

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



## ESCUELA SUPERIOR DE APAN

### TESIS DE LICENCIATURA

Mejora en la capacidad de producción de indigoidina en *Escherichia coli* mediante la eliminación de factores de hibernación ribosomal

**Para obtener el título de**

Licenciado en Ingeniería en Biociencias

### PRESENTA

Aaron Miranda Neri

#### **Directores de tesis**

Dr. José Utrilla Carreri

M.C. Jair Ernesto Díaz Ramírez

#### **Codirector de tesis**

Dr. Marín Peralta Gil

Apan, Hidalgo.

Fecha: Agosto, 2025

**Lugar donde se realizó la tesis**

Este trabajo se realizó en el Programa de Biología Sintética del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. José Utrilla Carreri y el M.C. Jair Ernesto Díaz Ramírez y fue financiado por el proyecto DGAPA- PAPIIT- UNAM IN214923.



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAP-005/2025  
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Aarón Miranda Neri  
P.D.L.I.B.C.  
**PRESENTE**

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a el pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Aarón Miranda Neri (440546)**, a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Mejora en la capacidad de producción de indigoidina en *Escherichia coli* mediante la eliminación de factores de hibernación ribosomal”**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. José Ultrilla Carreri

PRIMER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SEGUNDO VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

TERCER VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 1: Dra. Teresa Romero Cortes

SUPLENTE 2: Dr. Luis Alberto Hernández Hernández

ATENTAMENTE  
“Amor, Orden y Progreso”  
Chimalpa, Apan, Hgo., México a 15 de agosto de 2025.

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros  
Coordinador de Ingeniería en Biociencias

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa  
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900  
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901  
esap@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



uaeh.edu.mx



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAp-006/2025

Asunto: Solicitud de Incorporación de Tesis al repositorio institucional

Mtro. Jorge E. Peña Zepeda  
Director de Bibliotecas y Centro de Información  
**PRESENTE.**

Por medio del presente hago constar que la tesis en formato digital titulado “Mejora en la capacidad de producción de indigoidina en *Escherichia coli* mediante la eliminación de factores de hibernación ribosomal” que presenta Aarón Miranda Neri con número de cuenta 440546 es la versión final validada por el Comité Tutorial y cumple con el oficio de autorización de impresión, por lo que solicito su integración en el repositorio institucional de tesis.

**ATENTAMENTE**

**“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”**

Chimalpa, Apan, Hgo., México a 15 de agosto de 2025.

Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros  
Coordinador de Ingeniería en Biociencias

Aarón Miranda Neri  
Autor de tesis

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa  
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900  
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901  
esap@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



uaeh.edu.mx

## Dedicatoria

*A mis abuelos, por su amor incondicional, su ejemplo de vida y por enseñarme a valorar cada esfuerzo; y de manera muy especial, a mi abuelita, quien no pudo verme llegar hasta este punto.*

*A mis padres, por su apoyo constante y por permitirme seguir mis sueños.*

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al **Dr. José Utrilla Carreri**, director de este proyecto, por brindarme la oportunidad de desarrollarlo bajo su guía. Al **M.C. Jair Ernesto Díaz Ramírez**, quien fue responsable de mí en el laboratorio, le agradezco infinitamente su paciencia, el tiempo dedicado a revisar mi tesis, la disposición para resolver todas mis dudas y, sobre todo, por ser un gran mentor que me enseñó tanto académica como personalmente con generosidad y se convirtió en un ejemplo a seguir. A la **Dra. Gaby Pérez**, técnico de laboratorio, por su apoyo invaluable en la realización de la fusión transcripcional, sus consejos prácticos, y también por brindarme su amistad sincera dentro y fuera del laboratorio. Al **M.C. Omar Alejandro Aguilar Vera** y al **Dr. Rafael Díaz Méndez**, por el respaldo técnico y la colaboración que hicieron posible este trabajo.

De manera muy especial, agradezco a **Valentina Reyes**, mi pareja y mi amiga, quien caminó a mi lado durante todo este proceso, compartiendo conmigo no solo los momentos de alegría, sino también los de incertidumbre y cansancio. Su apoyo incondicional, su amistad sincera y su cariño constante fueron un refugio que me dio fuerza para seguir adelante. Gracias a su compañía y a la forma en que siempre me animó con ternura, encontré la motivación y la confianza necesarias para culminar esta etapa tan importante de mi vida. A mi amiga **Citlali Campos**, quien me acompañó a lo largo de todo el transcurso de la universidad, compartiendo conmigo cada etapa de esta experiencia. Su compañía constante, su apoyo y su amistad sincera hicieron este camino más llevadero, y gracias a ella encontré siempre motivación y alegría para seguir adelante. A mis mejores amigos **Valeria Bermeo**, **Karina Mendoza**, **Mauricio Herrera** y **Jonathan Hernández**, por ser un pilar fundamental en este camino. Con ustedes compartí risas, apoyo y momentos inolvidables que hicieron de mi estancia en Cuernavaca una etapa verdaderamente especial y bonita. Gracias por estar a mi lado no solo en los momentos buenos, sino también en los más difíciles, y por recordarme siempre que nunca estoy solo; los quiero con todo mi corazón. Finalmente, agradezco de todo corazón al **Dr. Martín Peralta Gil**, un profesor en quien encontré no solo confianza, sino también inspiración; gracias a él descubrí mi amor por la ciencia, encontré el rumbo que me trajo hasta aquí y logré terminar la carrera. Para mí, él no solo fue un guía académico, sino una persona a la que admiro mucho y quien me hizo ver el mundo de una forma diferente.

## Resumen

La indigoidina es un pigmento de interés biotecnológico cuya producción puede potenciarse mediante la manipulación de los factores de hibernación ribosomal (RHF), un proceso que regula la actividad traduccional al inactivar los ribosomas bajo condiciones de estrés. En este trabajo se evaluó la eliminación de los genes que codifican para factores de hibernación ribosomal: *raiA*, *rmf* y *hpf* en *Escherichia coli* para incrementar la capacidad traduccional y favorecer la síntesis del pigmento. La eliminación de estos genes no comprometió la viabilidad celular en ninguno de los medios evaluados. La cepa  $\Delta raiA$  fue la que obtuvo la mayor producción de indigoidina, con un incremento de la producción del 158 % respecto a la silvestre, atribuibles a la mayor proporción de ribosomas activos y al ahorro proteómico asociado. En contraste,  $\Delta hpf$  presentó los peores resultados, sugiriendo que su eliminación afecta negativamente la homeostasis ribosomal, posiblemente por efectos polares en genes adyacentes. La doble mutante  $\Delta raiA\Delta rmf$  no superó en producción a las mutantes individuales, pese a que se esperaba lo contrario al prever una mayor actividad ribosomal, lo que indica que la hibernación, aunque limita la traducción, cumple un papel protector esencial frente al estrés. El análisis temporal reveló que la producción máxima varió según el medio: en glucosa y glucosa suplementada con cas-aminoácidos, la acumulación de indigoidina disminuyó a las 24 h, mientras que en galactosa y glicerol se observaron incrementos tardíos asociados a una cinética metabólica más lenta. Además, la caracterización de los promotores de *raiA* y *rmf* evidenció que su actividad depende de la fuente de carbono, siendo el promotor de *raiA* el de mayor intensidad, lo que concuerda con la sobreproducción observada en la cepa  $\Delta raiA$ . En conjunto, estos resultados demuestran que la manipulación del sistema de hibernación ribosomal constituye una estrategia efectiva para mejorar la producción de indigoidina, al tiempo que aporta una visión más profunda del papel fisiológico de los RHF como reguladores de la traducción y guardianes de la integridad ribosomal bajo condiciones adversas.

## Abstract

Indigoidine is a pigment of biotechnological interest whose production can be enhanced through the manipulation of ribosome hibernation factors (RHF), a process that regulates translational activity by inactivating ribosomes under stress conditions. In this work, the deletion of the genes encoding ribosome hibernation factors (*raiA*, *rmf*, and *hpf*) in *Escherichia coli* was evaluated in order to increase translational capacity and promote pigment synthesis. The elimination of these genes did not compromise cell viability in any of the media tested. The  $\Delta$ *raiA* strain achieved the highest indigoidine production, with a 158% increase compared to the wild type, attributable to a higher proportion of active ribosomes and the associated proteomic savings. In contrast,  $\Delta$ *hpf* showed the poorest results, suggesting that its deletion negatively affects ribosomal homeostasis, possibly due to polar effects on adjacent genes. The double mutant  $\Delta$ *raiA* $\Delta$ *rmf* did not surpass the single mutants in production, despite expectations of greater ribosomal activity, indicating that hibernation, although it limits translation, plays an essential protective role under stress conditions. Temporal analysis revealed that maximum production varied according to the medium: in glucose and glucose supplemented with casamino acids, indigoidine accumulation decreased at 24 h, whereas in galactose and glycerol late increases were observed, associated with slower metabolic kinetics. In addition, characterization of the *raiA* and *rmf* promoters showed that their activity depends on the carbon source, with the *raiA* promoter exhibiting the highest intensity, consistent with the overproduction observed in the  $\Delta$ *raiA* strain. Altogether, these results demonstrate that manipulation of the ribosome hibernation system constitutes an effective strategy to improve indigoidine production, while also providing deeper insight into the physiological role of RHF as regulators of translation and guardians of ribosomal integrity under adverse conditions.

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b> .....	3
<i>Escherichia coli</i> como organismo modelo en biotecnología .....	3
Producción de biocompuestos.....	3
La indigoidina como metabolito de interés industrial.....	5
Producción de indigoidina en <i>E. coli</i> .....	6
Biología sintética y sus enfoques aplicados en la optimización celular .....	7
Papel de los ribosomas.....	9
Conservación del mecanismo de hibernación ribosomal entre especies .....	10
Hibernación ribosomal en <i>Escherichia coli</i> .....	11
RaiA.....	12
RMF .....	12
HPF.....	13
Expresión génica de los factores de hibernación .....	14
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	20
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	21
Plásmidos y cepas bacterianas .....	21
Construcción de plásmido reportero del promotor <i>raiA</i> .....	21
Medios de cultivo.....	23
Cinéticas de crecimiento en placa de 96 pocillos .....	23
Producción y cuantificación de indigoidina .....	25
Medición de actividad promotora .....	26
Análisis estadísticos .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
Análisis de cinéticas de crecimiento.....	28
Análisis de actividad promotora de <i>raiA</i> y <i>rmf</i> .....	32

<b>Análisis de producción de indigoidina 16 hpi</b> .....	37
<b>Análisis de producción de indigoidina 24 hpi</b> .....	44
<b>CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>REFERENCIAS</b> .....	50
<b>ÍNDICE DE IMÁGENES</b> .....	56
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	56
<b>Anexos</b> .....	57

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### ***Escherichia coli* como organismo modelo en biotecnología**

La bacteria *Escherichia coli* fue descubierta por el pediatra alemán Theodor Escherichia en 1885 y actualmente es uno de los microorganismos más estudiados (Moon et al., 2021). En la naturaleza, *E. coli* se encuentra predominantemente en el microbioma intestinal de los mamíferos, aunque también se ha encontrado en microbiomas intestinales de peces, aves, reptiles, muestras de suelo, de tierra, de alimentos, de agua y en plantas (Blount, 2015). Es una bacteria gram negativa con forma de bacilo, puede contar con flagelos o no (según la cepa), cuenta con un metabolismo tanto fermentativo como respiratorio, sus requerimientos nutricionales son mínimos, su tasa de crecimiento es rápida, su genética es estable y es fácil de manipular con las herramientas de edición genética que contamos hoy en día, por dichas razones esta bacteria se ha convertido en el organismo modelo de la biotecnología (Moon et al., 2021).

Gracias al avance científico y tecnológico que se ha desarrollado a lo largo del tiempo, se han generado grandes conjuntos de datos para *E. coli*; (transcriptómicos, proteómicos, metabolómicos y fluxómicos), además de una gran variedad de herramientas avanzadas de ingeniería genómica, modelos metabólicos y modelos regulatorios (Adamczyk & Reed, 2017). Todos estos avances nos permiten tener un gran entendimiento de esta bacteria y, por ende, facilitan modificarla para un fin en particular, por lo que ha sido ampliamente usada para la producción de compuestos de gran interés industrial.

### **Producción de biocompuestos**

Diversos productos como fármacos, saborizantes, colorantes, nutracéuticos, aditivos alimentarios, cosméticos entre otros productos, son obtenidos generalmente mediante dos vías, a partir de organismos nativos o por síntesis química, sin embargo; los rendimientos obtenidos mediante la primera vía suelen ser bajos; lo cual puede llevar a que el proceso sea insostenible, mientras que los productos obtenidos a partir de la síntesis química, por lo general implican un daño

al medio ambiente (Xu et al., 2020). Por lo que es necesario crear nuevas estrategias que sean más amigables para el medio ambiente, pero que a la vez tengan un buen rendimiento para satisfacer la demanda industrial.

Para mejorar la producción de estos compuestos muchas veces se analizan sus vías metabólicas o los genes necesarios para la síntesis de ese producto en particular, y son expresados en cepas de *E. coli*, logrando mejores rendimientos que las cepas silvestres. Un caso destacado de éxito fue la obtención de 1,4-butanodiol, un compuesto de gran relevancia industrial tradicionalmente producido por síntesis química para la fabricación de poliésteres. En este estudio, un grupo de científicos alcanzó una producción de 120 g/L, con una tasa de 3 g/L·h, empleando una cepa de *E. coli* modificada mediante la optimización de sus rutas metabólicas y la expresión de enzimas heterólogas, superando ampliamente otros sistemas que no lograban sobrepasar el 1 g/L. Estos parámetros de rendimiento se consideran adecuados para aplicaciones industriales, lo que permitió su escalamiento y la entrada al mercado comercial del producto 1,4-butanodiol (Barton et al., 2015).

También, se han logrado producir de manera eficiente biocombustibles; productos químicos como putrescina, ácido fumárico y ácido maléico; productos naturales como amorfadieno y astaxantina; diversos polihidroxicanoatos; proteínas como la proteína de seda de araña, anticuerpos, entre otros (Yang et al., 2021).

A pesar de todos los avances que hay en la ingeniería de *E. coli* y de todos los proyectos exitosos que ha habido, aún se pueden dar problemas para tener una producción óptima de diversos bioproductos. Entre los problemas más comunes se encuentra el desequilibrio en el metabolismo, reducción en la síntesis de proteínas relacionadas con el crecimiento, mal plegamiento de las proteínas heterólogas y cambios estructurales en las proteínas heterólogas, que, en consecuencia, llevan a la célula a un rendimiento inferior en términos de biomasa, productividad y viabilidad

celular (Carneiro et al., 2013). También en algunos casos, la proteína o el metabolito heterólogo puede llegar a ser tóxico para la célula hospedera (Rosano et al., 2019).

### **La indigoidina como metabolito de interés industrial**

En las últimas décadas, el campo de los colorantes naturales ha ganado un interés creciente en diversos sectores industriales y académicos gracias a sus características no tóxicas, no cancerígenas y completamente biodegradables. Dentro de las distintas fuentes de biopigmentos, las cepas bacterianas destacan por presentar un ciclo de vida corto, libre de las limitaciones estacionales propias de plantas y hongos, así como por ofrecer una sencilla manipulación y escalado en procesos de fermentación. Además, estas bacterias pueden producir una amplia gama de colores y matices, lo que las convierte en candidatas ideales para sustituir a los colorantes sintéticos de origen petroquímico. Más allá de su perfil ambiental y su elevada seguridad para el ser humano, muchos de estos pigmentos microbianos poseen importantes propiedades farmacológicas, incluyendo actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antineoplásicas, anticancerígenas y antioxidantes, lo que abre nuevas posibilidades de aplicación en ámbitos tan diversos como la cosmética, la alimentación y la industria farmacéutica (Huang et al., 2024).

Entre uno de los pigmentos más usados en la industria se encuentra la indigoidina, una difenilquinona que presenta características similares al tinte índigo, pero con ciertas ventajas como una mayor estabilidad, color más intenso e incluso actividad antioxidante y antimicrobiana lo cual le da cierto valor agregado a este compuesto (Zhao et al., 2024).

Actualmente, el teñido de prendas de mezclilla es el principal uso de la indigoidina. Se estima que de la producción total de indigoidina, alrededor del 95% se destina para el teñido de prendas de mezclilla, y su demanda ha estado aumentando a una tasa de 5.1% cada año (Baral et al., 2025). Además de esta aplicación, la indigoidina también es usada en la industria alimentaria y farmacéutica (Zhao et al., 2024). También se ha desarrollado un biosensor para la detección de

metales pesados en agua (Hui et al., 2021), un biosensor de pH (Wehrs et al., 2019), y quimiosensores basados en indigoidina como el de Fereja et al para detectar glucosa en sangre y orina (Fereja et al., 2020), además de su posible aplicación en supercondensadores y baterías (Huang et al., 2024). Es por el gran potencial que tiene la indigoidina en diversas industrias que es necesario crear una estrategia para la producción eficiente de este pigmento.

### Producción de indigoidina en *E. coli*

Para la producción de indigoidina es necesario que la célula cuente con una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS), una PPTasa y dos moléculas de glutamina (Fig. 1).

En este trabajo se usó la BpsA, la cual es una NRPS de módulo único, para la producción de indigoidina. Primero BpsA se activa cuando una PPTasa transfiere un grupo 4'-fosfopanteteína desde CoA a una serina de su PCP (Peptidyl Carrier Protein o Proteína Transportadora de Peptidilos) del dominio T, dotándolo de un "brazo" móvil. A continuación, su dominio de adenilación (A), que incorpora un subdominio de oxidación (Ox), activa y oxida dos moléculas de L-glutamina, ligándolas al PCP mediante enlaces tioéster. Una vez cargadas, el dominio de tioesterasa (TE) libera cada intermedio oxidado de 5-amino-pirimidin-diona. Finalmente, estos monómeros se dimerizan espontáneamente para dar lugar a la indigoidina (Vickery et al., 2020).

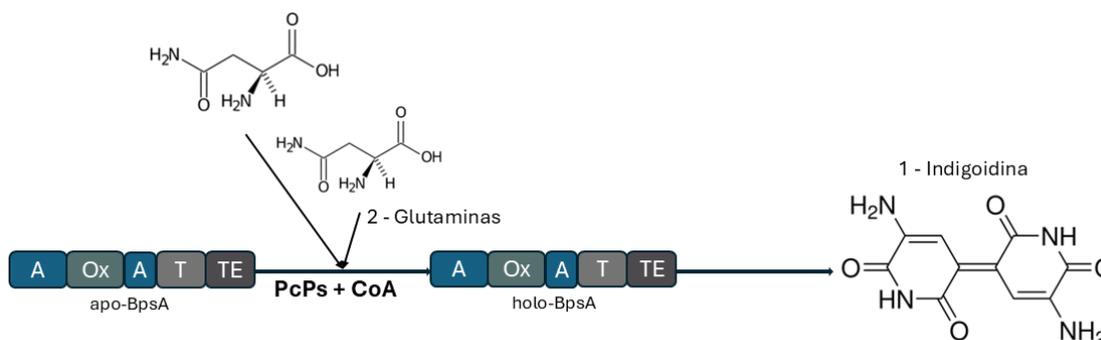


Figura 1. Producción de indigoidina a partir de dos moléculas de glutamina.

