La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE © 2025. Todos los derechos reservados

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Maestría en Ciencias en Nanociencias

Expresión recombinante de la proteína de cápside del virus de moteado clorótico del caupí

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Oscar Uriel Patricio Hernández

Ensenada, Baja California, México 2025 Tesis defendida por Oscar Uriel Patricio Hernández

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava Director de tesis

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Oscar González Davis

Dr. Andrés Zárate Romero



Dra. Catalina López Bastidas Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo Directora de Estudios de Posgrado

Copyright © 2025, Todos los Derechos Reservados, CICESE Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE Resumen de la tesis que presenta **Oscar Uriel Patricio Hernández** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias

Expresión recombinante de la proteína de cápside del virus de moteado clorótico del caupí

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava Director de tesis

Las VPLs de CCMV se han convertido en un sistema prometedor como nanoacarreador de moléculas de interés biomédico, sin embargo, su producción requiere de una gran cantidad de hojas infectadas para obtener la partícula viral suficiente que permita llevar a cabo la investigación. Se ha optado por su producción en un sistema heterólogo con la finalidad de obtener la proteína de cápside del CCMV soluble y sin etiquetas, para su óptima y fácil aplicación. En este estudio, se logró producir la proteína de cápside del CCMV de forma soluble en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y se purificó en forma de VLPs. La producción se llevó a cabo en matraces con medio LB y MMM que presentaron una producción de 14.03 \pm 2.80 y 5.53 \pm 0.59 mg/L, respectivamente. La producción en biorreactores con MMM fue de 103.07 \pm 32.35mg/L, lo anterior resalta las ventajas de realizar el crecimiento en biorreactores. Las VPLs obtenidas tienen una morfología esférica con un tamaño aproximado de 28 nm. La proteína de cápside del CCMV soluble y sin etiquetas mostró su funcionalidad al ser recuperada en forma de VLPs. Esto demuestra que su producción en bacterias es conveniente y eficiente al disminuir los tiempos, en comparación con la producción del virus en plantas.

Abstract of the thesis presented **by Oscar Uriel Patricio Hernández** as a partial requirement to obtain the Master of Science in Nanoscience degree.

Expression of recombinant cowpea chlorotic mottle virus capsid protein

Abstract approved by:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava Thesis Director

CCMV VLPs have become a promising system as nanocarriers of molecules of biomedical interest, however, their production requires a large number of infected leaves to obtain enough virus to carry out the research. Therefore, their production in a heterologous system has been chosen to obtain soluble and label-free CCMV capsid protein, for its optimal and easy application. In this study, soluble CCMV capsid protein was produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified in the form of VLPs. Production was carried out in flasks with LB and MMM medium that produced 14.03 ± 2.80 and 5.53 ± 0.59 mg/L, respectively. Production in bioreactors with MMM was 103.07 ± 32.35 mg/L, highlighting the advantages of carrying outgrowth in bioreactors. The obtained VLPs have a spherical morphology with an approximate size of 28 nm. The soluble and label-free CCMV capsid protein showed its functionality when recovered in the form of VLPs. This demonstrates that its production in bacteria is convenient and efficient by reducing the time, compared to the production of the virus in plants and even purification of the capsid protein.

Dedicatoria

A mis padres, hermano y amigos por su apoyo incondicional brindado en el transcurso de la maestría.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)por la beca concedida para la realización de mis estudios en el posgrado, CVU: 1195814.

De igual manera, al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y en especial al posgrado de Nanociencias.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM), Ensenada, Baja California, por permitirme utilizar sus instalaciones en el transcurso de mis estudios de posgrado, en particular al departamento de Bionanotecnología.

Al proyecto de Ciencia de Frontera 2023 (CF-2023-I-1313) por el apoyo económico otorgado.

Al Dr. Kees Van Ark del Laboratorio de Microbiología, Wageningen UR, Netherlands por proporcionar el plásmido que codifica la CP de CCMV (pSB1C3-BBa_K883001).

A mi director el Dr. Rubén Darío Cadena Nava, por el apoyo brindado para la realización del proyecto y su acompañamiento a lo largo de la maestría.

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y al Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán por su incondicional ayuda desde inicios del proyecto, gracias por los conocimientos otorgados en toda la parte de la expresión, producción de la proteína recombinante, les agradezco por haberme recibido en su laboratorio para realizar los análisis de la producción de la CP y poder enriquecer el proyecto.

A mi comité sinodal, el Dr. Oscar González Davis, Dr. Andrés Zárate Romero y la Dra. Jimena Carrillo Tripp, por los consejos y franqueza demostrada en cada avance de tesis, y al apoyo brindado para la terminación exitosa de mis estudios.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bionanotecnología, Mtro. Carlos Alejandro Medrano Villagómez y Mtra. Kendra Ramírez Acosta, por su ayuda en el laboratorio en particular para la purificación de las VLPs de CCMV, muchas gracias a ambos por compartirme de su experiencia y poder brindarme el apoyo en momentos complicados. A Ely y Mariana por su amistad y buenos momentos que pasamos. A mis compañeros de nanociencias, en particular a Milton, Manu, Hugo y Kim. A mis compañeros y amigos de CV, Gis, Ceci, Paulette y Yajis, gracias por su compañía y momentos agradables en los viajes.

Al chino (Jaime), por su amistad, compañía ofreciéndonos café y postres en compañía de Maggie y Sergio.

Al técnico Mtra. Itandehui Betanzo Gutiérrez por su disponibilidad para apoyarme con asesorías de los equipos y reactivos. Nuevamente le agradezco al Dr. Oscar por sus múltiples participaciones al proyecto en su labor como técnico, sinodal de esta tesis y como amigo, al escucharme y aconsejarme en cada idea, experimento y resultado generado en esta tesis.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi

Capítu	lo 1. Introducción	1
1 1	Antecedentes	2
1.1	Antecedentes	J
1.2	Justificación	5
1.3	Hipótesis	6
1.4	Objetivos	6
1.4	1 Objetivo general	6
1.4	2 Objetivos específicos	6

7	Metodología	Capítulo 2.
7	ansformación bacteriana	2.1 Tra
8	edios y condiciones de cultivo	2.2 M
9	antificación de glucosa y acetato	2.3 Cu
9	antificación de proteína celular	2.4 Cu
	rificación de las VLPs de CCMV	2.5 Pu
	racterización de VLPs de CCMV.	2.6 Ca

Capítulo	3.	Resultados	12
3.1 produc	Crecimi tora de (niento bacteriano y parámetros cinéticos del cultivo de la cepa <i>E. co</i> CP de CCMV	<i>li</i> BL21 (DE3) 12
3.2	Expresi	sión de CP de CCMV en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	15
3.3	Purifica	cación y caracterización de VLPs de CCMV	17
Capítulo	4.	Discusión	21
Capítulo	5.	Conclusiones	24
Literatur	a citada	a	25
Anexos .			31

viii

Lista de figuras

Figura

- Valores de pH durante el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) durante la producción CP de CCMV. El pH fue monitoreado en los matraces con LB (círculos), MMM (cuadrados) y en el biorreactor con MMM (triángulos).
- 4. Consumo de glucosa en cultivos en matraces (cuadrados) y biorreactor con MMM (triángulos).
- 5. Producción de acetato en matraces (cuadrados) y biorreactor con MMM (triángulos). 14
- 6. Análisis de la expresión de la CP del CCMV en *E. coli* mediante geles de electroforesis SDS-PAGE al 12%. Proteína soluble (A, B) e insoluble (C, D) del cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) en matraces con medio LB (geles hacia la izquierda) y MMM (geles hacia la derecha) por triplicado. Carriles 1, 2, 3: antes de inducir; Carriles 4, 5, 6: 3 h después de inducir; Carril kDa: marcador de peso molecular; Carriles 8, 9, 10: tiempo final. La flecha roja en los geles indica la CP del CCMV.. 16
- Purificación de VLPs de CCMV empleando colchón de sacarosa 10%. Análisis por DLS (A) y TEM (B).
 18
- 9. Purificación de CCMV nativo mediante cromatografía de filtración en gel. Cromatograma de la inyección de la muestra (A), su caracterización por DLS (B) y visualización por TEM (C)...... 19

11.	DLS	de	las	poblacione	s de	las	VLPS	CCMV	producidas	de	forma	recombinante	obtenidas
	desp	bués	s de	la purificac	ón p	or F	PLC						31

Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Comparación de diversos sistemas de expresión de CP de CCMV.	5
2.	Parámetros de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) productora de CP de CCMV. Se re matraces (LB, MMM) y biorreactores (MMM).	alizó en 15

Capítulo 1. Introducción

Las nanopartículas (NPs) son objetos muy pequeños que se definen por sus dimensiones que van desde un nanómetro (nm) hasta 100 nm, y de acuerdo con su composición, pueden ser metálicas, poliméricas, lipídicas o proteicas (Harish et al., 2022). Las nanopartículas por sus características pueden ser utilizadas para inhibir microorganismos, como biosensores o para el envío de moléculas de interés biomédico. Dentro de las nanopartículas idóneas para el envío de moléculas terapéuticas están las de origen proteico debido a su capacidad de carga y biocompatibilidad (Yetisgin et al., 2020). Además, este tipo de nanopartículas pueden ser funcionalizadas en su exterior para dirigirlas a células u órganos diana (Cheng et al., 2023). También, las NPs proteicas pueden ser utilizadas como nanoacarreadores de fármacos al prolongar su tiempo de circulación en el cuerpo humano y al disminuir las dosis necesarias durante la terapia (Singh & Lillard, 2009). Dentro de las nanopartículas proteicas con gran interés biotecnológico se encuentran las partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés).

