

MODELO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DESDE LA MULTIDISCIPLINARIEDAD DE LOS BIOPROCESOS PARA OBTENER, PURIFICAR Y EVALUAR LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

“THEORETICAL-EXPERIMENTAL MODEL FROM THE MULTIDISCIPLINARITY
OF BIOPROCESSES TO OBTAIN, PURIFY AND EVALUATE THE
RECOMBINANT PROTEIN”

Por: Alberto Quintero
(albertoquinteroaraque@gmail.com)

Recepción: 07/07/2023

Aprobado: 11/12/2023

RESUMEN

El estudio titulado "Modelo Teórico-Experimental desde la Multidisciplinarietà de los Bioprocesos para Obtener, Purificar y Evaluar la Proteína Recombinante" se enfoca en el desarrollo de un enfoque integral para la producción, purificación y evaluación de proteínas recombinantes. El objetivo principal de esta investigación es establecer un marco teórico y experimental que abarque diferentes disciplinas científicas, como la biología molecular, la ingeniería de proteínas, la biotecnología y la bioquímica, con el fin de optimizar los procesos de obtención y purificación de proteínas recombinantes. El estudio propone un modelo teórico que integra los conocimientos y avances más recientes en dichas disciplinas, permitiendo un diseño más eficiente y rentable de los bioprocesos. Además, se llevan a cabo experimentos para validar y optimizar este modelo teórico, utilizando técnicas de clonación, expresión génica, cultivo celular y purificación de proteínas. El enfoque multidisciplinario de esta investigación es fundamental para abordar los desafíos asociados con la producción de proteínas recombinantes, como la selección de sistemas de expresión adecuados, la optimización de las condiciones de cultivo y la mejora de los métodos de purificación.

Palabras clave: Multidisciplinarietà; Bioprocesos; Proteína Recombinante.

ABSTRACT

The study titled "Theoretical-Experimental Model from the Multidisciplinarietà of Bioprocesses to Obtain, Purify and Evaluate Recombinant Protein" focuses on the development of a comprehensive approach for the production, purification and evaluation of recombinant proteins. The main objective of this research is to establish a theoretical and



experimental framework that covers different scientific disciplines, such as molecular biology, protein engineering, biotechnology and biochemistry, in order to optimize the processes of obtaining and purifying recombinant proteins. The study proposes a theoretical model that integrates the most recent knowledge and advances in these disciplines, allowing a more efficient and profitable design of bioprocesses. In addition, experiments are carried out to validate and optimize this theoretical model, using cloning, gene expression, cell culture and protein purification techniques. The multidisciplinary approach of this research is essential to address the challenges associated with recombinant protein production, such as selecting suitable expression systems, optimizing culture conditions, and improving purification methods.

Keywords: Multidisciplinary; Bioprocesses; Recombinant Protein.

INTRODUCCIÓN

El modelo teórico-experimental multidisciplinario de los bioprosos es un enfoque que combina técnicas y conocimientos de diversas disciplinas para obtener, purificar y evaluar proteínas recombinantes en animales. Este enfoque se basa en la producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos, que pueden ser utilizadas en la industria farmacéutica y en la producción animal.

Algunas de las técnicas y métodos utilizados en este modelo incluyen producción de proteínas recombinantes, donde se orienta el estudio hacia la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN), recombinante que permite transferir genes de una especie en el genoma de otra especie, lo que facilita la producción de proteínas recombinantes de interés.

También está el aislamiento y purificación de proteínas, donde las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas, como la cromatografía, la electroforesis y la precipitación, se utilizan para obtener proteínas recombinantes de alta pureza y actividad; aunado a esto están los estudios de bioactividad que son técnicas de bioactividad, como la inmunoassay y la enzimático-assay, se utilizan para evaluar la actividad y la eficacia de las proteínas recombinantes.

En conjunción con esto está el sistemas de expresión, el cual se utiliza desde diferentes sistemas de expresión, como la producción de proteínas en leche, orina y semen, para obtener proteínas recombinantes en animales; y los animales transgénicos, ya que se

emplean animales transgénicos, como ruminos, conejas, cerdos, aves e insectos, para la producción de proteínas recombinantes.

