

# ATTIVITA' ENZIMATICA



The background image shows a chemical reaction mechanism for electrophilic aromatic substitution (EAS) on chlorobenzene. It illustrates the formation of a sigma complex intermediate. The starting material is chlorobenzene, with a chlorine atom (Cl) and a hydrogen atom (H) on the benzene ring. An electrophile (E+) is shown attacking the ring. The mechanism shows the formation of a sigma complex intermediate, which is a cyclohexadienyl cation with a positive charge delocalized over the ring. The text "para attack" and "meta attack" is visible, indicating the different positions where the electrophile can attack. The text "ortho attack" is also visible, indicating the other possible position for attack. The text "ortho attack" is also visible, indicating the other possible position for attack. The text "ortho attack" is also visible, indicating the other possible position for attack.

# INDICE

- Enzimi (struttura e classificazione)
  - Regolazione enzimatica
  - Regolazione allosterica
  - Reazioni accoppiate
  - Cinetica enzimatica
  - Parametri sulla velocità di reazione

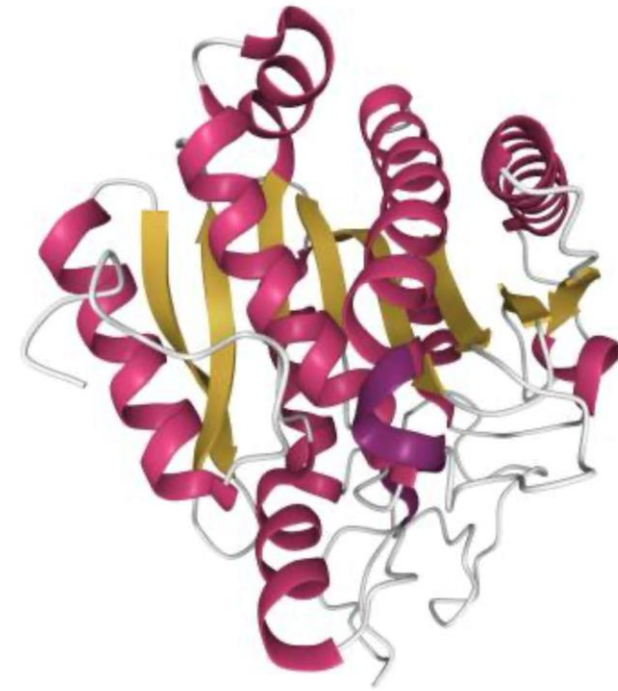
- Metodi immunochimici
- Diagnostica enzimatica
- Metodi spettrofotometrici
- Tecniche di rilevazione mediante luminescenza
- Immobilizzazione