Actualmente se sigue produciendo índigo de forma sintética que indigoidina de forma biológica, teniendo un impacto negativo en el medio ambiente, ya que la producción de este pigmento a partir de microorganismos sigue siendo ineficiente (Kaplan & Seferoğlu, 2023). Por lo que es necesario desarrollar un chasis microbiano capaz de producir este pigmento de manera eficiente y de este modo generar un impacto ambiental menor.

### **Biología sintética y sus enfoques aplicados en la optimización celular**

La biología sintética surge de la necesidad de modificar diversos microorganismos de manera amplia y dirigida con el fin de optimizar características específicas, constituyendo así una herramienta poderosa y de gran valor para enfrentar algunos de los principales desafíos de la humanidad.

Esta disciplina es un campo de investigación científica en donde se aplican conocimientos de química, biología, física, informática e ingeniería para diseñar circuitos genéticos los cuales pueden ser usados de una manera controlada en diversos ámbitos como por ejemplo la industria o la terapia génica abriendo la puerta a un sinfín de oportunidades (Hanczyc, 2020).

Este nuevo campo científico se basa en el ciclo “diseño-construcción-prueba-aprendizaje” o “DBTL” por sus siglas en inglés (Design-Build-Test-Learn) en donde primero se selecciona el organismo hospedero, se diseña el experimento y la ruta para llevar a cabo el objetivo principal (Design), posteriormente se diseñan las construcciones genéticas a utilizar y se ensamblan en un solo circuito (Build) para después experimentar con ellos mediante diversas técnicas (Test) y finalmente con los resultados obtenidos se llegan a conclusiones y se mejora el circuito para una mejor eficiencia (Learn) (Kitano et al., 2023).

En biología sintética existen principalmente dos enfoques para construir o rediseñar sistemas biológicos. El primer enfoque se denomina “bottom-up” o de abajo hacia arriba, en donde se crea desde cero un sistema biológico con los

componentes básicos para que este pueda subsistir por él mismo. Este enfoque se caracteriza por tener un gran control sobre los componentes que integran el sistema biológico y por permitir el estudio de funciones aisladas, sin embargo, lograr la autonomía y la autorregulación del sistema sintético sigue siendo todo un desafío (Hirschi et al., 2022).

El segundo enfoque se denomina “Top-Down” o de arriba hacia abajo. Este enfoque busca minimizar el genoma de un organismo, principalmente quitando genes no esenciales o regiones intergénicas sin alterar la viabilidad celular. De este modo, el organismo con genoma minimizado podrá redistribuir la energía a vías heterólogas introducidas para un fin en particular (Simons, 2021). Este enfoque proporciona un chasis biológico perfecto para la producción de metabolitos secundarios y proteínas recombinantes al eliminar genes o regiones génicas, reduciendo así el coste de replicación, transcripción y traducción, además de limitar interacciones regulatorias no deseadas. Sin embargo, la eliminación de un gen o de una región génica importante para la célula puede traer grandes problemas para la célula, afectando la producción y el crecimiento celular (L. Wang & Maranas, 2018).

Una de las formas más prácticas para crear un chasis biológico para la sobreproducción de compuestos de interés es reducir el material genético de la célula, sin embargo, surge una cuestión: ¿Es mejor minimizar el genoma o el proteoma? Entendiendo a la reducción del genoma como la eliminación de secuencias genéticas que no necesariamente son codificantes (Ma et al., 2024) y la reducción del proteoma como la eliminación de aquellos genes que codifican para proteínas o péptidos (de la Cruz et al., 2020).

En un trabajo realizado por Elisa Márquez-Zavala y colaboradores, 2023, se presenta un estudio en donde comparan el ahorro de recursos (ATP) en células minimizadas por reducción del genoma y por reducción del proteoma, en donde se demostró que la eliminación del genoma no es directamente proporcional a la liberación del proteoma, por lo que eliminar genes que codifican para proteínas

parece ser la mejor forma para el ahorro de recursos. Además, también demuestran que el proceso de traducción es el proceso que más consume energía, por lo que eliminar genes codificantes para proteínas permitirá a la célula tener más energía libre para vías heterólogas (Marquez-Zavala & Utrilla, 2023).

Considerando lo anterior, nuestro equipo optó por emplear cepas de *E. coli* con deleciones individuales en cada uno de los tres principales factores de hibernación ribosomal (RaiA, RMF y HPF), así como una cepa doble mutante con la eliminación simultánea de RaiA y RMF. Estas variantes representan cepas en las cuales, la ausencia de los factores de hibernación ribosomal podría favorecer una mayor producción de indigoidina.

### **Papel de los ribosomas**

Los ribosomas son las máquinas moleculares de la síntesis de proteínas, estos interactúan con el ARNm y otros factores de transcripción para poder pasar de una secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos los cuales se irán plegando entre sí para finalmente dar lugar a una proteína funcional (d'Aquino et al., 2018).

Estas fábricas de proteínas en su forma activa están conformadas por dos subunidades, en procariontes, la subunidad pequeña 30S y la subunidad grande 50S. La subunidad 30S está conformada por un ARN ribosomal (ARNr 16S) y alrededor de 20 proteínas ribosomales. Por otro lado, la subunidad 50S está conformada por dos ARN ribosomales (ARNr 23S y ARNr 5S) y alrededor de 30 proteínas ribosomales (Prossliner et al., 2018).

En condiciones favorables, estas dos subunidades pueden interactuar entre sí, junto con el ARNm, permitiendo la síntesis de proteínas, la cual consta de 4 etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas. En la primera etapa (iniciación) la subunidad 30S se une al ARNm mediante la secuencia Shine-Dalgarno, un ARNt cargado reconoce y se une al codón de inicio y posteriormente

la subunidad 50S se ensambla junto con factores de iniciación (IF1, IF2 e IF3) formando un ribosoma funcional 70S. En la segunda etapa (elongación) el ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm añadiendo más aminoácidos a la cadena peptídica que se va formando. En la tercera etapa (terminación) el ribosoma reconoce un codón de paro (UAA, UAG o UGA) y libera la cadena peptídica por la acción de factores de liberación como RF1 y RF2 (Usachev et al., 2020). Finalmente, en la última etapa, el ribosoma se disocia en sus dos subunidades principales para poder empezar con el proceso de nuevo, por la acción de factores de liberación como RF3 y RRF (Korostelev, 2021).

### **Conservación del mecanismo de hibernación ribosomal entre especies**

La hibernación ribosomal es un mecanismo de supervivencia observado en varias formas de vida. Durante tiempos de estrés o falta de nutrientes, los organismos emplean esta estrategia para reducir la síntesis de proteína temporalmente y así ahorrar recursos celulares. Cuando las condiciones mejoran, la síntesis de proteínas vuelve a su estado normal (Zegarra et al., 2023).

Este mecanismo no es exclusivo de las gammaproteobacterias como *E. coli*, también se ha observado en betaproteobacterias, e incluso en plantas. El principio del mecanismo es el mismo, bajo estrés o limitaciones de nutrientes, los factores de hibernación ribosomal se expresan y llevan a la célula a un estado de hibernación.

En el caso de las gammaproteobacterias y betaproteobacterias la inanición es causada por la falta de fuentes de carbono, lo que hace que ppGpp se acumule en la célula, expresando de este modo los factores de hibernación ribosomal y por ende parando la síntesis de proteínas. En el caso de las cianobacterias fotosintéticas y en los cloroplastos de plantas la inanición es provocada por el ciclo circadiano y la regulación redox de las células, en donde en la fase oscura, debido a la poca captación de energía por falta de luz, las células entran en un estado de hibernación (Trösch & Willmund, 2019).

## Hibernación ribosomal en *Escherichia coli*

Ante condiciones de estrés, ambientes desfavorables o durante la fase estacionaria, los ribosomas bacterianos entran en un estado inactivo conocido como hibernación ribosomal. En este proceso, los ribosomas pueden formar complejos 100S (dímeros de ribosomas 70S) (Fig. 2B) o adoptar conformaciones inactivas de 70S (Fig. 2A), perdiendo temporalmente la capacidad de traducir ARNm (Prossliner et al., 2018). La principal función de la hibernación es detener transitoriamente la síntesis de proteínas para preservar la maquinaria celular y ahorrar energía, ya que los ribosomas en este estado son menos propensos a la degradación y no requieren ser sintetizados de nuevo. Una vez que las condiciones mejoran, pueden reactivarse rápidamente y reanudar la traducción (Usachev et al., 2020; T. Wang et al., 2020).

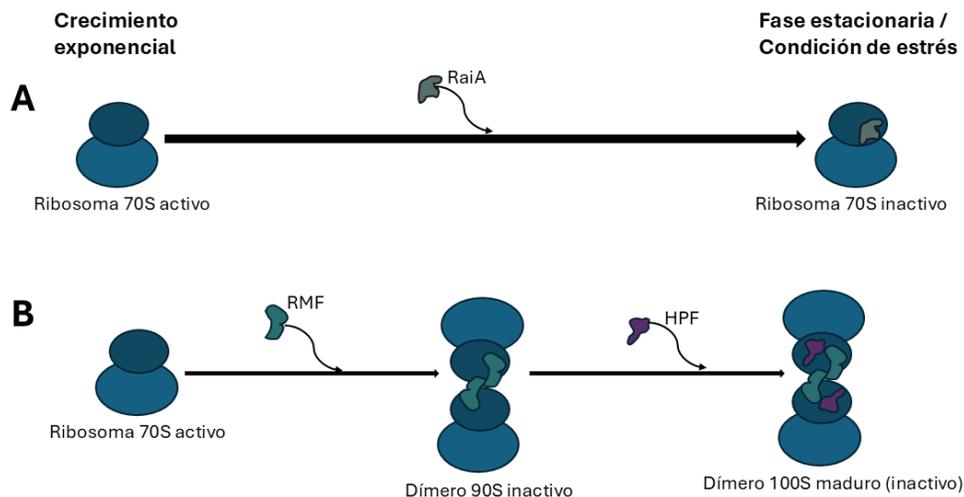


Figura 2. Formas de hibernación ribosomal en *E. coli*. Adaptado de: "Ribosome Hibernation" (2018).

Los factores de hibernación ribosomal (HRFs) son proteínas pequeñas que van desde los 55 hasta los 113 aminoácidos, y actúan interactuando con las subunidades 30S y 50S del ribosoma para frenar la síntesis de proteínas. Esto lo logran ya sea bloqueando directamente la traducción del ARNm o promoviendo la formación de dímeros de ribosomas completamente inactivos. En *E. coli*, los tres factores de hibernación más representativos son RaiA, RMF y HPF, que participan en distintos mecanismos de inactivación y estabilización ribosomal.

## **RaiA**

La proteína inhibidora asociada al ribosoma RaiA (también llamada Py o YfiA) es una proteína de 113 aminoácidos y 12.785 Da (Agafonov et al., 1999), cuya expresión se induce bajo condiciones de estrés como bajas temperaturas o en la fase estacionaria, aunque también puede encontrarse en fase exponencial a bajos niveles (Lang et al., 2021). Una vez que las condiciones vuelven a ser favorables, RaiA se disocia de los ribosomas, permitiendo reanudar el crecimiento celular (Agafonov et al., 2001).

RaiA se une específicamente a la subunidad 30S, pero interactúa también con la subunidad 50S para estabilizar el complejo ribosomal, previniendo su disociación. En un estudio se observó que, con una proporción de 3:1 (RaiA:ribosomas), más del 50% de los ribosomas permanecían en la conformación 70S, en condiciones en las que normalmente se disociarían en ausencia de RaiA (Agafonov et al., 1999).

Estructuralmente, RaiA presenta un dominio globular N-terminal con topología  $\beta\alpha\beta\beta\alpha$  y una cola C-terminal flexible (Ye et al., 2002). Mediante cristalografía se demostró que RaiA bloquea la traducción al ocupar el canal de la subunidad 30S, interactuando con los sitios A y P, lo que impide tanto la elongación del ARNm como la entrada de ARNt en el sitio A (Vila-Sanjurjo et al., 2004). Esta acción protege al ribosoma contra antibióticos y contra la degradación.

Cabe destacar que RaiA presenta homología con HPF: ambos comparten la topología  $\beta\text{-}\alpha\text{-}\beta\text{-}\beta\text{-}\alpha$ , y el dominio N-terminal de RaiA se une en el mismo sitio que HPF, mientras que su cola C-terminal bloquea el sitio de unión de RMF. Esto genera competencia entre mecanismos de hibernación, pues la unión de RaiA puede interferir con la dimerización promovida por RMF y HPF (Franken et al., 2017).

## **RMF**

El factor de modulación del ribosoma (RMF) es una proteína de solo 55 aminoácidos que participa en la formación de los complejos 100S, al promover la

dimerización de ribosomas 70S (Maki & Yoshida, 2021). Además de inducir hibernación, se ha demostrado que es crucial para la supervivencia celular bajo estrés térmico, ácido u osmótico, ya que protege al ARNr de la degradación y puede bloquear el sitio de unión de ciertos antibióticos (Maki & Yoshida, 2021; Yoshida & Wada, 2014).

A nivel molecular, RMF inhibe la traducción al unirse directamente a la secuencia anti-Shine-Dalgarno (antiSD) del ribosoma, impidiendo que esta se empareje con la secuencia Shine-Dalgarno del ARNm (Prossliner et al., 2021).

Estructuralmente, RMF está formada por dos hélices  $\alpha$  conectadas por una cadena de 13 aminoácidos. Estudios de crio-EM mostraron que se une a la subunidad 30S en un hueco delimitado por las proteínas ribosomales S2, S7 y S21, y por las hélices h28, h37 y h40 del ARNr 16S. Su unión genera un cambio conformacional en la proteína ribosómica S1, que adopta una conformación compacta. Esto facilita que dos ribosomas 70S se asocien transitoriamente en complejos 90S inactivos, los cuales son posteriormente estabilizados por HPF para formar ribosomas 100S (Beckert et al., 2018; Prossliner et al., 2018).

### **HPF**

El factor promotor de la hibernación (HPF) es una proteína de 95 aminoácidos, esencial para la formación de los dímeros ribosomales 100S (Prossliner et al., 2018). Sus homólogos se encuentran no solo en bacterias, sino también en plantas (Franklin et al., 2020; Matzov et al., 2019), lo que sugiere un papel evolutivamente conservado.

Además de promover la dimerización, HPF protege a los ribosomas de la degradación por ribonucleasas (Maki & Yoshida, 2021; Theng et al., 2020). Estructuralmente, comparte con RaiA la topología  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ , en la cual dos hélices  $\alpha$  paralelas se encuentran próximas a una hoja  $\beta$  de cuatro cadenas (Prossliner et al., 2018).

HPF se une a la región funcional central del ribosoma, ocupando simultáneamente los sitios A y P de la subunidad 30S, lo que interfiere con factores esenciales de iniciación y elongación como IF1, IF3 y EF-G. Además, interactúa directamente con el lazo del tallo anticodón de un ARNt desacilado en el sitio E, estabilizándolo. De esta manera, HPF bloquea múltiples funciones clave y promueve la formación de ribosomas 100S inactivos, que se han observado vacíos de ARNm pero con un ARNt desacilado en el sitio E (Beckert et al., 2018; Prossliner et al., 2018).

En conjunto, RaiA, RMF y HPF actúan de manera complementaria para preservar la integridad ribosomal en condiciones de estrés. Mientras RaiA estabiliza ribosomas 70S individuales y bloquea la traducción directamente, RMF y HPF coordinan la formación de complejos 100S mediante cambios conformacionales en las proteínas ribosomales S1 y S2, que inactivan la entrada de ARNm y estabilizan interacciones entre ribosomas. Estos mecanismos permiten a *E. coli* mantener ribosomas en reserva, protegerlos de la degradación y reactivar la síntesis proteica de manera eficiente una vez que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables (Feaga et al., 2020; Maki & Yoshida, 2021; Prossliner et al., 2018).

### **Expresión génica de los factores de hibernación**

Se ha demostrado que los genes *raiA*, *hpf* y *rmf*, que codifican los principales factores de hibernación ribosomal, están regulados por la molécula señalizadora ppGpp (guanosina tetrafosfato), un nucleótido de alarma clave en la fisiología bacteriana. Esta molécula es fundamental para la activación de la respuesta estricta, un mecanismo adaptativo que permite a las bacterias responder rápidamente a condiciones adversas del entorno, como la depleción de nutrientes, el estrés oxidativo, cambios en el pH, entre otros (Feid, 2023; Prossliner et al., 2018). Así mismo, se demostró que la expresión de proteínas heterólogas también puede activar la respuesta estricta, activando los factores de hibernación ribosomal (Díaz-Ramírez et al., 2025) (Fig. 3).

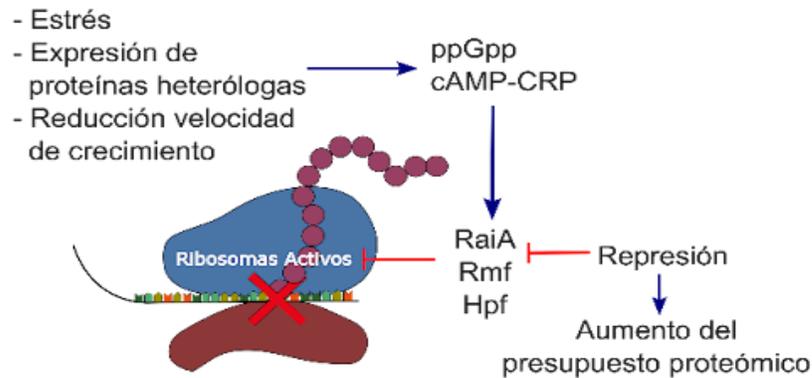


Figura 3. Inactivación ribosomal mediada por los factores de hibernación ribosomal en *E. coli*. Extraído de: "Disruption of ribosomal hibernation increases translational capacity in diverse microbial hosts" (2025).

Durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, o en situaciones donde la célula experimenta un desequilibrio metabólico, disminuye la disponibilidad de aminoácidos, lo que provoca la acumulación de ARNt no cargados (sin su correspondiente aminoácido) en el citoplasma. Estos ARNt se asocian con el ribosoma en el sitio A, lo que actúa como señal para reclutar a la enzima RelA, una sintetasa asociada a la subunidad ribosomal grande. RelA cataliza la síntesis de ppGpp o pppGpp a partir de GDP o GTP, respectivamente, en un proceso dependiente de ATP (Maki & Yoshida, 2021; Urwin et al., 2024).

