

GLI ENZIMI E LA MISURA DELLA LORO ATTIVITÀ

PARTE 3 // 18 Luglio 2025

Vantaggi nella determinazione delle attività specifiche degli enzimi

L'attività cheratinolitica è ovviamente importante per la depilazione, sebbene non rilasci i peli dai follicoli ma agisca sulla cheratina del pelo.

L'attività delle elastasi, che agiscono sull'elastina, è desiderabile per la rimozione dell'elastina indesiderata dalle pelli, contribuendo a ottenere pelli più morbide e flessibili.

L'attività collagenasica, sebbene talvolta necessaria, è generalmente meno desiderabile in quanto un'attività troppo elevata può danneggiare la struttura del fiore della pelle e le caratteristiche fisico-meccaniche.

La determinazione delle attività verso un particolare tipo di substrato, può essere utilizzata per la definizione di indici di specificità, cioè il rapporto tra attività relative verso un substrato rispetto ad un altro e renderne più efficace e gestito l'uso nelle diverse fasi del processo conciario.

Ad esempio, per distinguere le cheratinasi da proteasi generiche, si utilizza il rapporto $K : C$ tra attività su cheratina e caseina che per le vere e proprie cheratinasi si trova nel range 0,5–0,7.

[10]

Metodi continui per la determinazione dell'attività enzimatica

I saggi continui sono definiti dalla capacità di monitorare continuamente la scomparsa di un dato substrato o l'apparizione di un dato prodotto. Essi si basano principalmente su tecniche spettroscopiche, come l'assorbimento nell'ultravioletto-visibile e l'emissione di fluorescenza.

Spettroscopia di assorbimento UV-Visibile

La legge di Lambert-Beer ($A = \epsilon cl$) stabilisce che l'assorbanza (A) è direttamente proporzionale al coefficiente di estinzione molare (ϵ), alla concentrazione del composto (c) e al cammino ottico della cuvetta (l). Pertanto, la variazione molare della concentrazione nel tempo, o velocità iniziale ($v = -d[S]/dt$ o $d[P]/dt$), può essere calcolata direttamente dalla pendenza della variazione del segnale spettroscopico a una data lunghezza d'onda rispetto al tempo (dA/dt), dividendo per ϵl .

Un esempio è rappresentato dal saggio della tripsina (EC 3.4.21.4) con BAEE, che utilizza il $N\alpha$ -Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) come substrato.

La reazione prevede l'idrolisi di BAEE in $N\alpha$ -Benzoyl-L-arginine ed etanolo, catalizzata dalla tripsina. La misurazione viene effettuata come determinazione spettrofotometrica continua della velocità a 253 nm (A_{253}).

Definizione dell'Unità (Unità BAEE): Un'unità BAEE di attività della tripsina produce un ΔA_{253} di 0,001 per minuto con BAEE come substrato a pH 7,6 e 25 °C in un volume di reazione di 3,20 mL.

Il calcolo si basa sulla variazione dell'assorbanza ($\Delta A_{253}/\text{min}$) divisa per il fattore di diluizione e il volume di campione utilizzato.

Spettroscopia di Fluorescenza e Fosforescenza

Questi metodi offrono una sensibilità significativamente maggiore rispetto all'assorbimento UV-Visibile. In essi vengono confrontate le variazioni relative nell'emissione di fluorescenza nel tempo, poiché non è possibile calcolare la concentrazione del fluoroforo da una costante universale equivalente al coefficiente di estinzione molare.

Saggi Accoppiati

In casi in cui la coppia substrato-prodotto non presenta proprietà spettroscopiche utili, uno o più enzimi aggiuntivi possono essere inclusi nella miscela di reazione per "accoppiare" un dato prodotto a una reazione che produce una proprietà spettroscopica rilevabile.

In questi saggi è fondamentale assicurarsi che la velocità di reazione sia determinata esclusivamente dall'enzima di interesse, e che la concentrazione di ciascun componente aggiunto per facilitare la reazione accoppiata sia in eccesso tale da non limitare la reazione (ordine zero rispetto a questi componenti).

Riferimenti bibliografici

[1] <https://www.researchandmarkets.com/reports/5393522/industrial-enzymes-market-global-forecast-report>

[2] <https://ssip.it/2024/10/24/focus-scientifico-macerazioni-delle-pelli-obiettivi-ed-aspetti-tecnologici/>

[3] Wet blue enzymatic treatment and its effect on leather properties and post-tanning processes. *Materials* 2023, 16, 2301. <https://doi.org/10.3390/ma16062301>

[4] <https://ssip.it/2021/12/21/analisi-prospettica-delle-tecnologie-enzimatiche-applicate-alla-filiera-della-pelle/>

[5] <https://ssip.it/2025/05/29/focus-panoramica-sugli-approcci-enzimatici-per-innovazioni-nel-recupero-e-nel-riutilizzo-dei-rifiuti-conciari/>

[6] <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>

[7] Heidemann, E. (1993) Collagen Chemistry. In Fundamentals of Leather Manufacture, Eduard Roether KG.

[8] Naviglio B., Problemi relativi alla determinazione del potere digestivo dei maceranti, CPMC 65(3), 21 - 1989

[9] A rapid quantitative assay for bacterial protease activity, Hyen - <http://hdl.handle.net/2346/1352>

[10] Isolation of Bacillus sp. A5.3 Strain with Keratinolytic Activity; Aktayeva et al., *Biology* **2022**, 11(2), 244