# GLI ENZIMI

- Proteine
- Biomolecole altamente specializzate



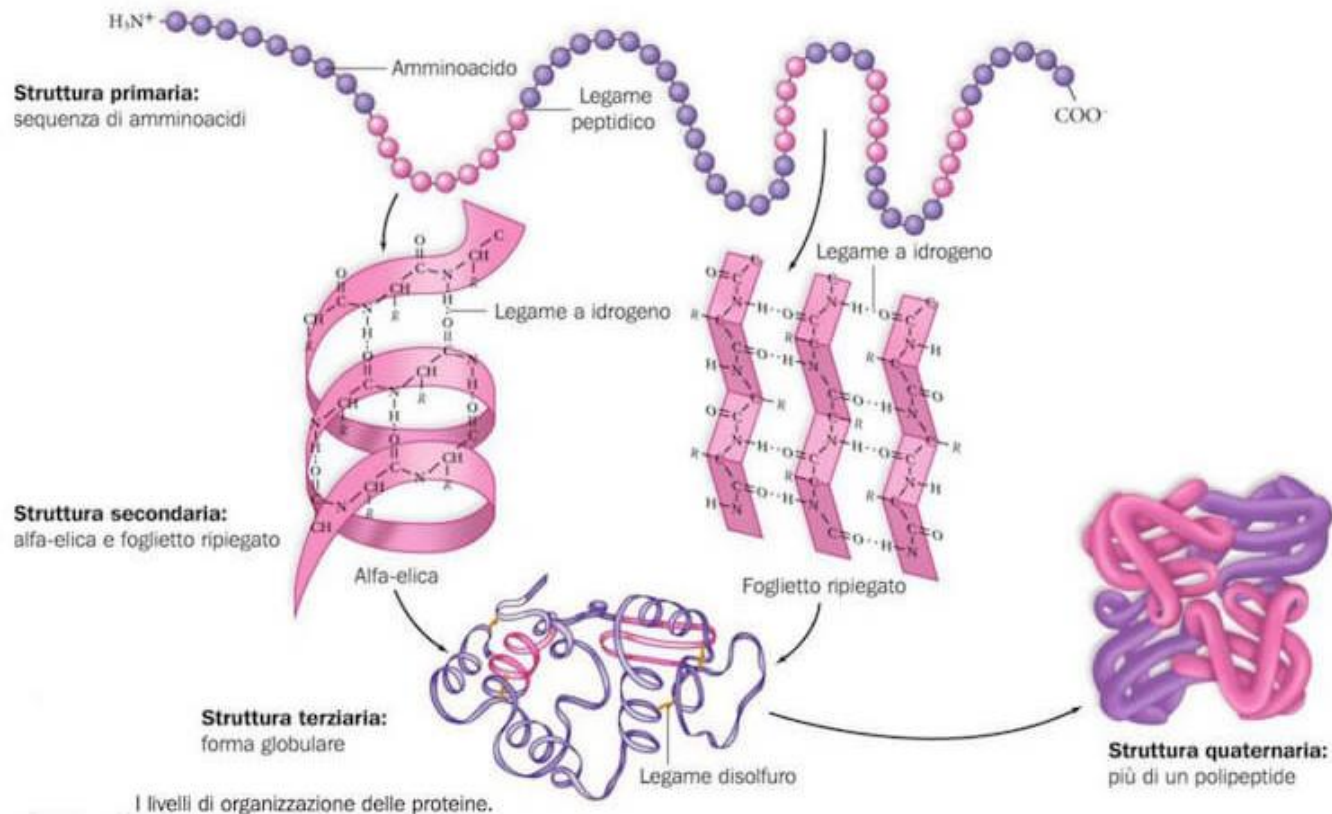
***Catalizzatori biologici***



Questi fanno avvenire reazioni termodinamicamente sfavorevoli, modificando la velocità della reazione, senza alterare l'equilibrio e rimanendo inalterati alla fine del processo di catalisi.

# Enzimi → Proteine

## Struttura gerarchica



- **Primaria:** sequenza con cui gli amminoacidi sono legati covalentemente tra di loro, determinando la conformazione della proteina.
- **Secondaria:** conformazione spaziale assunta a livello locale dagli atomi che costituiscono lo scheletro covalente.
- **Terziaria:** disposizione tridimensionale degli amminoacidi all'interno di questa molecola
- **Quaternaria:** Alcuni sono costituiti da più sub-unità proteiche che si combinano per formare una struttura quaternaria

# Gli enzimi

## Catene proteiche

### Semplici

Solo catene peptidiche

### Coniugate

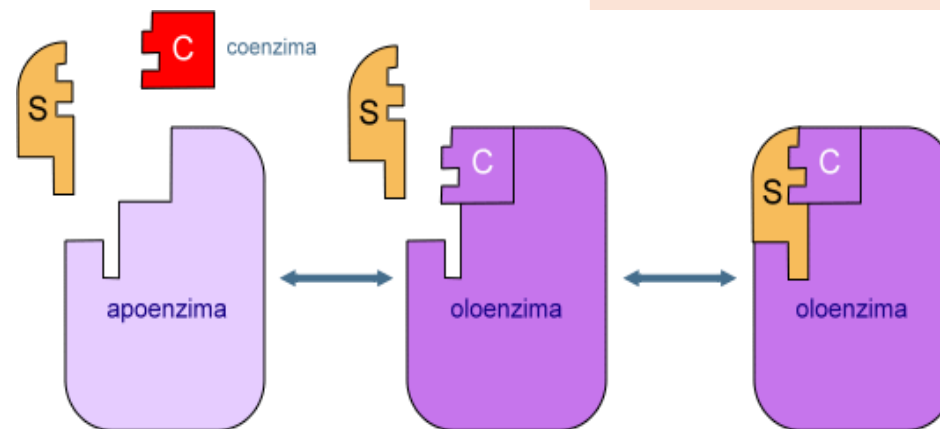
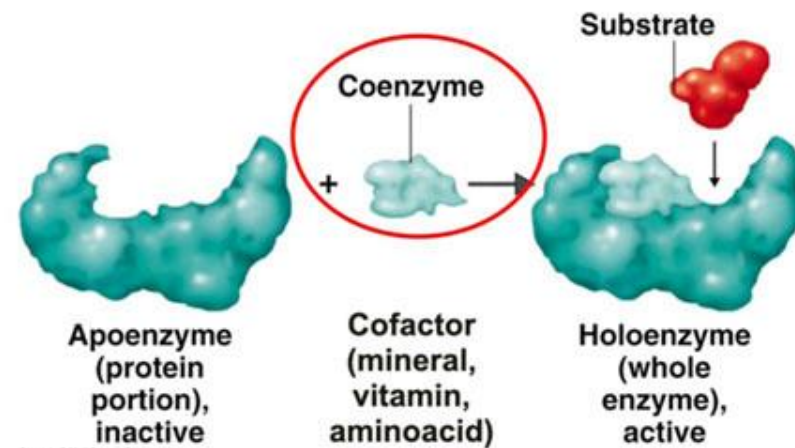
Catene peptidiche  
+  
Cofattore (gruppo prostetico)

### Oloenzimi

- Cofattori:  
Ioni rame, ferro, potassio, magnesio

- Coenzimi:  
Biotina, CoA, CoB, FAD, NAD ecc..