Además de RelA, otra enzima crítica en este proceso es SpoT, que también puede sintetizar ppGpp, pero cuya principal función es su hidrolización. A diferencia de RelA, que responde principalmente a la escasez de aminoácidos, SpoT se activa ante otros tipos de estrés metabólico, como la limitación de ácidos grasos, fosfatos, carbono o hierro, y es responsable de mantener un equilibrio dinámico entre los niveles de ppGpp mediante su capacidad bifuncional: tanto sintasa como hidrolasa. De esta manera, SpoT actúa como un regulador fino de la concentración intracelular de ppGpp, permitiendo que la célula ajuste su fisiología en función del tipo y duración del estrés (Feid, 2023; Urwin et al., 2024).

Una vez sintetizada, ppGpp actúa como un regulador maestro que reprograma globalmente la expresión génica. Su acción incluye la represión de genes

involucrados en la biosíntesis de ribosomas (como los genes de ARN ribosómico y ribosomal), la inhibición de la replicación del ADN y la activación de genes relacionados con la supervivencia, el metabolismo alternativo y la respuesta al estrés. Entre estos genes activados se encuentran *raiA*, *hpf* y *rmf* (Irving et al., 2021; Prossliner et al., 2018, 2021).

Además de ppGpp que es capaz de inducir la expresión de estos tres factores de hibernación ribosomal, se han detectado otros factores que los pueden inducir. En el caso de *raiA*, su promotor está bajo control de CRP-cAMP, ZraR, Cra y Cpx (Prossliner et al., 2018, 2021). El promotor de *rmf* también está controlado por CRP-cAMP, sin embargo, su expresión cambia dependiendo del estrés en el que se encuentre la célula y se ha observado que el nivel de poliaminas también afecta su nivel de expresión y por lo regular el nivel de expresión de *rmf* es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento de la célula (Khaova & Tkachenko, 2024). También se han encontrado diversos factores de transcripción que pueden activar el promotor de *rmf*, tal es el caso de McbR, RcdA, SdiA, SlyA y Fur (Maki & Yoshida, 2021; Yoshida et al., 2018). Por último, el promotor de *hpf* parece ser inducido por AI-2 o auto-inductor 2 el cual está relacionado con el quorum sensing y la formación de biopelículas (Prossliner et al., 2018, 2021).

## JUSTIFICACIÓN

La producción microbiana de compuestos de alto valor agregado, como pigmentos y metabolitos secundarios, ha adquirido creciente relevancia como alternativa sostenible frente a la síntesis química convencional, la cual suele implicar procesos costosos y ambientalmente contaminantes. En este contexto, la indigoidina se ha consolidado como un biopigmento de notable interés debido a su intensidad de color, estabilidad y propiedades antioxidantes y antimicrobianas, características que la posicionan como un recurso versátil con aplicaciones en la industria textil, alimentaria, farmacéutica y cosmética. Además, su uso representa una alternativa a los colorantes y compuestos derivados del petróleo, contribuyendo a procesos más limpios y compatibles con los estándares de sostenibilidad.

A pesar de su potencial, la obtención de indigoidina en niveles productivos industrialmente viables sigue siendo un desafío. Esto subraya la necesidad de implementar estrategias de biología sintética e ingeniería metabólica que permitan optimizar la capacidad biosintética de los sistemas microbianos. La producción en bacterias resulta particularmente ventajosa, pues permite un control preciso de las condiciones de cultivo, facilita la escalabilidad del proceso y reduce riesgos ambientales asociados a la síntesis química.

La presente investigación se inscribe en este esfuerzo al proponer la manipulación de factores de hibernación ribosomal en *Escherichia coli* como un enfoque para potenciar la producción de indigoidina. A diferencia de enfoques tradicionales centrados en modificar rutas metabólicas específicas, este planteamiento busca intervenir en un nivel fundamental de la biología celular: la regulación de la actividad ribosomal. Con ello se pretende establecer una estrategia innovadora de biología sintética orientada a mantener una mayor capacidad traduccional y redirigir recursos hacia la síntesis del pigmento.

De este modo, el trabajo no solo propone un marco alternativo para incrementar la biosíntesis de indigoidina, sino que contribuye al diseño de chasis bacterianos más eficientes en la producción de metabolitos secundarios de interés industrial. En consecuencia, los resultados de esta investigación pueden trascender el caso particular de la indigoidina, aportando conocimiento aplicable al desarrollo de procesos biotecnológicos sostenibles y con potencial de impacto en sectores estratégicos como el textil, alimentario y farmacéutico.

## **HIPÓTESIS**

Las cepas de *Escherichia coli* con eliminaciones en genes de factores de hibernación ribosomal presentarán mayor capacidad para la producción de indigoidina bajo distintas condiciones de crecimiento.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el impacto de las eliminaciones de los genes de los factores de hibernación ribosomal sobre el crecimiento y la producción de indigoidina en *E. coli* BW25113 en distintos medios de crecimiento, además de evaluar la dinámica de expresión de los genes *raiA* y *rmf*.

### Objetivos específicos

Evaluación del efecto de la eliminación de los genes que codifican para los factores de hibernación ribosomal en el crecimiento.

Evaluación de la dinámica de expresión de los factores de hibernación ribosomal *rmf* y *raiA* bajo distintos medios de cultivo.

Evaluación de la producción de indigoidina bajo distintos medios de cultivo.

## MATERIALES Y METODOS

### Plásmidos y cepas bacterianas

El plásmido pSAY-IPTG-Indigoidine (Diaz-Ramirez et al., 2025) se usó para la producción de indigoidina. Cuenta con los genes necesarios para convertir dos moléculas de glutamina en una de indigoidina y es inducible por Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, el plásmido cuenta con un origen de replicación de alto número de copias y el gen de resistencia a gentamicina.

El plásmido pUA66 se usó para realizar las fusiones transcripcionales de los promotores de *raiA* y *rmf* (Zaslaver et al., 2006). Este plásmido cuenta con una proteína verde fluorescente (GFP) como reportero, es de bajo número de copias y contiene el gen de resistencia a kanamicina. El producto de la fusión transcripcional se denomina pUA66-*praiA* (para el plásmido que contiene el promotor del gen *raiA* fusionado con GFP en el plásmido pUA66) y pUA66-*prmf* (para el plásmido que contiene el promotor del gen *rmf* fusionado a GFP en el plásmido pUA66).

Las cepas de *E. coli* usadas en este trabajo fueron la BW25113 (la cual se usó como cepa silvestre) y 3 de las mutantes de la colección de Keio las cuales tienen una eliminación única para cada factor de hibernación ribosomal de *E. coli* ( $\Delta$ *raiA*,  $\Delta$ *rmf*,  $\Delta$ *hpf*) (Baba et al., 2006). Estas cepas en lugar de tener el gen que codifica para el respectivo factor de hibernación ribosomal cuentan con un gen de resistencia a kanamicina. Además, también se trabajó con una doble mutante la cual se construyó durante este trabajo ( $\Delta$ *raiA* $\Delta$ *rmf*). Esta última cepa no cuenta con resistencia a antibióticos.

### Construcción de plásmido reportero del promotor *raiA*

Debido a que la colección de promotores no incluía la fusión transcripcional correspondiente al promotor de *raiA*, esta construcción se realizó siguiendo el

protocolo descrito por Zaslaver et al. (2006). Se utilizó el plásmido pUA66 como vector base, ya que corresponde al mismo empleado en la colección original de promotores. El plásmido portador de la fusión transcripcional incluyó la región promotora de *raiA*, una proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero, un cassette de resistencia a kanamicina y un origen de replicación de bajo número de copias (Fig. 4).

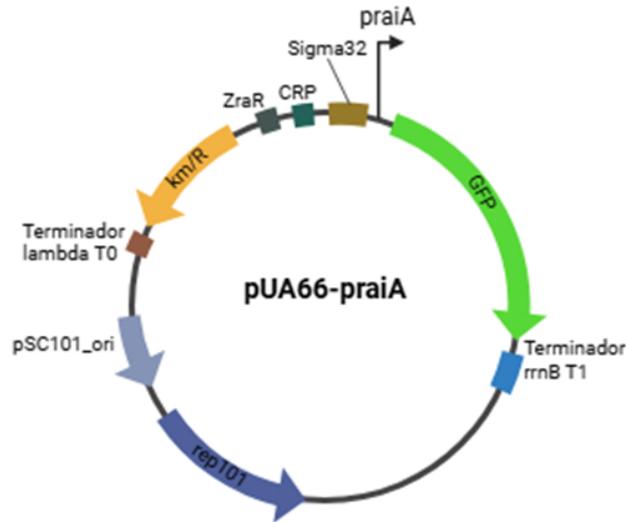


Figura 4. Estructura del plásmido pUA66-praiA.

La región promotora se delimitó considerando los sitios de unión reportados para los reguladores de *raiA* (sigma 32, CRP y ZraR). A partir del ADN genómico de la cepa BW25113 se diseñaron oligonucleótidos que flanqueaban dicha región:

Forward: 5'-gagggcccttctgtcttcaccTGTGAAACTGAAGCGATTTAGTC-3'

Reverse: 5'-tctccttcttaaattctagagAACCCAGAACGCCGTTAGG-3'.

En ambos oligonucleótidos, las bases en mayúsculas corresponden a la región promotora de *raiA*, mientras que las bases en minúsculas representan colas diseñadas para el ensamblaje Gibson en los sitios de restricción XbaI y BglIII del vector pUA66.

La amplificación de la región promotora se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos anteriores. El producto de PCR fue tratado con la enzima DpnI para eliminar ADN genómico residual. En paralelo, el plásmido pUA66 fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y BglII. El ensamblaje de los fragmentos se llevó a cabo mediante Gibson Assembly.

Las construcciones recombinantes se seleccionaron en medio suplementado con kanamicina. La verificación de la inserción se realizó mediante observación de fluorescencia en un fotodocumentador y posterior secuenciación de la región insertada, a fin de descartar mutaciones que afectaran la expresión de GFP.

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo que se probaron fueron los siguientes: Medio mínimo M9 con glucosa 4 g/L, medio mínimo M9 con galactosa 4 g/L, medio mínimo M9 con glicerol 4 g/L, medio mínimo M9 con glucosa 4 g/L adicionado con 0.45 M de NaCl<sub>2</sub>, medio mínimo M9 con glucosa 4 g/L adicionado con 0.6 M de NaCl<sub>2</sub>, medio mínimo M9 con glucosa 4 g/L adicionado con 0.2% de cas aminoácidos. La composición del medio mínimo M9 fue 33.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.55 mM NaCl, 9.35 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, (J.T.Baker) suplementado con nutrientes traza (13.4 μM EDTA, 3.1 μM FeCl<sub>3</sub>, 0.62 μM ZnCl<sub>2</sub>, 76 nM CuCl<sub>2</sub>, 42 nM CoCl<sub>2</sub>, 162 nM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 8.1 nM MnCl<sub>2</sub>, J.T. Baker).

### **Cinéticas de crecimiento en placa de 96 pocillos**

Todas las cepas fueron recuperadas de criopreservados, tomando 10 μl y estriando en placas Petri en medio LB con agar adicionadas con kanamicina (50 μg/ml) para el caso de las mutantes simples. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Una vez recuperadas las cepas, se seleccionó una colonia individual de cada una para preparar el preinóculo. Cada colonia se inoculó en 3 mL del medio a

evaluar, suplementado con kanamicina en el caso de las mutantes simples y se incubaron a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, se midió la densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de cada preinóculo utilizando un espectrofotómetro (BioSpectrometer, Eppendorf). Las muestras fueron diluidas 1:10 para evitar saturación. Se utilizó como blanco el mismo medio de cultivo de la muestra a medir. El valor real de  $OD_{600}$  se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución. El cultivo se normalizó a una  $OD_{600}$  de 0.05. En microtubos se añadió medio fresco a evaluar y el preinóculo de cada cepa en base a los cálculos obtenidos anteriormente y en el caso de las mutantes simples se añadió kanamicina. En una placa de 96 pocillos se añadieron 150  $\mu$ l de cada tubo, dando lugar a 3 réplicas técnicas por cada cepa. La placa se cubrió con film y se le realizaron pequeños orificios en cada pocillo para permitir el intercambio de oxígeno. Una vez la placa cargada y con el film, esta se colocó en el lector de microplacas BioTek ELx808, operado mediante el software Gen5 versión 3.05.

El experimento fue programado para monitorear el crecimiento bacteriano a 37 °C, con agitación orbital constante y lecturas de densidad óptica ( $OD_{600}$ ) cada 20 minutos, durante un periodo total de 48 horas. Finalizada la lectura, los datos fueron exportados en formato de texto (.txt) para su posterior análisis.

Esto se realizó 3 veces para obtener 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas para cada una de las cepas en cada uno de los medios a analizar.

**NOTA:** En el caso de la evaluación de crecimiento en medios adicionados con NaCl2 y Cas aminoácidos, los pre-inóculos fueron cultivados en el medio base (M9 con glucosa) y para el llenado de la placa se usó el medio con las concentraciones correspondientes de NaCl2 y Cas aminoácidos.

## **Producción y cuantificación de indigoidina**

Todas las cepas transformadas con el plásmido pSAY-IPTG-Indigoidine fueron recuperadas de criopreservados, tomando 10  $\mu$ l y estriándolas en placas Petri en medio LB con agar adicionadas con gentamicina (50  $\mu$ g/ml). Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Una vez recuperadas las cepas, se seleccionó una colonia individual de cada una para preparar el preinóculo. Cada colonia se inoculó en 5mL del medio a evaluar, suplementado con gentamicina y se incubaron a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, se midió la densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de cada preinóculo utilizando un espectrofotómetro (BioSpectrometer, Eppendorf). Las muestras fueron diluidas 1:10 para evitar saturación. Se utilizó como blanco el mismo medio de cultivo de la muestra a medir. El valor real de OD se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución. Una vez obtenidas la OD de cada cultivo se hicieron los cálculos para normalizar 50 ml de medio a una OD de 0.1. En matraces estériles de 250 ml se añadieron 50 ml de medio fresco a evaluar con gentamicina, se agregó la cantidad de preinóculo calculada anteriormente para una OD de 0.1 y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.5  $\pm$  0.1. Al alcanzar la OD, se realizó la inducción con IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se volvieron a incubar, pero ahora a 30°C para evitar la degradación de la indigoidina. Las cuantificaciones se realizaron a 16 y 24 horas post inducción (hpi).

Para las cuantificaciones se tomaron tres alícuotas de 1 ml para cada cepa, se centrifugaron a 14,000 G por 2.5 minutos para precipitar las células. Se tomaron 100  $\mu$ l del sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 pocillos (por triplicado). Una vez cargada la placa con las muestras se midió la absorbancia a 600 nm de cada pocillo en un equipo Synergy H1 de BioTek. Finalizada la lectura, los datos fueron exportados en formato de texto (.txt) para su posterior análisis.

Esto se realizó 3 veces para obtener 3 réplicas biológicas con sus 9 réplicas técnicas, esto para cada una de las cepas y en cada uno de los medios.

**NOTA:** En el caso de la producción de indigoidina en medios adicionados con NaCl<sub>2</sub> y Cas aminoácidos, los pre-inóculos fueron cultivados en el medio base (M9 con glucosa) y para la producción en matraz se usó el medio con las concentraciones correspondientes de NaCl<sub>2</sub> y Cas aminoácidos.

### **Medición de actividad promotora**

La cepa BW25113 transformada con el plásmido pUA66-*praiA* y pUA66-*prmf* fueron recuperadas de criopreservados, tomando 10 µl y estriando en placas Petri en medio LB con agar adicionadas con kanamicina (50 µg/ml). Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Una vez recuperadas las cepas, se seleccionó una colonia individual de cada una para preparar el preinóculo. Cada colonia se inoculó en 3 mL del medio a evaluar, suplementado con kanamicina y se incubaron a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, se midió la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de cada preinóculo utilizando un espectrofotómetro (BioSpectrometer, Eppendorf). Las muestras fueron diluidas 1:10 para evitar saturación. Se utilizó como blanco el mismo medio de cultivo de la muestra a medir. El valor real de OD se obtuvo multiplicando la lectura por el factor de dilución. Una vez obtenidas la OD de cada cultivo se hicieron los cálculos para normalizar 500 µl de medio a una OD de 0.05. En tubos eppendorf se añadió medio fresco a evaluar y el preinóculo de cada cepa en base a los cálculos obtenidos anteriormente y se añadió kanamicina. En una placa de 96 pocillos con bordes negros se añadieron 150 µl de cada tubo, dando lugar a 3 réplicas técnicas por cada cepa. La placa se cubrió con film y se le realizaron pequeños orificios en cada pocillo para permitir el intercambio de oxígeno. Una vez la placa cargada y con el film, esta se colocó en el lector de microplacas Synergy H1 (BioTek), operado mediante el software Gen5 versión 3.05.

El experimento fue programado para monitorear el crecimiento bacteriano a 37 °C, con agitación orbital constante y lecturas de densidad óptica ( $OD_{600}$ ) cada 20 minutos, durante un periodo total de 48 horas. Además de tomar lecturas de fluorescencia a una excitación de 479 nm y una emisión de 520 nm. Finalizada la lectura, los datos fueron exportados en formato de texto (.txt) para su posterior análisis.

Esto se realizó 3 veces para obtener 3 réplicas biológicas con sus 3 réplicas técnicas, esto para cada una de las dos cepas y para cada medio.

**NOTA:** En el caso de la evaluación de la actividad promotora en medios adicionados con  $NaCl_2$  y Cas aminoácidos, los pre-inóculos fueron cultivados en el medio base (M9 con glucosa) y para el llenado de la placa se usó el medio con las concentraciones correspondientes de  $NaCl_2$  y Cas aminoácidos.

### **Análisis estadísticos**

Todos los resultados fueron analizados en Python versión 3.10 usando las librerías numpy versión 1.24.1 y scipy versión 1.10.0. Se realizó una prueba T Student en todos los casos para discernir entre los resultados. Valores “p”:  $p < 0.01$  (\*\*\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.05$  (\*).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de cinéticas de crecimiento

Se analizaron las cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes para identificar posibles fenotipos que afectaran su desarrollo en comparación con la cepa silvestre. Para ello, se realizaron ensayos en microplacas de 96 pocillos utilizando los distintos medios definidos en los que posteriormente se evaluaría la producción del pigmento.

En el medio M9 con glucosa a 4 g/L la cepa BW25113 mostró tener la mayor tasa de crecimiento y una OD máxima ligeramente superior a las demás cepas, a excepción de  $\Delta raiA\Delta rmf$ , donde no se observó diferencia significativa (Tabla 1). Las cepas  $\Delta hpf$  y  $\Delta rmf$  a pesar de que sus velocidades de crecimiento fueron estadísticamente diferentes en comparación a la BW25113, fueron bastante similares, con una reducción tan solo del 2.69 y 2.55% respectivamente, mientras que en el caso de OD máxima se notó una reducción considerable del 14.51% para  $\Delta hpf$  mientras que para  $\Delta rmf$  solo hubo una disminución del 1.06% (Tabla 1). Para la cepa  $\Delta raiA\Delta rmf$  no hubo diferencia significativa y, en el caso de  $\Delta raiA$ , se observó una velocidad de crecimiento reducida en un 20.15%; sin embargo, su OD máxima solo se redujo en un 4.87% en comparación con la cepa silvestre (Tabla 1).

