durante este período de almacenamiento. Se observa una tendencia general de disminución gradual en la estabilidad de las membranas, con un descenso del $82.16 \pm 2.19 \%$ en el día 0 al $69.88 \pm 1.56 \%$ en el día 21. Este cambio representa una disminución del 13.88% en tres semanas, lo que indica que la eficacia de la gelatina para proteger la integridad de la membrana se va deteriorando con el tiempo.

Las barras de error en el gráfico representan la variabilidad entre las muestras individuales, y aunque existe cierta variación en los datos, la tendencia general de disminución es consistente. Esto sugiere que la capacidad del pigmento para mantener la estabilidad de la membrana se ve afectada a medida que pasa el tiempo. El mantenimiento de la estabilidad de la membrana es crucial para la integridad celular, y su pérdida progresiva podría tener implicaciones en la eficacia del pigmento como agente bioactivo en productos almacenados durante períodos prolongados.

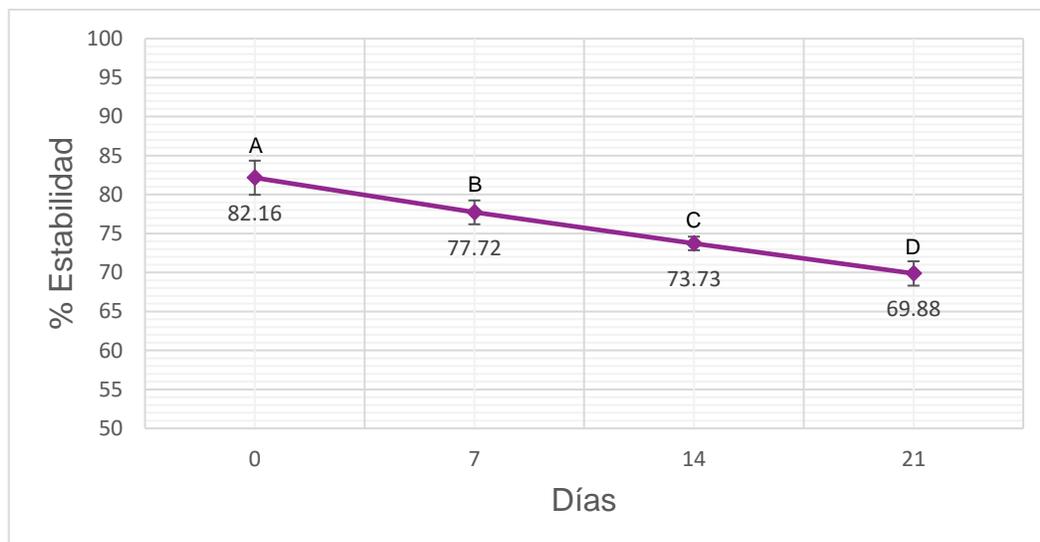


Figura 19. Porcentaje de estabilidad de membrana a lo largo de 3 semanas de evaluación, donde las barras representan la variabilidad entre las muestras de los individuos evaluados. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Esta capacidad antiinflamatoria observada es consistente con el potencial antiinflamatorio documentado en otros estudios sobre la violaceína. Se ha reportado que este compuesto puede reducir la producción de citocinas proinflamatorias, como las interleucinas (IL-6), lo que contribuye a disminuir la inflamación y mitigar una respuesta inmune excesiva (Verinaud et al., 2015). Este mecanismo es clave para reducir la inflamación crónica y para su aplicación en productos con fines terapéuticos. Asimismo, investigaciones anteriores han demostrado que la violaceína, a una dosis de 40 mg/kg p.c. (peso corporal), también modula los mediadores inflamatorios, lo que refuerza su utilidad en el tratamiento de condiciones inflamatorias (Antonisamy & Ignacimuthu, 2010).

Los datos encontrados sugieren que, aunque el pigmento recombinante mantiene una capacidad significativa para estabilizar las membranas y ejercer una capacidad antiinflamatoria, estas propiedades llegan a deteriorarse con el paso del tiempo en condiciones de refrigeración. Estos resultados resaltan la necesidad de estudiar

más a fondo la estabilidad a largo plazo del pigmento en diversas formulaciones y condiciones de almacenamiento, lo que podría influir en su aplicación en productos industriales.

