

# GLI ENZIMI E LA MISURA DELLA LORO ATTIVITÀ

## PARTE 2 //11-07-2025

### ***Metodi di determinazione dell'attività enzimatica***

La misurazione dell'attività enzimatica, o attività catalitica, si basa sulla quantificazione della velocità di una reazione chimica catalizzata da un enzima. L'enzima agisce aumentando la velocità della reazione senza essere consumato nel prodotto finale. Questo viene tipicamente ottenuto misurando la velocità di scomparsa di un dato substrato o la velocità di formazione di un dato prodotto nel tempo.

I metodi per la determinazione dell'attività enzimatica possono essere classificati in due categorie principali:

- Saggi discontinui: in questi approcci, la reazione enzimatica viene interrotta manualmente (o "bloccata") a intervalli di tempo specifici, e successivamente le concentrazioni del substrato o del prodotto vengono determinate per ciascun punto temporale.
- Saggi continui: questi metodi consentono di monitorare costantemente la variazione di concentrazione del substrato o del prodotto nel tempo.

### ***Metodi Discontinui per la Determinazione dell'Attività Enzimatica***

I saggi discontinui vengono utilizzati quando non è possibile monitorare continuamente e selettivamente le variazioni di concentrazione del substrato o del prodotto (ad esempio, quando presentano proprietà spettroscopiche simili o assenti). La reazione enzimatica deve essere interrotta manualmente (o "bloccata") a diversi intervalli di tempo. I campioni bloccati vengono quindi sottoposti a un metodo per separare efficacemente il prodotto dal substrato, in modo da determinare la variazione di concentrazione di uno dei due per ogni singolo punto temporale.

I fattori critici includono il blocco efficiente della reazione e la separazione efficiente di una piccolissima quantità di prodotto formato (spesso circa il 5%) da una quantità molto maggiore di substrato non reagito (circa il 95%) necessaria per misurare le velocità iniziali.

Limitandosi ai metodi di determinazione dell'attività dei soli enzimi proteolitici, i cui substrati di azione rappresentano la parte più rilevante del prodotto pelle, tra i metodi discontinui, va sicuramente riportato il metodo Löhlein-Volhard.

Questo è uno dei metodi tradizionalmente più usati e valuta l'azione degli enzimi, e più in generale delle sostanze maceranti, sul substrato costituito da caseina. Essendo quest'ultimo una proteina non presente nella pelle, la sua scelta è dovuta ad un compromesso tra facilità di ottenere questo substrato con un buon grado di purezza e la rappresentatività del risultato.

Questo metodo, però, ha intrinsecamente una forte restrizione di utilizzo all'interno di un range abbastanza stretto del rapporto enzima/substrato, alla quale si sopperisce unicamente ripetendo più volte il test fino a trovarsi in condizioni idonee.

### METODO LÖHLEIN-VOLHARD



Di questo metodo sono state proposte versioni modificate in modo da minimizzare questi fattori limitanti. <sup>[8]</sup>

Un altro metodo molto utilizzato è il metodo Anson, il quale prevede la digestione, per 10 minuti a pH 7.5 ed a 25°C, di emoglobina denaturata da parte dell'enzima, o dei prodotti maceranti. L'emoglobina non decomposta viene precipitata con acido tricloroacetico mentre l'amminoacido tirosina liberato dall'azione dell'enzima reagisce con il reattivo di Colin-Ciocalteu portando ad un prodotto la cui assorbanza è rilevabile e quantificabile a 660 o 750 nm.

### METODO DI ANSON



Un altro saggio che è stato ampiamente utilizzato e che prevede l'utilizzo di un substrato generico è il saggio che fa uso di Azocoll, un collagene sottoposto ad un trattamento di colorazione con un colorante azoico, e, quindi, permette di rilevare la azione collagenolitica delle proteasi. La digestione proteolitica rilascia peptidi legati al colorante, che possono, poi, essere quantificati colorimetricamente.

Nel tempo sono stati proposti saggi che fanno uso di substrati più specifici in relazione alle proteine presenti nella pelle e sulle quali, durante il processo di lavorazione, si ha intenzione di agire. Tra i diversi, si citano i saggi con Keratin Azure, Elastin-Congo Red, Hide Powder Black.

Utilizzando questi substrati proteici, ai quali o covalentemente o in maniera polare sono fissati i coloranti, si liberano in soluzione sostanze, anche se ancora associate a peptidi più solubili del substrato di partenza, rilevabili spettrofotometricamente (ad esempio a 595 nm per keratin azure, 495 nm per elastin-Congo Red, 592 nm per hide powder black).

Per questi saggi, un'unità di attività enzimatica corrisponde alla quantità di enzima che provoca una variazione di assorbanza di 0,01 a una lunghezza d'onda specifica (a seconda del substrato e del colorante) per 30 minuti a 55 °C.

Uno studio<sup>[9]</sup> sullo sviluppo di un saggio che utilizza un ulteriore colorante, enuclea in maniera molto esaustiva tutte le variabili che possono influenzare l'efficacia e la robustezza di questa tipologia di substrati.

Il colorante usato in questo studio è il Coomassie Blue R350, altrimenti indicato come Acid Blue 90, sviluppato in origine per l'industria tessile ma ora comunemente impiegato per colorare le proteine nelle analisi biochimiche, specificamente nell'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Come substrato viene utilizzata polvere di pelle ottenuta per molitura di pelle grezza essiccata.

Il Coomassie Blue R350 ha, in soluzione, un picco di assorbimento a 550 nm, che si sposta leggermente a 559 nm per la soluzione di peptidi legati al Coomassie, indicando una stabilità del colore in un ampio intervallo di pH (3-12), il che è importante per la rilevazione di diversi tipi di enzimi.

La colorazione influisce sulla reazione di idrolisi, probabilmente ostacolando l'accesso dell'enzima e riducendo l'efficienza rispetto alla polvere di pelle non colorata o idratata. L'impiego di una maggiore concentrazione di enzima permette di raggiungere la massima efficienza di idrolisi con la polvere di pelle colorata.

La presenza di sale, comune nei bagni di pelle conciata, influisce sull'idrolisi enzimatica e alcalina. L'aumento della concentrazione di sale tende a diminuire l'assorbanza (efficienza di idrolisi). Questo provoca uno spostamento verso il basso della curva di calibrazione, ma la pendenza della relazione lineare tra assorbanza e concentrazione di enzima rimane invariata, il che significa che la sensibilità del metodo è mantenuta.

Il metodo citato può rilevare concentrazioni dell'enzima 0,01 µg/ml o un'attività enzimatica di  $1,01 \times 10^{-3}$  LVU/ml in assenza di sale, e 0,05 µg/ml o  $5,05 \times 10^{-3}$  LVU/ml in presenza di sale.

Questo rende il saggio della polvere di pelle colorata molto sensibile rispetto al limite di rilevazione del metodo Löhlein-Volhard (8 LVU/ml).