Para el medio M9 con glucosa a 4 g/L adicionado con NaCl a una concentración final de 0.45M, para generar estrés osmótico, se observó una reducción de la tasa de crecimiento para todas las cepas, sin embargo, la OD máxima de todas las cepas aumentó considerablemente a comparación del medio en glucosa. La cepa  $\Delta raiA$ , a pesar de haber mostrado una velocidad de crecimiento menor a todas las demás, obtuvo una OD máxima superior al resto de cepas; no obstante, en las curvas de crecimiento podemos notar un aumento en la duración de la fase lag (Fig 1 ANEXOS). Por otro lado, la cepa  $\Delta raiA\Delta rmf$  fue la que obtuvo la tasa de crecimiento más alta, sin embargo, también fue la que obtuvo la OD máxima más baja. Las cepas  $\Delta hpf$  y  $\Delta raiA\Delta rmf$  no mostraron diferencias significativas en sus respectivas tasas de crecimiento comparándolas con la cepa silvestre, mientras que  $\Delta raiA$  y  $\Delta rmf$  si la tuvieron, mostrando una tasa menor a la silvestre, con una reducción del

5.49 y 8.81% respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, en OD máxima las cepas *ΔraiA* y *Δhpf* tuvieron un aumento del 8.41 y 3.06% respectivamente, en comparación con la silvestre, mientras que *Δrmf* no mostró diferencia (Tabla 1).

Para el medio M9 con glucosa 4 g/L adicionado con 0.6M de NaCl se observó el mismo patrón que se ha observado previamente, a tasas de crecimiento más bajas, mayor es la OD máxima alcanzada, teniendo a *ΔraiA* con la menor tasa de crecimiento, pero con la mayor OD alcanzada. Al contrario de lo que se podría pensar, las tasas de crecimiento no bajaron en ninguna de las cepas en comparación con el medio con 0.45M de NaCl. La cepa silvestre, *Δrmf* y *ΔraiAΔrmf* mostraron un aumento en la tasa de crecimiento, siendo la *ΔraiAΔrmf* la cepa con la mayor tasa de crecimiento alcanzando los 0.82 h<sup>-1</sup>, superando a la silvestre en un 68.98% (Tabla 1), lo cual le podría dar cierta ventaja en la industria, ya que el estrés osmótico es uno de los principales factores que puede afectar la producción a escala industrial. Estos resultados sugieren que la cepa *ΔraiAΔrmf* está usando un mecanismo diferente a las demás cepas lo cual le permite crecer muy bien bajo una concentración relativamente alta de sal.

En el medio M9 con glucosa suplementado con 0.2% de casaminoácidos, se obtuvo un crecimiento robusto en todas las cepas. La cepa silvestre presentó la tasa de crecimiento más alta de este medio, mientras que la cepa *ΔraiA* mostró la tasa de crecimiento más baja, con una reducción del 34.5% en comparación con BW25113 (Tabla 1). No obstante, es interesante destacar que *ΔraiA* alcanzó la mayor OD máxima, lo que sugiere que, a pesar de su crecimiento lento, esta cepa puede acumular mayor biomasa o beneficiarse mejor del enriquecimiento de aminoácidos, lo cual podría relacionarse con un ajuste en el metabolismo proteico.

En el medio M9 con galactosa 4 g/L la cepa con la tasa de crecimiento más baja fue la BW25113, *ΔraiA* obtuvo la más alta, con un aumento del 59.22% (Tabla 1). Las demás cepas obtuvieron tasas similares entre ellas e incluso mejores que la silvestre. En el caso de ODMax, la cepa *ΔraiA* es la que tuvo la OD más baja

mientras que la  $\Delta hpf$  obtuvo la más alta y la  $\Delta rmf$  no tuvo diferencia significativa en comparación a la silvestre (Tabla 1).

En el caso del medio M9 con glicerol 4 g/L la cepa silvestre fue la que presentó una tasa de crecimiento inferior a las demás, así mismo, fue la que obtuvo una OD máxima menor. Las cepas  $\Delta raiA$ ,  $\Delta hpf$  y  $\Delta rmf$  tuvieron una tasa de crecimiento similar entre ellas, siendo la cepa  $\Delta rmf$  la que obtuvo la OD máxima mayor con un aumento del 39.21% con respecto a la silvestre (Tabla 1).

Tabla 1. Datos cinéticos.

Medio	Cepa	$\mu$	Dif_ $\mu$ %	ODmax	Dif_OD%	Sig_ $\mu$	Sig_OD
Glucosa	BW25113	0.622032	NA	0.63432	NA	-	-
Glucosa	$\Delta raiA$	0.496681	-20.15	0.603439	-4.87	***	***
Glucosa	$\Delta hpf$	0.605283	-2.69	0.542258	-14.51	*	***
Glucosa	$\Delta rmf$	0.606169	-2.55	0.62761	-1.06	*	*
Glucosa	$\Delta rmf\Delta raiA$	0.627062	0.81	0.637221	0.46	N/S	N/S
Glucosa+0.45M NaCl	BW25113	0.459211	NA	0.880944	NA	-	-
Glucosa+0.45M NaCl	$\Delta raiA$	0.434009	-5.49	0.955046	8.41	*	***
Glucosa+0.45M NaCl	$\Delta hpf$	0.466767	1.65	0.907862	3.06	N/S	***
Glucosa+0.45M NaCl	$\Delta rmf$	0.418753	-8.81	0.888936	0.91	***	N/S
Glucosa+0.45M NaCl	$\Delta rmf\Delta raiA$	0.471204	2.61	0.836292	-5.07	N/S	***
Glucosa+0.6M NaCl	BW25113	0.475361	NA	0.73836	NA	-	-
Glucosa+0.6M NaCl	$\Delta raiA$	0.261527	-44.98	0.923632	25.09	***	***
Glucosa+0.6M NaCl	$\Delta hpf$	0.264319	-44.4	0.882436	19.51	***	***
Glucosa+0.6M NaCl	$\Delta rmf$	0.545705	14.8	0.768871	4.13	N/S	***
Glucosa+0.6M NaCl	$\Delta rmf\Delta raiA$	0.803283	68.98	0.695976	-5.74	***	***
Glucosa+CasAA	BW25113	1.176775	NA	0.911666	NA	-	-

<b>Glucosa+CasAA</b>	$\Delta$ raiA	0.770824	-34.5	0.961876	5.51	***	***
<b>Glucosa+CasAA</b>	$\Delta$ hpf	0.977939	-16.9	0.934934	2.55	***	***
<b>Glucosa+CasAA</b>	$\Delta$ rmf	0.959004	-18.51	0.853005	-6.43	***	***
<b>Glucosa+CasAA</b>	$\Delta$ rmf $\Delta$ raiA	0.991585	-15.74	0.797695	-12.5	***	***
<b>Galactosa</b>	BW25113	0.262774	NA	0.676422	NA	-	-
<b>Galactosa</b>	$\Delta$ raiA	0.418395	59.22	0.63323	-6.39	***	***
<b>Galactosa</b>	$\Delta$ hpf	0.31698	20.63	0.71947	6.36	***	***
<b>Galactosa</b>	$\Delta$ rmf	0.314568	19.71	0.684354	1.17	**	N/S
<b>Galactosa</b>	$\Delta$ rmf $\Delta$ raiA	0.310867	18.3	0.638337	-5.63	**	***
<b>Glicerol</b>	BW25113	0.355097	NA	0.611490	NA	-	-
<b>Glicerol</b>	$\Delta$ raiA	0.403248	13.55	0.794875	29.98	*	***
<b>Glicerol</b>	$\Delta$ hpf	0.425035	19.69	0.799828	30.79	**	***
<b>Glicerol</b>	$\Delta$ rmf	0.441954	24.46	0.851305	39.21	***	***
<b>Glicerol</b>	$\Delta$ rmf $\Delta$ raiA	0.563859	58.79	0.822342	34.48	N/S	***

Se aplicó una prueba T-Student para discernir entre los resultados. Valores “p”:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.05$  (\*). Abreviaturas: velocidades de crecimiento ( $\mu$ ), diferencia entre las velocidades de crecimiento con respecto a la silvestre en porcentaje (Dif\_ $\mu$ %), densidad óptica máxima alcanzada (ODmax), diferencia entre las densidades ópticas máximas alcanzadas con respecto a la silvestre en porcentaje (Dif\_OD%), grado de significancia entre las velocidades de crecimiento con respecto a la silvestre (Sig\_ $\mu$ ) y grado de significancia entre las densidades ópticas máximas alcanzadas con respecto a la silvestre (Sig\_OD).

En casi todos los medios la cepa  $\Delta$ raiA $\Delta$ rmf obtuvo una OD máxima similar o inferior a la cepa silvestre en comparación con las demás cepas las cuales en más de un medio obtuvieron una OD máxima superior a la silvestre, lo cual podría indicar que la doble mutante presenta un fenotipo inferior a la silvestre en cuestión de crecimiento, esto podría deberse a que *E. coli* se queda sin los principales mecanismos de reserva de ribosomas, provocando una mayor degradación de estos o una regulación descontrolada.

Observando las curvas de crecimiento (Fig. 1 ANEXOS), se puede notar que *ΔraiA* creció de una forma bastante similar o mejor que las demás cepas en la mayoría de los medios, a excepción de los medios adicionados con cloruro de sodio, donde se observó un ligero aumento en la duración de la fase lag, esto podría ser consecuencia de la falta de activación de RpoS, la cual es inducida bajo condiciones de estrés, al no reaccionar este sistema, *ΔraiA* podría tener más problemas para crecer en estos medios (Diaz-Ramirez et al., 2025).

A pesar de los casos en que algunas cepas mutantes manifestaron tasas de crecimiento más lentas o densidades ópticas inferiores a las obtenidas con la cepa silvestre, es importante resaltar que todas las cepas crecieron en todos los medios evaluados. Este resultado indica que la eliminación de los factores de hibernación ribosomal no compromete la viabilidad celular, aunque sí puede modular la eficiencia del crecimiento y la acumulación de biomasa en condiciones específicas.

Dado que la síntesis de indigoidina se correlaciona estrechamente con la densidad celular alcanzada, es razonable esperar que los medios que permitan mayores valores de OD, en particular, M9 con glucosa y NaCl (0.45M), M9 con glucosa y CasAA, y M9 con glicerol, sean los que propicien los títulos de indigoidina más altos.

### **Análisis de actividad promotora de *raiA* y *rmf***

Se decidió analizar la dinámica de expresión de los promotores de *raiA* y *rmf* para entender cómo se regulan estos genes y por qué su actividad varía según el medio de cultivo.

En el caso de *raiA*, se observaron picos máximos de expresión en momentos específicos del tiempo (Fig. 5A). Al correlacionar estos picos con las curvas de crecimiento (Fig. 1 ANEXOS), se encontró que la mayor expresión ocurre durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria. Este patrón coincide con lo reportado en la literatura, donde se menciona que, en condiciones normales sin

estrés, los factores de hibernación ribosomal como *raiA* se expresan al entrar en fase estacionaria. Su función en este contexto es detener la síntesis proteica y preservar los ribosomas, permitiendo su reutilización cuando haya disponibilidad de recursos y se reanude el crecimiento celular.

Posteriormente, la actividad del promotor disminuye considerablemente. Además, el momento en que se alcanza el pico de expresión máximo del *raiA* depende del medio de cultivo: en medio LB, más rico en nutrientes, el pico ocurre antes que en los medios M9 con glucosa y casaminoácidos o con glucosa sola (Fig. 5A). Esto se debe a que en medio LB las bacterias alcanzan más rápidamente la fase estacionaria, seguidas por el medio con casaminoácidos y, finalmente, el medio con solo glucosa.

En contraste, la dinámica de expresión del promotor de *rmf* es diferente. En el medio con glucosa, se detecta expresión desde la fase exponencial, con una disminución casi total antes de llegar a la fase estacionaria (Fig. 5B). Este resultado contradice reportes previos, los cuales indican que *rmf* se expresa únicamente durante la transición hacia la fase estacionaria (Aiso et al., 2005; Reier et al., 2023; Shimada et al., 2013). Nuestros datos, sin embargo, sugieren que *rmf* comienza a expresarse antes, en plena fase exponencial, y su actividad decae al entrar en fase estacionaria (Fig. 5B).

En los medios LB y M9 con glucosa y casaminoácidos, la actividad del promotor de *rmf* aumenta gradualmente. En el medio con casaminoácidos, el pico de expresión se alcanza a mitad de la fase exponencial, mientras que en medio LB ocurre casi al final de esta fase.

Estos resultados indican que, en condiciones de crecimiento sin estrés, *raiA* alcanza su máxima expresión durante la transición a fase estacionaria, mientras que *rmf* se expresa principalmente durante la fase exponencial.

Finalmente, al comparar la intensidad de los picos de actividad entre ambos promotores, se observa que el promotor de *raiA* es más fuerte que el de *rmf* (Fig. 5). Esta observación podría indicar que la cepa  $\Delta raiA$  será la que tiene la mejor producción de indigoidina. Esto sugeriría que la eliminación de *raiA* podría generar un ahorro energético al evitar la síntesis de este factor, permitiendo redirigir recursos hacia la producción de indigoidina.

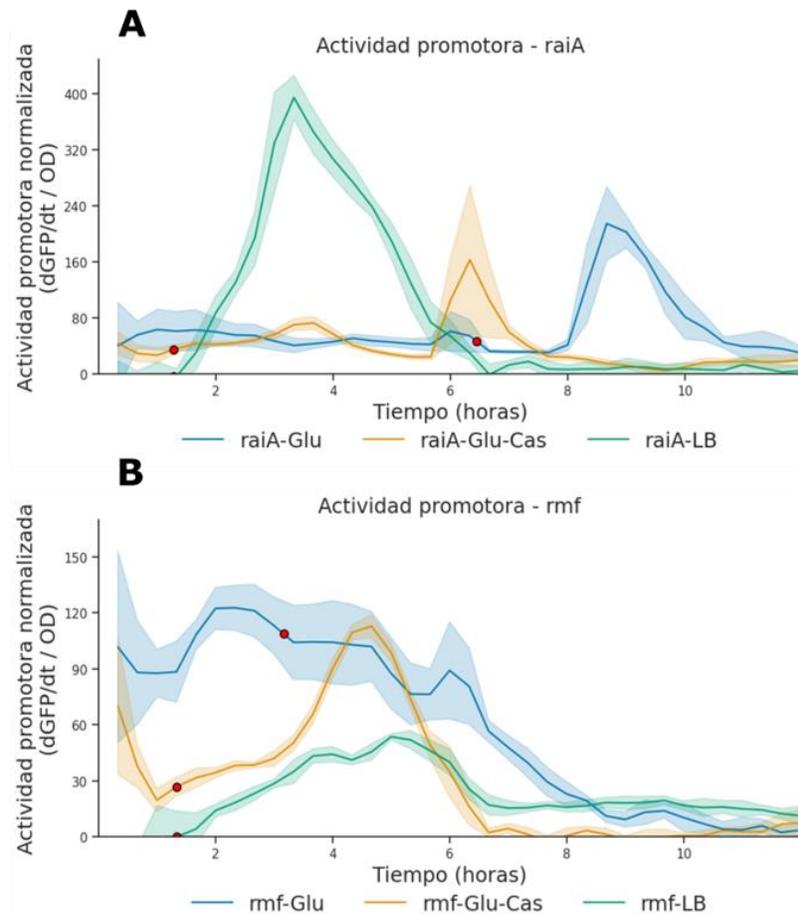


Figura 5. Actividad promotora de *raiA* y *rmf* en medios M9 con glucosa, M9 con glucosa y CasAA y medio LB. Los puntos en rojo corresponden al momento donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento.

En los medios con glicerol y galactosa, la dinámica de activación de los promotores cambia en comparación con los medios previamente analizados. En ambos casos, la expresión génica inicia desde el comienzo de la fase exponencial y tiende a aumentar gradualmente con el tiempo o a mantenerse constante. Sin

embargo, en el medio con glicerol se observa un comportamiento distinto: la actividad del promotor de *rmf* comienza a disminuir después de las 6.3 horas, mientras que la de *raiA* decae a partir de las 10 horas, llegando prácticamente a cero (Fig. 6).

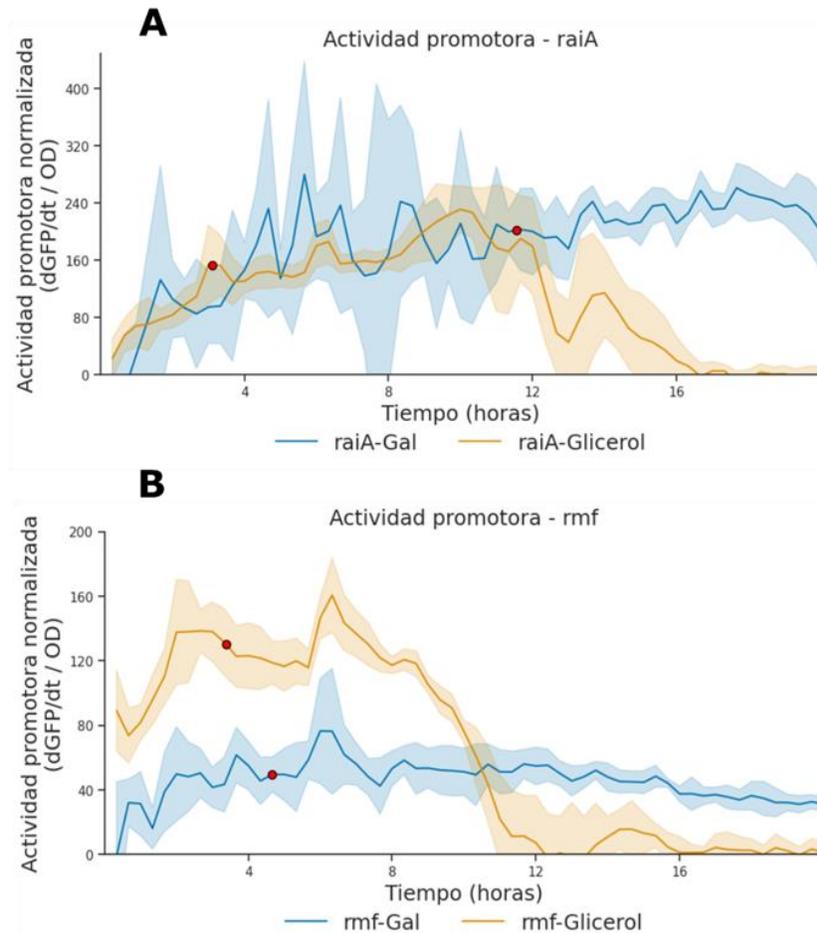


Figura 6. Actividad promotora de *raiA* y *rmf* en medio M9 con galactosa y glicerol. Los puntos en rojo corresponden al momento donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento.