6.11. Capacidad antioxidante durante la vida de anaquel

En cuanto a la capacidad antioxidante de las muestras de gelatina preparadas con la Formulación 2 durante las 3 semanas de evaluación, la capacidad antioxidante medida mediante los ensayos de FRAP (Figura 20) y DPPH (Figura 21) mostró patrones distintos en la preservación de las propiedades antioxidantes a lo largo de las 3 semanas de evaluación. En el caso del ensayo de FRAP, se observó una disminución significativa del 92.22 % en la capacidad reductora férrica, lo que indica que la violaceína perdió una cantidad considerable de su actividad antioxidante. Esta pérdida puede explicarse por la interacción con factores ambientales como temperatura, pH y humedad, los cuales probablemente afectaron la estabilidad estructural del pigmento. A lo largo del tiempo, la violaceína puede sufrir cambios en su conformación molecular debido a la formación de aglomerados, que se producen cuando las moléculas del pigmento se unen a través de enlaces de hidrógeno. Esta agregación podría alterar su funcionalidad biológica (Arif et al., 2017).

En contraste, la capacidad de neutralización de radicales medidas a través del ensayo de DPPH mostró una mayor estabilidad en comparación con el FRAP. Aunque también hubo una reducción en la capacidad antioxidante, el descenso fue menos pronunciado, manteniéndose alrededor del 33 % de inhibición tras 21 días. Esto sugiere que la violaceína tiene una capacidad más robusta para conservar su actividad de neutralización de radicales libres lo cual puede estar relacionado con la estructura molecular de la violaceína y la naturaleza de su interacción con el radical DPPH. De acuerdo con Kedare & Singh (2011) y Platzer et al. (2022), los grupos funcionales presentes en la molécula de violaceína, como los grupos

hidroxilo y amina, facilitan la donación de electrones o átomos de hidrógeno, lo que permite una neutralización eficaz de los radicales DPPH a lo largo del tiempo.

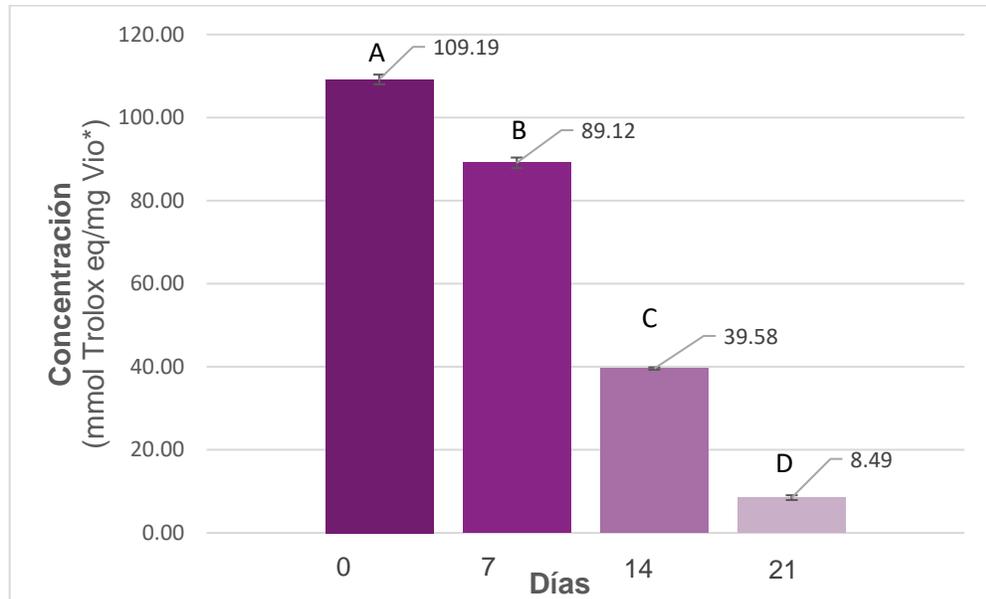


Figura 20. Capacidad antioxidante del ensayo FRAP durante un periodo de 3 semanas para la formulación experimental. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

