

Empleo de detergentes homólogos a Tritón X-100 en la purificación de cuerpos de inclusión

Lázaro Guerra ¹, Yinet Cartaya ¹, Lourdes Zumalacárregui ², Dayana Soler ¹,
Dunía González ¹, Daniela Rivero ¹, Thalia Lambert ¹, Analeydis García ¹

¹ Centro de Ingeniería genética y Biotecnología, C.P. 11600

² Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, C.P. 19390
lazaroguerracabezas@gmail.com

Resumen

La Agencia Europea de Sustancias Químicas, como parte del Parlamento Europeo y del Consejo, estableció el Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH), para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente. El detergente Tritón X-100 se incluyó en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes debido a las propiedades de alteración endocrina del producto de degradación. En este trabajo se estudió la influencia del empleo de los detergentes Ecosurf™ EH-9, Ecosurf™ SA-9 y Tergitol™ 15-S-9 como sustitutos del Tritón X-100 en la purificación de los cuerpos de inclusión en el proceso de purificación de una proteína modelo basada en la cápside del virus del dengue. Para ello se realizó un diseño de experimentos multifactorial categórico evaluando los tensoactivos en dos estrategias de purificación de los cuerpos de inclusión con las variables de respuesta pureza y recobrado del precipitado de lavado y pureza del sobrenadante de solubilización. Los resultados indican que es posible sustituir Tritón X-100 por Ecosurf EH-9™, obteniendo además resultados positivos en cuanto al recobrado de la etapa, con valores superiores 1,12 veces a los obtenidos con el empleo de Tritón X-100 sin afectar la pureza de la proteína solubilizada.

Palabras Claves: Tritón X-100, detergentes sustitutos, purificación, cuerpos de inclusión.

Abstract

The European Chemicals Agency, as part of the European Parliament and Council, established the Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH) Regulation to ensure a high level of protection for human health and the environment. The detergent Triton X-100 was included in the list of substances of very high concern due to the endocrine-disrupting properties of its degradation product. This study examines the influence of using Ecosurf™ EH-9, Ecosurf™ SA-9, and Tergitol™ 15-S-9 as substitutes for Triton X-100 in the purification of inclusion bodies during the purification process of a model protein based on the dengue virus capsid. A categorical multifactorial experimental design was carried out, evaluating the surfactants in two purification strategies for inclusion bodies, using purity and recovery of the wash precipitate and purity of the solubilization supernatant as response variables. The results indicate that Ecosurf™ EH-9 can replace Triton X-100, also yielding positive results in terms of recovery, with values 1.12 times higher than those obtained with Triton X-100, without affecting the purity of the solubilized protein.

Key Words: Triton X-100, substitute detergents, purification, inclusion bodies.

Introducción

La Agencia Europea de Sustancias Químicas, como parte del Parlamento Europeo y del Consejo, estableció el Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH), Reglamento (CE) nº 1907/20061, para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente. Tritón X-100 se incluyó en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes según el marco reglamentario, el 19 de diciembre de 2012 (McNamara L, 2022) y desde el 4 de enero de 2021 se prohibió su uso en la Unión Europea con algunas excepciones (Marques et al., 2024). Tritón X-100 es un tensoactivo no iónico (<https://echa.europa.eu/candidate-list-table/-/dislist/details/Ob0236e18db570>) ampliamente utilizado como parte del proceso de producción de proteínas terapéuticas (Yadav et al., 2024), sin embargo, estudios ecológicos recientes han indicado que sus productos de descomposición pueden comportarse potencialmente como disruptores endocrinos en organismos acuáticos (Conley et al., 2017). Hoy en día, la mayoría de las empresas farmacéuticas que desarrollan nuevos productos y procesos evitan su uso (McNamara L, 2022) y, en cambio, buscan alternativas ecológicas (Feroz et al., 2022). Se han realizados estudios empleando detergentes ecológicos en procesos de separación de fases (7), lisis celular (Marques et al., 2024) e inactivación viral (Conley et al., 2017; Feroz et al., 2022; Yadav et al., 2024). El siguiente trabajo tiene como objetivo analizar la influencia del empleo de los detergentes Ecosurf EH-9™, Ecosurf SA-9™ y Tergitol 15-S-9™ como sustitutos de Tritón X-100 en la purificación de los cuerpos de inclusión (CI) del proceso de purificación de una proteína modelo basada en la cápside del virus del dengue. Estos son tensoactivos no iónicos, compuestos de alcoholes, y son una alternativa más sostenible porque son biodegradables, no tóxicos y no bioacumulativos. Además, tienen propiedades tensoactivas similares a las de Tritón X-100, lo que los convierte en sustitutos prácticos (<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-eh-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9778>; <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-sa-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9779>; <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/t>

[ergitol-15-s-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9780](#)).