Este comportamiento podría indicar que, aunque en medio con glicerol las células presentan un buen crecimiento y una elevada acumulación de biomasa, no serían capaces de redirigir eficientemente los recursos hacia la producción de indigoidina. Esto sugiere que podrían estar activando rutas metabólicas alternas que consumen la energía y recursos disponibles, los cuales de otro modo podrían destinarse a la síntesis de indigoidina.

En el caso del medio con galactosa, la actividad de los promotores aumenta de forma progresiva y se mantiene en el tiempo (Fig. 6), por lo que podríamos esperar una sobreproducción de indigoidina en este medio, al menos para la cepa  $\Delta raiA$ , lo cual indicaría que este medio favorece significativamente la expresión del sistema biosintético.

Asimismo, al comparar el nivel de activación de los promotores entre *raiA* y *rmf* en estos medios, se mantiene el mismo patrón observado anteriormente: el promotor de *raiA* presenta una mayor actividad que el de *rmf* (Fig. 6). Esto refuerza la idea de que la delección de *raiA* tiene un impacto más pronunciado en la redirección de recursos hacia la producción de indigoidina.

En condiciones de estrés, como lo es en los medios suplementados con NaCl, los cuales involucra un estrés osmótico directo, se espera que los promotores de los factores de hibernación ribosomal se activen con más fuerza, lo cual podría correlacionarse con un mayor aumento de la producción de indigoidina en estos medios. En el caso del promotor de *raiA*, se observa un aumento gradual de su actividad hasta aproximadamente las 5 horas. A partir de ese momento, en el medio con 0.45 M de NaCl, la activación se mantiene estable hasta alcanzar un pico justo en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria. Posteriormente, la actividad disminuye bruscamente hasta alcanzar niveles prácticamente nulos. En contraste, en el medio con 0.6 M de NaCl, la actividad también comienza a decaer después de las 5 horas, pero no llega a desaparecer por completo, como ocurre en la condición con 0.45 M de NaCl (Fig. 7A).

Respecto al promotor de *rmf*, su actividad aumenta progresivamente con el tiempo, alcanzando su punto máximo alrededor de las 6 horas. Después de este pico, la activación disminuye de forma sostenida hasta llegar a cero, indicando que este promotor deja de estar activo al inicio de la fase estacionaria (Fig. 7B).

Estos resultados sugieren que la cepa  $\Delta raiA$  tendría mayor disponibilidad de recursos celulares para destinar a la producción de indigoidina en comparación con  $\Delta rmf$  en este medio. No obstante, los niveles de activación de los promotores no fueron los esperados, ya que la activación de los promotores fue inferior a la actividad promotora en los demás medios analizados.

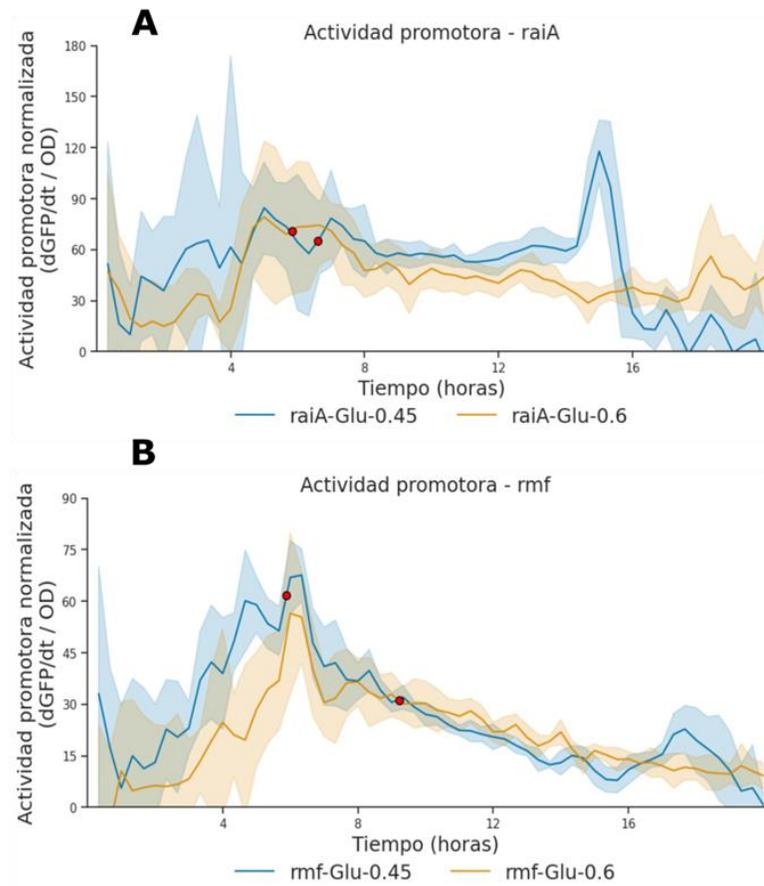


Figura 7. Actividad promotora de *raiA* y *rmf* en medio M9 con glucosa adicionado con 0.45M y 0.6M de NaCl. Los puntos en rojo corresponden al momento donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento.

### Análisis de producción de indigoidina 16 hpi

Se verificó que las cepas transformadas con el plásmido pSAY-IPTG-Indigoidine presentaran el fenotipo, tanto en placa como en cultivo líquido, en las placas las colonias se tornan en un tono gris azulado, mientras que, en los cultivos líquidos, el medio se torna azul (Fig. 8).



Figura 8. Expresión de indigoidina. De izquierda a derecha cepas: BW25113,  $\Delta raiA$ ,  $\Delta hpf$ ,  $\Delta rmf$ ,  $\Delta raiA\Delta rmf$  en medio M9 con glicerol.

Las cuantificaciones de indigoidina se realizaron en dos tiempos distintos después de la inducción con IPTG. La primera muestra fue a las 16 horas post inducción (hpi) basándose en un reporte previo el cual analizaba la degradación de indigoidina en el tiempo, en el cual obtuvieron el pico máximo de producción a esa hora (Hui et al., 2021). La siguiente hora de toma de muestra fue a las 24 hpi para observar el grado de degradación de la indigoidina.

Las cuantificaciones de indigoidina se realizaron como se menciona en materiales y métodos, protegiendo las muestras de la luz, ya que esta degrada la indigoidina.

Las cuantificaciones de indigoidina de 16 hpi sugieren que la cepa  $\Delta raiA$  tiene la mayor producción de indigoidina en todos los medios de cultivo a excepción del medio con glicerol y el medio con glucosa adicionado con CasAA (Fig. 9). El aumento en la producción para  $\Delta raiA$  en comparación con la silvestre fueron los siguientes: 35.32% para glucosa, 103.08% para glucosa con 0.45M de NaCl, 158.38% para glucosa con 0.6M de NaCl y 49.14% para galactosa, y una disminución del 2% para glucosa con CasAA y del 59.21% para el caso del medio con glicerol (Tabla 1 ANEXOS). Las demás cepas mostraron tener un rendimiento inferior a la cepa silvestre en la mayoría de los medios, a excepción de los medios con glucosa adicionados con cloruro de sodio en donde las cepas  $\Delta rmf$  y  $\Delta raiA\Delta rmf$

mostraron un rendimiento superior, con incrementos del 66.98% y 61.1% respectivamente (Tabla 1 ANEXOS).

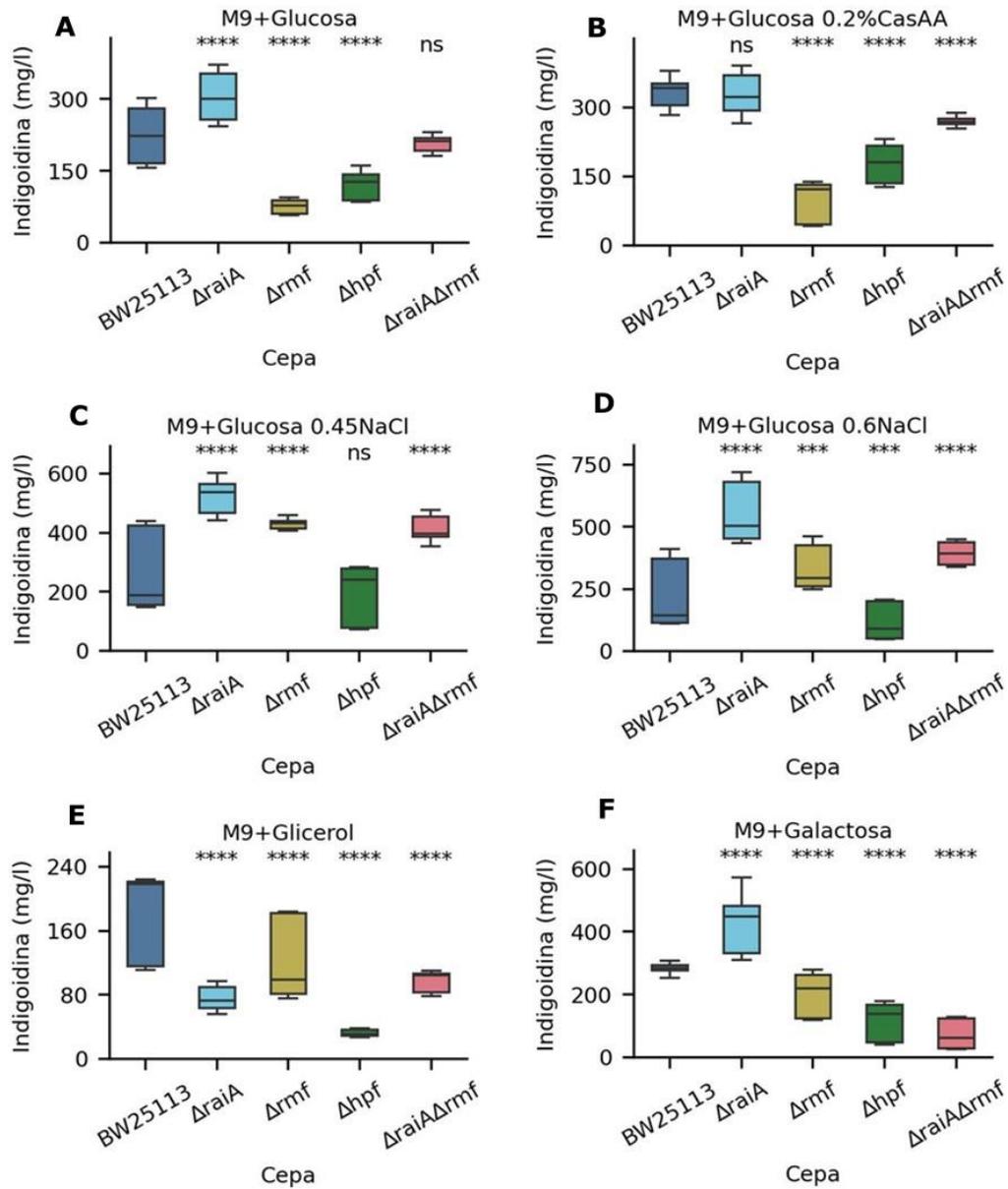


Figura 9. Cuantificaciones de indigoidina a las 16 horas post inducción.

Por otro lado, la cepa  $\Delta$ hpf no mostró tener un rendimiento superior en ninguno de los casos.

La sobreproducción de indigoidina en la cepa  $\Delta raiA$  sugiere que la mayor producción de indigoidina se da cuando la bacteria se encuentra bajo estrés, lo cual tiene sentido ya que los factores de hibernación ribosomal se expresan bajo distintos tipos de estrés. Al no tener estos factores de hibernación y no poder expresarlos, la célula podría estar redirigiendo los recursos a la producción de indigoidina. Además de que datos de proteómica indican que RaiA, RMF y HPF se expresan en cantidades considerables en la fase estacionaria, por lo que la eliminación de estos genes puede contribuir a un ahorro en el gasto proteómico (Mori et al., 2021).

Otra hipótesis que podría explicar la sobreproducción de indigoidina en las cepas que presentan un rendimiento superior en comparación con la cepa silvestre tiene que ver con el papel fisiológico que llevan a cabo los ribosomas.

En condiciones estacionarias, la regulación de la actividad ribosomal es crítica para la conservación de la maquinaria de traducción. En *E. coli*, se ha señalado que en fases de estrés o baja disponibilidad de nutrientes alrededor del 40% de todos los ribosomas se encuentran inactivos en la conformación 100S, otra cantidad indefinida permanece en forma de 70S inactivos, lo que reduce la tasa general de síntesis proteica y permite la reorientación de recursos metabólicos hacia funciones de mantenimiento y protección (Maki & Yoshida, 2021). En la cepa silvestre, estos mecanismos de inactivación permiten un ahorro energético a costa de disminuir la capacidad traduccional. Sin embargo, en mutantes como  $\Delta raiA$  no es posible la formación de ribosomas 70S inactivos, lo que conlleva a que un mayor porcentaje de ribosomas permanezca activo durante la fase estacionaria, favoreciendo la síntesis proteica y, en este caso, la producción de metabolitos secundarios como la indigoidina (Helena-Bueno et al., 2024).

La sobreproducción de indigoidina en la cepa  $\Delta raiA$  se puede interpretar entonces desde dos perspectivas complementarias. Por un lado, la eliminación de *raiA* reduce la transición de ribosomas activos a un estado inactivo, permitiendo una mayor eficiencia en la traducción durante condiciones de estrés. Esto implicaría que,

en ausencia de RaiA, los ribosomas no se hibernan y continúan participando activamente en la síntesis de proteínas, incluyendo las enzimas necesarias para la biosíntesis de indigoidina. Por otro lado, la ausencia de RaiA podría implicar un ahorro en el gasto proteómico que normalmente se destina a la síntesis y mantenimiento del factor, lo que redirige los recursos energéticos y metabólicos hacia la producción secundaria. Esta doble ventaja (mayor actividad traduccional y ahorro en costos de expresión) favorece la sobreproducción del pigmento.

A pesar de que la cepa  $\Delta raiA$  mostró un buen crecimiento y acumulación de biomasa tanto en el medio con glucosa suplementado con CasAA como en el medio con glicerol, la producción de indigoidina fue ineficiente en este último y no significativa en el primero (Tabla 1). En el caso del medio con glucosa y CasAA, este resultado era esperado, ya que bajo estas condiciones las células no están sometidas a estrés, lo que implica que los factores de hibernación ribosomal se activarían muy poco o nada. Por tanto, la eliminación de *raiA* no proporcionaría una ventaja metabólica, y se esperaría un rendimiento similar al de la cepa silvestre, como efectivamente se observó.

En contraste, en el medio con glicerol se esperaba una mayor producción de indigoidina, sin embargo, esta disminuyó en todas las cepas, incluyendo la silvestre (Fig. 9). De hecho, este fue el medio en el que se obtuvieron los títulos más bajos de producción. Lo cual refuerza la idea de que, bajo estas condiciones, las células podrían estar utilizando rutas metabólicas alternativas más demandantes en términos de recursos, lo que reduciría la disponibilidad de estos para la biosíntesis de indigoidina.

En los medios con cloruro de sodio (0.45M y 0.6M) se obtuvo la mayor producción de indigoidina, sin embargo, en los ensayos de actividad promotora, se observó que estos medios son los que obtuvieron la actividad más baja respecto a los demás medios analizados, por lo que un mecanismo desconocido tiene que ser el causante de la sobreproducción de indigoidina que observamos en estos medios.

En un estudio reciente, muestran que la cepa  $\Delta raiA$  no responde a RpoS, un regulador maestro involucrado en la respuesta general al estrés, que controla aproximadamente el 10 % del transcriptoma de *E. coli* (Diaz-Ramirez et al., 2025). Esta falta de respuesta a RpoS podría explicar el aumento en la producción de indigoidina en condiciones de estrés salino. Es posible que, al no activarse la respuesta típica al estrés mediada por RpoS, los recursos que normalmente se destinarían a programas de defensa celular se redirijan hacia rutas biosintéticas como la de la indigoidina, favoreciendo así su acumulación.

Por otra parte, se esperaba que la cepa  $\Delta raiA\Delta rmf$ , al combinar la eliminación de dos mecanismos de hibernación (la formación de ribosomas inactivos 70S regulados por RaiA y la dimerización en complejos 100S mediada por RMF), podría tener la mayor proporción de ribosomas activos, lo que teóricamente favorecería una mayor producción de indigoidina. No obstante, los resultados indican que, si bien en ciertos medios la producción es superior a la silvestre, no se alcanza el rendimiento óptimo esperado (Fig. 9). Esta observación sugiere que la presencia de un mecanismo de hibernación, aunque disminuya la actividad traduccional, resulta esencial para la protección de los ribosomas frente a la degradación en condiciones de estrés, debido a que los factores de hibernación, además de inhibir la traducción, protegen a los ribosomas de la acción de ribonucleasas y otros procesos degradativos, preservando la integridad estructural y funcional de la maquinaria traduccional (Feaga et al., 2020; Prossliner et al., 2018, 2021). En ausencia completa de estos mecanismos, la célula podría sufrir una degradación acelerada de la maquinaria ribosomal, lo que contrarresta el beneficio de disponer de una mayor cantidad de ribosomas activos. Por lo tanto, en la cepa  $\Delta raiA\Delta rmf$ , aunque se elimina la inactivación de los ribosomas, la falta de protección impide mantener una reserva estable de ribosomas, lo que podría limitar la síntesis de indigoidina. Esta situación ilustra la necesidad de un equilibrio fino entre la inactivación y la protección de los ribosomas para optimizar tanto la viabilidad celular como la producción de metabolitos secundarios.

Los resultados también muestran una marcada dependencia de la fuente de carbono y de los suplementos del medio en la producción de indigoidina. En particular, el incremento de producción observado en medios con glucosa suplementada con cloruro de sodio (0.45M y 0.6M NaCl) sugiere que las condiciones osmóticas y el tipo de carbono pueden modular la respuesta de hibernación ribosomal y, en consecuencia, la actividad traduccional (Fig. 9). La presencia de sal puede inducir una respuesta de estrés adicional que, en combinación con la delección de factores hibernantes, deriva en diferencias en la asignación de recursos metabólicos, favoreciendo la síntesis de ciertos metabolitos secundarios entre ellos la indigoidina. Asimismo, la disminución observada en medios con glicerol o en aquellos suplementados con CasAA indica que la eficiencia de la síntesis de indigoidina está estrechamente ligada a la composición del medio, lo que puede estar relacionado con la capacidad de las células para modular la formación de complejos 70S inactivos y 100S y la proporción de ribosomas activos.

