

GLI ENZIMI E LA MISURA DELLA LORO ATTIVITÀ

PARTE 1

Gli enzimi e la loro classificazione

Gli enzimi sono macromolecole che fungono da catalizzatori: accelerano, senza essere consumati, reazioni chimiche in una varietà di processi biologici. Per questa caratteristica, sono ampiamente utilizzati in molti ambiti industriali, dall'industria alimentare a quella delle bevande, dal tessile al conciario, dal farmaceutico a quello dei biocarburanti, contribuendo ad aumentare la produzione, ridurre il consumo di energia e migliorare la qualità dei prodotti.

La richiesta di enzimi industriali è aumentata a seguito del crescente interesse per metodi di produzione ecocompatibili e sostenibili ed il settore prevede una delle maggiori espansioni di mercato dei prossimi anni ^[1].

Nel settore conciario, gli enzimi sono utilizzati in diverse fasi chiave della lavorazione. Tradizionalmente il loro utilizzo è stato concentrato nelle fasi di riviera e di preparazione alla concia ^[2]. I recenti sviluppi del settore biotecnologico ne stanno prospettando un sempre maggiore impiego anche su prodotti semilavorati ^[3] ed anche nelle fasi di rifinizione oltre che nella gestione degli scarti di lavorazione e dei rifiuti ^{[4][5]}.

Nel tempo si è esteso l'uso di enzimi da quelli estratti da deiezioni o dal sistema digerente di animali anche a quelli ottenuti da metabolismo di funghi, lieviti e batteri.

La disponibilità e la conoscenza della funzionalità di una gamma sempre maggiore di enzimi si sono potute ottenere grazie all'esplorazione di un numero sempre più esteso di microrganismi, soprattutto di ceppi batterici, abbinata alla sempre maggiore capacità di rilevarne ed interpretarne i meccanismi di azione biochimica.

Data la estrema vastità della classe chimica delle macromolecole proteiche così come quella dei substrati sui quali, quando svolgono la funzione di enzima, possono agire, è facile immaginare la complessità e la non esaustività nel descrivere e tentare di classificare in maniera sistematica gli enzimi.

Tra le diverse utilizzate, la classificazione (il cui ultimo aggiornamento è del 2024) basata sulla specifica reazione chimica catalizzata da un determinato enzima è quella gestita dal *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*^[6]. In tabella 1 sono dettagliati quelli di maggior interesse per il settore conciario.

EC 1	Ossidoreduttasi
EC 2	Transferasi
EC 3	Idrolasi
EC 3.1	Acting on ester bonds
EC 3.1.1	Carboxylic ester hydrolases
EC 3.1.4	Phosphoric diester hydrolases

EC 3.4	Acting on peptide bonds (Peptidases)	
EC 3.4.11–19	Exopeptidases	Scissione in prossimità di un'estremità di peptidi o proteine
EC 3.4.11	Aminopeptidases	Rimozione di un singolo amminoacido dall'estremità ammino-terminale libera
EC 3.4.13	Dipeptidases	Esopeptidasi specifiche per dipeptidi
EC 3.4.14	Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases	Rimozione di un dipeptide o tripeptide dall'estremità ammino-terminale libera
EC 3.4.15	Peptidyl-dipeptidases	Rimozione di dipeptidi dalla porzione carbossi-terminale di un peptide
EC 3.4.16–18	Carboxypeptidases	Rimozione di un singolo amminoacido dall'estremità carbossi-terminale
EC 3.4.16	Serine-type carboxypeptidases	I siti attivi contengono serina
EC 3.4.17	Metallo-carboxypeptidases	I siti attivi contengono ioni metallici
EC 3.4.18	Cysteine-type carboxypeptidases	I siti attivi contengono cisteina
EC 3.4.19	Omega peptidases	Rimozione dei residui terminali sostituiti, ciclizzati o legati da legami isopeptidici
EC 3.4.21–25	Endopeptidases	Scissione interna di peptidi o proteine
EC 3.4.21	Serine endopeptidases	I siti attivi contengono serina
EC 3.4.22	Cysteine endopeptidases	I siti attivi contengono cisteina
EC 3.4.23	Aspartic endopeptidases	I siti attivi contengono aspartato
EC 3.4.24	Metalloendopeptidases	I siti attivi contengono ioni metallici
EC 3.4.25	Threonine endopeptidases	I siti attivi contengono treonina
EC 3.4.99	Endopeptidases of unknown catalytic mechanism	Azione su legami peptidici
EC 4	Liasi	
EC 5	Isomerasi	
EC 6	Ligasi	
EC 7	Traslocasi	