## Enzima e cofattore:



OLOENZIMA: APOenzima + cofattore

# Classificazione degli enzimi in base alla reazione catalizzata

Gli enzimi vengono classificati e identificati attraverso una doppia nomenclatura

“nome sistematico”  
“codice numero” EC

nome di uso comune:  
“nome del substrato”  
un termine con suffisso “-asi” che  
tende a **specificare la reazione**

Numero di E.C. (Enzyme Commission number)

E.C. 2.7.1.1

- **2.** → *trasferasi (tipo di reazione)*
- **7.** → fosfotrasferasi (tipo di substrato)
- **1.** → (tipo di accettorte o gruppo rimosso)
- **1** → (numero di serie dell'enzima)

- 1. Ossidoreduttasi**
- 2. Trasferasi**
- 3. Idrolasi**
- 4. Liasi**
- 5. Isomerasi**
- 6. Ligasi**

# Tipi di reazione catalizzate



## 1. Ossidoreduttasi

Trasferimento di elettroni (ioni idruro H<sup>-</sup>, atomi di idrogeno)  
(*Catalizzano reazioni redox*)

## 2. Trasferasi

Trasferimento di gruppi funzionali da due molecole un funge da donatore l'altra che funge da accettore

## 3. Idrolasi

Idrolisi aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura  
(*rottura di legame + aggiunta di 1H<sub>2</sub>O*)

## 4. Liasi

Addizione di gruppi e legami doppi

## 5. Isomerasi

Catalisi di reazioni di Isomerizzazione cis-trans

## 6. Ligasi

Formazione di legami C-C, C-S, C-O, C-N utilizzando energia dall'ATP

### E.C. 2.7.1.1

- 2. → trasferasi (tipo di reazione)

# Interazione enzima-substrato

**Substrato** → molecola che si lega al sito attivo dall'enzima

**Sito attivo** → tasca dell'enzima al cui interno avviene la trasformazione del substrato in prodotto



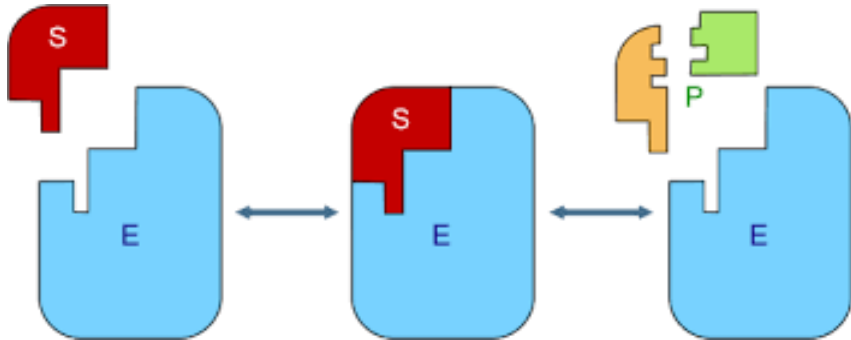
Si forma il complesso enzima-substrato che è l'evento essenziale per la catalisi enzimatica



# Complesso enzima-substrato

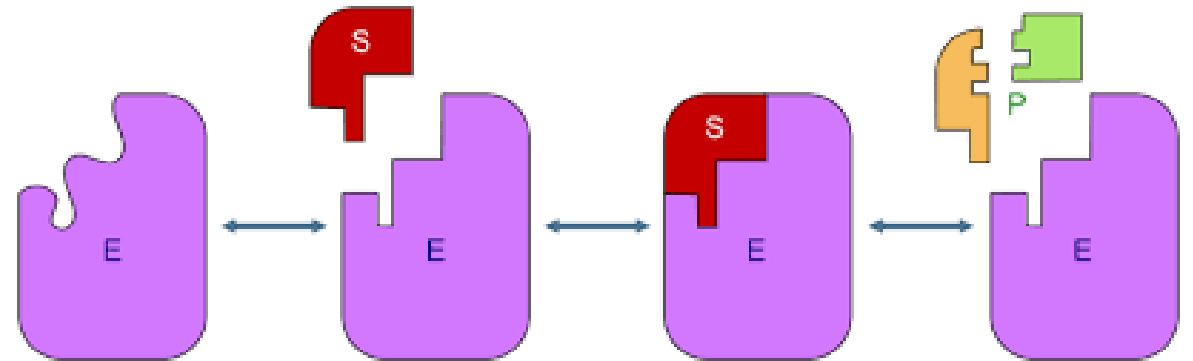
## Modello della serratura e della chiave

(Hermann Emil Fischer 1894)



## Modello dell'adattamento indotto

(Daniel Koshland 1958)



# Regolazione enzimatica

Avviene attraverso gli *enzimi regolatori*  possono aumentare o ridurre la loro attività catalitica in risposta a determinati segnali

Tipi di regolazione enzimatica :