A grandes rasgos, el modelo teórico-experimental multidisciplinario de los bioprocesos es un enfoque innovador que permite abordar los desafíos de la producción, purificación y evaluación de proteínas recombinantes en animales, y tiene el potencial de mejorar la producción de medicamentos y bioproductos de origen animal.

Por ello la razón de ser de este artículo que es un primer avance de la propuesta doctoral, está en establecer un marco teórico y experimental que abarque diferentes disciplinas científicas, como la biología molecular, la ingeniería de proteínas, la biotecnología y la bioquímica, con el fin de optimizar los procesos de obtención y purificación de proteínas recombinantes; reconociendo los elementos constitutivos del modelo teórico-experimental desde la multidisciplinariedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los alimentos balanceados para animales (ABAs) son mezclas de muy diversa composición donde en casi todos los casos los carbohidratos, las proteínas, las grasas y los oligoelementos o minerales representan los principales grupos presentes en estos productos. Las proteínas son parte esencial de los ABAs, y su modo de obtención determina el costo de la misma, la soya como principal fuente de aporte de estos tipos de compuestos ha sido históricamente la materia prima empleada para la fabricación de los ABAs, sin embargo, el costo de producción es considerablemente alto, básicamente debido a una larga lista de insumos que se precisan para su siembra y su cosecha, lo cual se traduce en el aumento del valor monetario del producto terminado.

En este trabajo se propone plantear un sistema recombinante de producción de proteínas que luego serán usadas como fuente de aminoácidos en una mezcla de ABA potencial. Para ellos se hace uso de vectores de levaduras y expresión en microorganismos,

su posterior purificación y su mezcla para obtener un producto final que considerara la adición de una fuente de carbohidratos, grasas y oligoelementos.

Luego de ello se prueban productos resultantes con ABAs de marcas reconocidas y se evalúan perfiles nutricionales, así como tamaño y peso, con el fin de medir la efectividad del material en cuestión. Al final, los análisis estadísticos de los resultados nos mostrarán la procedencia de la metodología y del estudio propuesto.

Los problemas asociados a la producción de alimentos balanceados para animales son muy comunes y repetitivos en la industria de los alimentos. Hoy en día las materias primas se hacen cada vez más escasas y su obtención desemboca en dificultades de múltiples causas, entre ellas la fuente de proteicos.

En el uso de técnicas de ADN's recombinantes es frecuentes en estos días, siendo hasta la producción de medicamentos uno de sus usos más conocidos, lo mismo sucede con la obtención de metabolitos a través de la producción de enzimas por la clonación de sus genes respectivos en sistemas bacterianos y eucariotas.

En el 2017, Natalia Amigo realizó una investigación llamada "Identificación y caracterización de proteínas diferencialmente expresadas por cepas de Escherichia coli O157:H7 con fenotipo de hiper virulencia provenientes de ganado argentino" (Amigo, N., 2017). En este trabajo, se estudiaron ocho aislados seleccionados al azar de E. coli O157:H7 (una variedad que puede provocar diarreas y daños renales graves) en cepas procedentes del ganado de Argentina, así como dos cepas de casos clínicos humanos. Fue posible demostrar, por el análisis de 23 de SNPs (Polimorfismos de Simples Nucleótidos, por sus siglas en inglés) la existencia de 4 cepas aisladas de bovinos que fueron clasificadas como clado 8 (mediante estudios estadísticos de análisis de secuencias de ADNs, por el Neighbor Joining Method o el método del vecino más cercano), así como también 2 cepas aisladas de humanos, mientras que otras dos variedades bovinas fueron clasificadas como clado 6, también descrito como hipervirulento.