Tabella 1

Il continuo aggiornamento di tale classificazione è inevitabilmente legato anche alla capacità di isolare e purificare in maniera sempre più spinta i singoli enzimi.

Al fini dell'efficacia ed economicità dell'uso è utile la caratterizzazione sempre più puntuale del meccanismo di azione degli enzimi già noti o quelli di nuova identificazione, così come l'identificazione dei trigger, cioè delle variabili di processo che ne influenzano il comportamento.

Un esempio dell'importanza di tali informazioni si riscontra nel meccanismo di azione della classe enzimatica delle peptidasi, note anche come proteasi, che, sebbene agiscano sulla stessa tipologia di substrato, possono portare, o essere utilizzate per arrivare, a risultati differenti.

Infatti, la tripla elica del collagene nativo non può essere scissa da tutte le proteasi, ma può essere degradata dalle collagenasi, una delle peptidasi del codice EC 3.4.24

Gli enzimi collagenasi sono specifici per i diversi tipi di collagene e attaccano punti ben precisi della struttura del collagene.

Ad esempio, la collagenasi dei mammiferi, la cosiddetta collagenasi “classica” interstiziale, taglia il collagene nativo di Tipo I in corrispondenza di Gly-Leu o Gly-Ile, tra le posizioni 771 e 813.

Dopo questo taglio, la tripla elica perde la sua integrità e diventa suscettibile all'azione di altre proteasi.

Le proteasi prive di specificità collagenolitica possono degradare il collagene solo dopo che esso è stato denaturato e la tripla elica è stata distrutta.

È noto, tuttavia, che il collagene nativo può essere attaccato nelle regioni non elicoidali delle estremità N- e C-terminali da enzimi proteolitici come tripsina, chimotripsina, elastasi, pepsina e molti altri, anche a temperatura ambiente.

La parte elicoidale del collagene, invece, risulta rimanere intatta. ^[7]

Il vantaggio della disponibilità di enzimi sempre più specializzati in quanto ottenibili ad un grado di purezza elevato e non in combinazione con altri enzimi della stessa classe o addirittura di classi diverse, è ancora maggiore se si conosce la loro capacità di azione, la loro attività, che, come abbiamo visto, non è esprimibile tout-court in termini assoluti, ma piuttosto verso uno specifico substrato.

La grandezza che rappresenta questa caratteristica è definita unità enzimatica, cioè la quantità di enzima che provoca la trasformazione di una certa quantità di substrato in un determinato tempo ad una data temperatura.

- Una unità enzimatica (U) è definita come la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di 1 micromole (μmol) di substrato in prodotto in un minuto, a 25°C e in condizioni ottimali per l'enzima (usualmente ad un dato pH).
- Nel Sistema Internazionale (SI), l'unità di attività enzimatica è il katal (kat), che corrisponde all'attività di un enzima che, in condizioni standard (25°C ed 1 atm), catalizza la trasformazione di una mole di substrato al secondo.

L'attività specifica, poi, rappresenta il numero di unità enzimatiche per mg di proteina.

In base a quanto illustrato prima, sarebbe dunque più opportuno specificare anche a quale substrato si riferisce l'unità enzimatica o l'attività dell'enzima.

In alternativa si dovrebbe indirizzare la misurazione verso il substrato di elezione o, ancora meglio, il substrato su cui l'enzima viene utilizzato.