Las VPLs están compuestas por las proteínas de la cápside (CP) de un virus y se pueden autoensamblar en NPs de un tamaño que oscila entre los 15 a 120 nm de diametro, carecen del material genético del virus del cual derivan, por lo cual no presentan el riesgo de infección, además que son biodegradables (Grgacic & Anderson, 2006). Por las anteriores características pueden ser utilizadas como nanoacarreadores de moléculas de interés biomédico, debido a que, en su interior, pueden transportar diversas moléculas, como proteínas, material genético y fármacos, entre otras, para diferentes aplicaciones en nanomedicina (Mejía-Méndez et al., 2022; Yang et al., 2022). Para mejorar la entrega de fármacos en donde son requeridos, su superficie exterior puede ser funcionalizada con diferentes moléculas como anticuerpos, péptidos o moléculas para reconocer las células blanco, etc., (Caldeira et al., 2010; Hu & Steinmetz, 2020; Xia et al., 2016).

Las VLPs que recientemente han generado interés son las derivadas de virus de plantas. Los virus de plantas en su mayoría carecen de una envoltura lipídica y su cápside está constituida por un solo tipo de proteína. Por ejemplo, la cápside del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) está conformada por 180 unidades idénticas de una proteína y tiene un diámetro de 28 nm (Speir et al., 1995). El CCMV tiene la propiedad de desensamblarse en un ambiente neutro a pH 7.0 y una alta fuerza iónica, además las CPs tienen la propiedad de ensamblarse de manera espontánea en diferentes estructuras dependiendo del pH y fuerza iónica (Lavelle et al., 2009a). La capacidad de las CPs del CCMV de autoensamblarse a un pH neutro en presencia de moléculas aniónicas puede ser utilizada para encapsidar un sin número de materiales

tanto biológicos como no biológicos siempre y cuando estos tengan una carga superficial negativa. Las CPs, en particular de los virus de ARN de cadena sencilla (ssRNA), poseen residuos cargados positivamente en su extremo N-terminal el cuál se encuentra al interior de la cápside, por lo que esta característica puede ser explotada para encapsidar un gran número de moléculas que poseen carga negativa (Azizgolshani et al., 2013; Nuñez-Rivera et al., 2020; Pretto et al., 2021; Sánchez-Sánchez et al., 2014).

El proceso de producción de VLPs derivadas de virus que infectan plantas por lo general requiere el uso de plantas para propagar el virus. Por lo anterior, es necesario contar con instalaciones adecuadas que brinden las condiciones óptimas (temperatura, humedad, exposición de luz) para el cultivo de plantas y que pueda darse la infección viral eficiente para una alta producción de virus. Así también, se requiere tener un control del riego, nutrientes, controlar las malezas y evitar plagas, con la finalidad de obtener un buen rendimiento de biomasa (Podar, 2013). Los viveros, invernaderos y cámaras de cultivo *in vitro* pueden brindar las condiciones para el crecimiento óptimo de la planta (Katagiri et al., 2015; Messelink et al., 2021; Paradiso & Proietti, 2022). Por otro lado, para la recuperación de VLPs, el virus debe de ser purificado de las hojas infectadas y posteriormente desensamblado, con la finalidad de remover su material genético y obtener únicamente la proteína de la cápside, para finalmente reensamblarla alrededor de la molécula de interés (Ali & Roossinck, 2007; Cadena-Nava et al., 2012).

El éxito de las VLPs está también determinado por su tiempo de producción, por lo que una de las alternativas es producirlas a través de sistemas heterólogos tal como las bacterias, levaduras, líneas celulares de mamíferos, plantas e insectos. Si bien, cada sistema presenta ventajas y desventajas específicas, es importante considerar la eficiencia de producción, plegamiento correcto, presencia de componentes del hospedero, costos de producción y procesos de purificación complejos (Gupta et al., 2023). Un fenómeno común en la producción de proteínas recombinantes es su sobreexpresión, lo cual puede causar una elevada agregación de proteínas en el citoplasma o periplasma, originando cuerpos de inclusión (Palmer & Wingfield, 2004).

Normalmente, para recuperar proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión se emplean altas concentraciones de agentes desnaturalizantes como urea (6 a 8 M) y cloruro de guanidina, seguido del replegamiento y recuperación de la proteína funcional solubilizada (Upadhyay et al., 2016; Y. Wang et al., 2017). La búsqueda de un método eficiente para la obtención de VLPs en gran escala y en un tiempo corto es indispensable para poder satisfacer las diferentes aplicaciones en biomedicina.

1.1 Antecedentes

En la búsqueda para obtener la CP de CCMV producida en un sistema heterólogo se han realizado diversos trabajos en células procariotas y eucariotas. Los datos más relevantes respecto a la producción y procesos de purificación se mencionan a continuación y se resumen en la Tabla 1.

Escherichia coli es utilizada para la producción de proteínas recombinantes principalmente por su fácil y rápido crecimiento, bajo costo y abundante información sobre su replicación y metabolismo, lo que permite realizar modificaciones genéticas para aumentar la producción de la proteína recombinante (Gopal & Kumar, 2013). Existen diferentes cepas de *E. coli* utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes (BL21, Rosetta-gami, WE110, entre otras), diferenciándose entre ellas por características específicas como la ausencia de proteasas, producción de acetato y la producción de proteína soluble recombinante (Arauzo-Aguilera et al., 2023; Lozano Terol et al., 2019). La cepa BL21 (DE3) es la más utilizada por la presencia del gen ARN polimerasa T7 logrando la expresión con esta bacteria comúnmente es empleando un plásmido pET (Agrawal et al., 2024; F. Du et al., 2021). Debido a lo anterior, diversos grupos de investigación han optado por la expresión de la CP del CCMV con este microorganismo.

Preferentemente se desea expresar y obtener la CP en la fracción soluble, puesto que, agiliza el proceso de purificación y evita la utilización de agentes caotrópicos, los cuales son empleados cuando las proteínas forman cuerpos de inclusión, forzando al reensamblaje para posteriormente seguir con la recuperación de las VLPs formadas por diferentes métodos como la precipitación con PEG (Phelps et al., 2007), cromatografía de exclusión de tamaño (Willits et al., 2003; Zhao et al., 1995) o mediante ultracentrifugación (Hassani-Mehraban et al., 2015). Así también, Díaz-Valle et al., (2015), dió a conocer la producción de la CP etiquetada con histidina en el extremo C-terminal presente en la fracción soluble, lo que facilitó la recuperación de la CP de manera selectiva utilizando cromatografía de afinidad a níquel.

Es necesario implementar estrategias que permitan brindar condiciones apropiadas para el crecimiento de microorganismos procariontes y eucariontes, en vista de que en el crecimiento realizado en matraces no se puede subministrar oxigeno constantemente, y por ende, conforme avanza el crecimiento la concentración de oxígeno disminuye (Takahashi et al., 2020). Además, parámetros como el pH tampoco pueden ser monitoreados y controlados, lo que causa un cambio metabólico al microorganismo (Jin & Kirk, 2018). Para superar estos inconvenientes, el crecimiento en biorreactores es una solución favorable, puesto que proporciona un ambiente idóneo para cada microorganismo, controlando parámetros

fundamentales, como temperatura, agitación, aireación, flujo, pH, suplementación de nutrientes en crecimiento de células en suspensión y su posible producción a gran escala (Jaibiba et al., 2020; Wang & Zhong, 2007). Por lo anterior, grupos de investigación han optado por la producción de la CP de CCMV en biorreactores de tanque agitado, con células procariotas y eucariotas.