Materiales y Métodos

Material biológico

La proteína de interés fue expresada en células de *E. coli* y producida en un biorreactor de tanque agitado de volumen total 50 L (Sartorius, Alemania) en modo discontinuo. Se empleó una de las cosechas obtenidas, la que presentó una viabilidad celular de $9,55 \times 10^9$ superior al criterio de aceptación ($> 10^6$), una estabilidad plasmídica de 95 % por encima del criterio de aceptación (> 85 %) y una expresión de 11 %; por lo que se consideró el proceso de fermentación como estable y consistente. La fermentación se centrifugó a 10 000 rpm, durante 30 min a 4°C, luego se almacenó a -20°C para su posterior procesamiento.

Metodología para el diseño experimental

Se partió de 10 g de la biomasa proveniente de la etapa de fermentación que se homogeneizaron en NaCl 150 mmol/L, tris (tris(hidroximetil)aminometano) 20 mmol/L, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mmol/L, pH 8 a razón de 100 g/L con el empleo de un homogenizador de cuchillas verticales (IKA, Alemania). Posteriormente se realizaron tres ciclos de ruptura celular con empleo de un homogenizador de alta presión tipo prensa francesa (Ohtake works, Japón) manteniendo una presión entre 60 y 80 MPa, incubando en hielo 10 minutos luego de cada ciclo. El material roto se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min, 20°C, el sobrenadante se desechó y el precipitado se volvió a resuspender en NaCl 150 mmol/L, tris 20 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8 a razón de 100 g/L y se alicuotó 3 mL en viales. Los viales se centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 min, 20°C y se desechó el sobrenadante, el precipitado constituyó el material de partida de los experimentos.

Con el empleo de STATGRAFICS Centurion XVI Versión 16.1.11 se realizó un diseño de experimentos multifactorial categórico estudiando los factores experimentales tensoactivo: Tritón X-100 (Merck KGaA, Alemania), Ecosurf EH-9™, Tergitol 15-S-9™, Ecosurf SA-9™ (neoFroxx, Alemania) y estrategia de

purificación de los CI; se realizaron dos réplicas para un total de 24 corridas. La metodología consistió en resuspender el precipitado de ruptura a razón de 100 g/L en el tampón de lavado 1 (Estrategia A: urea 2 mol/L, NaCl 200 mmol/L, tris 20 mmol/L y tensoactivo 1 %, pH 8; Estrategia B: Na₂HPO₄ 100 mmol/L, tensoactivo 2 %, pH 11,2). Los viales se incubaron 1 h con agitación lenta a 4°C, posteriormente se centrifugaron a las condiciones antes mencionadas, se tomaron muestras, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en tampón de lavado 2 (Estrategia A: urea 2 mol/L, NaCl 200 mmol/L, tris 20 mmol/L, pH 8; Estrategia B: tris 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 8), para eliminar el exceso de detergente y a continuación se centrifugó. Para lograr la solubilización de los CI se homogenizó el precipitado en urea 8 mol/L, tris 20 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, Tween 20 1 %, pH 8, incubando durante 16 h con agitación lenta a 4°C. Luego de la centrifugación la proteína de interés se encuentra en el sobrenadante. Las muestras tomadas en cada una de las corridas experimentales fueron analizadas por Microcoomassie y Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las variables analizadas fueron pureza del precipitado de lavado y sobrenadante de solubilización. Se empleó el *software* ImageJ y el recobrado de lavado que se determinó a partir de la ecuación 1.

$$\text{Recobrado (\%)} = \frac{m(PL)}{m(PR)} * 100 \quad (1)$$

Donde:

$m(PL)$: masa en miligramos de proteína de interés en el precipitado de lavado

$m(PR)$: masa en miligramos de proteína de interés en el precipitado de ruptura celular

La masa de proteína de interés se determinó a partir de la ecuación 2.

$$\text{masa (mg)} = c \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * \text{Pureza (\%)} \quad (2)$$