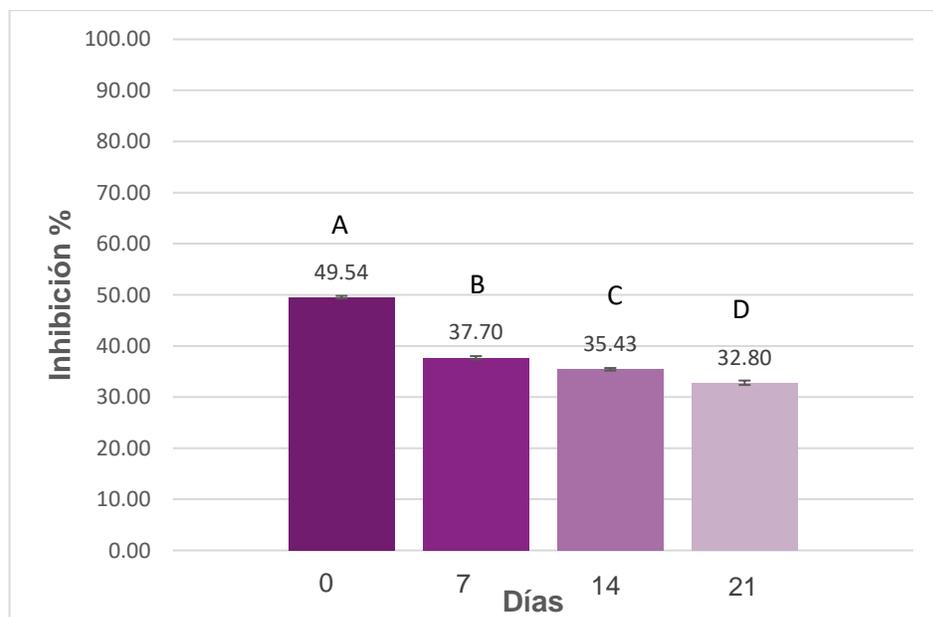


Figura 21. Capacidad antioxidante del ensayo DPPH durante un periodo de 3 semanas para la formulación experimental. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En resumen, mientras que la capacidad reductora férrica de la violaceína parece ser susceptible a factores ambientales y al paso del tiempo, su capacidad de neutralización de radicales presenta una mayor estabilidad, lo cual podría ser explotado en aplicaciones donde se busque preservar la capacidad antioxidante a largo plazo.

6.12. Análisis microbiológico

En lo que respecta al análisis microbiológico realizado específicamente para detectar la presencia de hongos y levaduras, no se observó producción ni crecimiento de ningún tipo durante las tres semanas completas de la evaluación. Esto sugiere que el pigmento podría poseer propiedades antifúngicas significativas, tal como lo sugieren investigaciones previas (Sasidharan et. al., 2015). Además, estos resultados también indican que se implementaron correctamente todos los protocolos necesarios para garantizar la precisión y validez de las pruebas, lo que refuerza la confiabilidad de los datos obtenidos en el estudio.

7. CONCLUSIONES

Se logró expresar el plásmido pAJM.336Vio en *Pseudomonas chlororaphis* mediante electroporación, obteniendo un pigmento recombinante. Sin embargo, la aplicación de voltaje en el sistema de fermentación mostró un efecto negativo en la producción de este pigmento en comparación con la fermentación tradicional. No obstante, el pigmento recombinante mostro propiedades antioxidantes y antiinflamatorias cuando se agregó en una matriz alimentaria de grenetina, permaneciendo estable en estas funciones durante siete días bajo condiciones controladas de temperatura. No obstante, es importante considerar que no se realizó una purificación exhaustiva de la violaceína. La mezcla de productos derivados de *P. chlororaphis* podría incluir otras sustancias bioactivas que, junto con la violaceína, podrían contribuir a los efectos observados.

Para futuras estudios e investigaciones, se recomienda investigar más a fondo la toxicidad del pigmento, especialmente si se considera su aplicación en la industria alimentaria. Igualmente se recomienda realizar un análisis más profundo de la pureza del compuesto y conocimiento del perfil bioactivo serán cruciales para evaluar su seguridad y efectividad. Además, una evaluación tecno-económica del proceso de producción del pigmento a gran escala podría ofrecer información crucial sobre su viabilidad económica y comercial. La implementación de estos estudios permitirá no solo entender mejor el potencial del pigmento, sino también explorar sus beneficios funcionales y aplicaciones prácticas en productos que podrían aprovechar sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Estos pasos serán esenciales para avanzar hacia la posible incorporación de este pigmento en matrices industriales, incrementando el valor agregado de productos naturales con funciones bioactivas.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para llevar a cabo este proyecto, se siguieron las normas y regulaciones establecidas por el comité de seguridad e higiene de la Facultad de Química y se aplicaron las buenas prácticas de laboratorio. El protocolo fue evaluado por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química y fue dictaminado como aprobado en lo referente a los aspectos bioéticos del proyecto según el oficio CBQ23/064b (Anexo 1).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agler, M. T., Wrenn, B. A., Zinder, S. H., & Angenent, L. T. (2011). Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 70–78.
- Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. W., Zakaria, Z. A., & Yusof, N. Z. (2012). *Application of Bacterial Pigments as Colorant* (pp. 57–74). https://doi.org/10.1007/978-3-642-24520-6_4
- 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>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Amin, K. A., Abdel Hameid, H., & Abd Elsttar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994–2999. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.039>
- Anderson, J. A., Staley, J., Challender, M., & Heuton, J. (2018). Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. *Transgenic research*, 27, 103-113. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0061-6>
- Antoniamy, P., & Ignacimuthu, S. (2010). Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomedicine*, 17(3–4), 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.018>
- Arif, S., Batool, A., Khalid, N., Ahmed, I., & Janjua, H. A. (2017). Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC advances*, 7(8), 4468-4478. <https://doi.org/10.1039/C6RA25806A>
- Arimboor, R., Natarajan, R. B., Menon, K. R., Chandrasekhar, L. P., & Moorkoth, V. (2015). Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food