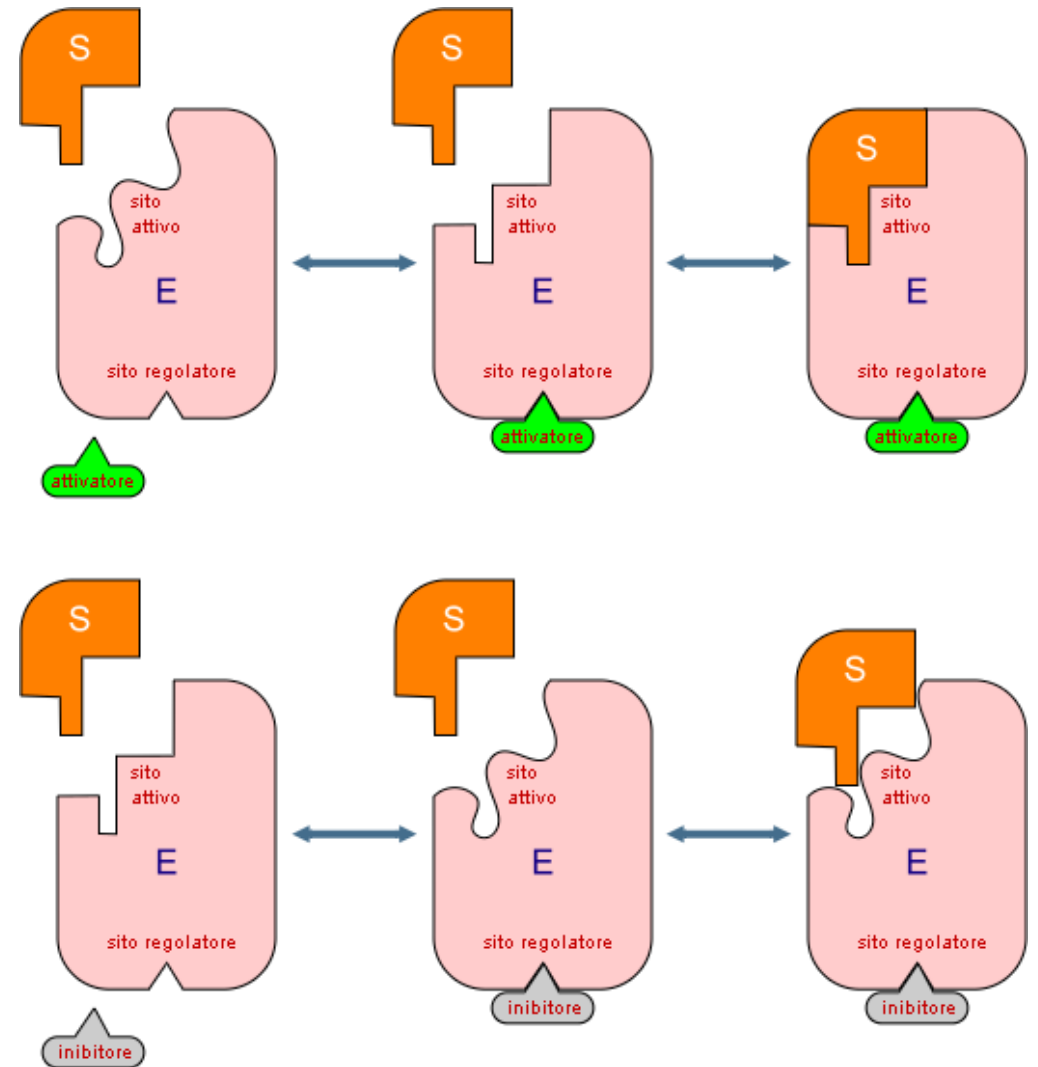
- ***Controllo genico***
- ***Regolazioni covalenti reversibili***
- ***Regolazioni covalenti irreversibili***
- ***Regolazione allosterica***

# REGOLAZIONE ALLOSTERICA

La funzione catalitica degli enzimi viene modulata da molecole che si legano a siti allosterici, provocando un cambiamento conformazionale nell'enzima, che può alterare la sua attività catalitica.

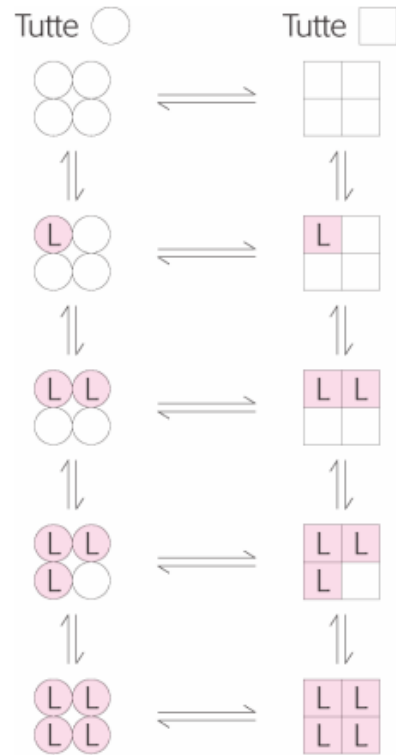
Le molecole regolatrici possono essere **attivatori**, che aumentano l'attività dell'enzima, o **inibitori**, che la diminuiscono.