Phelps et al., (2007), expresaron la CP de CCMV y obtuvieron VLPs de forma soluble en *Pseudonomas fluorescens* utilizando un biorreactor de taque agitado de 20L; la estrategia de purificación es similar a la empleada comúnmente en la extracción con plantas infectadas y el rendimiento obtenido fue de 2.6 g/L de CP. Este trabajo es el único hasta la actualidad donde emplean este microorganismo. *Pseudonomas fluorescens* es empleada para la producción de proteínas recombinantes por su capacidad de secretarlas al medio extracelular. Por otra parte, se cuenta con amplia información genética, por ende, da lugar a la utilización diversas las estrategias para la optimización de la producción (Retallack et al., 2012). Sin duda, nace la interrogante de conocer la facilidad para lograr reproducir el crecimiento y rendimientos similares en un volumen de crecimiento menor (matraz), y conocer si esta modificación no afectará los parámetros cinéticos que tenga el microorganismo para crecer óptimamente y producir la CP de CCMV en matraces o biorreactores de 1L de volumen nominal, lo cual es lo más accesible para la mayoría de los laboratorios.

La expresión de la CP de CCMV también se ha realizado en microorganismos eucariontes como *Pichia pastoris*, una levadura metilotrófica, que, por su rápido crecimiento y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales en el retículo endoplasmático, así como secretar las proteínas al medio extracelular, es utilizada para la producción de diversas proteínas recombinantes que requieran de modificaciones postraduccionales para ser funcionales(Karbalaei et al., 2020).

La expresión en *P. pastoris* produce CP soluble. De acuerdo con los trabajos reportados, la proteína se ha recuperado mediante gradientes de CsCl después de haber realizado la lisis de la levadura (Brumfield et al., 2004; Wu et al., 2011), obteniendo rendimientos de 0.05mg/g a 4.8 g/L, respectivamente. Por otra parte, Zhu et al., (2020) produjeron CP secretada por la levadura hacia el medio extracelular, lo cual evita la necesidad de la ruptura celular continuando con la obtención de la proteína etiquetadas con colas de histidinas por cromatografía de afinidad a Ni obteniendo un rendimiento de 95 mg/L.

Cada uno de los trabajos mencionados brinda información relevante acerca de los procesos de expresión y purificación de la CP soluble y además de que esta sea funcional, en un sistema de expresión accesible para toda la comunidad científica.

Organismo de Rendimient		Solubl	Producción y purificación	Referencia
expresión (cepa, o CPs vector)		е		
E. coli (Rosetta2, pET19b)25.92 mg/LSiRuptura afinidad de iones metálicos			Ruptura celular, cromatografía de afinidad de iones metálicos	(Díaz-Valle et al., 2015)
<i>E. coli</i> (BL21, pET23a)	75-100 mg/L	No	Ruptura celular, resolubilización con urea, cromatografía de exclusión de tamaño	(Zhao et al., 1995)
<i>E. coli</i> (BL21 (DE3), pET23a)	10 mg/L	No	Ruptura celular, resolubilización con urea, cromatografía de exclusión de tamaño	(Willits et al., 2003)
<i>E. coli</i> (BL21 (DE3), pET28a)	36-63 mg/L	No	Ruptura celular, desnaturalización con urea, reensamble por diálisis, colchón de sacarosa.	(Hassani-Mehraban et al., 2015)
Pseudomonas fluorescens (DC487, pDOW3250)	2.6 g/L	Si	Biorreactor 20L, disrupción celular, precipitación con PEG, gradiente de sacarosa	(Phelps et al., 2007)
Pichia pastoris (CN15349, pPICZA)	95 mg/L	Si	Sobrenadante secretado, cromatografía de afinidad a Ni	(Zhu et al., 2020)
Pichia pastoris (pPICZA)	0.05-0.5 mg/g	Si	Biorreactor 4L, ruptura celular, gradiente de CsCl	(Brumfield et al., 2004)
Pichia pastoris (GS115, pPICZA)	4.8 g/L	Si	Biorreactor 5L, ruptura celular, precipitación con PEG, gradiente de CsCl	(Wu et al., 2011)

1.2 Justificación

El propósito de esta investigación es obtener un sistema de expresión heterólogo que produzca la proteína de cápside del virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) sin etiquetas tal como histidinas, soluble y funcional, que posea la capacidad de autoensamblarse en cápsides virales "VLPs" con la finalidad de tener otra alternativa a la de su producción en plantas.

1.3 Hipótesis

La expresión recombinante de la proteína de cápside de CCMV en *E. coli* será producida en alto rendimiento y en forma soluble en forma de partículas tipo virus.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Producir la proteína de cápside de CCMV en un sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3) con alto rendimiento en forma de VLPs.

1.4.2 Objetivos específicos

Producir y estudiar la expresión de la proteína de cápside de CCMV en *E. coli* BL21 (DE3) utilizando matraces.

Producir y estudiar la expresión de la proteína de cápside de CCMV en *E. coli* BL21 (DE3) utilizando biorreactores.

Purificar y caracterizar las VLPs recombinantes de CCMV.

En esta sección se describe la metodología empleada para llevar a cabo la investigación, detallando los procesos, técnicas y herramientas utilizados para garantizar la precisión y reproducibilidad de cada experimento.

2.1 Transformación bacteriana

Las células competentes *E. coli* Bl21 (DE3) (One Shot[®] BL21 DE3 Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific: C6000-03) fueron transformadas con el plásmido pSB1C3-Bba_K883001 donado cordialmente por el Dr. Kees Van Ark (Laboratory of Microbiology, Wageningen UR, Nethelands). Este plásmido codifica la proteína de cápside de CCMV (número de acceso GeneBank NP_613277.1) bajo el promotor Lac, expresando el gen de resistencia a cloranfenicol (Chol), como se muestra en la Figura 1. En primera instancia, se generó un banco de células de trabajo con una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 1 unidad de absorbancia (UA) en alícuotas de 1 mL con 40% de glicerol. Estas células fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.



Figura 1. Mapa del plásmido pSB1C3-BBa_K883001 empleado para la transformación bacteriana que codifica el gen de la proteína de cápside de CCMV, CamR; cloranfenicol acetiltransferasa que brinda resistencia al cloranfenicol a las bacterias, pMB1; el origen de replicación es un pMB1 derivado de pUCB19.

2.2 Medios y condiciones de cultivo

Se utilizó el medio LB compuesto por (g/L): 10.0, triptona; 5.0, extracto de levadura; 10.0 NaCl. También se empleó el medio mineral modificado (MMM) reportado por Restrepo-Pineda et al., (2019), compuesto por (g/L): 4.0, (NH₄)₂HPO₄; 13.3, KH₂PO₄; 1.7, ácido cítrico; 1.2, MgSO₄·7H₂O;0.045, tiamina; 17.5, glucosa; 3.0 casaminoácidos y 2 mL de solución de oligoelementos. La solución concentrada (500X) de oligoelementos contenía (g/L): 100.8, Fe-(III); 32.0, ZnSO₄·2H₂O; 15.0, MnCl₂·4H₂O; 3.0, H₃BO₃; 14.1, EDTA; 2.5, CoCl₂·₆H₂O; 2.1, NaMoO₄·2H₂O. La solución de glucosa, MgSO₄·7H₂O y los oligoelementos se esterilizaron por separado del medio de cultivo en autoclave. En cuanto las soluciones de tiamina, casaminoácidos y el antibiótico cloranifenicol (34 mg/mL) se esterilizaron empleando filtros con un tamaño de poro de 0.22 μm (Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) (Restrepo-Pineda et al., 2022). Ambos medios se ajustaron a pH de 7.2.

Se realizó un precultivo con 3 mL de LB y 1 mL de células provenientes del banco previamente congelado. El cultivo contenía cloranfenicol (34 μ g/mL) y se creció a temperatura ambiente hasta obtener una OD₆₀₀ de 0.7. Una vez alcanzada dicha densidad óptica se adicionó 1 mL a 50 mL de LB con 34 μ g/mL de Chol en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se cultivó a 37 °C y 180 rpm. Alcanzada una OD₆₀₀ de 1, se indujo con 0.1 mM de IPTG. El crecimiento se detuvo hasta las 23 h, realizando muestreos de 1 mL antes de inducir, 3 h después de inducir y tiempo final. El cultivo final se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min en una centrifuga ThermoFisher, modelo Heraeus Multifuge X1R. El sobrenadante se descartó y la pastilla celular se guardó a -20 °C.