- colors: analysis and stability—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1258–1271. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1260-7>
- Aruldass, C. A., Dufossé, L., & Ahmad, W. A. (2018). Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *Journal of Cleaner Production*, 180, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>
- Ausubel, R., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidan, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (1994). Short protocols in molecular cloning. *Wiley and Sons, Inc. New York and Brisbane*, 1-14
- Babitha, S. (2009). Microbial Pigments. En *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 147–162). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_8
- Balibar, C. J., & Walsh, C. T. (2006). In Vitro Biosynthesis of Violacein from *l*-Tryptophan by the Enzymes VioA–E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry*, 45(51), 15444–15457. <https://doi.org/10.1021/bi061998z>
- Ballantine, J. A., Barrett, C. B., Beer, R. J. S., Eardley, S., Robertson, A., Shaw, B. L., & Simpson, T. H. (1958). 147. The chemistry of bacteria. Part VII. The structure of violacein. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 757. <https://doi.org/10.1039/JR9580000755>
- Baptista, S. L., Cunha, J. T., Romani, A., & Domingues, L. (2018). Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*, 267, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.068>
- Batalla, M. V. (2007). Antioxidantes presentes en los alimentos: vitaminas, minerales y suplementos. *Offarm: farmacia y sociedad*, 26(10), 79-86.
- Behera, S. S., Ray, R. C., Das, U., Panda, S. K., & Saranraj, P. (2019). *Microorganisms in Fermentation* (pp. 1–39). https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1
- Beretta, G., Mastorgio, A. F., Pedrali, L., Saponaro, S., & Sezenna, E. (2019). The effects of electric, magnetic and electromagnetic fields on microorganisms in the perspective of bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18, 29-75. [https://doi.org/10.1007/s11157-018-09491-9\(0123456789\(\),-volIV\)](https://doi.org/10.1007/s11157-018-09491-9(0123456789(),-volIV))
- Bhat, S. V., N. Bhimsen. A., & S. Meenakshi. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Alpha Science International Limited.
- Block, G., Woods, M., Potosky, A., & Clifford, C. (1990). Validation of a self-administered diet history questionnaire using multiple diet records. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43(12), 1327–1335. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(90\)90099-B](https://doi.org/10.1016/0895-4356(90)90099-B)

- Cao, W., Chen, W., Sun, S., Guo, P., Song, J., & Tian, C. (2007). Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 817(2), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2007.04.022>
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2018a). Color additives questions and answers for consumers. *U.S. Food and Drug Administration*. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/color-additives-questions-and-answers-consumers>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2018b). Overview of food ingredients, Additives & Colors. *U.S. Food and Drug Administration*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>
- Ceyhan, B. M., Gultekin, F., Doguc, D. K., & Kulac, E. (2013). Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.016>
- Chaitanya Lakshmi, G. (2014). Food coloring: the natural way. *Res J Chem Sci*, 2231(8), 606X.
- 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>
- Cheng, Y.-T., & Yang, C.-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 61, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027>
- Chung, K.-T. (2016). Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(4), 233–261. <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602>
- Clavé, P., & Shaker, R. (2015). Dysphagia: current reality and scope of the problem. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.49>
- Clavé, P., Terré, R., Kraa, M. de, & Serra, M. (2004). Approaching oropharyngeal dysphagia. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96(2). <https://doi.org/10.4321/S1130-01082004000200005>

