REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA
R. esp. Fisiol., 22, n.º 1, 19-24. 1966

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona

Inducción de ribonucleasas en hongos. I. Rendimiento de enzima en función de las condiciones de cultivo(*)

por
C. M. Cuchillo (**), E. Concustell y V. Villar-Palasí

(Recibido para publicar el 5 de enero de 1966)

A partir de la primera purificación realizada por KUNITZ en el año 1940, la ribonucleasa aislada de páncreas de buey (EC 2.7.7.16) ha sido la base de un gran número de estudios en el campo de la química de las proteínas. Factores importantes en la elección del enzima como proteína idónea para la investigación estructural son su gran estabilidad y bajo peso molecular. Como macromolécula, la ribonucleasa ocupa actualmente la posición de un standard primario para la calibración de muchas técnicas físicas y químicas. Los estudios de ANFINSEN y de SMYTH, STEIN y MOORE (7) y colaboradores proporcionaron ya la estructura covalente completa de esta molécula.

En 1956 HIRS comprobó que en el mismo páncreas de buey existían otras ribonucleasas (2), denominándose ribonucleasa I ó ribonucleasa A a su componente mayoritario. Por otra parte, en el año 1954, KUMINAKA (4) describió la existencia de ribonucleasas en un hongo: el *Aspergillus oryzae (Taka-Diastasa)*. Pronto se comprobó que en el mismo existían como mínimo tres enzimas con actividad hidrolítica sobre el RNA, aunque con diferente especificidad de bases, de las cuales las dos principales ribonucleasa T_1 y ribonucleasa T_2 han sido ampliamente estudiadas (1), estando en la actualidad perfectamente clasificada la ribonucleasa T_1 (EC 2.7.7.26).

Posteriormente se ha procedido al estudio de ribonucleasas en diversos microorganismos, algunos de ellos de tipo fúngico, entre los que podemos citar los trabajos de SATO-ASANO (6), TANAKA y YONEDA (8, 10, 11).

En estudios llevados a cabo en este laboratorio (5) se comprobó que cultivando hongos de distintos géneros en

(*) Con una ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación Nacional.

(**) Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación.

medios de cultivo compuestos por RNA se provocaba en algunos de ellos una notable inducción de ribonucleasa. Como es sabido la síntesis proteica puede ser provocada o inhibida por la influencia de agentes específicos de origen externo, definiéndose como inducción «*la síntesis de un enzima provocada por una sustancia que es, casi invariablemente, un sustrato o un análogo del sustrato del enzima*» (3).

Por todo ello se ha considerado interesante el estudio sistemático de la inducción de ribonucleasa en hongos de diversos géneros cultivados en medios líquidos enriquecidos en RNA y la caracterización de las modalidades de su acción enzimática, así como la posible presencia de formas isoenzimáticas.

En este primer trabajo se definen las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento fúngico en *Pleospora*. Se presentan también los datos concernientes a la actividad ribonucleásica, referidos a las condiciones variables de cultivo descritas. Otros aspectos relativos a las características enzimáticas serán objeto de publicaciones posteriores.

Material y métodos

1. *Microorganismo utilizado:* Aunque en anteriores experiencias (5) se utilizaron hongos del género *Alternaria (Hifomicetos),* se ha preferido trabajar con la fase esporulada del mismo perteneciente al género *Pleospora (Ascomicetos),* por resultar más constantes sus características en las condiciones de conservación, obteniéndose además un mayor rendimiento en el crecimiento con los medios de cultivo utilizados.

La conservación de las cepas se ha realizado en placas de Petri con medio Czapek sólido, resembrándose cada mes.

