

## Susceptibilidad proteolítica de la $\alpha$ -amilasa de páncreas de cerdo privada de su calcio estructural

J. C. G. Milicua, F. A. García y J. M. Macarulla

Universidad del País Vasco  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias  
48080 Bilbao (España)

(Recibido el 6 de junio de 1984)

J. C. G. MILICUA, F. A. GARCIA and J. M. MACARULLA. *Hog Pancreas  $\alpha$ -Amylase Depleted of its Structural Calcium Proteolytic Susceptibility Changes*. Rev. esp. Fisiol., 42 (3), 355-358, 1984.

Hog pancreas  $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ -1-4-glucan-glucane hydrolase, E.C. 3.2.1.1) lost its structural calcium by action of EDTA at 20°C. Enzymatic activity experimented a decrease whereas a big increase in proteolytic susceptibility to bovine pancreas trypsin (E.C. 3.4.4.4) was shown. Native  $\alpha$ -amylase had an activity of 2,730 mg maltose/min  $\times$  mg enzyme and a  $K_m$  of 0.222 % amylose, the activity of calcium depleted amylase being of 1,640 mg maltose/min  $\times$  mg enzyme and  $K_m$  0.571 % amylose. Simple methods for evaluating proteolytic susceptibility of  $\alpha$ -amylase microamounts against trypsin action, and for the measurement of  $\alpha$ -amylase activity in polyacrylamide rod gels were also described.

Key words:  $\alpha$ -Amylase, Calcium, EDTA and trypsin.

La enzima  $\alpha$ -amilasa es secretada por el páncreas junto con varias proteasas, las cuales, liberadas en forma inactiva como zimógenos, son activadas en el duodeno por medio de una serie de reacciones iniciada con la conversión del tripsinógeno en tripsina, catalizada por la enteroquinasa (6). El resto de las proteasas pancreáticas son convertidas en su forma activa por acción de la tripsina (5). A partir de la activación de las proteasas pancreáticas, las proteínas ingeridas comienzan a sufrir la digestión intestinal. Sería un grave inconveniente que junto a estas proteínas fueran hidrolizadas enzimas digestivas, como la  $\alpha$ -amilasa. Por ello, un me-

canismo sencillo de protección podría depender del hecho de que estas enzimas nativas presentaran una baja susceptibilidad proteolítica. El objeto del presente trabajo consiste en estudiar comparativamente la susceptibilidad proteolítica de la  $\alpha$ -amilasa y de una  $\alpha$ -amilasa transconformada (4) frente a la acción de la tripsina.

### Materiales y Métodos

La enzima  $\alpha$ -amilasa (Merck) presenta pureza del 100 % en electroforesis, observándose sus dos isozimas (4). La trip-

sina es grado III (Sigma), la acrilamida y la n-n'-metilenbisacrilamida son de grado electroforético (BDH). El resto de los reactivos son de Merck. La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó por el método de DAVIES (1) y la tinción y destinción por el de WEBER Y OSBORN (9). La actividad  $\alpha$ -amilásica en geles de poliacrilamida se midió por la reacción yodoyodurada: el gusano de electroforesis se incubó con amilasa soluble al 0,1 % en tampón fosfato 0,02 M, NaCl 0,0067 M, pH 7,5, durante 20 minutos, a 20°C. Posteriormente, se lavó con el mismo tampón varias veces y se incubó durante una hora. Las zonas donde existía actividad amilásica, tras el revelado con la solución yodoyodurada, permanecieron transparentes, mientras se colorearon de azul las zonas que no contenían enzima. La actividad amilásica (1  $\mu$ g/ml) se ensayó por reductimetría con ácido dinitrosalicílico (7) en el tampón fosfato descrito, durante 10 min, usando como sustrato almidón purificado soluble de Merck (amilosa).