Para el cultivo en biorreactor con MMM, se inició preparando un preinóculo adicionando 1 mL del banco de células en 50 mL de MMM con 34 µg/mL Chol en matraz Erlenmeyer de 250 mL. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente sin agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1.5. El cultivo (50 mL) se utilizó para inocular 800 mL de MMM en un biorreactor de vidrio agitado (volumen nominal de 1.2 L) con dos turbinas Rushton estándar y una camisa de calentamiento (Applikon Biotechnology, Países Bajos) (Restrepo-Pineda et al., 2022).El crecimiento se realizó a 37 °C y la tensión de oxígeno disuelto se controló al 30% con una agitación de 250-350 rpm y una velocidad de flujo de aire constante. El pH se controló a 7.2 ± 0.2 adicionando NaOH 2M y HCl 2M, determinada por el software BioXpert[®]. La inducción con 0.1 mM de IPTG se realizó a una OD₆₀₀ de 4 UA. El crecimiento se detuvo hasta las 23 h, realizando muestreos de 1 mL antes de inducir, 3 h después de inducir y tiempo final. El cultivo final se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min empleando un rotor JA-14 en una centrifuga Beckman, modelo JXN-26. El sobrenadante se descartó y la pastilla celular se guardó a -20 °C.

Para poder comparar la influencia que tiene el crecimiento celular en un biorreactor se realizó una réplica en matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo; en este cultivo no se controló el pH. Estos tres crecimientos se realizaron por triplicado para asegurar su reproducibilidad.

2.3 Cuantificación de glucosa y acetato

Previamente, los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0.22 μm. La concentración de glucosa se determinó con el analizador automatizado Y15 (Biosystems, Barcelona, España). Las concentraciones de ácidos orgánicos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Kioto, Japón) empleando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm; 9μm de diámetro interno, Biorad, EE. UU.). Como fase móvil se empleó 4 mM H₂SO₄ con un flujo de 0.6 mL/min a 50 °C (software LC Solutions v1.25 Shimadzu, Japón). Para la obtención de la curva de calibración se utilizó el estándar de ácidos orgánicos utilizando las mismas condiciones (catálogo n.º 125-0586, Biorad, EE. UU.) (Valdez-Cruz et al., 2017).

2.4 Cuantificación de proteína celular

La biomasa obtenida de los muestreos de 1 mL se resuspendieron en 300 µL buffer de lisis (50 mM HCl-Tris, 1 mM EDTA, 100mM NaCl, pH 7.5) con 1 mM de PMSF (Merck-Sigma, USA). El homogenizado se lisó utilizando un sonicador Ultrasonicator YM-1000Y (Lanphan, CHN) con punta chica para volúmenes hasta 3 mL empleando 30% de intensidad durante 2 min con 9.9 s de aplicación y descanso, en hielo.

Para obtener la fracción soluble e insoluble, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C. La fracción insoluble se homogenizó en el mismo volumen con agua desionizada. Con el propósito de analizar las muestras de proteína total e insoluble estas se solubilizaron en buffer de enfoque isoeléctrico (IEF; 7 M urea, 2 M tiourea, 1% (p/v) Tween-20, 40 mM DTT) (Restrepo-Pineda et al., 2019; Valdez-Cruz et al., 2017), por al menos 12 h a temperatura ambiente con agitación rotativa constante.

La concentración de proteína total y soluble se determinó por el ensayo Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración de las muestras (proteína total y soluble) se determinó mediante curvas de calibración con albúmina sérica bovina (BSA, Merck-Sigma, USA) midiendo a una OD₅₉₅ por triplicado en placas de 96 pocillos en un lector de microplacas Multiskan GO (ThermoFisher Scientific Inc).

Para el análisis de la producción de CP-CCMV en las fracciones soluble e insoluble se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 15% (SDS-PAGE), cargando 15 μL de muestra en cada carril, teñido con azul brillante de Comassie R-250 (Bio-Rad, EE.UU.). La concentración de CP-CCMV se determinó por densitometría empleando el software ImageJ (https://imagej.net/ij/).

2.5 Purificación de las VLPs de CCMV

Se resuspendieron de 0.5 g de biomasa húmeda, resultante de la fermentación en biorreactor, con 10 mL de buffer de lisis. Posteriormente se lisó por ultrasonicación con una intensidad del 30% durante 10 min (9.9 s de aplicación y 9.9 s de descanso) en hielo. La purificación de las VLPs se realizó de la fracción soluble, por lo cual el lisado celular se centrifugó a 4,800 rpm durante 50 min a 4 °C en una centrifuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo-Fisher Scientific). Este proceso se repitió 2 veces, posteriormente se agregó 500 mM de NaCl y 10% (p/v) de PEG6000 y se mantuvo en agitación durante 12 h a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C, y el pellet resultante se resuspendió en 10 mL de buffer de acetatos (8 mM Mg(OAc)₂, 50 mM NaOAc). A partir de este punto se realizaron dos metodologías: la primera consistió en la utilización de un colchón de sacarosa y la segunda en filtrar mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC).

Para la primera metodología, la muestra fue ultracentrifugada a través de un colchón de sacarosa al 10%, a 32,000 rpm durante 2 h, a 4°C en un rotor de ángulo variable SW-32 Ti utilizando una ultracentrífuga Bekman modelo Optima XPN-100. La pastilla resultante se resuspendió en 500 μL de buffer de acetatos.

Para la segunda metodología, la muestra fue filtrada utilizando filtros celulosa de 0.45 y 0.22 μm secuencialmente. La muestra previamente filtrada se concentró hasta un volumen de 2 mL empleando el sistema concentrador Amicon a una presión de 25 psi y una membrana de celulosa de 10 kDa (25 mm). Las VPLs de CCMV se purificaron por medio de un FPLC ÄKTA prime plus (GE Healthcare) empleando una columna de filtración en gel HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare) equilibrada con buffer de

acetatos. La muestra fue inyectada a la columna con un flujo de 0.3 mL/min con un límite de presión de 0.5 MPa. Las fracciones correspondientes a la elución de las VLPs fueron recolectadas y colocadas en un colchón de sacarosa al 10% centrifugando a 34,000 rpm durante 2 horas a 4 °C utilizando un rotor de ángulo variable modelo SW 41 Ti en una ultracentrífuga Beckman modelo Optima XPN-100. La pastilla resultante se resuspendió en 500 μL de buffer de acetatos.

2.6 Caracterización de VLPs de CCMV

Las VLPs resultantes se analizaron por medio de dispersión dinámica de luz (DLS) en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern) para determinar su diámetro hidrodinámico. Se colocaron 100 µL de la muestra en una microcelda y cada medición se realizó por triplicado.

La integridad y morfología de las VLPs se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con un microscopio Hitachi 7500. Las muestras de VLPs (5 µL) se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono (400 mesh, Ted Pella) y el exceso de la muestra fue retirado. Posteriormente se colocó acetato de uranilo al 2% durante 60 segundos para teñir las VLPs. El exceso de acetato de uranilo se retiró con papel filtro Whatman No.2. Las muestras se almacenaron en un desecador para su posterior análisis por medio de TEM.

3.1 Crecimiento bacteriano y parámetros cinéticos del cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) productora de CP de CCMV

La cinértica de crecimiento bacteriano se realizó con dos diferentes medios de cultivo (LB y MMM) y en dos diferentes sistemas de crecimiento (matraz y biorreactor) mostrados en la Figura 2. El crecimiento en matraces con medio LB (50 mL) se inició con un pH de 7.2 a 37 °C y una agitación de 180 rpm. Una vez alcanzada la OD₆₀₀ de 0.7 UA, se procedió a inducir con 0.1 mM de IPTG (Figura 2). La concentración máxima de biomasa celular (X_{max}) fue de 1.49 ± 0.01 g/L y presentando una tasa de crecimiento especifica (μ) de 1.24 ± 0.05 h⁻¹ (Tabla 2). Las condiciones iniciales de crecimiento bacteriano en matraces con MMM fueron idénticas a las anteriormente mencionadas, con la diferencia que la inducción se realizó hasta obtenidas 4 UA (~7 h), obteniendo una X_{max} de 1.50 ± 0.07 g/L y mostrando una μ de 0.83 ± 0.04 h⁻¹ (Figura 2, Tabla 2). El crecimiento realizado en biorreactor con MMM se inició con un preinoculo de 1.5 UA. La inducción se realizó a las 4 UA (~4 h), al término del crecimiento se obtuvo una X_{max} de 4.20 ± 0.32 g/L y presentó una μ de 0.95 ± 0.06 h⁻¹ (Figura 2, Tabla 2).



Figura 2. Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) productora de CP de CCMV. El crecimiento en matraces con medio LB (círculos) y MMM (cuadrados), y crecimiento en biorreactor con MMM (triángulos). La inducción se realizó a 0.7 UA en el crecimiento con LB (línea de puntos) y a 4 UA en los crecimientos con MMM (línea de trazos).