Seguidamente, se evaluó la patogenicidad de las cepas o clados prenombrados realizando ensayos de producción de toxina Shiga (la bacteria que produce esta toxina se

denomina E. coli productora de toxina Shiga y se le conoce por su sigla en inglés, STEC), lisis de glóbulos rojos in vitro, ensayos de adherencia en cultivos celulares, inhibición de la absorción normal de agua en células de colon humano y análisis de morbilidad y letalidad en ratones BALB/c (una variedad de ratón albino de laboratorio). Cuatro de las cepas bovinas mostraron una alta producción de Stx (Toxina Shiga) y una de ellas, la cepa 7.1 Anguil, mostro alta actividad Verocitotóxica (es decir, mortal para la cepa celular de riñon de mono africano verde) en cultivos celulares, y una fuerte inhibición de la normal absorción de agua en células de colon humano, en relación a la cepa E. coli O157:H7 EDL933 (una cepa conocida como inofensiva). Dos cepas, Rafaela II y 7.1 Anguil, presentaron altos niveles de lisis en eritrocitos, altos niveles de producción de Stx2 y fueron asociadas con una alta letalidad y morbilidad en el modelo murino ensayado (en ratones). Por los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia realizados tanto in vitro, ex vivo como in vivo, fueron seleccionadas la cepa Rafaela II (clado 8, bovina) y la cepa 7.1 Anguil (clado 6, bovina), como candidatas para el posterior análisis genómico y proteómico comparativo, con la cepa EDL933 (cepa de referencia).

Cuando se realizó la secuenciación de los genomas de estas cepas se detectó el plásmido pO157 y en la cepa 7.1 Anguil se detectó un plásmido adicional con alta homología con el plásmido pChi7122-3 de la cepa aviar APEC E. coli 7122 (O78:K80:H9). El análisis proteómico cuantitativo, se efectuó en las proteínas sobre expresadas que podrían estar relacionadas con la virulencia. Las proteínas que se sobre expresaron en E. coli O157:H7 Rafaela II fueron, la proteína del curli CsgC, un activador transcripcional (PchE), las proteínas de fagos, Stx2, FlgM y FlgD, CheY, CheW, una diene lactona hidrolasa y la proteasa EspP, estas últimas dos codificadas en el plásmido pO157, entre otras. Estas proteínas fueron detectadas como sobre expresadas entre 4 y 16 veces más en las cepas Rafaela II y 7.1 Anguil comparadas con EDL933 (control basal) (Amigo, N., 2017).

Con el estudio de las secuencias genómicas de los plásmidos se encontraron varios mutantes para el gen stx2 los cuales exhibían menos patogenicidad en los modelos celulares empleados (en células Vero), demostrado por el análisis de los eventos de apoptosis causados,



lo que infiere a la vez el papel de estas proteínas en la virulencia de dichas variantes. A la vez, la aparición de tales mutaciones mostró una marcada disminución en los perfiles de mortalidad ensayados para los ratones BALB/c.

Los análisis realizados con las secuencias de los genomas de los plásmidos estudiados y su relación con el aumento de la expresión de proteínas encontradas por los estudios de proteómica, mostraron en este trabajo el papel del gen STX en la patogenicidad de las cepas evaluadas en cuestión de *E. coli*. Los estudios de expresión y sobre expresión de genes permite la producción a mayor escala de derivados proteicos que pueden ser empleados para diversos fines, entre los que se encuentran los farmacéuticos, alimenticios e industriales.

Un trabajo interesante que muestra el uso de las técnicas de biología molecular es el presentado por el doctor Pablo Ravasi en el 2016 y que lleva por nombre “Desarrollo de herramientas para la producción de proteínas recombinantes en *Corynebacterium glutamicum*”, realizado en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Bioquímicos, en Rosario, Argentina.

El glutamato monosódico es producido extracelularmente por *C. glutamicum* y el mismo sirve para resaltar el sabor de las comidas, a la vez de ser un excelente preservante (Kinoshita, S., et al, 2004). El proceso de producción de glutamato utilizando *C. glutamicum* es actualmente una tecnología ampliamente estudiada y desarrollada desde hace décadas (Kumagai, A., et al 2000). Bajo condiciones estándares el glutamato es producido por la enzima glutamato deshidrogenasa utilizando como precursor el 2-oxoglutarato (Kholy. ER., et al, 1993). La productividad típica del proceso de obtención de glutamato a partir de cultivos de alta densidad de es de 100 g/L luego de 2 días de proceso (Kumagai, S., et al, 200). Para la producción industrial de este aminoácido, generalmente las fuentes de carbono suelen ser melazas de caña o remolacha, así como hidrolizados de almidón u otras azúcares (Ault, A., et al, 2004).