2. *Cultivo en frascos de Roux:* Las experiencias realizadas para estudiar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de ribonucleasa se han llevado a cabo en frascos de Roux de 1 litro de capacidad conteniendo 250 ml de medio líquido. Con objeto de proceder a la purificación de la ribonucleasa se están efectuando pruebas con un fermentador, diseñado especialmente, de 20 litros de capacidad.

a) *Preparación del medio de cultivo:* Como tal se ha utilizado una suspensión de RNA amortiguado. La suspensión se ha preparado de la siguiente forma: En un mortero de vidrio se deslíe la cantidad adecuada de RNA *(Serva Entwicklungslabor pract.* de peso molecular bajo) con pequeñas porciones de amortiguador previamente calentado a 90° C aproximadamente. La suspensión se filtra por papel, recogiéndola en un matraz aforado. El filtro se lava varias veces con amortiguador caliente, recogiendo los líquidos de lavado, mezclándolos con la suspensión y completando hasta el volumen final. El medio de cultivo se esteriliza al autoclave, realizando la siembra con asa de platino.

b) *Separación del micelio:* Transcurrido el tiempo fijado para el crecimiento, se procede a la separación del micelio filtrando el contenido de los frascos de Roux a través de lana de vidrio previamente tarada. El conjunto se deseca y pesa.

3. *Medición de la actividad enzimática:* Para la medición de la actividad ribonucleásica se ha utilizado el procedimiento de TANAKA (8).

Resultados

A) CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

1. *Influencia de la concentración de RNA del medio de cultivo.* Se han realizado pruebas en medios con 0,5 % y 0,75 % de RNA en amortiguador de citratos 0,025 M, *p*H 6,5, representándose los resultados en la figura 1.

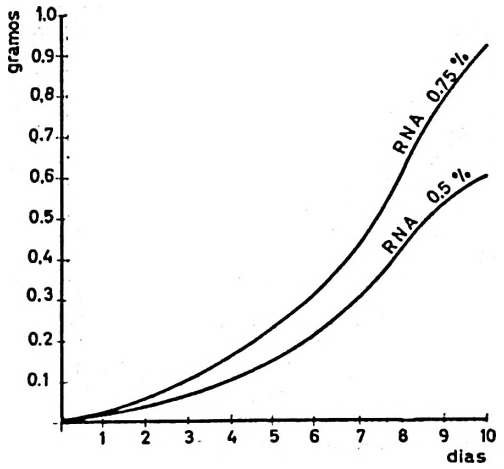

FIG. 1. Influencia de la concentración de RNA del medio de cultivo. RNA al 0,5 % y 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5, 0,025 M.

2. *Influencia del tipo de solución amortiguadora y medio de cultivo.* En la Tabla I se exponen los resultados obtenidos en cultivos de *Pleospora* realizados en medio Czapek; RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos 0,025 M, *p*H 6,3; en RNA al 0,75 % en amortiguador de fosfatos 0,025 M, *p*H 6,3; en amortiguador de citratos 0,025 M, *p*H 6,3; en amortiguador de fosfatos 0,025 M, *p*H 6,3 y en agua.

3. *Influencia del pH de la solución amortiguadora.* En la fig. 2 se representan los rendimientos obtenidos en el cultivo de *Pleospora* en función del *p*H de la solución amortiguadora.

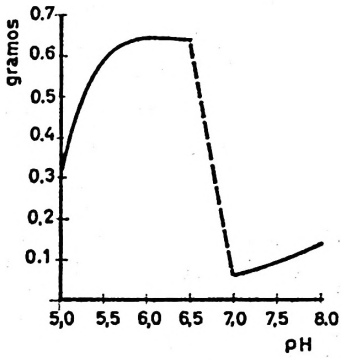

FIG. .2 Influencia del *p*H de la solución amortiguadora. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos 0,025 M. Duración del cultivo : 8 días.

4. *Influencia de la fuerza iónica.* Se ha determinado la influencia que ejerce

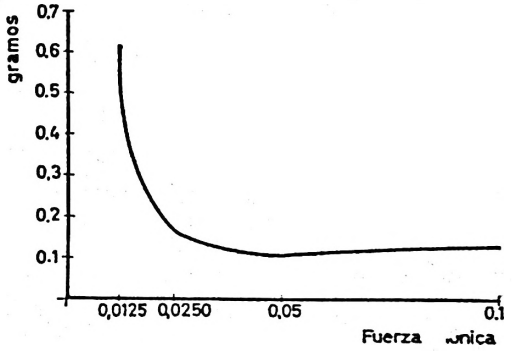

FIG. 3. Influencia de la fuerza iónica. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5. Duración del cultivo : 8 días.