Resultados

Los CI son agregados altamente específicos y están compuestos fundamentalmente por la proteína recombinante de interés, por lo que su aislamiento y purificación, previo a la solubilización, contribuye significativamente al incremento del grado de pureza de la proteína (Palmer y Wingfield, 2024). Los CI recuperados de lisados celulares están altamente contaminados con componentes de la pared celular y la membrana externa de *E. coli*; estos se eliminan en gran medida por extracción selectiva con detergentes y bajas concentraciones de urea (Falero-Morejón et al., 2015). También hay reportes de que los CI pueden solubilizarse con métodos más suaves como el uso de pH alcalinos (Brito-Molina et al., 2015). La concentración de urea y detergente en el tampón de lavado puede variar. Se reporta que la concentración de urea suele estar entre 1 y 4 mol/L y la concentración habitual de detergente está entre el 0,5 % y el 5 % (Falero-Morejón et al., 2015).

En la estrategia de lavado A se empleó una concentración de urea de 2 mol/L y de detergente de 1 %, mientras que en la estrategia B se optó por una concentración de detergente de 2 % y el empleo de pH básico para favorecer la solubilización de proteínas contaminantes.

En la figura 1 se muestra una electroforesis correspondiente a los pasos de lavado y solubilización de una de las réplicas del diseño experimental.