En este trabajo fue diseñado un vector sintético denominado pTGR (vector de clonación), en el cual todos sus componentes se encuentran flanqueados por sitios de restricción únicos. El mismo permite el rápido intercambio de secuencias regulatorias, así



como la obtención de construcciones que permiten la expresión de varios genes simultáneamente. La plataforma que provee el sistema del pTGR contribuye a la exploración de partes involucradas en la expresión génica y facilita el rápido ensamblado de circuitos genéticos el cual permite realizar ingeniería metabólica en *C. glutamicum*. El sistema fue validado utilizando genes reporteros para ensayar promotores y RBSs (sitios de unión al ribosoma, por sus siglas en inglés). En este sentido, se determinó que tanto la variación de la concentración del inductor, así como el intercambio de orígenes de replicación con distinto número de copias, pueden ser utilizados como herramientas para regular los niveles de expresión de proteínas recombinantes en *C. glutamicum* (Ravasi, P., 2015).

Se utilizaron diferentes péptidos señales evaluados con el sistema pTGR para expresar y secretar la fosfolipasa C de *B. cereus* (*Bacillus cereus*) (BC-PLC). Esta enzima es un candidato atractivo para el proceso de desgomado enzimático, de aceites consumibles, debido a su capacidad de degradar fosfolípidos. En este tipo de ensayo se han obtenido hasta 0.12 g/L de enzima en sobrenadante de cultivos en Batch de *C. glutamicum*. Finalmente, a partir de ensayos de RMN (resonancia magnética nuclear), se demostró que la enzima recombinante fue capaz de hidrolizar completamente los fosfolípidos mayoritarios del aceite crudo de soja fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, demostrando su capacidad para el proceso de desgomado enzimático (Ravasi, P., 2015). El trabajo es una muestra de la posibilidad de producir y extraer una proteína recombinante por medio del cultivo de un microorganismo manipulado con un vector de sobre expresión en un reactor de crecimiento.

Otro trabajo que muestra la posibilidad de producir moléculas tan complicadas y elaboradas como los anticuerpos, fue el realizado por Alessandra Baldecchi, cuyo nombre es “Caracterización de clones de células CHO productoras de IgG mediante análisis metabólico e expresión transcripcional”, en Santiago de Chile en el 2013, en la Universidad de Chile.

A partir de una línea celular CHO (ovario de Hamster chino) productora de IgG (Inmunoglobulina G, un tipo específico de anticuerpo), que sobre expresan los genes MDHII y PYC2 (enzimas del metabolismo de los carbohidratos) se realizó un ensayo, produciendo menos lactato (el lactato se acumula en el medio extracelular acidificándolo y matando



posteriormente a las células) y aumentando el flujo de carbonos desde la glicólisis hacia el ciclo del TCA (mejor conocido como ciclo de Krebs), para luego de esto producir energía para el resto de los procesos metabólicos. La caracterización de la expresión transcripcional se realizó mediante un PCR en tiempo real, para el que fue previamente necesario extraer el RNA de las muestras, seguida de la síntesis de cDNA (técnica del ADN complementario).

Los resultados mostraron una menor producción de biomasa y anticuerpo IgG en los clones en comparación al control CHO wild-type. Los cálculos de productividad específica de IgG demostraron que la producción de proteína recombinante estaría asociada al crecimiento celular y se cree que el consumo de glutamina cumpliría un rol importante en la producción de biomasa e IgG debido a que se obtuvieron mayores concentraciones de amonio en las células con mayor densidad y producción de proteína (Baldecchi, A., 2013).