El pH de los cultivos en matraces fue determinado con el potenciómetro (Jenway). En el cultivo en matraces con medio LB se observó una acidificación gradual del medio con un pH de 5.35 ± 0.03 a las 8 h de crecimiento. A continuación, el pH del medio comenzó a alcalinizarse mostrando un pH de 8.91 ± 0.04 (Figura 3, Tabla 2) a las 23 horas.

En cuanto al crecimiento en matraces con MMM, se observó una inclinación clara hacia la acidificación del medio con un pH de 5.19 al término del crecimiento (Figura 3, Tabla 2). Por otro lado, el biorreactor se mantuvo constante a un pH de 7.2 debido a la adición controlada de NaOH (2 M) y HCl (2 M) determinada por el software BioXpert[®] (Figura 3).



Figura 3. Valores de pH durante el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) durante la producción CP de CCMV. El pH fue monitoreado en los matraces con LB (círculos), MMM (cuadrados) y en el biorreactor con MMM (triángulos).

Se determinó la concentración de glucosa con respecto al tiempo únicamente en los cultivos con MMM debido a la alta presencia de glucosa en su composición. Por otra parte, se omitió la medición de glucosa en el cultivo con medio LB debido a su baja o nula presencia. En el cultivo de matraces se observó una constante captación de la glucosa por parte del microorganismo hasta las 9 h de crecimiento, tiempo después, la glucosa ya no fue consumida por el microorganismo permaneciendo en el medio hasta la finalización del crecimiento (Figura 4).

Se reporta un consumo del 54.97 \pm 2.45 % (Tabla 2). Por el contrario, en el biorreactor la glucosa fue consumida en su totalidad a las 8 h de iniciado el crecimiento. Los rendimientos de biomasa por glucosa

 $(Y_{x/s})$ calculados en el crecimiento de matraces y biorreactores fue de 0.16 ± 0.003 y 0.24 ± 0.02, respectivamente, siendo 33% mayor el rendimiento del cultivo de biorreactor (Figura 4, Tabla 2).



Figura 4. Consumo de glucosa en cultivos en matraces (cuadrados) y biorreactor con MMM (triángulos).

La producción máxima de acetato en matraz (7.80 \pm 1.99 g/L) se detectó al término del cultivo, mientras que en el biorreactor la acumulación máxima (9.6 g/L) se produjo a las 8h de cultivo (Figura5, Tabla 2). Solo en el biorreactor el acetato fue consumido gradualmente durante la fase estacionaria, al finalizar el cultivo el acetato fue consumido totalmente (Figura 5).



Figura 5. Producción de acetato en matraces (cuadrados) y biorreactor con MMM (triángulos).

Parámetros	Matraz (LB)	Matraz (MMM)	Biorreactor (MMM)
μ (h ⁻¹)	1.24 ± 0.05	0.835 ± 0.04	0.948 ± 0.06
X _{max} (g/L)	1.49 ± 0.01	1.50 ± 0.07	4.20 ± 0.32
23 h (U.A)	4.02 ± 0.03	4.06 ± 0.18	11.35 ± 0.86
Glucosa consumida (%)	-	54.97 ± 2.45	100
Y _{x/s} (g _{DWC} /g _{Glu})	-	0.16 ± 0.003	0.24 ± 0.02
Acetato _{max} (g/L)	-	7.80 ± 1.99	9.6*
pH final	8.91 ± 0.04	5.19*	7.2
CP CCMV (mg/L)	14.03 ± 2.80	5.53 ± 0.59	103.07 ± 32.35
Y _{CP CCMV} (mg _{CP CCMV} /L)	-	-	4.26 ± 1.33

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) productora de CP de CCMV. Se realizó en matraces (LB, MMM) y biorreactores (MMM).

*No triplicado, solo una medición experimental.

3.2 Expresión de CP de CCMV en E. coli BL21 (DE3)

La expresión se llevó a cabo en cultivos en matraces con medio LB (Figura 6A, C) y MMM (Figura 6B, D) induciendo con 0.1 mM IPTG a una OD_{600} de 1 (~1h) y 4 (~7 h), respectivamente.

Se realizó el análisis de la expresión mediante la visualización por SDS-PAGE, en el gel se aprecian los extractos de cultivos por triplicado de las muestras previo a la inducción (Carril 1-3), 3 horas después de la inducción (Carril 4-6) y tiempo final del cultivo (Carril 8-10).

Únicamente se realizó la cuantificación por el método de Bradford de la proteína soluble del tiempo final obtenida después de la lisis celular y una separación por centrifugación (13,300 rpm durante 15 min).

La concentración de proteína soluble en medio LB fue de $350.53 \pm 84.49 \text{ mg/L}$ (Figura 6A) y en MMM de $113.84 \pm 15.73 \text{ mg/L}$ (Figura 6B), equivaliendo a una tercera parte de lo obtenido con medio LB. Con respecto a la proteína insoluble, es apreciable una concentración mayor (no cuantificada) en los cultivos con LB (Figura 6C) y MMM (Figura 6D), pero debido a la complejidad que implica la recuperación de la proteína de interés se decidió prescindir de ella al menos para este trabajo.



Figura 6. Análisis de la expresión de la CP del CCMV en *E. coli* mediante geles de electroforesis SDS-PAGE al 12%. Proteína soluble (A, B) e insoluble (C, D) del cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) en matraces con medio LB (geles hacia la izquierda) y MMM (geles hacia la derecha) por triplicado. Carriles 1, 2, 3: antes de inducir; Carriles 4, 5, 6: 3 h después de inducir; Carril kDa: marcador de peso molecular; Carriles 8, 9, 10: tiempo final. La flecha roja en los geles indica la CP del CCMV.

El contenido de proteína soluble total resultante de los cultivos en biorreactores con MMM fue de 806.99 \pm 170.17 mg/L (Figura 7A). La proteína insoluble no fue contemplada para la recuperación de la proteína de interés (Figura 7B), pero se pudo visualizar una gran cantidad de CP de CCMV. Lo anterior impulsará a futuros trabajos que tengan como objetivo la recuperación de la CP de CCMV a partir de este material insoluble.

El análisis por densitometría en los geles mostrados anteriormente nos permitió estimar la producción de la CP soluble de CCMV (Figura 7C, Tabla 2), obteniendo la mayor producción en los cultivos realizados en biorreactor (103 \pm 32 mg/L) en comparación con los cultivos en matraces con medio LB (14.03 \pm 2.80 mg/L) y MMM (5.53 \pm 0.59 mg/L).

Los resultados anteriores nos demuestran la gran relevancia que se obtiene al realizar el cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) productora de CP de CCMVV en biorreactores de tanque agitado y empleando MMM.



Figura 7. Análisis de proteína soluble (A) e insoluble (B) del cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) en biorreactores con MMM y concentración de CP de CCMV soluble. Carril 1, 5: antes de inducir; Carril 2, 6: 3 h después de inducir; Carril kDa: marcador de peso molecular; Carril 3, 7: tiempo final.

3.3 Purificación y caracterización de VLPs de CCMV

La purificación de VPLs recombinantes de CCMV comenzó con la proteína soluble total obtenida. Después de la ruptura celular, se agregaron 10% PEG6000 y 500 mM NaCl con la finalidad de formar las partículas y precipitarlas.

En la muestra se observarón dos rangos de partículas que se encuentran entre los 20 a 100 nm y 400 a 1000 nm, siendo el primer rango el cual mostró una mayor abundancia en la muestra (Figura 10A).

Como resultado de la primera metodología para la purificación de las VLPs, se obtuvieron partículas en un rango de 25 a 32 nm de diametro y superiores a los 400 nm (Figura 8A). Ambas estructuras fueron observadas; las primeras mostraron una morfología esférica, mientras que las más grandes presentaron formas de bastones (Figura 8B).



Figura 8. Purificación de VLPs de CCMV empleando colchón de sacarosa 10%. Análisis por DLS (A) y TEM (B).

Para la segunda purificación se tomó como muestra control CCMV nativo previamente purificado de plantas de caupí infectadas, y se pasó a través da la columna de cromatografía de filtración en gel (Figura 9A). El virus comenzó a eluir aproximadamente a los 70 mL, las fracciones fueron recolectadas y analizadas por DLS y TEM (Figura 9B y 9C, respectivamente) mostrando un diámetro de 30 ± 6.9 nm.

Para la purificación de las VLPs recombinantes la muestra resultante de laa precipitación con PEG6000 y NaCl (Figura 10A) fue concentrada y posteriormente inyectada al FPLC, el cromatograma resultante se deconvolucionó mostrando dos poblaciones de partículas siendo la población 1 la que se asemeja al cromatograma del virus nativo (Figura 9A) debido a que estas partículas eluyen a los 65 mL (Figura 10B).