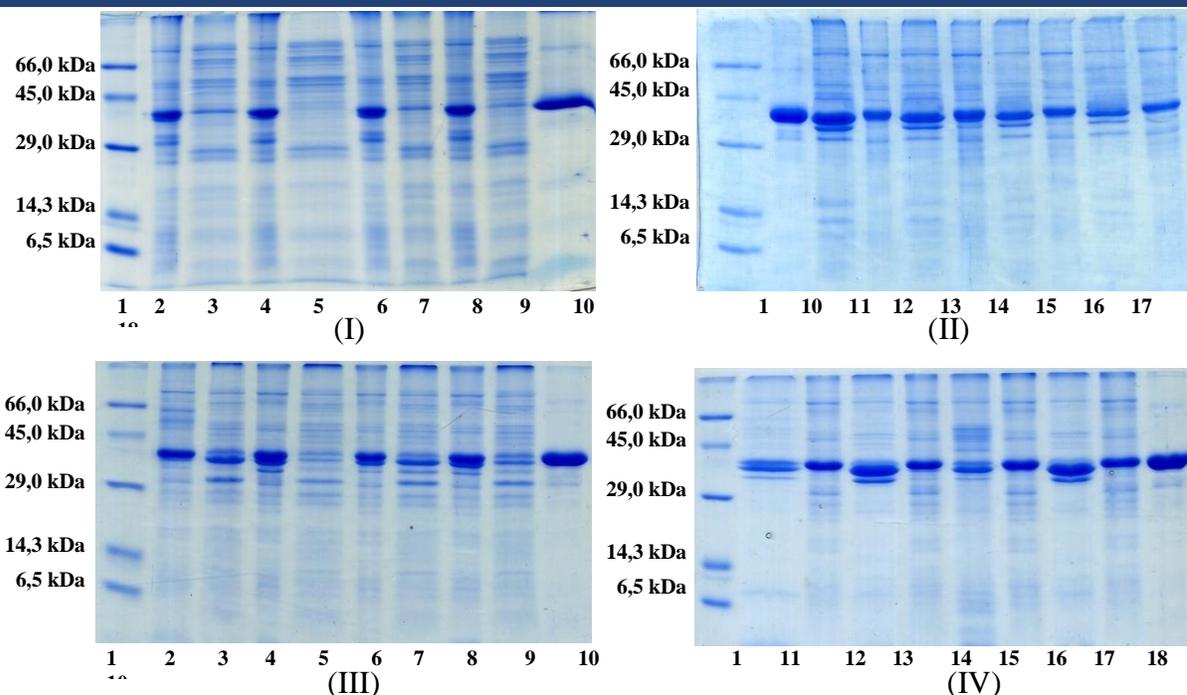


Figura 1. Electroforesis SDS-Page en poliacrilamida al 15 % en condiciones reductoras de una de las réplicas del diseño experimental. (I) Lavado según estrategia A. (II) Solubilización de los CI a partir de la estrategia A. (III) Lavado con estrategia B. (IV) Solubilización de los CI a partir de la estrategia B. En la figura: 1- patrón de masa molar, 2- precipitado de lavado 1 Tritón X-100, 3- sobrenadante de lavado 1 Tritón X-100, 4- precipitado de lavado 1 Ecosurf EH-9TM, 5- sobrenadante de lavado 1 Ecosurf EH-9TM, 6- precipitado de lavado 1 Tergitol 15-S-9TM, 7- sobrenadante de lavado 1 Tergitol 15-S-9TM, 8- precipitado de lavado 1 Ecosurf SA-9TM, 9- sobrenadante de lavado 1 Ecosurf SA-9TM, 10- Control positivo de la proteína de interés, 11- precipitado de solubilización a partir del lavado con Tritón X-100, 12- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Tritón X-100, 13- precipitado de solubilización a partir del lavado con Ecosurf EH-9TM, 14- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Ecosurf EH-9TM, 15- precipitado de solubilización a partir del lavado con Tergitol 15-S-9TM, 16- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Tergitol 15-S-9TM, 17- precipitado de solubilización a partir del lavado con Ecosurf SA-9TM, 18- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Ecosurf SA-9TM.

La proteína se encuentra insoluble formando CI, por lo que el objetivo es que se encuentre en el precipitado de lavado hasta el paso de solubilización o extracción de los mismos. En los carriles 3, 7 y 9 (Fig. 1A), que constituyen las fracciones solubles de los lavados con los detergentes Tritón X-100, Tergitol 15-S-9TM y Ecosurf SA-9TM con la estrategia A respectivamente, se observa una banda que migra a la misma altura que la proteína de interés evidenciándose una pérdida de la misma en las fracciones solubles, no mostrándose este comportamiento al realizar el lavado empleando Ecosurf EH-9TM. Sin embargo, al emplear la estrategia B de purificación de los CI (Fig. 1B) se observa la presencia de una banda a la misma altura que la proteína de interés en todas las fracciones solubles, comportamiento presente en todas las réplicas.

A partir del diseño de experimentos se obtiene para las variables de respuesta analizadas el

diagrama de interacciones entre la estrategia de purificación de los CI y tensoactivo empleado.

Como se muestra en la figura 2A la media de los mayores valores de pureza del precipitado de lavado se obtienen al emplear Ecosurf EH-9TM en la estrategia uno y Tritón X-100 en la estrategia dos, con una pureza media de 36,6 % y 37,6 % respectivamente. Por otra parte los valores de recobrado de la proteína de interés en el precipitado de lavado y pureza en el sobrenadante de solubilización con ambas estrategias describen una curva similar (Fig. 2B y 2C), obteniéndose el mayor recobrado del precipitado de lavado al emplear Ecosurf EH-9TM en la estrategia A (75,7 %) y una media de la pureza de la solubilización de los CI aproximada de 56 % al emplear Tritón X-100 y Ecosurf EH-9TM indistintamente con la estrategia dos.

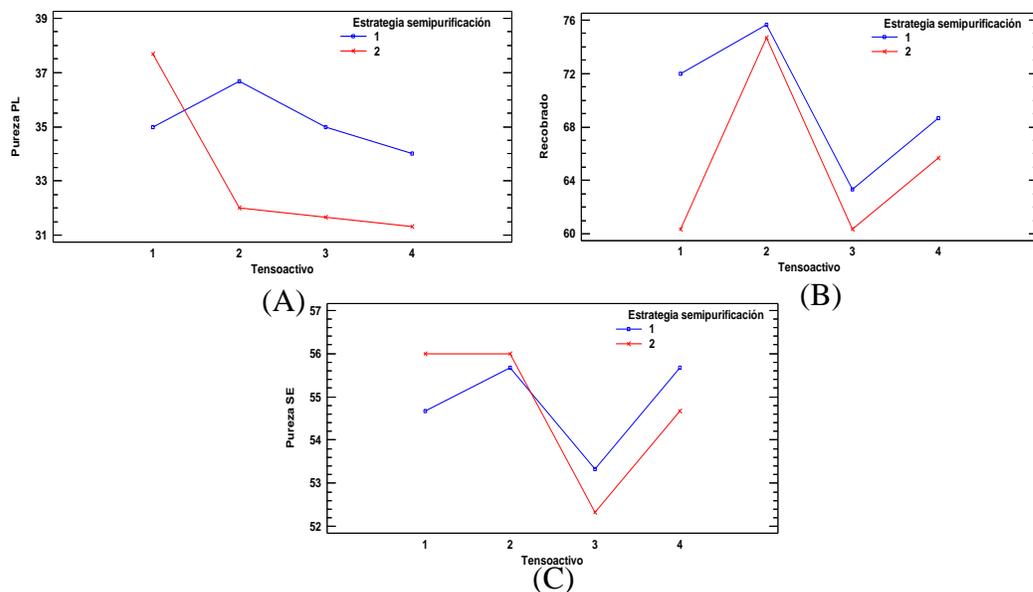


Figura 2. Gráficos de interacciones para las variables de respuesta analizadas. En la figura (A) Pureza del precipitado de lavado 1, (B) Recobrado del precipitado de lavado 1, (C) Pureza del sobrenadante de solubilización. 1- Tritón X-100, 2- Ecosurf EH-9™, 3- Tergitol 15-S-9™, 4- Ecosurf SA-9™.