- 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>
- de Carvalho, D. D., Costa, F. T. M., Duran, N., & Haun, M. (2006). Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 20(8), 1514–1521. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.06.007>
- de Souza, K. D., Perez, K. R., Durán, N., Justo, G. Z., and Caseli, L. (2017). Interaction of violacein in models for cellular membranes: Regulation of the interaction by the lipid composition at the air-water interface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 160, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.027>
- Dossi, N., Piccin, E., Bontempelli, G., Carrilho, E., & Wang, J. (2007). Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection. *ELECTROPHORESIS*, 28(22), 4240–4246. <https://doi.org/10.1002/elps.200700208>
- Dufossé, L. (2016). Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). En *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 337–354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6>
- Dufossé, L. (2018). Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. En *Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes* (pp. 113–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3.00004-1>
- 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>
- Dyaa, A., Soliman, H., Abdelrazak, A., Samra, B. N., Khojah, E., Ahmed, A. F., El-Esawi, M. A., & Elsayed, A. (2022). Optimization of Carotenoids Production from Rhodotorula sp. Strain ATL72 for Enhancing Its Biotechnological Applications. *Journal of Fungi*, 8(2), 160. <https://doi.org/10.3390/jof8020160>
- Elliott, R. (2005). Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.009>
- 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>
- Focsan, Polyakov, & Kispert. (2019). Supramolecular Carotenoid Complexes of Enhanced Solubility and Stability—The Way of Bioavailability Improvement. *Molecules*, 24(21), 3947. <https://doi.org/10.3390/molecules24213947>

- Foong, L. C., Loh, C. W. L., Ng, H. S., & Lan, J. C.-W. (2021). Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02967-3>
- Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X., & Jin, H. (2011). Effect of Food Azo Dye Tartrazine on Learning and Memory Functions in Mice and Rats, and the Possible Mechanisms Involved. *Journal of Food Science*, 76(6), T125–T129. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02267.x>
- Ghergab, A., Selin, C., Tanner, J., Brassinga, A. K., & Dekievit, T. (2021). *Pseudomonas chlororaphis* PA23 metabolites protect against protozoan grazing by the predator *Acanthamoeba castellanii*. *PeerJ*, 9, e10756. <https://doi.org/10.7717/peerj.10756>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gómez-Gómez, B., Arregui, L., Serrano, S., Santos, A., Pérez-Corona, T., & Madrid, Y. (2019). Selenium and tellurium-based nanoparticles as interfering factors in quorum sensing-regulated processes: violacein production and bacterial biofilm formation. *Metallomics*, 11(6), 1104–1114. <https://doi.org/10.1039/c9mt00044e>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(6), 1089-1098. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>
- Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>
- Hou, P. Z., & Regenstein, J. M. (2006). Optimization of Extraction Conditions for Pollock Skin Gelatin. *Journal of Food Science*, 69(5), C393–C398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10704.x>
- Johnston-Banks, F. A. (1990). In Harris, P.(Ed.), *Food Gels*.
- Jurić, S., Jurić, M., Król-Kilińska, Ž., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M., Dragović-Uzelac, V., & Donsì, F. (2022). Sources, stability, encapsulation and

- application of natural pigments in foods. *Food Reviews International*, 38(8), 1735–1790. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1837862>
- Kang, B. R., Han, S. H., Zdor, R. E., Anderson, A. J., Spencer, M., Yang, K. Y., ... & Kim, Y. C. (2007). Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, GacS. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(4), 586-593.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412-422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Kent, R., & Dixon, N. (2020). Contemporary tools for regulating gene expression in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 38(3), 316-333. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.09.007>
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., & Jyoti, S. (2014). Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/837891>
- Kobylewski, S., & Jacobson, M. F. (2012). Toxicology of food dyes. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 18(3), 220–246. <https://doi.org/10.1179/1077352512Z.000000000034>
- Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial pigments: production and their applications in various industries. *IJPCBS*, 5(1), 203-212.
- 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>
- Lichtenthaler, H. K. (2004, June). Evolution of carotenoid and isoprenoid biosynthesis in photosynthetic and non-photosynthetic organisms. *In Proceedings of the 16th Plant Lipid Symposium*, Budapest, Hungary (Vol. 14).
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Lu, S., & Li, L. (2008). Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), 778–785. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00708.x>
- Mao, X., He, T., Kour, G., Yin, H., Ling, C., Gao, G., Jin, Y., Liu, Q., O'Mullane, A., & Du, A. (2024). Computational electrocatalysis beyond conventional hydrogen electrode model: CO₂ reduction to C₂ species on copper facilitated by