Figura 9. Purificación de CCMV nativo mediante cromatografía de filtración en gel. Cromatograma de la inyección de la muestra (A), su caracterización por DLS (B) y visualización por TEM (C).

Las fracciones presentaron un tamaño similar (Anexo A), por lo anterior se unieron, obteniendo un diámetro de 30.7 ± 7.3 nm (Figura 10C). El análisis por SDS-PAGE permite visualizar el proceso de purificación partiendo con la lisis celular, las fases resultantes de la precipitación con 10% PEG y 500 mM NaCl evidencian que este paso permite precipitar las partículas, pero, las filtraciones presentaron una perdida considerable de la muestra (Figura 10D). Las partículas fueron concentradas por ultracentrifugación y posteriormente se analizó por SDS-PAGE, mostrando una pureza del 99% libre de otras proteínas (Figura 10E). El rendimiento determinado por densitometría de CP soluble recombinante de VLPs de CCMV purificadas es de 4.26 ± 1.33 mg_{CP CCMV}/L determinado por densitometría (Tabla 2). La visualización por TEM nos mostró la presencia únicamente de partículas con una morfología esférica de 27. 92 ± 3.18 nm (Figura 10F, G).



Figura 10. Purificación de VLPs recombinantes de CCMV mediante cromatografía de filtración en gel. DLS de VLPs de CCMV después de la precipitación con PEG6000 y NaCl (A), análisis del cromatograma por deconvolución de la muestra inyectada al FPLC, y su caracterización por DLS (C). SDS-PAGE de la purificación (D). Carril 1: sobrenadante de lisis celular; Carriles 2 y 3: sobrenadante y pellet, respectivamente después de la precipitación con PEG; Carriles 4 y 5, filtración por 0.45 y 0.22 μm, respectivamente. SDS-PAGE de CCMV (E). Carril 1: CP de CCMV recombinante después de FPLC; Carril 2: CCMV nativo; kDA: marcador de peso molecular. Histograma (F) y visualización por TEM de VLPs recombinantes (G).

Los biorreactores proporcionan grandes ventajas para el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) y la producción con un alto rendimiento de la proteína de cápside de CCMV en comparación a cuando son utilizados matraces. Lo anterior se atribuye al control de parámetros que no pueden ser regulados en matraces como el pH, suministración de oxígeno, distribución homogénea de células y nutrientes, lo que permite una mejor distribución de nutrientes y su asimilación por parte del microorganismo (Soini et al., 2008; Suzuki et al., 2006). Esto permitió obtener aproximadamente tres veces más biomasa al utilizar biorreactores en comparación con los cultivos en matraces (Figura 2). En los cultivos donde fue utilizado MMM la principal fuente de carbono fue glucosa (17.5 g/L), en donde el cultivo realizado en matraz no fue consumida en su totalidad, en comparación con el consumo total observado en el biorreactor, debido a que las limitaciones de oxígeno y cambios en el pH afecta el consumo de glucosa al no ser oxidada completamente y por ello el crecimiento del microorganismo es diferente en ambos sistemas (O'Beirne & Hamer, 2000).

Con respecto a la producción, acumulación extracelular y consumo del acetato en cultivos con matraces y biorreactores, se observaron situaciones diferentes. Cabe mencionar que el acetato es un subproducto del metabolismo resultante del consumo de la glucosa en un ambiente aeróbico, su producción se debe a 1) una deficiencia de oxígeno disuelto en el medio (fermentación ácida mixta) dando como resultado una baja oxidación de la glucosa propiciando un metabolismo parcialmente anaeróbico al convertir la glucosa en acetato (Bafna-Rührer et al., 2024; De Mey et al., 2007) y 2) un desbordamiento metabólico provocado por el exceso de glucosa acompañado por un desequilibrio de la producción y asimilación de acetil-CoA (Millard et al., 2021).

La acumulación y falta consumo del acetato afecta la producción de proteínas recombinantes y en el crecimiento microbiano (De Mey et al., 2007). Se han reportado dos vías de consumo del acetato para su conversión a acetil-CoA, la vía catalizada por la acetil-CoA sintetasa irreversible de alta afinidad formadora de AMP (Acs) y la vía reversible Pta-AckA, siendo la primera vía mencionada la que presenta mayor asimilación de acetato y la cual únicamente se activa en ausencia de glucosa (Enjalbert et al., 2017; Xu et al., 2017). En el cultivo en biorreactores la glucosa es consumida totalmente a las 8h del cultivo (Figura 4) y en este mismo tiempo se observó la mayor producción de acetato (9.6 g/L). En las próximas horas el acetato extracelular fue consumido en su totalidad (Figura 5) muy posiblemente a través de la vía Acs, debido a la ausencia de glucosa. Caso contrario al cultivo en matraces con MMM donde la glucosa no fue consumida totalmente (54.97% consumida) debido a la falta de oxígeno disuelto en el medio, provocando

la acumulación de acetato y, por ende, la acidificación de este, afectando el crecimiento del microorganismo y la producción de la proteína de cápside. Lo anterior se ve reflejado en los rendimientos obtenidos (Tabla 2, Figura 6C).

Algo interesante fue el comportamiento del pH en los diferentes medios en matraces (LB y MMM, Tabla 2) que depende de la fuente principal de nutrientes (Figura 2), ya que, el cultivo con LB mostró una acidificación (pH 5.2) hasta las 8 h y posteriormente el pH se volvió alcalino (pH 8.9). La principal fuente de carbono presente en el medio LB son los aminoácidos (AAs) que componen a los oligopéptidos presentes en el extracto de levadura y triptona. El catabolismo de los AAs produce amonio y su acumulación alcaliniza el medio (Tabla 2) (Sezonov et al., 2007; Zarkan et al., 2019). Por otro lado, los medios que contienen una gran cantidad de glucosa tienen a acidificarse al ser consumida derivando a la producción de acetato (Sánchez-Clemente et al., 2018).

La concentración de proteína soluble total al final de los cultivos en matraz LB y MMM fue de 350.5 ± 84.5 mg/L y 113.8 ± 15.7 mg/L, respectivamente. Esta diferencia se atribuye al estado en el cual se encontraba el microorganismo al momento de realizar la inducción. En medio LB se indujo a 1 UA (~3 h) en plena fase exponencial, mientras que en MMM se realizó a 4 UA (~7 h) cuando la bacteria se encontraba en la fase estacionaria. La disminución de la concentración de proteína total con respecto al tiempo se atribuye al canibalismo efectuado entre las bacterias (Morimatsu et al., 2019; Rozen et al., 2009). La alta producción de la CP de CCMV soluble en los biorreactores fue notable (103 ± 32.4 mg/L, ver Tabla 2) comparada a los cultivos realizados en matraces, resaltado las virtudes que proporciona el crecimiento en biorreactores donde los parámetros son controlados (pH, oxígeno disuelto, temperatura, agitación).

El proceso de purificación de una proteína es esencial para su utilización en diversas aplicaciones dentro de la investigación. Por ello, se utilizan procedimientos secuenciales con la finalidad de obtener una muestra relativamente pura. La purificación del CCMV extraído de plantas infectadas se realiza mayoritariamente mediante ultracentrifugación en colchones de sacarosa, con la finalidad de obtener los viriones en función de su tamaño y velocidad de sedimentación, para posteriormente desensamblar el virión retirando el material genético de su interior y de esta forma purificar la CP de CCMV (Ramirez-Acosta et al., 2024).

En primera instancia, en el intento de purificación mediante ultracentrifugación con colchones de sacarosa se obtuvieron VPLs del tamaño esperado (Figura 8A), sin embargo, también se observaron estructuras tubulares de un tamaño superior (Figura 8B), las cuales suelen formarse en el reensamblaje de la CP de CCMV en condiciones de fuerza iónica, pH, temperatura y concentraciones específicas de la proteína, con un tamaño que va desde los 70 hasta los 900 nm (Durán-Meza et al., 2020; Lavelle et al., 2009b). Puesto que no se logró la pureza deseada se buscaron nuevas estrategias, lo que llevó a la utilización de la técnica de cromatografía de exclusión de tamaño, permitiéndonos obtener VLPs de CCMV recombinantes. Se determinó el tiempo de elución del virus nativo (Figura 9A) y se tomó este dato como referencia para la recuperación de las VLPs recombinantes. Se notó en el cromatograma un pico con poca definición, por lo cual se realizó la deconvolución del mismo apreciando dos poblaciones, en donde la población 1 mostró mayor similitud con el cromatograma del virus nativo (Figura 10B). La diferencia en los tiempos de elución con respecto al control se puede atribuir a las propiedades de la CP de CCMV en los extremos N y C terminal (Annamalai et al., 2005; Konecny et al., 2006) al interaccionar con una gran cantidad de moléculas presentes en la muestra, lo que puede aumentar su peso molecular y, por ende, variaciones en los tiempos de elución. Ambas poblaciones mostraron un tamaño similar (Anexo 1), por lo anterior se mezclaron y se apreciaron morfologías esféricas (Figura 10). Sin duda los procesos de purificación conllevan a la perdida gradual de la proteína recombinante(Du et al., 2022), sin embargo, al final de esta metodología se obtuvo una alta pureza (Figura 10 D, E) cumpliendo con el propósito de este proyecto.