Este ensayo demuestra la capacidad de producir una proteína recombinante tal como un anticuerpo que luego de ser sintetizada sufre modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones. Aunque aquí se mostró que el producir menos proteína fue mejor para el metabolismo celular dado a que se producía menos lactato, se deja claro que por medio de manipulaciones tales como la adición de un inductor en el medio celular se pueden aumentar o disminuir la producción del metabolito.

Existe un trabajo realizado por Florencia Eberhart, en la Universidad de Rosario, Argentina en el 2017 que se titula “Desarrollo de un proceso de fermentación para la producción de EGasa1, una enzima capaz de mejorar la calidad del biodiesel”

Se desarrolló un método enzimático para la eliminación eficiente de los EG (precipitados insolubles de los esteril glicósidos) del biodiesel, basado en la actividad de una β -glucosidasa de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Whittmann, E., et al, 2007).

En este trabajo se puso a punto un sistema de expresión en *E. coli* de la enzima EGasa1, enzima que hidroliza completamente los esteril glucósidos presentes en el biodiesel, mejorando notablemente su calidad. Se describe en el mismo trabajo el correspondiente proceso de fermentación a alta densidad celular, luego un método de recuperación de la enzima EGasa1 y finalmente el tratamiento enzimático de biodiesel. La enzima hidroliza

completamente los estériles glucósidos presentes en el biodiesel, mejorando notablemente su calidad.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la mejor cepa para la producción de EGasa1 a gran escala es la variante que expresa la proteína EGasa1 a partir del plásmido pKCN-BAD-EGasa1, y el sistema de chaperonas GroES-GroEL (proteínas que permiten la exportación de otra proteína al medio extracelular) a partir del plásmido pGro7, los cuales poseen orígenes de replicación compatibles e inducibles por la L-arabinosa (la cual fungía como inductor del proceso de transcripción del gen clonado) (Aguirre, A., et al, 2014).

El proceso de tratamiento se escaló exitosamente hasta 20 toneladas usando un reactor agitado, en el cual 7g de EGasa1 por tonelada de biodiesel eliminaron por completo las 75 ppm de EG presentes en la muestra en aproximadamente 2 h (Peiru, S., et al, 2015).

Por último, mencionaremos el trabajo efectuado por el doctor Ramón Roldán de la Universidad de Barcelona, España, en el año 2018 cuyo nombre lleva por título “Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células HEK293”.

El trabajo realizado se basó en la obtención de células de riñón embrionario humano (HEK293) modificadas genéticamente para producir dos proteínas bioterapéuticas, el interferón gamma y el anticuerpo monoclonal trastuzumab.

Los resultados obtenidos pudieron mostrar dos marcadores de selección: La enzima fenilalanina hidroxilasa y la glutamina sintetasa. El empleo de la fenilalanina hidroxilasa como un marcador junto con su inhibidor, permitió la producción entre 3 y 5 veces de interferón gamma y de trastuzumab, en comparación con los valores de referencias.

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica ensayada permite la integración dirigida en el punto deseado del ADN genómico de la célula, habiéndose logrado duplicar la producción específica de interferón gamma y aumentando la producción de trastuzumab en un 30%. Luego de esto se llevó a cabo un estudio de escalado en la producción de interferón gamma usando biorreactores como paso previo a una potencial aplicación industrial. El

proceso resultante ha sido escalado usando un reactor preindustrial de un solo uso de 50L. Se puede concluir, a tenor de los resultados obtenidos y, dada la variedad de modelos ensayados, que las técnicas desarrolladas resultan interesantes de cara a una posible aplicación en la producción de diferentes proteínas recombinantes de interés bioterapéuticas, sector de gran importancia económica e industrial (Roman, 2018).

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Los primeros experimentos en este tipo de investigación pueden incluir la selección de un sistema de expresión adecuado para la proteína recombinante, como bacterias, levaduras o células de mamíferos. Luego, se pueden realizar experimentos de clonación para insertar el gen de la proteína de interés en el sistema de expresión elegido.

Una vez que se ha logrado la expresión de la proteína recombinante, se pueden llevar a cabo experimentos de cultivo celular para optimizar las condiciones de crecimiento y producción de la proteína. Esto puede involucrar la optimización de parámetros como la temperatura, el pH, la concentración de nutrientes y la velocidad de agitación.