TABLA I

Influencia del tipo de solución amortiguadora y medio de cultivo en el crecimiento de Pleospora. Duración del cultivo: 8 días.

% RNA	Tampón	Molaridad	pH	Medio	Peso micelio
——	——	——	—	Czapek	2,745 g
0,75	Citrato	0,025	6,3	—	0,602 "
0,75	Fosfato	0,025	6,3	—	0,035 "
——	Citrato	0,025	6,3	—	0,017 "
——	Fosfato	0,025	6,3	—	0,015 "
——	——	——	—	Agua	0,005 "

la fuerza iónica (I) en el crecimiento de *Pleospora* trabajando con amortiguador de citratos de *p*H 6,5. Los resultados se exponen en la figura 3.

5. *Influencia del tiempo.* En la fig. 4 se reflejan los resultados hallados realizando las determinaciones a intervalos de 4, 6, 8 y 10 días. Las experiencias se han llevado a cabo en RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5 y fuerza iónica 0,0125.

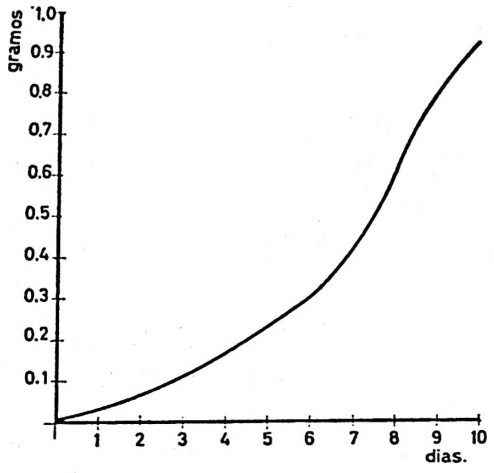

FIG. 4. Influencia del tiempo. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5, fuerza iónica 0,0125.

B) INDUCCIÓN DE RIBONUCLEASA.

1. *Influencia del pH.* En la fig. 5 se indica la actividad ribonucleásica, densidad óptica a 260 mμ, obtenida a distintos valores de *p*H, así como la actividad relativa (actividad total/peso de micelio). Asimismo se indican los valores obtenidos con medio Czapek. Para la obtención de la actividad relativa se ha partido de los pesos de micelio indicados en la fig. 2, a excepción del obtenido con medio Czapek para el que se ha partido de 1 gramo de micelio.

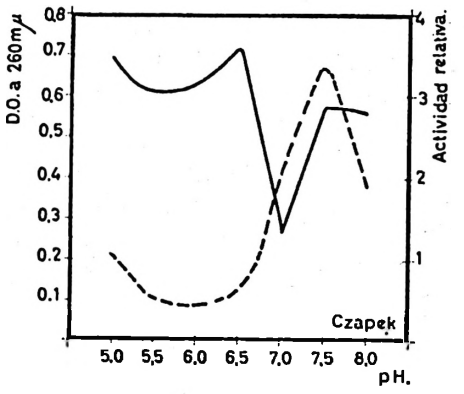

FIG. 5. Influencia del *p*H sobre la actividad ribonucleásica. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos 0,025 M. Duración del cultivo: 8 días. — Actividad absoluta. - - - Actividad relativa.

2. *Influencia de la fuerza iónica.* En la fig. 6 se exponen los resultados obtenidos trabajando con los pesos de micelio que se indican en la fig. 3.

3. *Influencia del tiempo.* Los resultados obtenidos partiendo de los pesos señalados en la fig. 4, se exponen en la fig. 7.