Más allá de la modulación de la actividad traduccional, los factores de hibernación ribosomal tienen el rol adicional de proteger a los ribosomas de la degradación inducida por ribonucleasas y otros mecanismos que inducen estrés en la célula. La presencia de RaiA, RMF y HPF durante la fase estacionaria garantiza que, a pesar de la inactivación de la traducción, la maquinaria ribosomal permanezca intacta y disponible para reactivar la síntesis proteica rápidamente cuando se restauren condiciones favorables (Prossliner et al., 2018; Reier et al., 2023; Usachev et al., 2020). Esta protección es fundamental para la supervivencia celular y para evitar un gasto energético excesivo que se traduciría en la necesidad de sintetizar de novo complejos ribosomales, un proceso altamente costoso para la célula. La hipótesis de que la eliminación parcial de dichos factores puede liberar ribosomas activos y redirigir los recursos hacia la síntesis de metabolitos secundarios se ve entonces balanceada por la necesidad crítica de mantener la integridad del aparato traduccional. En este sentido, la sobreproducción de indigoidina en la cepa  $\Delta$ *raiA* se entiende como el resultado de un reequilibrio en el que la ganancia en actividad traduccional supera el costo asociado a la pérdida de

protección parcial. Sin embargo, una eliminación demasiado extensa (como en  $\Delta raiA\Delta rmf$  o en propuestas de delección triple que incluyan *hpf*) resulta en fenotipos aberrantes y en una mayor degradación de los ribosomas, como se ha reportado previamente (Lang et al., 2021).

### **Análisis de producción de indigoidina 24 hpi**

A las 24 hpi, la cepa  $\Delta raiA$  continuó presentando la mayor producción de indigoidina en los medios con glucosa y con glucosa suplementada con 0.6M de NaCl con incremento en la producción de 37.3 y 113.51% respectivamente (Tabla 2 ANEXOS). En cambio, en los medios con glucosa suplementado con 0.45M de NaCl, galactosa y glucosa con CasAA, no se observaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (Fig. 10).

El nivel de producción de las demás cepas fue inferior a la cepa silvestre a excepción de las cepas  $\Delta rmf$  y  $\Delta raiA\Delta rmf$  en medio M9 con glucosa adicionado con 0.6M de NaCl, donde las cepas obtuvieron un rendimiento superior a la silvestre del 53.43 y 81.78% respectivamente (Tabla 2 ANEXOS).

También se confirmó que la cepa  $\Delta hpf$  mantuvo niveles de producción inferiores a los de la cepa silvestre en todas las condiciones analizadas, tanto a las 16 hpi como a las 24 hpi, consolidándose como la cepa menos eficiente para la biosíntesis de indigoidina (Fig. 9 y 10).

En algunos casos, la producción a las 24 hpi fue menor que a las 16 hpi. Esto se atribuye en parte a la degradación de la indigoidina, ya que este pigmento es sensible a la luz y a la temperatura. No obstante, también influyen factores asociados al tipo de medio y a la dinámica de crecimiento celular. Por ejemplo, en la cepa silvestre se observó una disminución en la producción a las 24 hpi en medios donde el crecimiento bacteriano fue más favorable, como en glucosa y glucosa con CasAA. En contraste, en condiciones que imponen un mayor estrés, como glucosa con 0.45 M o 0.6 M de NaCl, y galactosa, la producción aumentó, lo que sugiere

que, al crecer más lentamente, las células alcanzan su pico de producción en un punto posterior.

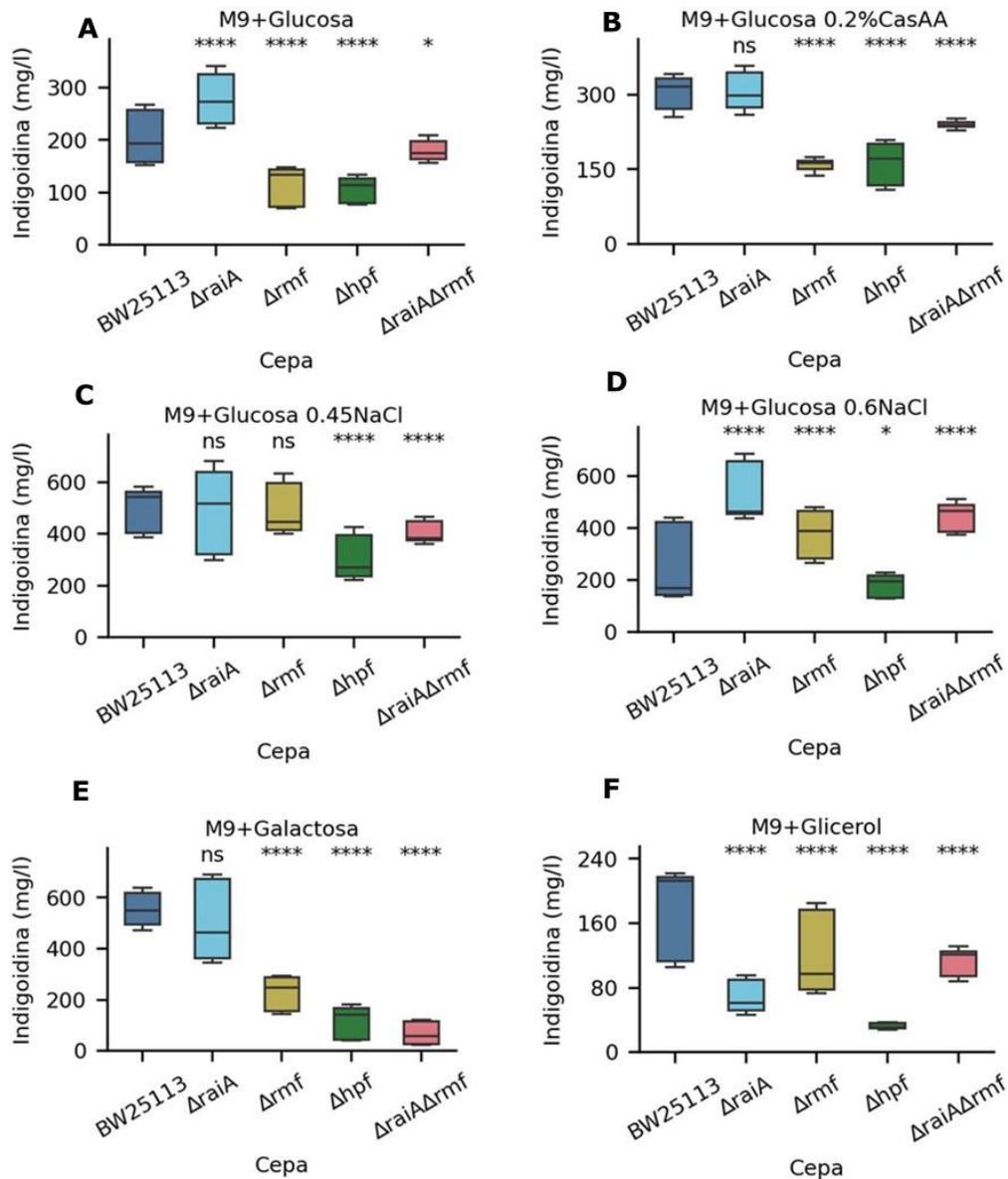


Figura 10. Cuantificaciones de indigoidina a las 24 horas post inducción.

En el caso específico de  $\Delta$ raiA, se observó una disminución general en la producción de indigoidina a las 24 hpi en casi todos los medios, salvo en galactosa (Fig. 10). Esto podría explicarse por un consumo más rápido de los recursos disponibles por parte de esta cepa, lo que provocaría una terminación temprana de la fase de síntesis del pigmento, seguida de su degradación. Por otro lado, los

mutantes *Δhpf* y *Δrmf* mostraron un leve aumento en la producción a las 24 hpi, posiblemente como una respuesta compensatoria al estrés o como resultado de una redistribución de recursos durante un crecimiento más lento.

Comparando ambas temporalidades (16 vs. 24 hpi), se identificó una tendencia general: en aproximadamente la mitad de las condiciones analizadas, la producción disminuyó a las 24 hpi, mientras que en la otra mitad se incrementó. Específicamente, en medios que favorecen el crecimiento rápido (glucosa y glucosa con CasAA), la producción disminuyó, posiblemente debido a la degradación del pigmento y al agotamiento de los recursos celulares. En cambio, en medios que ralentizan el crecimiento, como aquellos con NaCl y galactosa, la producción aumentó o se mantuvo, lo que sugiere un retraso en el pico de producción. Este comportamiento indica que la ventana óptima para cuantificar la indigoidina debe ajustarse en función del medio de cultivo.

En el medio con glicerol no se observó una diferencia significativa entre las 16 y las 24 hpi, lo cual podría indicar una producción más estable bajo estas condiciones, sin embargo, los títulos alcanzados siguen estando por debajo en comparación con los otros medios analizados, por lo que este medio es el peor para la producción de indigoidina.

Los hallazgos actuales sugieren que la modulación de la actividad ribosomal mediante la delección parcial de factores de hibernación puede ser una estrategia viable para optimizar la producción de compuestos secundarios como la indigoidina. No obstante, es esencial alcanzar un balance que permita mantener un número suficiente de ribosomas activos sin sacrificar la protección ribosomal necesaria para la estabilidad celular. Estudios futuros deberían explorar estrategias de ingeniería genética que permitan la regulación fina de la expresión de RaiA, RMF y HPF, de manera que se pueda ajustar la proporción de ribosomas activos versus inactivos en función del momento de la fase de crecimiento y las condiciones ambientales específicas. Por ejemplo, el uso de promotores regulables o sistemas de control

post-transcripcional podría facilitar la creación de cepas en las que la inactivación ribosomal se minimice durante el periodo de producción del metabolito, pero se mantenga suficiente protección para evitar una degradación excesiva de la maquinaria traduccional.

Adicionalmente, la relación entre la composición del medio de cultivo y la actividad ribosomal es un factor que merece una investigación más detallada. Los resultados muestran una variabilidad en la producción de indigoidina en función de la fuente de carbono y la adición de otros componentes como NaCl o CasAA. Esto sugiere que la respuesta celular a los estímulos ambientales se integra a través de mecanismos complejos que afectan tanto la regulación de la traducción como el flujo metabólico global. La caracterización de estos efectos podría permitir optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de indigoidina sin comprometer la viabilidad celular. Por ejemplo, identificar concentraciones óptimas de sal y fuentes de carbono que, en conjunto con la manipulación de los factores de hibernación ribosomal, potencien la producción de indigoidina sería de gran interés para aplicaciones biotecnológicas.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó una estrategia innovadora para incrementar la producción del pigmento indigoidina mediante la eliminación de los factores de hibernación ribosomal en *Escherichia coli*. Antes de inducir la expresión del pigmento, se confirmó que la eliminación de los genes *raiA*, *rmf* y *hpf* no afecta la viabilidad celular, ya que todas las cepas mutantes mostraron crecimiento en los distintos medios utilizados. Además, se observó una relación inversa entre la velocidad de crecimiento y la densidad óptica máxima alcanzada, lo cual es relevante, ya que una mayor densidad celular se correlaciona con una mayor acumulación de indigoidina.

Las cuantificaciones de indigoidina a 16 y 24 horas post inducción evidenciaron que la cepa  $\Delta raiA$  fue la más eficiente en la mayoría de los medios, alcanzando un aumento de hasta 158% en comparación con la cepa silvestre. Esta sobreproducción puede explicarse por la doble ventaja que representa la ausencia de RaiA: una mayor proporción de ribosomas activos y un ahorro en el gasto proteómico celular, lo cual favorece la biosíntesis del pigmento. Por otro lado, la cepa  $\Delta hpf$  resultó ser la menos eficiente en todos los contextos, lo que indica que la eliminación de este factor no ofrece beneficios productivos y, por el contrario, puede comprometer la funcionalidad traduccional. Esto podría deberse a que *hpf* está dentro de un operón relacionado con nitrógeno y la respuesta al estrés, por lo que quitarlo afectaría el marco de lectura de los genes adyacentes o tener efectos polares (Akiyama et al., 2018; Mateus et al., 2021).

La cepa doble  $\Delta raiA\Delta rmf$ , a pesar de eliminar dos mecanismos de hibernación, no alcanzó los niveles de producción esperados. Esto sugiere que la hibernación ribosomal, aunque reduce la actividad traduccional, cumple un papel protector esencial para preservar la integridad de los ribosomas bajo estrés. En su ausencia, la maquinaria ribosomal podría ser más susceptible a la degradación, lo cual limita la síntesis sostenida de indigoidina. Estos resultados destacan la necesidad de un

equilibrio entre mantener la actividad traduccional y conservar la estabilidad estructural del ribosoma.

El análisis temporal de la producción mostró que el rendimiento máximo de indigoidina no ocurre siempre a las 16 horas post inducción, sino que varía según el medio de cultivo. En medios con crecimiento rápido, como glucosa y glucosa con CasAA, se observó una disminución de producción a las 24 horas, mientras que en medios que inducen un crecimiento más lento, como glicerol o galactosa, algunos casos mostraron un aumento posterior. Esto resalta la importancia de optimizar el tiempo de cuantificación según el medio utilizado.

Finalmente, el estudio de la actividad de los promotores de *raiA* y *rmf* reveló que su expresión depende tanto del tipo de fuente de carbono como de la tasa de crecimiento celular. En medios alternativos como galactosa y glicerol, la actividad promotora se mantuvo durante períodos más prolongados, al igual que en los medios con salinidad, sin embargo, en estos últimos, la actividad de los promotores no fue la esperada, por lo que la sobreproducción en estos medios se le atribuye a la dependencia que presenta  $\Delta raiA$  ante RpoS. Cabe destacar que el promotor de *raiA* presentó la mayor actividad en todos los casos, lo cual se correlaciona directamente con el mayor rendimiento observado en la cepa  $\Delta raiA$ .

En conjunto, estos resultados demuestran que la manipulación del sistema de hibernación ribosomal representa una estrategia efectiva para mejorar la producción de compuestos de interés biotecnológico como la indigoidina, y sientan las bases para futuras aplicaciones de este enfoque en otros microorganismos industriales. Además, este trabajo ofrece una perspectiva más profunda sobre la importancia fisiológica de los factores de hibernación, no solo como reguladores de la actividad traduccional, sino también como elementos clave para la homeostasis ribosomal bajo condiciones adversas.

## REFERENCIAS

- Adamczyk, P. A., & Reed, J. L. (2017). *Escherichia coli* as a model organism for systems metabolic engineering. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.11.001>
- Agafonov, D. E., Kolb, V. A., Nazimov, I. V., & Spirin, A. S. (1999). A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12345–12349. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12345>
- Agafonov, D. E., Kolb, V. A., & Spirin, A. S. (2001). Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Reports*, 2(5), 399–402. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve091>
- Aiso, T., Yoshida, H., Wada, A., & Ohki, R. (2005). Modulation of mRNA Stability Participates in Stationary-Phase-Specific Expression of Ribosome Modulation Factor. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 1951–1958. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1951-1958.2005>
- Akiyama, T., Williamson, K. S., & Franklin, M. J. (2018). Expression and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* hibernation promoting factor. *Molecular Microbiology*, 110(2), 161–175. <https://doi.org/10.1111/mmi.14001>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Baral, N. R., Banerjee, D., Eng, T., Simmons, B. A., Mukhopadhyay, A., & Scown, C. D. (2025). Microbial Pathways for Cost-Effective Low-Carbon Renewable Indigoidine. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 13(8), 3300–3310. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c09962>
- Barton, N. R., Burgard, A. P., Burk, M. J., Crater, J. S., Osterhout, R. E., Pharkya, P., Steer, B. A., Sun, J., Trawick, J. D., Van Dien, S. J., Yang, T. H., & Yim, H. (2015). An integrated biotechnology platform for developing sustainable chemical processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(3), 349–360. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1541-1>
- Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ignatova, Z., Plitzko, J. M., & Wilson, D. N. (2018). Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1. *Nature Microbiology*, 3(10), 1115–1121. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0237-0>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Carneiro, S., Ferreira, E. C., & Rocha, I. (2013). Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 164(3), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>

- d'Aquino, A. E., Kim, D. S., & Jewett, M. C. (2018). Engineered Ribosomes for Basic Science and Synthetic Biology. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 9, 311–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084129>
- de la Cruz, M., Ramírez, E. A., Sigala, J.-C., Utrilla, J., & Lara, A. R. (2020). Plasmid DNA Production in Proteome-Reduced Escherichia coli. *Microorganisms*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091444>
- Díaz-Ramírez, J., Miranda-Neri, A., Díaz-Méndez, R., Rosas-Santiago, P., & Utrilla, J. (2025). *Disruption of ribosomal hibernation increases translational capacity in diverse microbial hosts*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7255729/v1>
- Feaga, H. A., Kopylov, M., Kim, J. K., Jovanovic, M., & Dworkin, J. (2020). Ribosome Dimerization Protects the Small Subunit. *Journal of Bacteriology*, 202(10). <https://doi.org/10.1128/JB.00009-20>
- Feid, S. C. (2023). *INVESTIGATING THE IMPACT OF NONENZYMATIC LYSINE ACETYLATION ON THE FUNCTION OF THE BACTERIAL RIBOSOME* (4068).
- Fereja, T. H., Kitte, S. A., Zafar, M. N., Halawa, M. I., Han, S., Zhang, W., & Xu, G. (2020). Highly sensitive and selective non-enzymatic glucose detection based on indigo carmine/hemin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chemiluminescence. *The Analyst*, 145(3), 1041–1046. <https://doi.org/10.1039/C9AN02100K>
- Franken, L. E., Oostergetel, G. T., Pijning, T., Puri, P., Arkhipova, V., Boekema, E. J., Poolman, B., & Guskov, A. (2017). A general mechanism of ribosome dimerization revealed by single-particle cryo-electron microscopy. *Nature Communications*, 8(1), 722. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00718-x>
- Franklin, M. J., Sandvik, E., Yanardag, S., & Williamson, K. S. (2020). Functional Characterization of the Pseudomonas aeruginosa Ribosome Hibernation-Promoting Factor. *Journal of Bacteriology*, 202(19). <https://doi.org/10.1128/JB.00280-20>
- Hanczyc, M. M. (2020). Engineering Life: A Review of Synthetic Biology. *Artificial Life*, 26(2), 260–273. [https://doi.org/10.1162/artl\\_a\\_00318](https://doi.org/10.1162/artl_a_00318)
- Helena-Bueno, K., Chan, L. I., & Melnikov, S. V. (2024). Rippling life on a dormant planet: hibernation of ribosomes, RNA polymerases, and other essential enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1386179>
- Hirschi, S., Ward, T. R., Meier, W. P., Müller, D. J., & Fotiadis, D. (2022). Synthetic Biology: Bottom-Up Assembly of Molecular Systems. *Chemical Reviews*, 122(21), 16294–16328. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00339>
- Huang, X., Gan, L., He, Z., Jiang, G., & He, T. (2024). Bacterial Pigments as a Promising Alternative to Synthetic Colorants: From Fundamentals to Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(11), 2153–2165. <https://doi.org/10.4014/jmb.2404.04018>