La actividad de la tripsina sobre la  $\alpha$ -amilasa se midió por una modificación del método de FOLIN Y DENIS (3), basado en la facultad que posee el reactivo de Folin-Ciocalteu (2) para detectar grupos fenoles como los de la tirosina. A 100  $\mu$ l de disoluciones de 1 mg/ml  $\alpha$ -amilasa, tratada y sin tratar con EDTA 10 mM, en el tampón fosfato, se les añadió 20  $\mu$ l de una disolución de tripsina de 1 mg/ml, dejándolas reaccionar entre 20 y 60 min, y se detuvo la reacción por adición de 200  $\mu$ l de ácido tricloroacético que precipitó todos los polipéptidos no hidrolizados y la tripsina. Posteriormente, para eliminar los productos no hidrolizados, se centrifugó durante 20 min en una centrífuga clínica. Se tomaron 200  $\mu$ l del sobrenadante y se añadieron 400  $\mu$ l de NaOH 1 M y 120  $\mu$ l del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:2. El blanco de la reacción se preparó de la misma forma, deteniendo la reacción a tiempo cero. El 100 % de la reacción se midió sin centrifugar y sin aña-

dir tripsina. El color obtenido se midió a 578 nm.

## Resultados y Discusión

POMMIER *et al.* (8) demostraron que el EDTA tenía la propiedad de eliminar el calcio estructural de la  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, a la temperatura de 37°C en que fue realizado el trabajo, se observa una disminución gradual de la actividad tanto de la enzima como de la apoenzima *in vitro*, y por ello, estas condiciones de experimentación no eran válidas para la comparación de susceptibilidades proteolíticas entre una enzima intacta y otra que ha sufrido ligeras modificaciones; ya que la pérdida de actividad, debida a la temperatura, implica una distinta desnaturalización de la enzima  $\alpha$ -amilasa y su apoenzima. Con el fin de evitar la desnaturalización térmica, el calcio estructural fue eliminado por incubación de la enzima (1  $\mu$ g/ml) con EDTA 10 mM, a 20°C, debido a que la actividad enzimática, tanto de la enzima como la de su apoenzima, permanecían invariables en tiempos comprendidos entre 1 y 80 minutos. La concentración de 10 mM era suficiente para eliminar el calcio estructural ya que utilizando concentraciones entre 0 y 10 mM

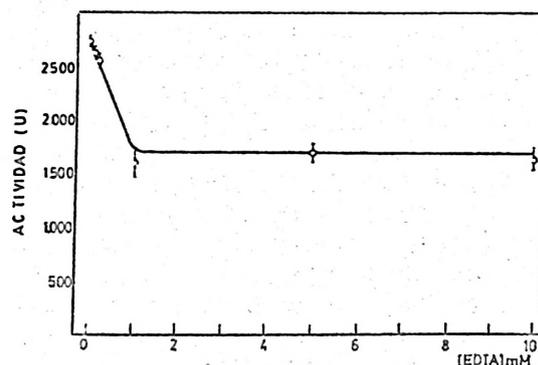


Fig. 1. Pérdida de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa por efecto de diferentes concentraciones de EDTA en tampón fosfato a pH 7,5 y a 20°C.

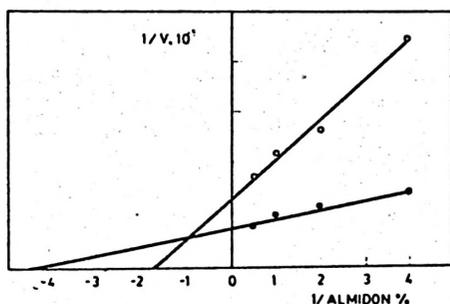


Fig. 2. Representación de Lineweaver-Burk de las actividades enzimáticas de la α-amilasa (●—●) y de su apoenzima (○—○), privada de su calcio estructural, en tampón fosfato a pH 7,5 y 20°C.

de EDTA se observó una curva de pérdida de actividad que presenta una saturación a partir de 1 mM (fig. 1). A partir de estos resultados se pudieron obtener las afinidades relativas por el calcio entre la enzima y el agente quelante. El calcio estaba repartido en su 50 % para la enzima cuando:  $-\Delta V = 1/2(-\Delta V_{total})$  por lo que la afinidad de la α-amilasa era aproximadamente 61.000 veces superior a la del EDTA por este calcio estructural.