Questi enzimi non seguono la cinetica di Michaelis-Menten.



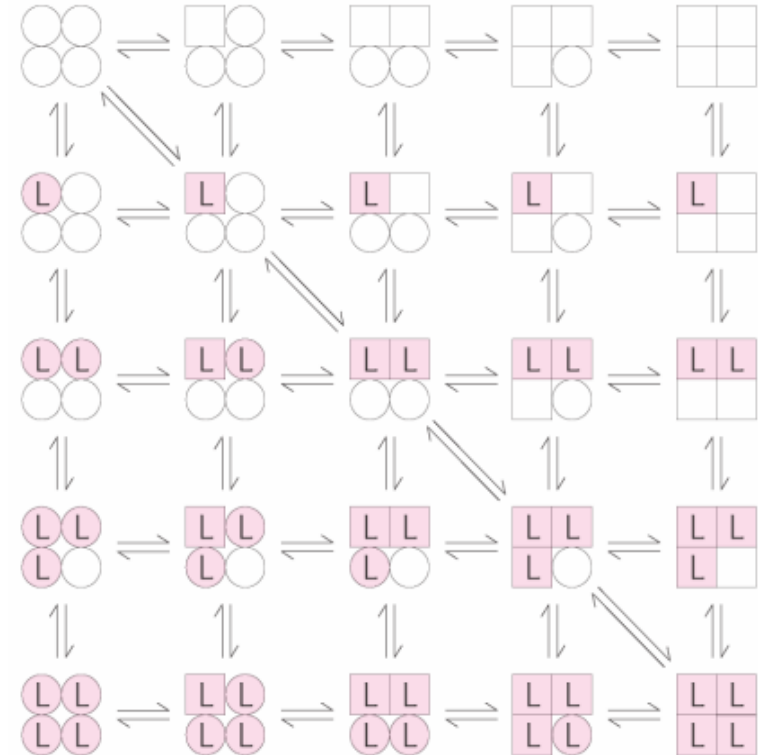
# Modelli di regolazione allosterica

Questi modelli descrivono due possibili meccanismi attraverso i quali gli enzimi allosterici possono essere attivati o inibiti:



○ **subunità inattiva**  
□ **subunità attiva**

**Modello concertato**  
(MWC - Monod-Wyman-Changeaux, 1965)



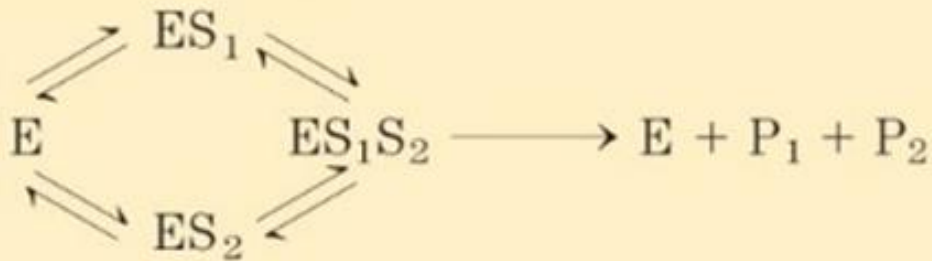
**Modello sequenziale**  
(Koshland e collaboratori, 1966)

# Reazioni a due substrati

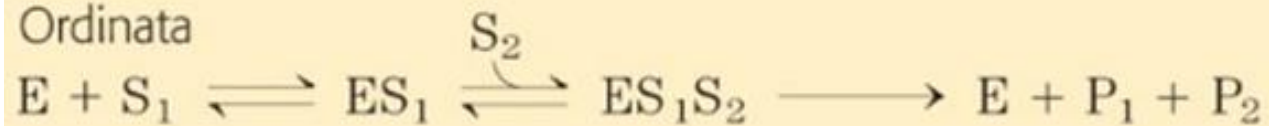
- **Modello casuale:** non presentano nessuna preferenza per l'ordine di legame dei substrati.
- **Modello ordinato:** hanno un preciso ordine di ingresso dei substrati.

## (a) Reazione enzimatica con formazione di un complesso ternario

Ordine casuale



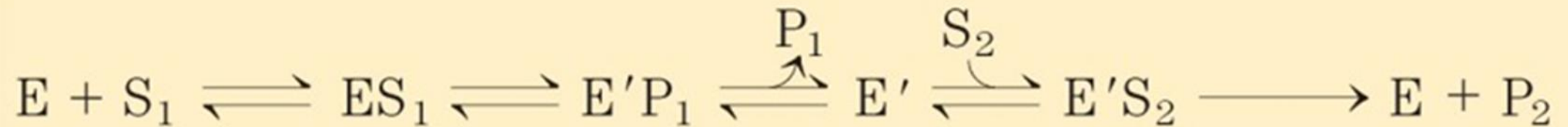
Ordinata



# Reazioni a due substrati

- **Meccanismo a Ping-pong:** I meccanismi con cui uno o più prodotti vengono rilasciati prima che tutti i substrati si siano legati all'enzima.