- Hui, C., Guo, Y., Li, L., Liu, L., Chen, Y., Yi, J., & Zhang, N. (2021). Indigoidine biosynthesis triggered by the heavy metal-responsive transcription regulator: a visual whole-cell biosensor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(14–15), 6087–6102. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11441-5>
- Irving, S. E., Choudhury, N. R., & Corrigan, R. M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(4), 256–271. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>
- Kaplan, G., & Seferoğlu, Z. (2023). The Synthetic Approaches for Preparation of Indigo and Applications in Denim Industry. *Current Organic Synthesis*, *20*(4), 361–364. <https://doi.org/10.2174/1570179419666220830091956>
- Khaova, E. A., & Tkachenko, A. G. (2024). Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, *28*(1), 24–32. <https://doi.org/10.18699/vjgb-24-04>
- Kitano, S., Lin, C., Foo, J. L., & Chang, M. W. (2023). Synthetic biology: Learning the way toward high-precision biological design. *PLOS Biology*, *21*(4), e3002116. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002116>
- Korostelev, A. A. (2021). Diversity and Similarity of Termination and Ribosome Rescue in Bacterial, Mitochondrial, and Cytoplasmic Translation. *Biochemistry (Moscow)*, *86*(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1134/S0006297921090066>
- Lang, M., Krin, E., Korlowski, C., Sismeiro, O., Varet, H., Coppée, J.-Y., Mazel, D., & Baharoglu, Z. (2021). Sleeping ribosomes: Bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *IScience*, *24*(10), 103128. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103128>
- Ma, S., Su, T., Lu, X., & Qi, Q. (2024). Bacterial genome reduction for optimal chassis of synthetic biology: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *44*(4), 660–673. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2208285>
- Maki, Y., & Yoshida, H. (2021). Ribosomal Hibernation-Associated Factors in *Escherichia coli*. *Microorganisms*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010033>
- Marquez-Zavala, E., & Utrilla, J. (2023). Engineering resource allocation in artificially minimized cells: Is genome reduction the best strategy? *Microbial Biotechnology*, *16*(5), 990–999. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14233>
- Mateus, A., Shah, M., Hevler, J., Kurzawa, N., Bobonis, J., Typas, A., & Savitski, M. M. (2021). Transcriptional and Post-Transcriptional Polar Effects in Bacterial Gene Deletion Libraries. *MSystems*, *6*(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00813-21>
- Matzov, D., Bashan, A., Yap, M. F., & Yonath, A. (2019). Stress response as implemented by hibernating ribosomes: a structural overview. *The FEBS Journal*, *286*(18), 3558–3565. <https://doi.org/10.1111/febs.14968>

- Moon, A., Meshram, V., Khan, D., & Pise, A. (2021). *Escherichia coli*: A Model Organism in Life Science Research. *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*.
- Mori, M., Zhang, Z., Banaei-Esfahani, A., Lalanne, J., Okano, H., Collins, B. C., Schmidt, A., Schubert, O. T., Lee, D., Li, G., Aebersold, R., Hwa, T., & Ludwig, C. (2021). From coarse to fine: the absolute *Escherichia coli* proteome under diverse growth conditions. *Molecular Systems Biology*, 17(5). <https://doi.org/10.15252/msb.20209536>
- Prossliner, T., Gerdes, K., Sørensen, M. A., & Winther, K. S. (2021). Hibernation factors directly block ribonucleases from entering the ribosome in response to starvation. *Nucleic Acids Research*, 49(4), 2226–2239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab017>
- Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M. A., & Gerdes, K. (2018). Ribosome Hibernation. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 321–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035130>
- Reier, K., Liiv, A., & Remme, J. (2023). Ribosome Protein Composition Mediates Translation during the *Escherichia coli* Stationary Phase. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms24043128>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Shimada, T., Yoshida, H., & Ishihama, A. (2013). Involvement of Cyclic AMP Receptor Protein in Regulation of the *rmf* Gene Encoding the Ribosome Modulation Factor in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2212–2219. <https://doi.org/10.1128/JB.02279-12>
- Simons, M. (2021). Synthetic biology as a technoscience: The case of minimal genomes and essential genes. *Studies in History and Philosophy of Science*, 85, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2020.09.012>
- Theng, S., Williamson, K. S., & Franklin, M. J. (2020). Role of Hibernation Promoting Factor in Ribosomal Protein Stability during *Pseudomonas aeruginosa* Dormancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9494. <https://doi.org/10.3390/ijms21249494>
- Trösch, R., & Willmund, F. (2019). The conserved theme of ribosome hibernation: from bacteria to chloroplasts of plants. *Biological Chemistry*, 400(7), 879–893. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0436>
- Urwin, L., Savva, O., & Corrigan, R. M. (2024). Microbial Primer: What is the stringent response and how does it allow bacteria to survive stress? *Microbiology*, 170(7). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001483>
- Usachev, K. S., Yusupov, M. M., & Validov, Sh. Z. (2020). Hibernation as a Stage of Ribosome Functioning. *Biochemistry (Moscow)*, 85(11), 1434–1442. <https://doi.org/10.1134/S0006297920110115>

- Vickery, C. R., McCulloch, I. P., Sonnenschein, E. C., Beld, J., Noel, J. P., & Burkart, M. D. (2020). Dissecting modular synthases through inhibition: A complementary chemical and genetic approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(2), 126820. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126820>
- Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B.-S., Hau, C. W., & Cate, J. H. D. (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(11), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nsmb850>
- Wang, L., & Maranas, C. D. (2018). MinGenome: An In Silico Top-Down Approach for the Synthesis of Minimized Genomes. *ACS Synthetic Biology*, 7(2), 462–473. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00296>
- Wang, T., Liang, C., Zheng, M., Liu, L., An, Y., Xu, H., Xiao, S., & Nie, L. (2020). Ribosome Hibernation as a Stress Response of Bacteria. *Protein & Peptide Letters*, 27(11), 1082–1091. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200610142118>
- Wehrs, M., Gladden, J. M., Liu, Y., Platz, L., Prah, J.-P., Moon, J., Papa, G., Sundstrom, E., Geiselman, G. M., Tanjore, D., Keasling, J. D., Pray, T. R., Simmons, B. A., & Mukhopadhyay, A. (2019). Sustainable bioproduction of the blue pigment indigoidine: Expanding the range of heterologous products in *R. toruloides* to include non-ribosomal peptides. *Green Chemistry*, 21(12), 3394–3406. <https://doi.org/10.1039/C9GC00920E>
- Xu, X., Liu, Y., Du, G., Ledesma-Amaro, R., & Liu, L. (2020). Microbial Chassis Development for Natural Product Biosynthesis. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 779–796. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.01.002>
- Yang, D., Prabowo, C. P. S., Eun, H., Park, S. Y., Cho, I. J., Jiao, S., & Lee, S. Y. (2021). *Escherichia coli* as a platform microbial host for systems metabolic engineering. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 225–246. <https://doi.org/10.1042/EBC20200172>
- Ye, K., Serganov, A., Hu, W., Garber, M., & Patel, D. J. (2002). Ribosome-associated factor Y adopts a fold resembling a double-stranded RNA binding domain scaffold. *European Journal of Biochemistry*, 269(21), 5182–5191. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03222.x>
- Yoshida, H., Shimada, T., & Ishihama, A. (2018). Coordinated Hibernation of Transcriptional and Translational Apparatus during Growth Transition of *Escherichia coli* to Stationary Phase. *MSystems*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00057-18>
- Yoshida, H., & Wada, A. (2014). The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress. *WIREs RNA*, 5(5), 723–732. <https://doi.org/10.1002/wrna.1242>
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M. G., & Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3(8), 623–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth895>

Zegarra, V., Bedrunka, P., Bange, G., & Czech, L. (2023). How to save a bacterial ribosome in times of stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 136, 3–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.015>

Zhao, M., Zhang, X.-S., Xiong, L.-B., Liu, K., Li, X.-F., Liu, Y., & Wang, F.-Q. (2024). Establishment of an Efficient Expression and Regulation System in *Streptomyces* for Economical and High-Level Production of the Natural Blue Pigment Indigoidine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(1), 483–492.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c05696>

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Producción de indigoidina a partir de dos moléculas de glutamina..	6
<i>Figura 2. Formas de hibernación ribosomal en E. coli.....</i>	11
<i>Figura 3. Inactivación ribosomal mediada por los factores de hibernación ribosomal en E. coli.....</i>	15
<i>Figura 4. Estructura del plásmido pUA66-praiA.....</i>	22
<i>Figura 5. Actividad promotora de raiA y rmf en medios M9 con glucosa, M9 con glucosa y CasAA y medio LB.....</i>	34
<i>Figura 6. Actividad promotora de raiA y rmf en medio M9 con galactosa y glicerol.....</i>	35
<i>Figura 7. Actividad promotora de raiA y rmf en medio M9 con glucosa adicionado con 0.45M y 0.6M de NaCl.....</i>	37
<i>Figura 8. Expresión de indigoidina.....</i>	38
<i>Figura 9. Cuantificaciones de indigoidina a las 16 horas post inducción.....</i>	39
<i>Figura 10. Cuantificaciones de indigoidina a las 24 horas post inducción.....</i>	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Datos cinéticos.....</i>	30
--------------------------------------	----

## Anexos

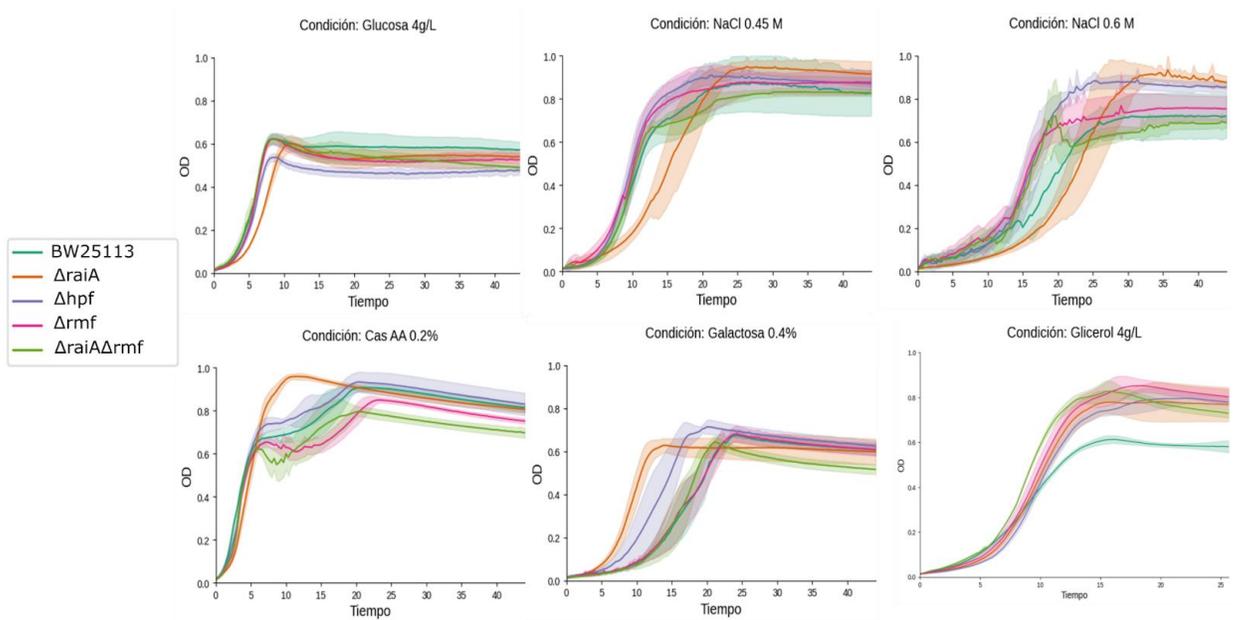


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de las distintas cepas en los distintos medios.

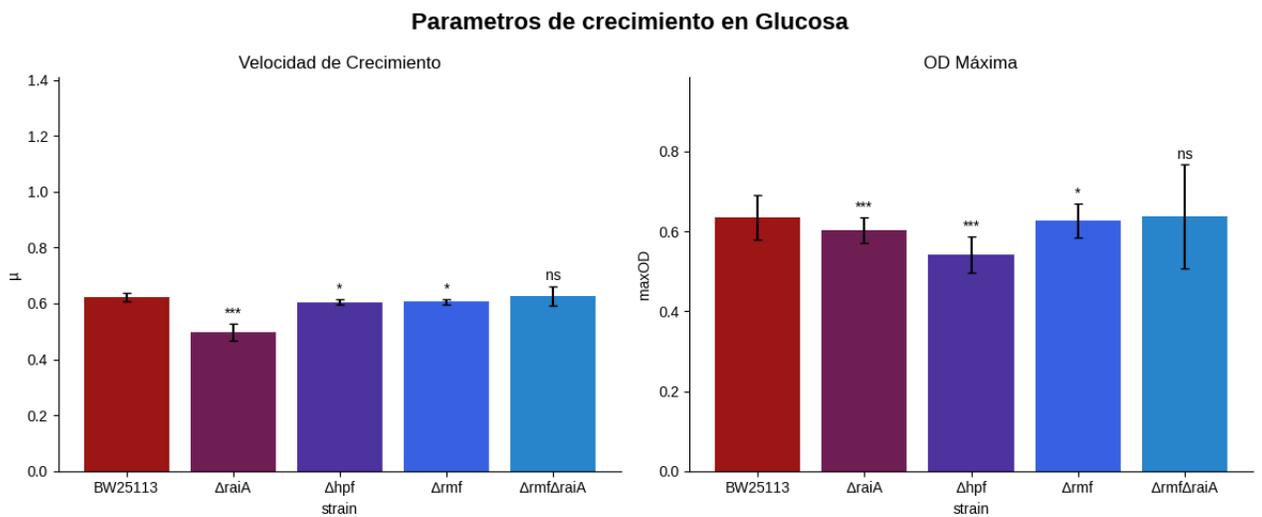


Figura 2. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con glucosa. Las cepas se comparan contra BW25113.

### Parametros de crecimiento en Glucosa+0.45NaCl

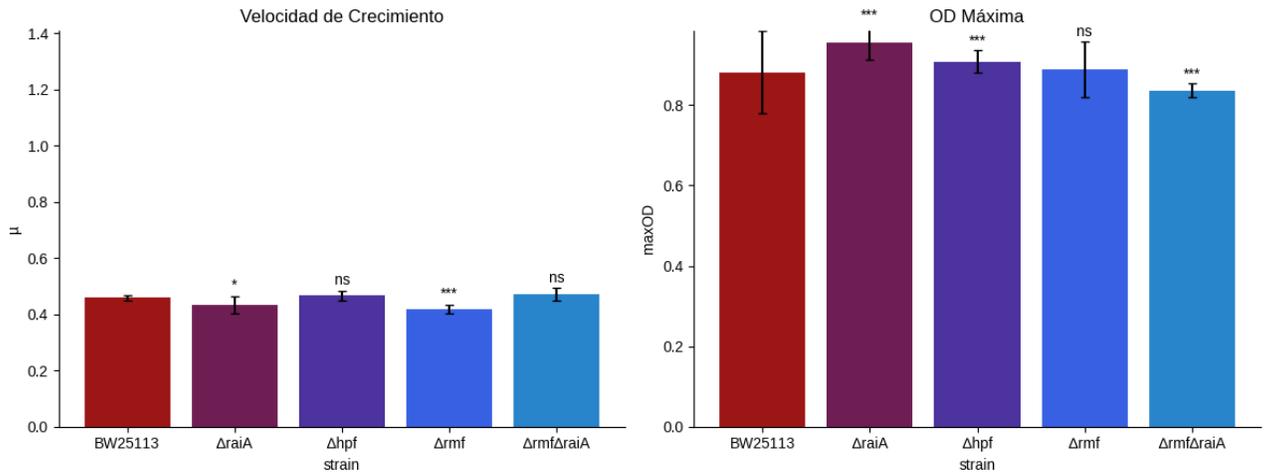


Figura 3. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con glucosa más 0.45M de NaCl. Las cepas se comparan contra BW25113.

### Parametros de crecimiento en Glucosa+0.6NaCl

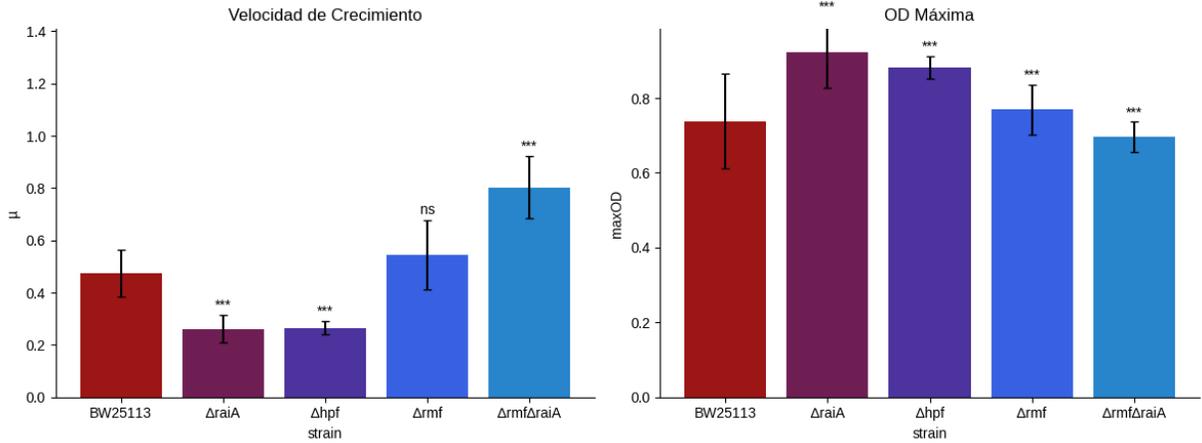


Figura 4. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con glucosa más 0.45M de NaCl. Las cepas se comparan contra BW25113.

### Parámetros de crecimiento en Glucosa+CasAA

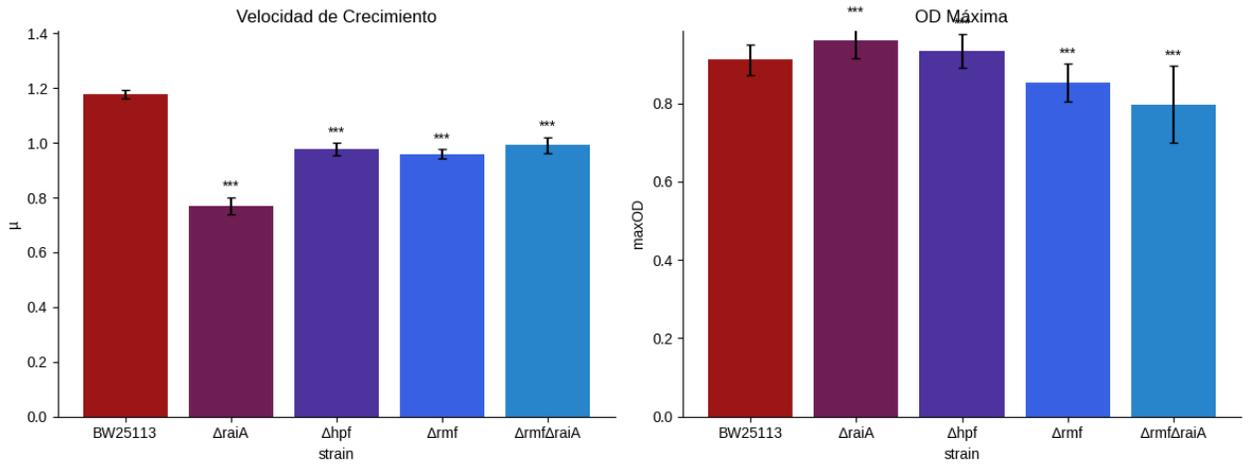


Figura 5. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con glucosa y 0.2% con CasAA. Las cepas se comparan contra BW25113.