- dynamically formed solvent halide ions at the solid–liquid interface. *Chemical Science*, 15(3, 7), 3330–3338. <https://doi.org/10.1039/D3SC06471A>
- Miller, M. D., Steinmaus, C., Golub, M. S., Castorina, R., Thilakartne, R., Bradman, A., & Marty, M. A. (2022). Potential impacts of synthetic food dyes on activity and attention in children: a review of the human and animal evidence. *Environmental Health*, 21(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00849-9>
- 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>
- Mota, I. G. C., Neves, R. A. M. Das, Nascimento, S. S. D. C., Maciel, B. L. L., Morais, A. H. D. A., & Passos, T. S. (2021). Artificial Dyes: Health Risks and the Need for Revision of International Regulations. *Food Reviews International*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1934694>
- Nikel, P. I., Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), 368–379. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3253>
- Panesar, R., Kaur, S., & Panesar, P. S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>
- Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J., & Ruiz, M. A. (2012). *Pathways of Carotenoid Biosynthesis in Bacteria and Microalgae* (pp. 1–12). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-879-5_1
- Pérez-Cruz, Elizabeth., González-Muñoz, Alejandro., Barrientos-Jiménez, Mirlene., Camacho-Guerrera, C. D., Tapia-Gómez, Yvett., Torres-González, K. O., & Uribe-Quiroz, Gabriela. (2018). Evaluación de la disfagia en pacientes con enfermedades neurológicas y su relación con riesgo de desnutrición. *Medicina Interna de México*, 34.
- 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>
- Perrier, V., Dubreucq, E., & Galzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Archives of Microbiology*, 164(3), 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF02529968>
- Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2022). Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: A quantitative structure-property relationship (QSPR) study. *Frontiers in nutrition*, 9, 882458. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.882458>

- Polyakov, N. E., & Leshina, T. V. (2006). Certain aspects of the reactivity of carotenoids. Redox processes and complexation. *Russian Chemical Reviews*, 75(12), 1049–1064. <https://doi.org/10.1070/RC2006v075n12ABEH003640>
- Pressman, P., Clemens, R., Hayes, W., & Reddy, C. (2017). Food additive safety. *Toxicology Research and Application*, 1, 239784731772357. <https://doi.org/10.1177/2397847317723572>
- Qiao, Y., Huang, Q., Guo, H., Qi, M., Zhang, H., Xu, Q., Shen, Q., & Ling, N. (2024). Nutrient status changes bacterial interactions in a synthetic community. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(11-12), e01566-23. <https://doi.org/10.1128/aem.01566-23>
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Rabaey, K., Girguis, P., & Nielsen, L. K. (2011). Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.010>
- Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Vijayalakshmi, G., & Kumar, V. (2016). In vitro antioxidant activity and antimicrobial activity against biofilm forming bacteria by the pigment from Desert soil *Streptomyces* sp D25. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 148–150. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60626>
- Ramesh, Vinithkumar, Kirubakaran, Venil, & Dufossé. (2019). Multifaceted Applications of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges and Future Directions for Public Health Implications. *Microorganisms*, 7(7), 186. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070186>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). *Structures and Analysis of Carotenoid Molecules* (pp. 71–108). https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_3
- Safar, H., van Wageningen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Sarıkaya, R., Selvi, M., & Erkoç, F. (2012). Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88(8), 974–979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.032>
- Sasidharan, A., Sasidharan, N. K., Amma, D. B. N. S., Vasu, R. K., Nataraja, A. V., & Bhaskaran, K. (2015). Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). *Journal of Microbiology*, 53, 694-701. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5173-6>
- Schievano, A., Sciarria, T. P., 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Schröder, U. (2012). Editorial: Microbial Fuel Cells and Microbial Electrochemistry: Into the Next Century! *ChemSusChem*, 5(6), 959–959. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200319>
- Simpson, K. L., Nakayama, T. O. M., & Chichester, C. O. (1964). BIOSYNTHESIS OF YEAST CAROTENOIDS. *Journal of Bacteriology*, 88(6), 1688–1694. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1688-1694.1964>
- Song, C. W., Lee, J., & Lee, S. Y. (2015). Genome engineering and gene expression control for bacterial strain development. *Biotechnology Journal*, 10(1), 56-68. <https://doi.org/10.1002/biot.201400057>
- Spence, C., & Piqueras-Fiszman, B. (2016). Food Color and Its Impact on Taste/Flavor Perception. En *Multisensory Flavor Perception* (pp. 107–132). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100350-3.00006-7>
- Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Chen, B.-H. (2021). Recent Advances on Nanoparticle Based Strategies for Improving Carotenoid Stability and Biological Activity. *Antioxidants*, 10(5), 713. <https://doi.org/10.3390/antiox10050713>
- Srilekha, V., Krishna, G., Srinivas, V. S., & Charya, M. S. (2017). Antimicrobial evaluation of bioactive pigment from *Salinicoccus* sp. isolated from Nellore sea coast. *Int. J. Biotechnol. Biochem*, 13, 211-217.
- Streeter, A. R., Cartwright, A., Zargarán, M., Wankhade, A., Anderson, A. J., & Britt, D. W. (2023). Adjuvant Pluronic F68 is compatible with a plant root-colonizing probiotic, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Agrochemicals*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.3390/agrochemicals3010001>
- Subramaniam, S., Ravi, V., & Sivasubramanian, A. (2014). Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic microorganisms. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 86–90. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.815634>
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
- Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y., & He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in *Rhodotorula* and Strategies for Enhanced Their Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 507–517. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01022>
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., & Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4669–4678. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>