**(b) Reazione enzimatica senza formazione di un complesso ternario**



# CINETICA ENZIMATICA

- La cinetica enzimatica è lo studio delle velocità di reazione catalizzate da enzimi.

## REAZIONI ENZIMATICHE



## REAZIONE CATALIZZATE DALL'ENZIMA

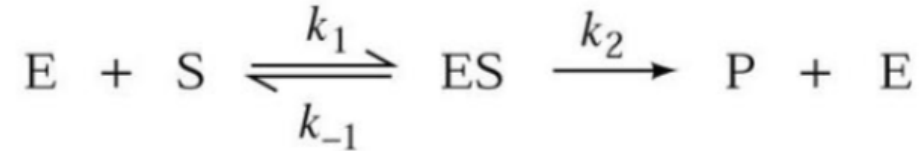
- La velocità di una reazione è una variazione di concentrazione nel tempo.

Si può valutare come:

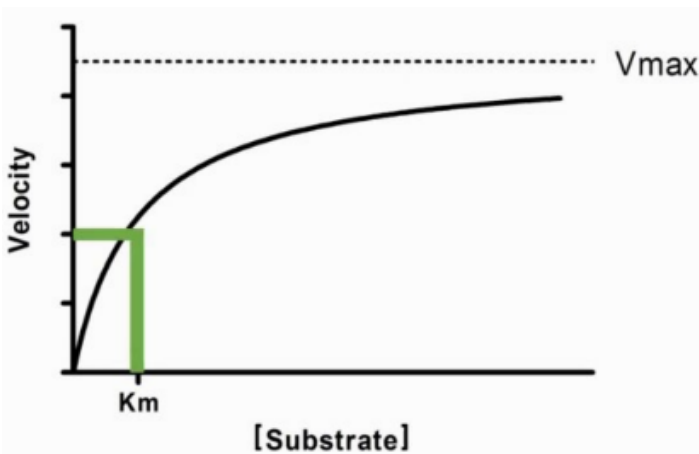
- Velocità con la quale si consuma substrato
- Velocità con la quale si forma un prodotto

# TEORIA ED EQUAZIONE DI MICHAELIS E MENTEN

La cinetica Michaelis-Menten descrive l'andamento della velocità di una reazione catalizzata da enzimi, al variare della concentrazione dell'enzima e del substrato. Questo modello è valido per enzimi non allosterici.



## Curva di Michaelis-Menten



- Rappresentazione della variazione della velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato.
- Curva iperbolica

## EQUAZIONE DI MICHAELIS-MENTEN

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

- $V_0$ : velocità iniziale della reazione
- $V_{max}$ : velocità massima della reazione
- $K_M$ : costante di Michaelis



# PARAMETRI CINETICI

## $K_M$ : costante di Michaelis

- Fornisce dettagli quantitativi sull'affinità dell'enzima per il substrato:
  - Maggiore è il valore di  $K_M$ , minore sarà l'affinità
  - Minore è il valore di  $K_M$ , maggiore sarà l'affinità

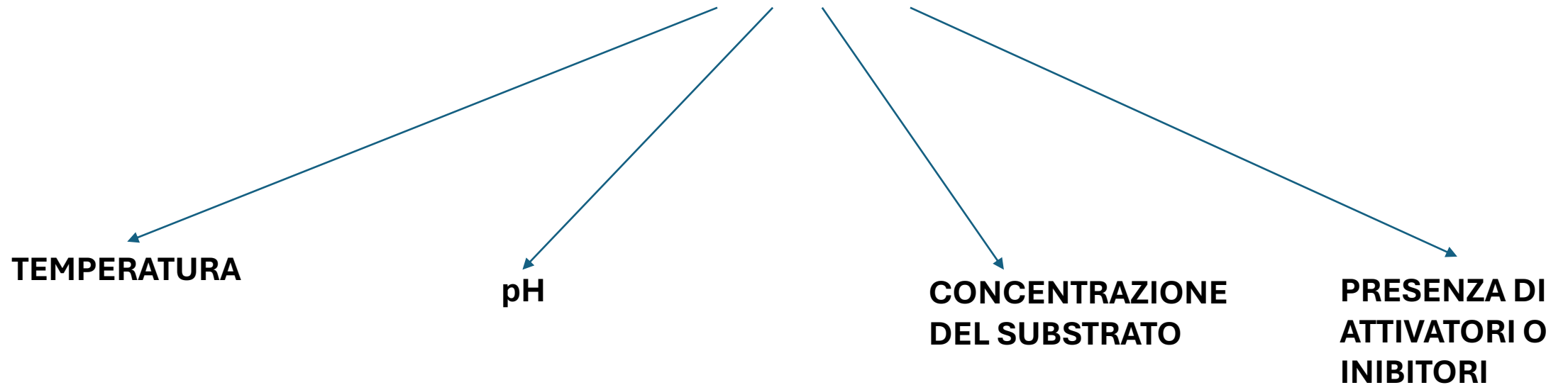
$$K_M = \frac{K_{-1}}{K_1}$$

## $V_{max}$ : velocità massima

- Rappresenta la velocità massima che può raggiungere l'enzima.
- Varia in base alle caratteristiche dell'enzima.
- Si ha quando tutto l'enzima è saturo.