Por otra parte al realizar una comparación de las medias obtenidas con el empleo de cada tensoactivo para las variables de respuestas analizadas (Fig. 3), se observan mayores porcentajes de pureza del precipitado de lavado con el empleo de Tritón X-100 con una media de $36,3 \pm 0,68$ %, mientras que el mayor recobrado se obtiene con el empleo de Ecosurf

EH-9™ con un valor medio de $75,17 \pm 2,26$ %. Al analizar las medias para las variables de respuesta pureza del sobrenadante de solubilización se obtienen valores similares pues no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0,4876$) con el empleo indistinto de los aditivos.

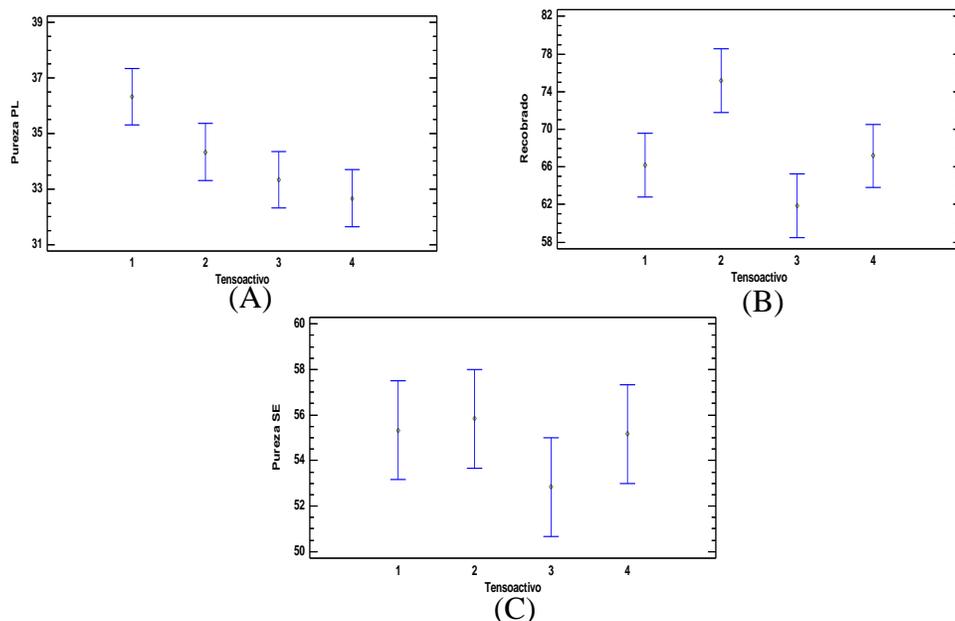


Figura 3. Gráficos de medias de los tensoactivos respecto a las variables de respuestas analizadas. En la figura (A) Pureza del precipitado de lavado 1, (B) Recobrado de la proteína de interés en el lavado 1, (C) Pureza del sobrenadante de solubilización.

Los mayores valores de pureza y recobrados obtenidos en la purificación de los CI se obtuvieron con la estrategia A. Por otra parte, el estudio de los diferentes detergentes mostró que el empleo de Tritón X-100 favorece la eliminación de proteínas contaminantes al alcanzarse una pureza 1,1 veces mayor que la alcanzada con Ecosurf EH-9™. Sin embargo, el mayor recobrado se obtuvo al emplear este último siendo 1,12 veces mayor que con Tritón X-100. Mientras, no existió una diferencia estadísticamente significativa en la etapa de solubilización a partir de los lavados con los diferentes tensoactivos. Por lo cual se puede inferir que es posible sustituir Ecosurf EH-9™ por Tritón X-100 en el lavado de los CI en el proceso de purificación en cuestión. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kiesewetter al lograr resultados similares con el empleo de Ecosurf EH-9™ y Tritón X-100 en la eliminación de lipopolisacáridos (Kiesewetter et al., 2023).