Posteriormente, se realizaron experimentos de purificación utilizando técnicas como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión molecular. Estos experimentos tienen como objetivo separar y purificar la proteína recombinante de otras proteínas y contaminantes presentes en el sistema.

Finalmente, al experimento se aplicó una evaluación para determinar la actividad, estabilidad y características estructurales de la proteína recombinante obtenida. Estos experimentos pueden incluir ensayos bioquímicos, análisis espectroscópicos y técnicas como la electroforesis en gel y la espectrometría de masas.

Estos resultados permitieron dar con los elementos constitutivos del modelo teórico que se desarrollará con mayor fundamentación en otros avances investigativos acerca del tema, por el momento el modelo teórico responde a fundamentos biológicos y genéticos, los cuales se vinculan y se adecúan a los principios de la biología molecular y la genética que permiten la producción de proteínas recombinantes. Esto implica el conocimiento de los



genes, las secuencias de ADN, la transcripción y la traducción.

Por otro lado, el modelo teórico se consolida en el marco de la ingeniería genética, utilizando técnicas para introducir genes recombinantes en organismos huéspedes, como bacterias, levaduras, células de mamíferos o plantas, de manera que puedan producir la proteína de interés.

Del mismo modo, se cultiva células y fermentación, desarrollando métodos de cultivo celular y fermentación que permitan el crecimiento óptimo de las células huésped, proporcionando el ambiente adecuado para la producción de la proteína recombinante.

A todas estas, los procesos de purificación parten por un proceso de estrategias de purificación para separar la proteína recombinante del resto de componentes celulares y obtener un producto final de alta pureza. Esto puede implicar técnicas como la cromatografía, la filtración y la precipitación.

En su etapa final, el modelo teórico presenta herramientas de valoración realizando análisis y pruebas para evaluar la calidad y actividad de la proteína recombinante producida. Esto puede incluir técnicas como la electroforesis, la espectrometría de masas y ensayos de actividad biológica.

En concreto, el modelo presenta un control de calidad y regulaciones, que parte del establecimiento de medidas de control de calidad para garantizar la seguridad y eficacia de la proteína recombinante producida, así como cumplir con las regulaciones y estándares aplicables en la industria farmacéutica o biotecnológica.

Estos elementos multidisciplinarios se combinan para formar un modelo teórico integral que abarca aspectos biológicos, genéticos, bioquímicos, de ingeniería y regulaciones, con el objetivo de obtener, purificar y evaluar de manera eficiente y segura la proteína recombinante.

CONCLUSIÓN

Un modelo teórico-experimental desde la multidisciplinariedad de los bioprocesos para obtener, purificar y evaluar la proteína recombinante, como se pudo apreciar en este experimento piloto aplicado, tiene un impacto significativo en varios aspectos.

Por un lado, permite la optimización de los bioprocesos; un modelo teórico-experimental permite simular y analizar diferentes condiciones y parámetros en el proceso de obtención de proteínas recombinantes. Esto ayuda a identificar las variables críticas y optimizar los bioprocesos para maximizar el rendimiento y la eficiencia de producción.

En otro sentido, permite la reducción de costos y tiempo; es decir, al simular y analizar diferentes estrategias de purificación, el modelo puede ayudar a identificar los pasos más eficientes y rentables para obtener proteínas recombinantes de alta pureza. Esto puede reducir los costos de producción y acortar el tiempo requerido para obtener el producto final.

En un aspecto práctico, permite el diseño racional de mutantes y variantes de proteínas: Utilizando el modelo, se pueden probar virtualmente diferentes mutaciones y variantes de proteínas para evaluar su impacto en la producción y funcionalidad. Esto tiene el potencial de acelerar el proceso de diseño y optimización de proteínas recombinantes con características deseables.

Y hace posible la evaluación de la estabilidad y actividad de la proteína; donde el modelo puede ayudar a predecir la estabilidad y actividad de la proteína recombinante bajo diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento. Esto es crucial para garantizar que la proteína mantenga su estructura y función adecuadas durante todo el proceso, desde la obtención hasta su uso.