# **EFFETTO DEI PARAMETRI SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE**

- **LA CINETICA DELLA REAZIONI DIPENDE DA MOLTI FATTORI, OSSIA:**



# TEMPERATURA:

- Questa svolge un ruolo fondamentale in quanto gli enzimi hanno una temperatura ottimale per svolgere il proprio lavoro. Una temperatura minore o maggiore di quella ottimale può compromettere l'attività dell'enzima. Generalmente il coefficiente di temperatura nel caso di reazioni enzimatiche è circa il 10% per grado centigrado. Se la temperatura è superiore viene accelerato il processo di inattivazione dell'enzima, se invece è inferiore, l'enzima svolge la sua reazione ma con un'attività ridotta. Il controllo della temperatura è importante per standardizzare la cinetica della reazione e l'attività enzimatica, e per ottenere una maggiore riproducibilità dei risultati, le reazioni enzimatiche vengono effettuate a 37°C mediante l'utilizzo di termostati.

**Tabella 16.8** Alcuni enzimi termolabili di microrganismi psicrotrofi

<b>Enzima</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Temperatura di crescita massima (°C)</b>	<b>Temperatura di inattivazione dell'enzima (°C)</b>
Lipasi extracellulare*	<i>P. fragi</i>	30	–
Enzimi sintetizzanti l'α-ossoglutarato e altri enzimi	<i>Cryptococcus</i>	~28	30
Alcol deidrogenasi	<i>Candida</i> sp.	<30	–
Acido formico liasi	Psicrofilo ceppo 82	35	45
Idrogenasi	Psicrofilo ceppo 82	35	>20
Malico deidrogenasi	<i>Vibrio marino</i>	30	30
Piruvato deidrogenasi	<i>Candida</i> sp.	~20	25
Isocitrato deidrogenasi	<i>Arthrobacter</i> sp.	~35	37
Enzimi fermentativi	<i>Candida</i> sp. P16	~25	35
Ossidasi del NAD ridotto	Psicrofilo 82	35	46
Citocromo c riduttasi	Psicrofilo 82	35	46
Lattico e glicerolo deidrogenasi	Psicrofilo 82	35	46
Enzimi catabolici del piruvato	Psicrofilo 82	35	46
Enzimi sintetizzanti proteine e RNA	<i>Micrococcus cryophilus</i>	25	30

\* Sistema di sintesi enzimatica inattivato.

**TABLE 3**  
**pH “optima” for malt enzymes**

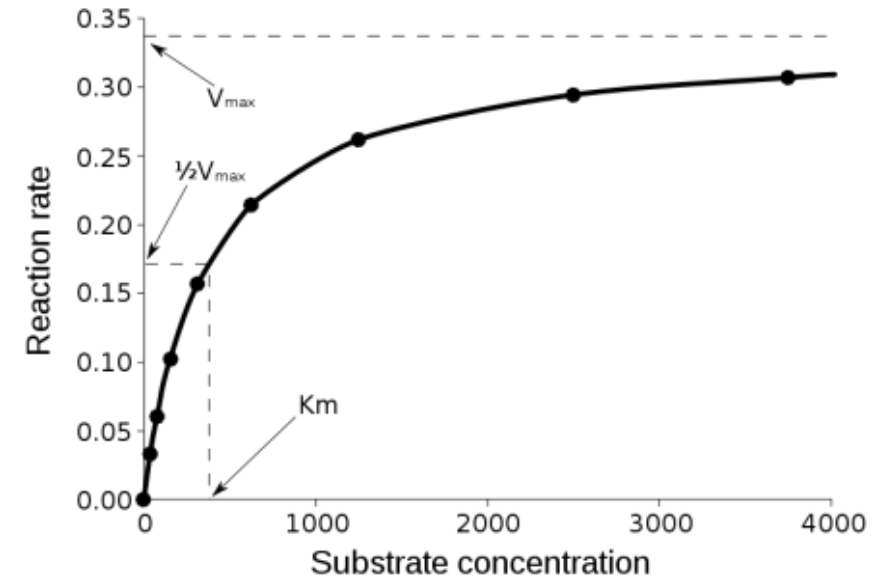
Enzyme	pH optimum	reference
Aminopeptidase (neutral)	7.0, 7.2	[15]
Aminopeptidase (leucine)	8-10	[15]
$\alpha$ -amylase	5.5	[19]
$\alpha$ -amylase I	3-5.5	[6]
$\alpha$ -amylase II	5-5.4	
$\beta$ -amylase	5.2	[43]
Carboxypeptidase	4.8, 5.2, 5.6	[15]
Dipeptidase	8.8	[48]
$\beta$ -glucan endohydrolase	4.7	[15]
$\beta$ -glucan exohydrolase	5.25	[28]
$\beta$ -glucan solubilase	6.35	[4]
$\alpha$ -glucosidase I	5.6	[55]
$\alpha$ -glucosidase II	6.3	
$\alpha$ -glucosidase	4.5	[36]
Limit dextrinase	5.5	[41]
Lipase	6.8, 8-8.5	[5]
Lipoxygenase	6.5	[14]
Maltase	4.2	[55]
Endo-peptidase – SH	3.9, 5.5	[15]
Endo-peptidase – Metal	5.5, 6.9, 8.5	[15]
Peroxidase	3.25-3.75	[9]
Phytase	5 - 6	[34]
Superoxide Dismutase	Activity at wort pH's	[2]