Se constató el cambio en los parámetros cinéticos entre la enzima α-amilasa y su apoenzima privada del calcio estructural (fig. 2), obteniéndose los valores de

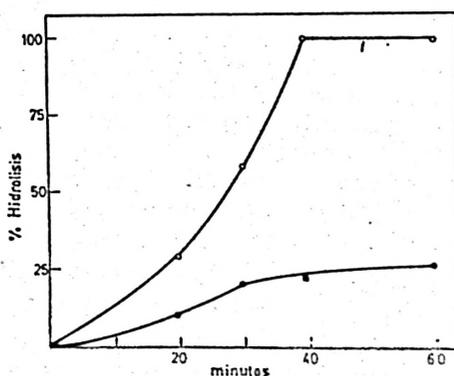


Fig. 3. Medida de la actividad de la tripsina sobre la α-amilasa (●—●) y su apoenzima (○—○) frente al tiempo.

V<sub>max</sub> de 2.730 mg maltosa/min · mg enzima y K<sub>m</sub> de 0,222 % de amilosa para la enzima nativa, y de una V<sub>max</sub> de 1.640 mg maltosa/min · mg enzima y una K<sub>m</sub> de 0,571 % de amilosa para la apoenzima. Sin embargo, estas variaciones discretas en la actividad se correspondían con drásticas variaciones en su susceptibilidad proteolítica, ya que la enzima nativa, sometida a elevadas concentraciones de tripsina, era prácticamente insensible a la actuación de dicha enzima, mientras que la apoenzima sufría una hidrólisis efectiva por parte de la tripsina (fig. 3). Estos resultados orientan hacia la idea de que las enzimas digestivas nativas son prácticamente insensibles a la acción de las proteasas digestivas. En cambio, pueden variar su actividad y su estructura en condiciones similares a la digestión y convertirse, a su vez, en sustratos para las proteasas, una vez terminada su función, para ser reabsorbidos sus aminoácidos por el tubo digestivo.

### Resumen

La enzima α-amilasa de páncreas porcino (α-1, 4-glucán-glucano-hidrolasa, E.C. 3.2.1.1) en presencia de EDTA a 20°C pierde su calcio estructural, lo que conlleva a una ligera pérdida de la actividad enzimática y a un notable aumento de su susceptibilidad proteolítica frente a la acción de la tripsina de páncreas bovino (E.C. 3.4.4.4). Se describen métodos sencillos para el análisis de la susceptibilidad proteolítica de microcantidades de enzima α-amilasa, frente a la acción de la tripsina y para la medida de la actividad α-amilasa en geles de poliacrilamida.

### Bibliografía

1. Davies, B. J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-409, 1964.
2. Folin, O. y Ciocalteu, V.: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927.
3. Folin, O. y Denis, W.: *J. Biol. Chem.*, **12**, 139, 1912.
4. Granger, M., Abadie, B., Mazzei, Y. y Marchis-Mouren, G.: *FEBS Lett.*, **50**, 276-278, 1975.

5. Hantley, B. S. y Shatton, D. M.: En «The Enzymes» (P. D. Boyer, ed.). Academic Press. Nueva York, 1971, vol. 3, pp. 323-373.
6. Keil, B.: En «The Enzymes» (P. D. Boyer, ed.). Academic Press. Nueva York, 1971, vol. 3, pp. 250-275.
7. Noelting, G. y Bernfeld, P.: *Helv. Chim. Acta*, **31**, 286, 1948.
8. Pommier, O., Cozzone, P., Marchis-Mouren, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, **350**, 71-83, 1974.
9. Weber, K. y Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412, 1969.