- 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>
- Venkata Mohan, S., Velvizhi, G., Annie Modestra, J., & Srikanth, S. (2014). Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 779–797. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.109>
- Verdugo, F. J., Briones, E., Porte, L., Amaro, J., & Fica, A. (2016). Peritonitis fúngica por *Rhodotorula mucilaginosa* en una paciente en diálisis peritoneal automatizada: Revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 33(2), 222–225. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200012>
- Verinaud, L., Lopes, S. C. P., Prado, I. C. N., Zanucoli, F., Alves da Costa, T., Di Gangi, R., ... & Thome, R. (2015). Violacein treatment modulates acute and chronic inflammation through the suppression of cytokine production and induction of regulatory T cells. *PLoS One*. 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125409>
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>
- Yang, C., Jiang, P., Xiao, S., Zhang, C., Lou, K., & Xing, X.-H. (2011). Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol. *Biochemical Engineering Journal*, 57, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.008>
- Zhang, H., Yang, Q., Lin, H., Ren, X., Zhao, L., & Hou, J. (2013). Phytic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvest gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.027>
- Zhang, L., Zhang, P., Xia, C., Cheng, Y., Guo, X., & Li, Y. (2020). Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture Research*, 51(5-9), 2766-2776. <https://doi.org/10.1111/are.14616>
- Ziegler, R. G., Mayne, S. T., & Swanson, C. A. (1996). Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes and Control*, 7(1), 157–177. <https://doi.org/10.1007/BF00115646>

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Aprobación de CONBIOETICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA



C.U., Querétaro, mayo 24, 2023
No. de oficio. CBQ23/064b

Dr. Aldo Amaro Reyes
Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Investigadores responsables

Melanie Quijada Carretas
Estudiante responsable

Dr. Carlos Regalado González
Dra. Rocío Campos Vega
Dra. Montserrat Escamilla García
Colaboradores

El protocolo de investigación titulado “Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación” sometido a evaluación por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Química involucra la participación de sujetos humanos. Las características del diseño del protocolo de investigación son resumidas a continuación:

Tipo de estudio	Toma de muestra biológica sin intervención
Población de estudio	Individuos sanos de entre 20 y 30 años que no hayan consumido medicamentos antiinflamatorios dos semanas previas
Tamaño de muestra	10 individuos
Reclutamiento	Mediante carteles en las instalaciones de la UAQ y redes sociales
Aviso de reclutamiento	Incluido
Tipo de intervención	No aplica
Duración del estudio	5-10 min
Variables de medición	No aplica
Manejo de RPBI	De acuerdo a la norma
Toma de muestra biológica	Sangre



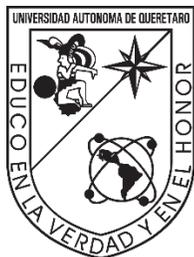
Personal capacitado para valoraciones	Incluido
Riesgos a los participantes	Mínimo
Atención médica	SuSalud-UAQ
Consentimiento informado	Incluido
Revocación del consentimiento informado	Incluido

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **“Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado en lo referente a los aspectos bioéticos del proyecto**.

Cabe mencionar que ningún integrante del Comité declaró conflicto de interés para la evaluación del protocolo de investigación. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente
Comité de Bioética de la Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro

10.2. Anexo 2. Carta responsiva



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
“Carta Responsiva”



Título del protocolo:

“Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”

Investigador principal: Dr. Aldo Amaro Reyes

Sede donde se realizará el estudio: Posgrado de alimentos. Facultad de Química.