Conclusiones

El estudio de detergentes homólogos al Tritón X-100 permitió obtener como sustituto al Ecosurf EH-9™ en la purificación de los CI de una proteína modelo basada en la cápside del núcleo del virus del dengue, que además de ser un detergente biodegradable que cumple con las normas del REACH, permite obtener un recobrado 1,12 veces superior, sin afectar la pureza de la proteína solubilizada.

Referencias

Brito-Molina SM, Falero-Morejón A, González-Acevedo-Forte D, Beltran-Lisabet JF, Serrano-Rivero Y, Aldama-Paz G, Pimienta-Rodríguez E & Marrero-Domínguez K (2015) Estudio preliminar de diferentes métodos de solubilización de la proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 16 obtenida en *Escherichia coli*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46, 349-352.
https://www.researchgate.net/publication/282251339_Estudio_preliminar_de_diferentes_métodos_de_solubilización_de_la_proteína_L1_del_virus_del_papiloma_humano_tipo_16_obtenida_en_Escherichia_coli
[Preliminary study of different methods of solubilization](https://www.researchgate.net/publication/282251339_Estudio_preliminar_de_diferentes_métodos_de_solubilización_de_la_proteína_L1_del_virus_del_papiloma_humano_tipo_16_obtenida_en_Escherichia_coli)

Conley L, Tao Y, Henry A, Koepf E, Cecchini D, Pieracci J, Ghose S (2017) Evaluation of eco-friendly zwitterionic detergents for enveloped virus inactivation. *Biotechnol Bioeng*

114(4):813-820. doi: 10.1002/bit.26209. ECHA, Substance information.
<https://echa.europa.eu/candidate-listtable/-/dislist/details/Ob0236e18db570>

Falero-Morejón A, Brito-Molina S, González-Acevedo-Forte D, Serrano-Rivero Y, Aldama-Paz G, Pimienta-Rodríguez E & Domínguez KM (2015) Purificación de los cuerpos de inclusión que contienen la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano 16 producidos en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46, 344-348.
https://www.researchgate.net/publication/282326443_Purificación_de_los_cuerpos_de_inclusión_que_contienen_a_la_proteína_L1_del_Virus_del_Papiloma_Humano_16_producidos_en_la_cepa_Rosetta_de_Escherichia_coli
[Purification of inclusion bodies f_Human_Pap](https://www.researchgate.net/publication/282326443_Purificación_de_los_cuerpos_de_inclusión_que_contienen_a_la_proteína_L1_del_Virus_del_Papiloma_Humano_16_producidos_en_la_cepa_Rosetta_de_Escherichia_coli)

Feroz H, Chennamsetty N, Byers S, Holstein M, Li ZJ, Ghose S (2022) Assessing detergent-mediated virus inactivation, protein stability, and impurity clearance in biologics downstream processes. *Biotechnol Bioeng* 119(4):1091-1104. doi: 10.1002/bit.28034.

Glembin P, Racheva R, Kerner M & Smirnova I Micelle mediated extraction of fatty acids from microalgae cultures: Implementation for outdoor cultivation. *Separation and purification technology* 135, 127-134.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.057>.

ITW Reagents, ECOSURF™ EH-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-eh-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9778>

ITW Reagents, ECOSURF™ SA-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-sa-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9779>

ITW Reagents, TERGITOL™ 15-S-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/tergitol-15-s-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9780>

Kiesewetter A, Gupta A, Heinen-Kreuzig A, Greenhalgh T & Stein A (2023) Improved endotoxin removal using ecofriendly detergents for intensified plasmid capture. *Biotechnology progress* 39(6), e3375.

<https://doi.org/10.1002/btpr.3375>

Marques LP, McQuillan K, Bajaj K, Broilo M, Malys B, Mir M & Haltli B (2024) Sustainable compendial grade GMP detergent substitutes for Triton™ X-100 in bioprocessing applications.

McNamara L (2022) Regulations in the European Union for the Use of Triton X-100 in the Pharmaceutical Industry. BDO URL: https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Regulations+in+the+European+Union+for+the+Use+of+Triton+X-100+in+the+Pharmaceutical+Industry&btnG

Palmer I, Wingfield PT (2004) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 6:6.3.1-6.3.18. doi: 10.1002/0471140864.ps0603s38.

Yadav V, Lunson M, Shore H, Aucamp J (2025) Systematic Development of a Detergent Toolbox as an Alternative to Triton X-100.