Se logró producir la proteína de cápside soluble de CCMV en un sistema heterólogo *E. coli* BL21 (DE3) en matraces con medio LB y MMM, además se escaló la producción de la proteína al realizar el cultivo en biorreactores de tanque agitado. El método de purificación favoreció la formación y estabilidad de las VPLs de CCMV logrando la separación de las partículas mediante la cromatografía de filtración en gel, sin la necesidad de un etiquetamiento con histidina. Las VLPs obtenidas muestran el tamaño y la morfología similares al virus nativo, abriendo la posibilidad de su utilización en investigaciones biomédicas y biotecnológicas.

La producción de CP de CCMV es competitiva con la reportada por otros grupos de investigación, sin embargo, es necesario buscar alternativas para mejorar el rendimiento de la purificación de las VLPs. Cabe mencionar que, la CP de CCMV que se encuentra en la fracción insoluble, muy posiblemente agregada y formando cuerpos de inclusión supera por al menos 4 veces la CP de CCMV soluble, incentivando a formular estrategias que permitan su recuperación en un futuro.

Literatura citada

- Agrawal, S., Padmaswari, M. H., Stokes, A. L., Maxenberger, D., Reese, M., Khalil, A., & Nelson, C. E. (2024). Optimizing Recombinant Cas9 Expression: Insights from E. coli BL21(DE3) Strains for Enhanced Protein Purification and Genome Editing. *Biomedicines*, *12*(6), 1226. <u>https://doi.org/10.3390/biomedicines12061226</u>
- Ali, A., & Roossinck, M. J. (2007). Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 84–86. <u>https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.038</u>
- Annamalai, P., Apte, S., Wilkens, S., & Rao, A. L. N. (2005). Deletion of Highly Conserved Arginine-Rich RNA Binding Motif in Cowpea Chlorotic Mottle Virus Capsid Protein Results in Virion Structural Alterations and RNA Packaging Constraints. *Journal of Virology*, 79(6), 3277–3288. <u>https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3277-3288.2005</u>
- Arauzo-Aguilera, K., Buscajoni, L., Koch, K., Thompson, G., Robinson, C., & Berkemeyer, M. (2023). Yields and product comparison between Escherichia coli BL21 and W3110 in industrially relevant conditions: anti-c-Met scFv as a case study. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 104. https://doi.org/10.1186/s12934-023-02111-4
- Azizgolshani, O., Garmann, R. F., Cadena-Nava, R., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2013). Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 441(1), 12–17. <u>https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.001</u>
- Bafna-Rührer, J., Orth, J. V., & Sudarsan, S. (2024). Combined oxygen and glucose oscillations distinctly change the transcriptional and physiological state of Escherichia coli. *Microbial Biotechnology*, 17(11). <u>https://doi.org/10.1111/1751-7915.70051</u>
- Brumfield, S., Willits, D., Tang, L., Johnson, J. E., Douglas, T., & Young, M. (2004). Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *Journal of General Virology*, 85(4), 1049– 1053. <u>https://doi.org/10.1099/vir.0.19688-0</u>
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, *86*(6), 3318–3326. https://doi.org/10.1128/JVI.06566-11
- Caldeira, J. do C., Medford, A., Kines, R. C., Lino, C. A., Schiller, J. T., Chackerian, B., & Peabody, D. S. (2010). Immunogenic display of diverse peptides, including a broadly cross-type neutralizing human papillomavirus L2 epitope, on virus-like particles of the RNA bacteriophage PP7. *Vaccine*, *28*(27), 4384–4393. <u>https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.049</u>
- Cheng, X., Xie, Q., & Sun, Y. (2023). Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1177151

- De Mey, M., De Maeseneire, S., Soetaert, W., & Vandamme, E. (2007). Minimizing acetate formation in E. coli fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *34*(11), 689–700. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0244-2
- Díaz-Valle, A., García-Salcedo, Y. M., Chávez-Calvillo, G., Silva-Rosales, L., & Carrillo-Tripp, M. (2015). Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble Cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and in vitro pH-dependent assembly of virus-like particles. *Journal of Virological Methods*, 225, 23–29. <u>https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.023</u>
- Du, F., Liu, Y.-Q., Xu, Y.-S., Li, Z.-J., Wang, Y.-Z., Zhang, Z.-X., & Sun, X.-M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 189. <u>https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6</u>
- Du, M., Hou, Z., Liu, L., Xuan, Y., Chen, X., Fan, L., Li, Z., & Xu, B. (2022). 1Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <u>https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691</u>
- Durán-Meza, A. L., Escamilla-Ruiz, M. I., Segovia-González, X. F., Villagrana-Escareño, M. V., Vega-Acosta, J. R., & Ruiz-Garcia, J. (2020). Encapsidation of Different Plasmonic Gold Nanoparticles by the CCMV CP. *Molecules*, 25(11), 2628. <u>https://doi.org/10.3390/molecules25112628</u>
- Enjalbert, B., Millard, P., Dinclaux, M., Portais, J.-C., & Létisse, F. (2017). Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 42135. <u>https://doi.org/10.1038/srep42135</u>
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. *The Protein Journal*, 32(6), 419–425. <u>https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5</u>
- Grgacic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65. <u>https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018</u>
- Gupta, R., Arora, K., Roy, S. S., Joseph, A., Rastogi, R., Arora, N. M., & Kundu, P. K. (2023). Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Frontiers in Immunology*, 14. <u>https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123805</u>
- Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., Swaroop, S., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2022). Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications. In *Nanomaterials* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <u>https://doi.org/10.3390/nano12030457</u>
- Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., van Heereveld, L., & Kormelink, R. (2015). Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC Biotechnology*, 15(1), 80. <u>https://doi.org/10.1186/s12896-015-0180-6</u>
- Hu, H., & Steinmetz, N. F. (2020). Cisplatin Prodrug-Loaded Nanoparticles Based on Physalis Mottle Virus for Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 17(12), 4629–4636. <u>https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00834</u>
- Jaibiba, P., Naga Vignesh, S., & Hariharan, S. (2020). Working principle of typical bioreactors. In *Bioreactors* (pp. 145–173). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00010-3</u>

- Jin, Q., & Kirk, M. F. (2018). pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6. <u>https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021</u>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867–5881. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.29583</u>
- Katagiri, F., Canelon-Suarez, D., Griffin, K., Petersen, J., Meyer, R. K., Siegle, M., & Mase, K. (2015). Design and Construction of an Inexpensive Homemade Plant Growth Chamber. *PLOS ONE*, 10(5), e0126826. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126826</u>
- Konecny, R., Trylska, J., Tama, F., Zhang, D., Baker, N. A., Brooks, C. L., & McCammon, J. A. (2006). Electrostatic properties of cowpea chlorotic mottle virus and cucumber mosaic virus capsids. *Biopolymers*, 82(2), 106–120. <u>https://doi.org/10.1002/bip.20409</u>
- Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., Cadena-Nava, R. D., Vega-Acosta, J. R., Pinedo-Torres, L. A., & Ruiz-Garcia, J. (2009a). Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), 3813–3819. <u>https://doi.org/10.1021/jp8079765</u>
- Lavelle, L., Gingery, M., Phillips, M., Gelbart, W. M., Knobler, C. M., Cadena-Nava, R. D., Vega-Acosta, J. R., Pinedo-Torres, L. A., & Ruiz-Garcia, J. (2009b). Phase Diagram of Self-assembled Viral Capsid Protein Polymorphs. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), 3813–3819. https://doi.org/10.1021/jp8079765
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2019). Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using E. coli BL21 acetate metabolism knockout strains. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 151. <u>https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1</u>
- Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2022). Viruslike Particles: Fundamentals and Biomedical Applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 15). MDPI. <u>https://doi.org/10.3390/ijms23158579</u>
- Messelink, G. J., Lambion, J., Janssen, A., & van Rijn, P. C. J. (2021). Biodiversity in and around Greenhouses: Benefits and Potential Risks for Pest Management. *Insects*, *12*(10), 933. <u>https://doi.org/10.3390/insects12100933</u>
- Millard, P., Enjalbert, B., Uttenweiler-Joseph, S., Portais, J.-C., & Létisse, F. (2021). Control and regulation of acetate overflow in Escherichia coli. *ELife*, 10. <u>https://doi.org/10.7554/eLife.63661</u>
- Morimatsu, K., Inaoka, T., Nakaura, Y., & Yamamoto, K. (2019). Injury and Recovery of Escherichia coli Cells in Phosphate-buffered Saline after High Hydrostatic Pressure TreatmentInjury and Recovery of Escherichia coli Cells in Phosphate-buffered Saline after High Hydrostatic Pressure Treatment. Food Science and Technology Research, 25(3), 479–484. https://doi.org/10.3136/fstr.25.479
- Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. <u>https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28</u>