Universidad Autónoma de Querétaro.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los pigmentos microbianos pueden presentar actividades biológicas como lo es la actividad antiinflamatoria dada su naturaleza química. El ensayo de estabilidad de membrana reactiva comprueba si existe actividad antiinflamatoria.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los carotenoides y violaceína producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* y *Pseudomonas chlororaphis* asistido por un sistema de electrofermentación.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá tener evidencia científica que sustente el uso de pigmentos microbianos como aditivo alimentario con actividad biológica.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

El estudio consta de una toma de muestra sanguínea realizada por personal capacitado.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

La toma de muestra sanguínea es un procedimiento rutinario que no implica riesgo alguno para la salud.

6. ACLARACIONES

- La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable en caso de no aceptar la invitación.
- Los participantes podrán retirarse en el momento que lo deseen, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no las razones, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No se recibirá pago por participar.

- En el transcurso del estudio los participantes podrán solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada participante, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Esta información es de carácter confidencial. La UAQ solo proporcionará información que no lo identificará personalmente.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de la participación o busca la opinión de otra persona fuera del estudio, puede consultar al médico de su confianza.

10.3. Anexo 3. Consentimiento informado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos



“Carta consentimiento para participar en un proyecto de investigación”

Título del protocolo:

“Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”

Investigador principal: Dr. Aldo Amaro Reyes

Sede donde se realizará el estudio: Posgrado de alimentos. Facultad de Química.

Universidad Autónoma de Querétaro.

INVITACIÓN

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como **consentimiento informado**. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los pigmentos microbianos pueden presentar actividades biológicas como lo es la actividad antiinflamatoria dada su naturaleza química. El ensayo de estabilidad de membrana reactiva comprueba si existe actividad antiinflamatoria.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los carotenoides y violaceína producidos por *Rhodotorula mucilaginosa* y *Pseudomonas chlororaphis* asistido por un sistema de electrofermentación.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá tener evidencia científica que sustente el uso de pigmentos microbianos como aditivo alimentario con actividad biológica.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

El estudio consta de una toma de muestra sanguínea realizada por personal capacitado.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

La toma de muestra sanguínea es un procedimiento rutinario que no implica riesgo alguno para la salud.

6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada participante, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Esta información es de carácter confidencial. La UAQ solo proporcionará información que no lo identificará personalmente.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. INFORMACIÓN DE CONTACTO

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza.

8. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del Participante

Fecha

Testigo 1

Fecha

Testigo 2

Fecha

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

10.4. Anexo 4. Carta de revocación del consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Carta revocación del consentimiento informado”



Título del protocolo:

“Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”

Investigador principal: Dr. Aldo Amaro Reyes

Sede donde se realizará el estudio: Posgrado de alimentos. Facultad de Química.

Universidad Autónoma de Querétaro.

Nombre del paciente:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de participar en el proyecto de investigación con nombre “Evaluación de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de una matriz alimentaria adicionada con pigmentos microbianos obtenidos bajo la influencia de un sistema de electrofermentación”, por las siguientes razones: (Puede dejarlo en blanco si no desea mencionar las razones.)

Si el paciente lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre el/ella con motivo de su participación en el proyecto de investigación.

Nombre y firma del paciente

___/___/___

día mes año

Nombre y firma del testigo

___/___/___

día mes año

Nombre y firma del testigo

___/___/___

día mes año

Con copia para el paciente (se deberá elaborar por duplicado, quedando una copia en poder del paciente).

10.5. Anexo 5. Invitación para los participantes.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



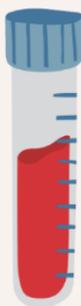
INVITACIÓN

A los interesados se les hace una cordial invitación para participar en el estudio de investigación titulado:

"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE UNA MATRIZ ALIMENTARIA ADICIONADA CON PIGMENTOS MICROBIANOS OBTENIDOS BAJO LA INFLUENCIA DE UN SISTEMA DE ELECTROFERMENTACIÓN"

Para lo cual se les pide una toma de muestra sanguínea, la muestra será tomada por parte del personal de análisis clínicos de la UAQ, quienes están capacitados para dicha actividad.

REQUISITOS:



Sexo indiferente



Entre 20 - 30 años



Estado de ayuno



No haber consumido ningún antiinflamatorio durante 2 semanas previas a la toma de muestra



Todos los datos obtenidos serán usados con fines de investigación y se manejarán de manera confidencial. La toma de muestra es un procedimiento rutinario que no representa riesgo para su salud.