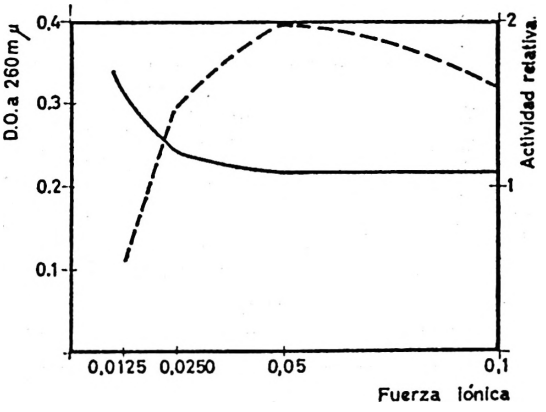

FIG. 6. Influencia de la fuerza iónica sobre la actividad ribonucleásica. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5. Duración del cultivo: 8 días. — Actividad absoluta. - - - Actividad relativa.

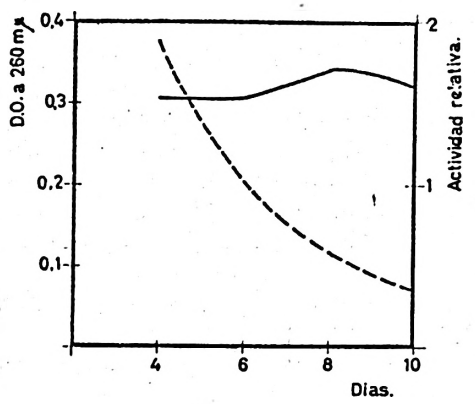

FIG. 7. Influencia del tiempo sobre la actividad ribonucleásica. RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos *p*H 6,5 I = 0,0125. — Actividad absoluta. - - - Actividad relativa.

Discusión

La concentración de RNA — como sustrato nutritivo — en el medio de cultivo influye directamente en el crecimiento micelar, observándose que a una concentración del 0,75 % se obtiene un rendimiento superior — del orden del 48 % como término medio — respecto al obtenido trabajando a una concentración de RNA del 0,5 %.

La naturaleza de la solución amortiguadora influye asimismo en el desarrollo micelar, teniendo a estos efectos el amortiguador de citratos una acción 17 veces mayor que el de fosfatos de igual *p*H y molaridad.

El *p*H de la solución amortiguadora ejerce igualmente una influencia manifiesta sobre el desarrollo de la masa micelar, encontrándose los valores óptimos entre unos límites de 5,5 y 6,5. A este respecto hay que hacer notar que las pruebas realizadas a los valores de *p*H comprendidos entre 7,0 y 8,0 se han llevado a cabo en amortiguador de fosfatos en lugar del de citratos dado que la capacidad amortiguadora de este último se encuentra entre unos límites de *p*H de 5,0 y 6,6.

La fuerza iónica de la solución amortiguadora interviene directamente en el rendimiento final, observándose que, prácticamente, la curva de crecimiento adopta una forma parabólica, siendo asintótica al eje de ordenadas en el valor de I = 0,0125 y al eje de abcisas en el valor I = 0,05, lo cual coincide con las experiencias realizadas por WINSTEAD y WOLD (9).

En cuanto a la relación existente entre la duración del cultivo y el crecimiento micelar, se ha podido comprobar que existe una fase lenta que dura aproximadamente hasta el 5.° día de cultivo, creciendo logarítmicamente entre el 5.° y 9.° día, a partir del cual se observa ya una inflexión en la curva de crecimiento que debe conducir a la fase estacionaria.

Los resultados concernientes a la actividad ribonucleásica permiten tener una idea bastante precisa del proceso inductivo en el microorganismo utilizado. En líneas generales, la actividad ribonucleásica total, por operación de cultivo, es sensiblemente proporcional al desarrollo micelar en función del *p*H y de la fuerza iónica del amortiguador utilizado. La actividad permanece aproximadamente constante, aunque el desarrollo de la masa micelar sea diferente, cuando la única variable del sistema es el tiempo de cultivo.

En cuanto a la actividad ribonucleásica relativa, se ha observado que se halla en razón sensiblemente inversa al desarrollo fúngico. En todos los casos estudiados, la actividad ribonucleásica, tanto total como relativa, ha sido muy superior a la obtenida cultivando en medio Czapek.