- O'Beirne, D., & Hamer, G. (2000). Oxygen availability and the growth of Escherichia coli W3110: A problem exacerbated by scale-up. *Bioprocess Engineering*, 23(5), 487–494. <u>https://doi.org/10.1007/s004499900185</u>
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2004). Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia coli. Current Protocols in Protein Science, 38(1). https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s38
- Paradiso, R., & Proietti, S. (2022). Light-Quality Manipulation to Control Plant Growth and Photomorphogenesis in Greenhouse Horticulture: The State of the Art and the Opportunities of Modern LED Systems. Journal of Plant Growth Regulation, 41(2), 742–780. <u>https://doi.org/10.1007/s00344-021-10337-y</u>
- Phelps, J., Dap, P., Jin, H., & Rasochova, L. (2007). Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in Pseudomonas fluorescens. *Journal of Biotechnology*, 128(2), 290–296. <u>https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.005</u>
- Podar, D. (2013). Plant Growth and Cultivation. In *Plant Minereal Nutrients* (Vol. 953, pp. 23–45). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3 2
- Pretto, C., Tang, M., Chen, M., Xu, H., Subrizi, A., Urtti, A., & van Hest, J. C. M. (2021). Cowpea Chlorotic Mottle Virus-Like Particles as Potential Platform for Antisense Oligonucleotide Delivery in Posterior Segment Ocular Diseases. *Macromolecular Bioscience*, 21(8). https://doi.org/10.1002/mabi.202100095
- Ramirez-Acosta, K., Loredo-García, E., Herrera-Hernandez, M. M., & Cadena-Nava, R. D. (2024). *Plant Virus-Like Particles for RNA Delivery* (pp. 387–410). <u>https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3918-</u> <u>4_24</u>
- Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C. G., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2019). Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible Escherichia coli: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies. *Cell Stress and Chaperones*, 24(4), 777–792. <u>https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x</u>
- Restrepo-Pineda, S., Sánchez-Puig, N., Pérez, N. O., García-Hernández, E., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2022). The pre-induction temperature affects recombinant HuGM-CSF aggregation in thermoinducible Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(8), 2883–2902. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-022-11908-z</u>
- Retallack, D. M., Jin, H., & Chew, L. (2012). Reliable protein production in a Pseudomonas fluorescens expression system. *Protein Expression and Purification*, *81*(2), 157–165. <u>https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.010</u>
- Rozen, D. E., Philippe, N., Arjan de Visser, J., Lenski, R. E., & Schneider, D. (2009). Death and cannibalism in a seasonal environment facilitate bacterial coexistence. *Ecology Letters*, 12(1), 34–44. <u>https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01257.x</u>
- Sánchez-Clemente, R., Igeño, M. I., Población, A. G., Guijo, M. I., Merchán, F., & Blasco, R. (2018). Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Environment*,

Green Technology, and Engineering International Conference, 1297. https://doi.org/10.3390/proceedings2201297

- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-Garcia, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., & Vazquez-Duhalt, R. (2014). Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology*, 60, 24–31. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.003
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. Journal of Bacteriology, 189(23), 8746–8749. <u>https://doi.org/10.1128/JB.01368-07</u>
- Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. In *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 86, Issue 3, pp. 215–223). <u>https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004</u>
- Soini, J., Ukkonen, K., & Neubauer, P. (2008). High cell density media for Escherichia coli are generally designed for aerobic cultivations – consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 26. <u>https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-26</u>
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., & Johnson, J. E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, 3(1), 63–78. <u>https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00135-6</u>
- Suzuki, M., Roy, R., Zheng, H., Woychik, N., & Inouye, M. (2006). Bacterial Bioreactors for High Yield Production of Recombinant Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(49), 37559–37565. https://doi.org/10.1074/jbc.M608806200
- Takahashi, M., Honzawa, T., Tominaga, R., & Aoyagi, H. (2020). Analysis of the influence of flame sterilization included in sampling operations on shake-flask cultures of microorganisms. *Scientific Reports*, 10(1), 10385. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-020-66810-3</u>
- Upadhyay, V., Singh, A., Jha, D., Singh, A., & Panda, A. K. (2016). Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 100. <u>https://doi.org/10.1186/s12934-016-0504-9</u>
- Valdez-Cruz, N. A., Reynoso-Cereceda, G. I., Pérez-Rodriguez, S., Restrepo-Pineda, S., González-Santana, J., Olvera, A., Zavala, G., Alagón, A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2017). Production of a recombinant phospholipase A2 in Escherichia coli using resonant acoustic mixing that improves oxygen transfer in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 129. <u>https://doi.org/10.1186/s12934-017-0746-1</u>
- Wang, S.-J., & Zhong, J.-J. (2007). Bioreactor Engineering. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 131–161). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50007-4</u>
- Wang, Y., van Oosterwijk, N., Ali, A. M., Adawy, A., Anindya, A. L., Dömling, A. S. S., & Groves, M. R. (2017).
 A Systematic Protein Refolding Screen Method using the DGR Approach Reveals that Time and Secondary TSA are Essential Variables. *Scientific Reports*, 7(1), 9355. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09687-z
- Willits, D., Zhao, X., Olson, N., Baker, T. S., Zlotnick, A., Johnson, J. E., Douglas, T., & Young, M. J. (2003).
 Effects of the Cowpea chlorotic mottle bromovirus β-hexamer structure on virion assembly.
 Virology, 306(2), 280–288. <u>https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00054-5</u>

- Wu, Y., Yang, H., & Shin, H.-J. (2011). Expression and Self Assembly of Cowpea Chlorotic Mottle Virus Capsid Proteins in *Pichia pastoris* and Encapsulation of Fluorescent Myoglobin. *MRS Proceedings*, 1317, mrsf10-1317-rr03-05. <u>https://doi.org/10.1557/opl.2011.138</u>
- Xia, L., Xian, Y., Wang, D., Chen, Y., Huang, X., Bi, X., Yu, H., Fu, Z., Liu, X., Li, S., An, Z., Luo, W., Zhao, Q., & Xia, N. (2016). A human monoclonal antibody against HPV16 recognizes an immunodominant and neutralizing epitope partially overlapping with that of H16.V5. *Scientific Reports*, 6(1), 19042. https://doi.org/10.1038/srep19042
- Xu, X., Xian, M., & Liu, H. (2017). Efficient conversion of acetate into phloroglucinol by recombinant Escherichia coli. *RSC Advances*, 7(80), 50942–50948. <u>https://doi.org/10.1039/C7RA09519H</u>
- Yang, Z., Chi, Y., Bao, J., Zhao, X., Zhang, J., & Wang, L. (2022). Virus-like Particles for TEM Regulation and Antitumor Therapy. In *Journal of Functional Biomaterials* (Vol. 13, Issue 4). MDPI. <u>https://doi.org/10.3390/jfb13040304</u>
- Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvin, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 9). MDPI AG. <u>https://doi.org/10.3390/molecules25092193</u>
- Zarkan, A., Caño-Muñiz, S., Zhu, J., Al Nahas, K., Cama, J., Keyser, U. F., & Summers, D. K. (2019). Indole Pulse Signalling Regulates the Cytoplasmic pH of E. coli in a Memory-Like Manner. *Scientific Reports*, 9(1), 3868. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-019-40560-3</u>
- Zhao, X., Fox, J. M., Olson, N. H., Baker, T. S., & Young, M. J. (1995). In Vitro Assembly of Cowpea Chlorotic Mottle Virus from Coat Protein Expressed in Escherichia coli and in Vitro-Transcribed Viral cDNA. Virology, 207(2), 486–494. <u>https://doi.org/10.1006/viro.1995.1108</u>
- Zhu, J., Yang, K., Liu, A., Lu, X., Yang, L., & Zhao, Q. (2020). Highly secretory expression of recombinant cowpea chlorotic mottle virus capsid proteins in Pichia pastoris and in-vitro encapsulation of ruthenium nanoparticles for catalysis. *Protein Expression and Purification*, 174, 105679. <u>https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105679</u>

Anexos





Figura 11. DLS de las poblaciones de las VLPS CCMV producidas de forma recombinante obtenidas después de la purificación por FPLC.