Para fortalecer y sostener en el tiempo un modelo teórico-experimental desde la multidisciplinariedad de los bioprocesos para obtener, purificar y evaluar la proteína recombinante, se recomienda tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Validación experimental: Es crucial realizar experimentos reales para validar y verificar los resultados obtenidos a partir del modelo teórico. Esto implica llevar a



cabo pruebas y comparar los resultados con los datos experimentales para garantizar la precisión y confiabilidad del modelo.

- Actualización y mejora continua: Los modelos teóricos y experimentales deben mantenerse actualizados con los avances científicos y tecnológicos. Es importante estar al tanto de las últimas investigaciones y técnicas en el campo de los bioprocesos y la producción de proteínas recombinantes para incorporar nuevos conocimientos y mejorar el modelo con el tiempo.
- Colaboración interdisciplinaria: Dado que el modelo abarca múltiples disciplinas, es beneficioso fomentar la colaboración y el intercambio de conocimientos entre expertos de diferentes áreas. Esto puede incluir biólogos, bioquímicos, ingenieros de procesos, modeladores matemáticos y otros profesionales relacionados. La colaboración interdisciplinaria permite abordar los desafíos desde diferentes perspectivas y enriquecer el modelo con diversas habilidades y conocimientos.
- Validación cruzada y comparativa: Es útil comparar y validar los resultados obtenidos a través del modelo teórico-experimental con otros modelos existentes o enfoques alternativos. La validación cruzada ayuda a identificar fortalezas y debilidades del modelo y proporciona una mayor confianza en los resultados.
- Documentación y compartición de conocimientos: Es esencial documentar y compartir los detalles del modelo teórico-experimental, incluyendo los supuestos, ecuaciones, protocolos experimentales y resultados. Esto facilita la reproducción y el intercambio de conocimientos entre investigadores y permite que otros científicos validen y utilicen el modelo en sus propias investigaciones.

Estas recomendaciones ayudarán a fortalecer y sostener en el tiempo un modelo teórico-experimental para los bioprocesos de obtención, purificación y evaluación de proteínas recombinantes, asegurando su utilidad y aplicabilidad en el campo científico y tecnológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, A., Peiru, S., Eberhardt, F., Vetcher, L., Cabrera, R., Menzella, H. (2014) Enzymatic hydrolysis of steryl glucosides, major contaminants of vegetable oil-derived biodiesel. *Applied Microbiology Biotechnology* 98:4033–4040.
- Amigo, Natalia Loreley (2017). "Identificación y caracterización de proteínas diferencialmente expresadas por cepas de *Escherichia coli* O157: H7 con fenotipo de hiper virulencia provenientes de ganado argentino". Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- Ault, A. (2004). The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. *Journal of Chemical Education*, 81:347– 355.
- Eberhardt, F., Aguirre A., Menzella, H.G, Peiru, S. (2017). Strain engineering and process optimization for enhancing the production of a thermostable steryl glucosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 44(1):141-147.
- Kholy, ER., Eikmanns, BJ., Gutmann, M., Sahm, H. (1993). Glutamate Dehydrogenase Is Not Essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 59(7):2329-2331.
- Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. (2004). Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 50(6):331-343.
- Kumagai, H. (2000). Microbial production of amino acids in Japan. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69: pp.71–85.
- Kumagai, H. (2003). Microbial production of amino acids in Japan. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2000, 69:71-85. 16. Hermann T: Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol*, 104(1-3):155-172. Referencias 105.



- Peiru S., Aguirre, A., Eberhardt, F., Braia M., Cabrera, R., Menzella, H. (2015). A scalable process for the enzymatic removal of steryl glucosides from biodiesel. *Biotechnology for Biofuels*. 8:223.
- Roman, R. (2017). “Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células HEK293”. Tesis de grado, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Wittmann, C. y Becker J. (2007). The L-lysine story: from metabolic pathways to industrial production. In: *Amino acid biosynthesis*. Edited by Wendisch V. Heidelberg: Springer; 39–70.