Dadas las características propias de los elementos y métodos de trabajo empleados en las experiencias reseñadas se ha procurado en todo caso normalizar al máximo las condiciones y técnicas operatorias, reflejándose en los resultados expuestos a lo largo de este estudio los valores medios obtenidos. Se han acep-

tado como satisfactorios aquellos que presentan una desviación de la media dentro de unos límites de ± 10 %.

Conclusiones

Las condiciones óptimas de crecimiento obtenidas con hongos del género *Pleospora*, se encuentran operando con un medio de cultivo integrado por RNA al 0,75 % en amortiguador de citratos de *p*H 6,5 y fuerza iónica 0,0125.

La inducción de ribonucleasa es manifiesta, observándose que para proceder a la purificación de la misma las condiciones óptimas coinciden con las de desarrollo de la masa micelar.

En cuanto a la intensidad del fenómeno inductivo se observa una relación sensiblemente inversa a la intensidad de crecimiento.

Resumen

Se estudian los rendimientos de RNA inductivo, obtenidos en el cultivo de hongos del género *Pleospora* en medios líquidos compuestos por RNA amortiguado, en función de la concentración de RNA, *p*H del amortiguador, medio de cultivo, tipo de amortiguador, fuerza iónica y duración del cultivo. Las condiciones óptimas de rendimiento corresponden a una concentración de RNA del 0,75 % en amortiguador de citratos de *p*H 6,5 y fuerza iónica 0,0125. El rendimiento obtenido con amortiguador de fosfatos es muy inferior al de amortiguador de citratos de igual *p*H y concentración. Se estudia igualmente el desarrollo miclear en función de la duración del cultivo.

Asimismo, se han realizado determinaciones de actividad ribonucleásica habiéndose comprobado que los resultados de las mismas mantienen una correlación entre desarrollo y actividad absoluta. La actividad relativa se halla, sin embargo, en relación inversa al crecimiento.

Summary

Induction of ribonucleases in fungi. I. Yield of enzyme with regard to the culture conditions.

The yields of inductive RNA in the culture of *Pleospora* fungi in liquid medium composed by buffered RNA, are studied in function of the concentration of RNA, *p*H of the buffer, kind of culture medium, kind of buffer, ionic strength and duration of culture. The best conditions of yield corresponding to a concentration of 0,75 % RNA in citrate buffer *p*H 6,5 and ionic strength 0,0125. The yield obtained with phosphate buffer is very inferior to the yield obtained with citrate buffer of the same *p*H and concentration. The mycelium growth in function to the duration of culture is also studied.

On the other hand, determinations of ribonuclease activity were carried out, and it appears that the results of those show a relationship between growth and absolute activity. The relative activity is, however, in inverse relation to the growth.

Bibliografía

(1) EGAMI, F., TAKAHASHI, K. y UCHIDA, T., en DAVIDSON, J. N. y COHN, W. E.: «Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology» Academic Press, Nueva York, 59, 1964.

(2) HIRS, C. H. W.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 611, 1956.

(3) JACOB, F. y MONOD, J.: «Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry», Pergamon Press, Oxford, 132, 1963.

(4) KUMINAKA, A.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 282, 1954.

(5) ROSELL, M., CONCUSTELL, E. y VILLAR-PALASÍ, V.: *R. esp. Fisiol.*, **16**. Supl. II, 165, 1960.

(6) SATO-ASANO, K.: *J. Biochem.*, **46**, 31, 1959.

(7) SMYTH, D. G., STEIN, W. H. y MOORE, S.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 227, 1963.

(8) TANAKA, K.: *J. Biochem.*, **50**, 62, 1961.

(9) WINSTEAD, J. A. y WOLD, F.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3694, 1965.

(10) YONEDA, M.: *J. Biochem.*, **55**, 469, 1964.

(11) YONEDA, M.: *J. Biochem.*, **55**, 481, 1964.