### Parámetros de crecimiento en Glicerol

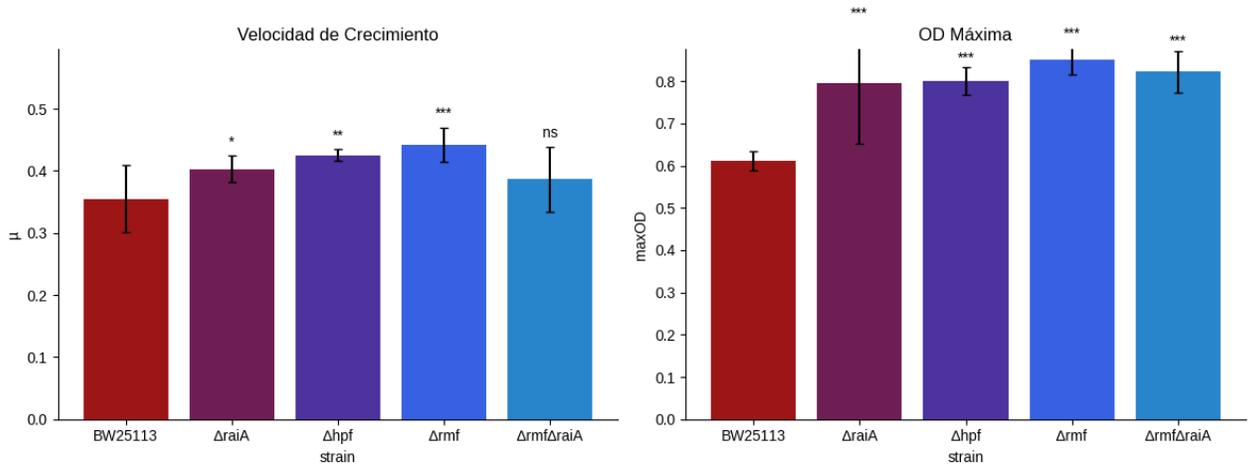


Figura 6. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con glicerol. Las cepas se comparan contra BW25113.

### Parámetros de crecimiento en Galactosa

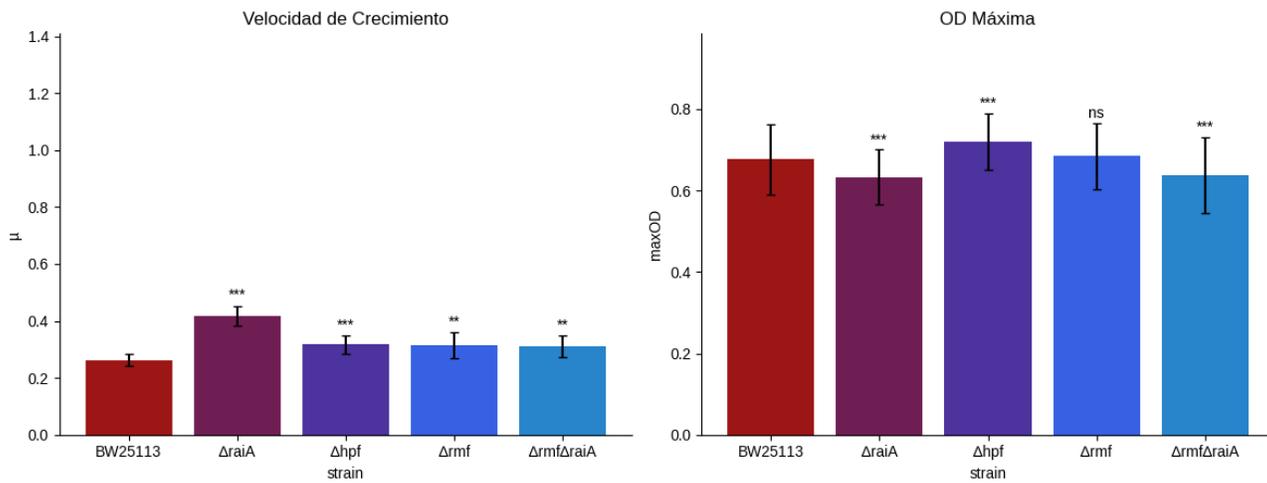


Figura 7. Parámetros cinéticos de las distintas cepas en medio M9 con galactosa. Las cepas se comparan contra BW25113.

Tabla 1. Producción de indigoidina a las 16 hpi.

Cepa	Medio	Media Indigoidina mg/L	%	Diferencia %
BW25113	M9+Glucosa	224.98	100	0
ΔraiA	M9+Glucosa	304.44	135.32	35.32
Δhpf	M9+Glucosa	120.71	53.65	-46.35
Δrmf	M9+Glucosa	75.86	33.72	-66.28
ΔraiAΔrmf	M9+Glucosa	208.02	92.46	-7.54
BW25113	M9+Glucosa+0.45M NaCl	256.85	100	0
ΔraiA	M9+Glucosa+0.45M NaCl	521.61	203.08	103.08
Δhpf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	198.66	77.34	-22.66
Δrmf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	428.9	166.98	66.98
ΔraiAΔrmf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	413.78	161.1	61.1

<b>BW25113</b>	<b>M9+Glucosa+0.6M NaCl</b>	<b>212.53</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>ΔraiA</b>	<b>M9+Glucosa+0.6M NaCl</b>	<b>549.14</b>	<b>258.38</b>	<b>158.38</b>
<b>Δhpf</b>	<b>M9+Glucosa+0.6M NaCl</b>	<b>114.81</b>	<b>54.02</b>	<b>-45.98</b>
<b>Δrmf</b>	<b>M9+Glucosa+0.6M NaCl</b>	<b>329.34</b>	<b>154.96</b>	<b>54.96</b>
<b>ΔraiAΔrmf</b>	<b>M9+Glucosa+0.6M NaCl</b>	<b>393.47</b>	<b>185.14</b>	<b>85.14</b>
<b>BW25113</b>	<b>M9+Glucosa+CasAA</b>	<b>333.25</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>ΔraiA</b>	<b>M9+Glucosa+CasAA</b>	<b>326.57</b>	<b>98</b>	<b>-2</b>
<b>Δhpf</b>	<b>M9+Glucosa+CasAA</b>	<b>179.06</b>	<b>53.73</b>	<b>-46.27</b>
<b>Δrmf</b>	<b>M9+Glucosa+CasAA</b>	<b>100.97</b>	<b>30.0</b>	<b>-69.7</b>
<b>ΔraiAΔrmf</b>	<b>M9+Glucosa+CasAA</b>	<b>268.95</b>	<b>80.71</b>	<b>-19.29</b>
<b>ΔraiAΔrmf</b>	<b>M9+Galactosa</b>	<b>284</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>ΔraiA</b>	<b>M9+Galactosa</b>	<b>423.55</b>	<b>149.14</b>	<b>49.14</b>
<b>Δhpf</b>	<b>M9+Galactosa</b>	<b>117.87</b>	<b>41.5</b>	<b>-58.5</b>
<b>Δrmf</b>	<b>M9+Galactosa</b>	<b>203.14</b>	<b>71.53</b>	<b>-28.47</b>
<b>ΔraiAΔrmf</b>	<b>M9+Galactosa</b>	<b>72.55</b>	<b>25.55</b>	<b>-74.45</b>
<b>BW25113</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>184.66</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>ΔraiA</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>75.33</b>	<b>40.79</b>	<b>-59.21</b>
<b>Δhpf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>32.15</b>	<b>17.41</b>	<b>-82.59</b>
<b>Δrmf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>120.03</b>	<b>65</b>	<b>-35</b>
<b>ΔraiAΔrmf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>97.74</b>	<b>52.93</b>	<b>-47.07</b>

Tabla 2. Producción de indigoidina a las 24 hpi.

Cepa	Medio	Media Indigoidina mg/L	%	Diferencia %
<b>BW25113</b>	<b>M9+Glucosa</b>	<b>203.36</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>ΔraiA</b>	<b>M9+Glucosa</b>	<b>279.22</b>	<b>137.3</b>	<b>37.3</b>

$\Delta$ hpf	M9+Glucosa	107.38	52.8	-47.2
$\Delta$ rmf	M9+Glucosa	117.17	57.62	-42.38
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Glucosa	178.9	87.97	-12.03
BW25113	M9+Glucosa+0.45M NaCl	501.93	100	0
$\Delta$ raiA	M9+Glucosa+0.45M NaCl	494.33	98.49	-1.51
$\Delta$ hpf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	300.1	59.79	-40.21
$\Delta$ rmf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	486.54	96.93	-3.07
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Glucosa+0.45M NaCl	403.15	80.32	-19.68
BW25113	M9+Glucosa+0.6M NaCl	246.05	100	0
$\Delta$ raiA	M9+Glucosa+0.6M NaCl	525.35	213.51	113.51
$\Delta$ hpf	M9+Glucosa+0.6M NaCl	181.93	73.94	-26.06
$\Delta$ rmf	M9+Glucosa+0.6M NaCl	377.52	153.43	53.43
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Glucosa+0.6M NaCl	447.27	181.78	81.78
BW25113	M9+Glucosa+CasAA	304.01	100	0
$\Delta$ raiA	M9+Glucosa+CasAA	305.32	100.43	0.43
$\Delta$ hpf	M9+Glucosa+CasAA	163.33	53.73	-46.27
$\Delta$ rmf	M9+Glucosa+CasAA	158.81	52.24	-47.76
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Glucosa+CasAA	139.59	78.81	-21.19
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Galactosa	552.72	100	0
$\Delta$ raiA	M9+Galactosa	500.01	90.46	-9.54
$\Delta$ hpf	M9+Galactosa	119.19	21.56	-78.44
$\Delta$ rmf	M9+Galactosa	230.53	41.71	-58.29
$\Delta$ raiA $\Delta$ rmf	M9+Galactosa	66.32	12	-88

<b>BW25113</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>180.66</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b><math>\Delta</math>raiA</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>67.93</b>	<b>37.6</b>	<b>-62.4</b>
<b><math>\Delta</math>hpf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>32.27</b>	<b>17.6</b>	<b>-82.14</b>
<b><math>\Delta</math>rmf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>117.9</b>	<b>65.26</b>	<b>-34.74</b>
<b><math>\Delta</math>raiA<math>\Delta</math>rmf</b>	<b>M9+Glicerol</b>	<b>113.14</b>	<b>62.63</b>	<b>-37.37</b>

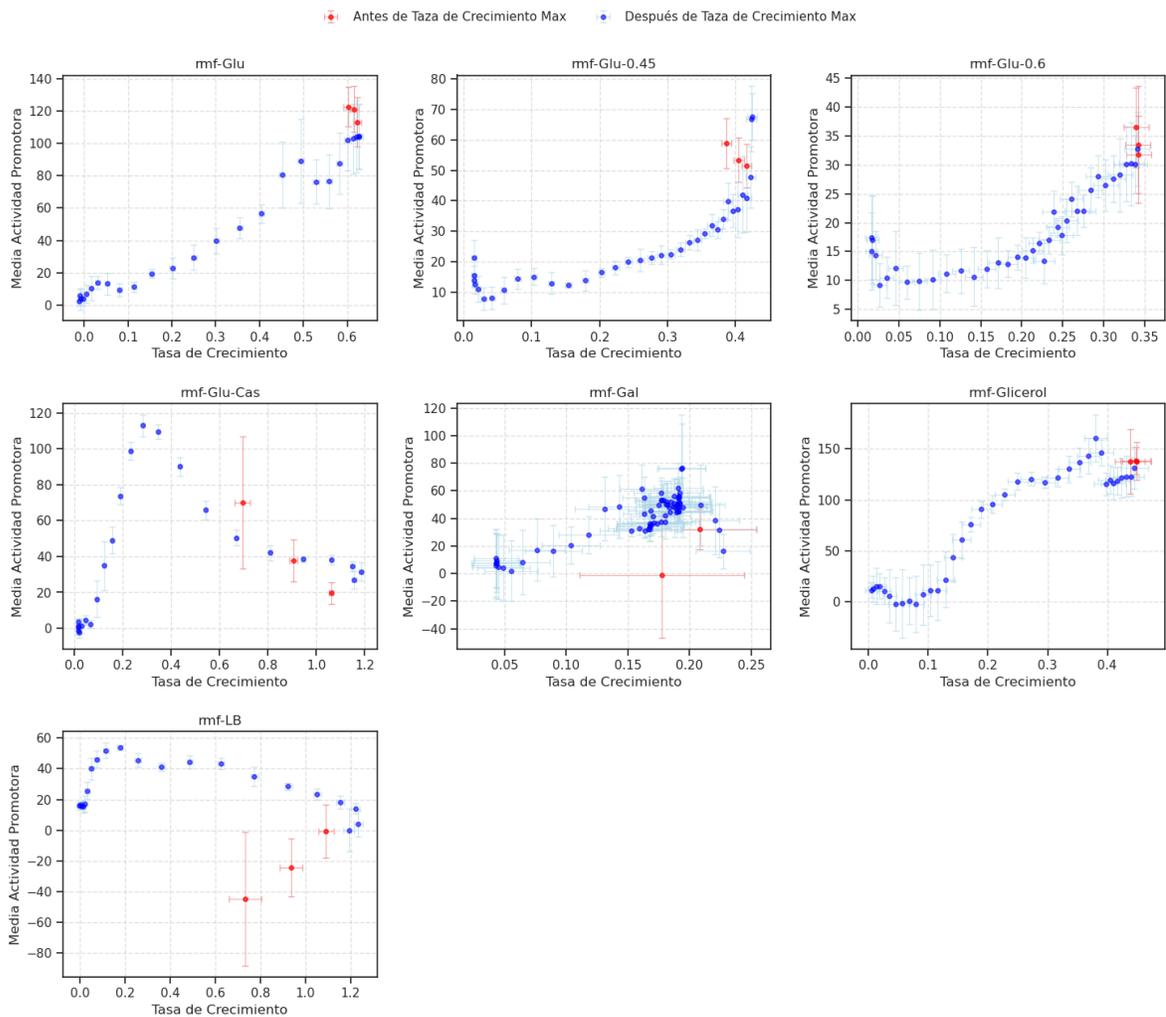
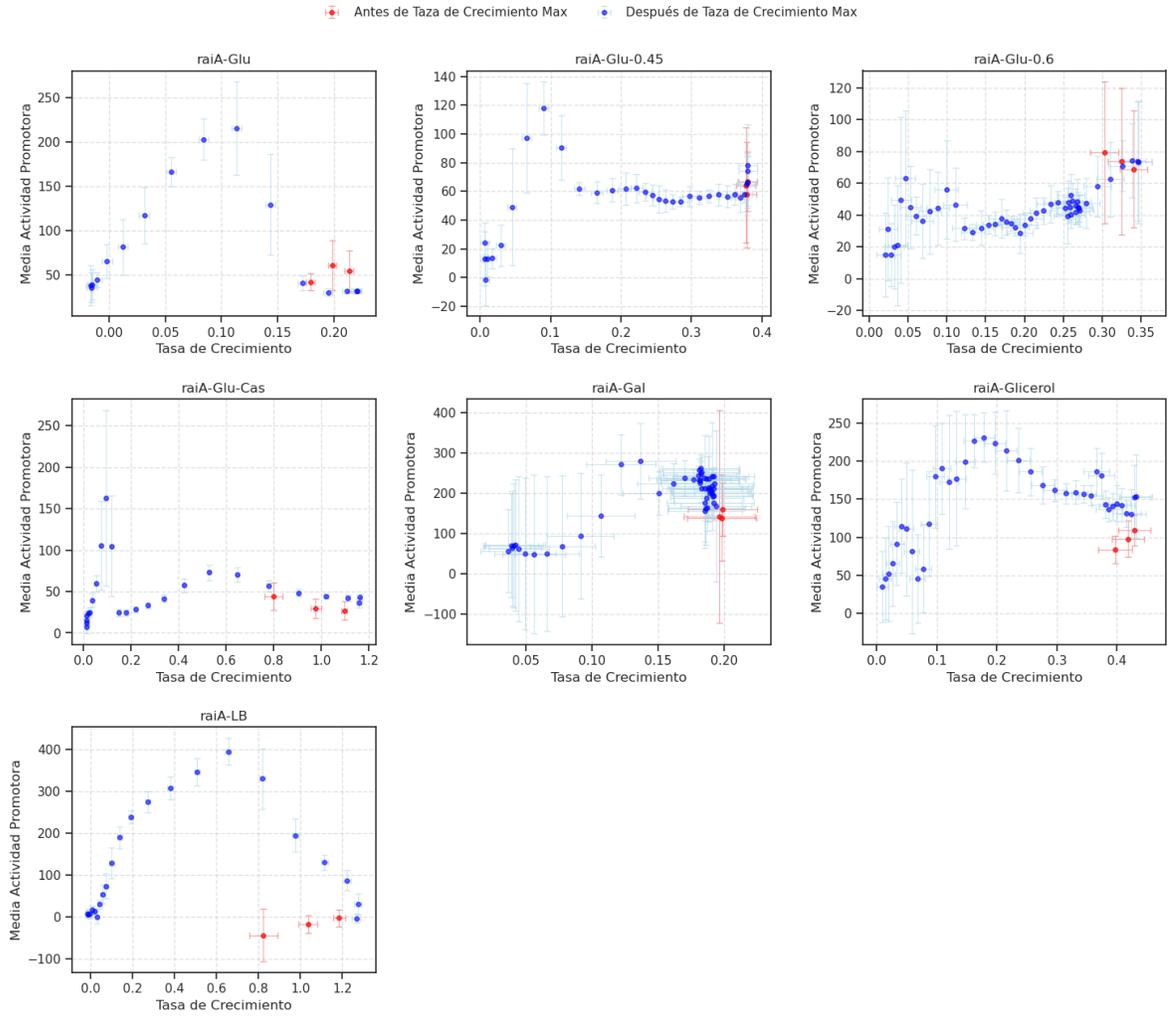


Figura 7. Actividad promotora de *rmf* a diferentes velocidades de crecimiento.



*Figura 8. Actividad promotora de raiA a distintas velocidades de crecimiento.*