# pH:

- **Tutti gli enzimi hanno un loro specifico pH ottimale di lavoro, che dipende dalla natura del tampone, dalla temperatura e dalla concentrazione del substrato. Al variare del pH varia la struttura superficiale della proteina e questo comporta una modifica del sito attivo con conseguente variazione dell'attività del substrato**

# CONCENTRAZIONE DEL SUBSTRATO:

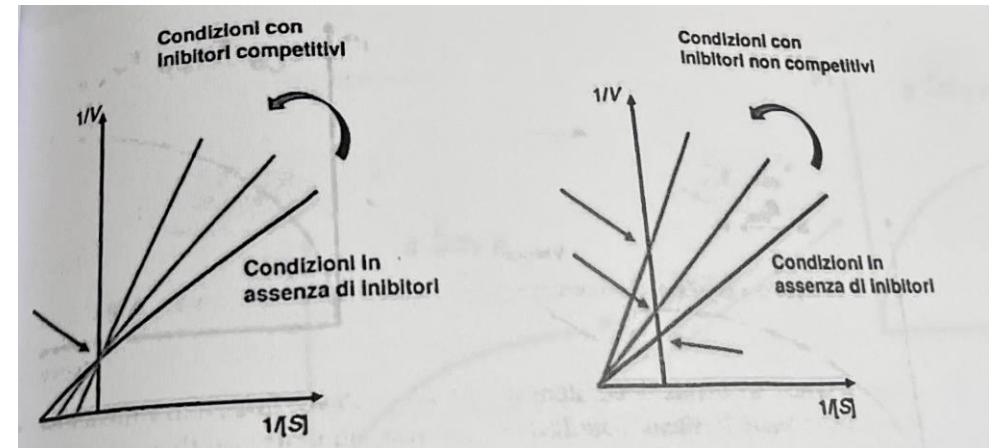
- In base all'equazione di Michaelis-Menten, per ottenere il valore massimo della velocità, il valore della  $K_m$  deve essere trascurabile rispetto alla concentrazione del substrato. Tale condizione può spesso non essere fattibile, quindi spesso si lavora in condizioni sub-ottimali



## PRESENZA DI ATTIVATORI E INIBITORI

- In merito agli attivatori, molti enzimi possono richiedere la presenza di ioni metallici. In merito alla presenza di inibitori, bisogna distinguere due tipologie: Competitivi e non competitivi

- Come si vede dalla figura, se siamo in presenza di inibitori competitivi il valore di  $1/V_{max}$  rimane invariato, ma varia la pendenza della retta. Nel caso invece di inibitori non competitivi, non varia solo la pendenza ma anche il valore di  $1/V_{max}$



# Metodi immunologici



**I metodi immunologici** si basano su una interazione specifica tra un antigene (Ag) e un anticorpo (Ab);

La specificità delle reazioni antigene-anticorpo e la sensibilità dei “marcatori” (enzimi, isotopi, sostanze fluorescenti, radicali liberi) possono essere combinate insieme per compiere un **dosaggio immunologico**:

quantificare con precisione una sostanza antigenica presente nel nostro caso nei fluidi biologici.

Tali metodi sono spesso impiegati nella ricerca di:

- marker tumorali,
- vitamine,
- ormoni,
- antigeni virali (test per l'epatite e l'AIDS),
- dosaggi anticorpali

Hanno il vantaggio di un'elevata specificità e sensibilità.

Dosaggi immunologici



Il legame antigene-anticorpo è evidenziato mediante l'utilizzo di traccianti fluorescenti, radioattivi o **enzimatici**

- Dosaggio radioimmunologico RIA  
**Radio Immuno Assay**

- Dosaggio ELISA  
**Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay**

- Dosaggio EMIT  
**Enzyme Multiplied Immunoassay Technique**



# Analisi immunologica

## Metodo ELISA:

### *Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*

- Ampio uso per :

Accertare la presenza di **anticorpi** contro un determinato antigene nel plasma sanguigno del paziente per accertarsi se c'è stata un'esposizione ad un determinato patogeno.



## Varianti del test ELISA



### ELISA diretto

### ELISA indiretto

Si differenziano a seconda dal componente che si vuole rivelare

Determinata la presenza dell'antigene

Determinata la presenza degli anticorpi contro l'antigene

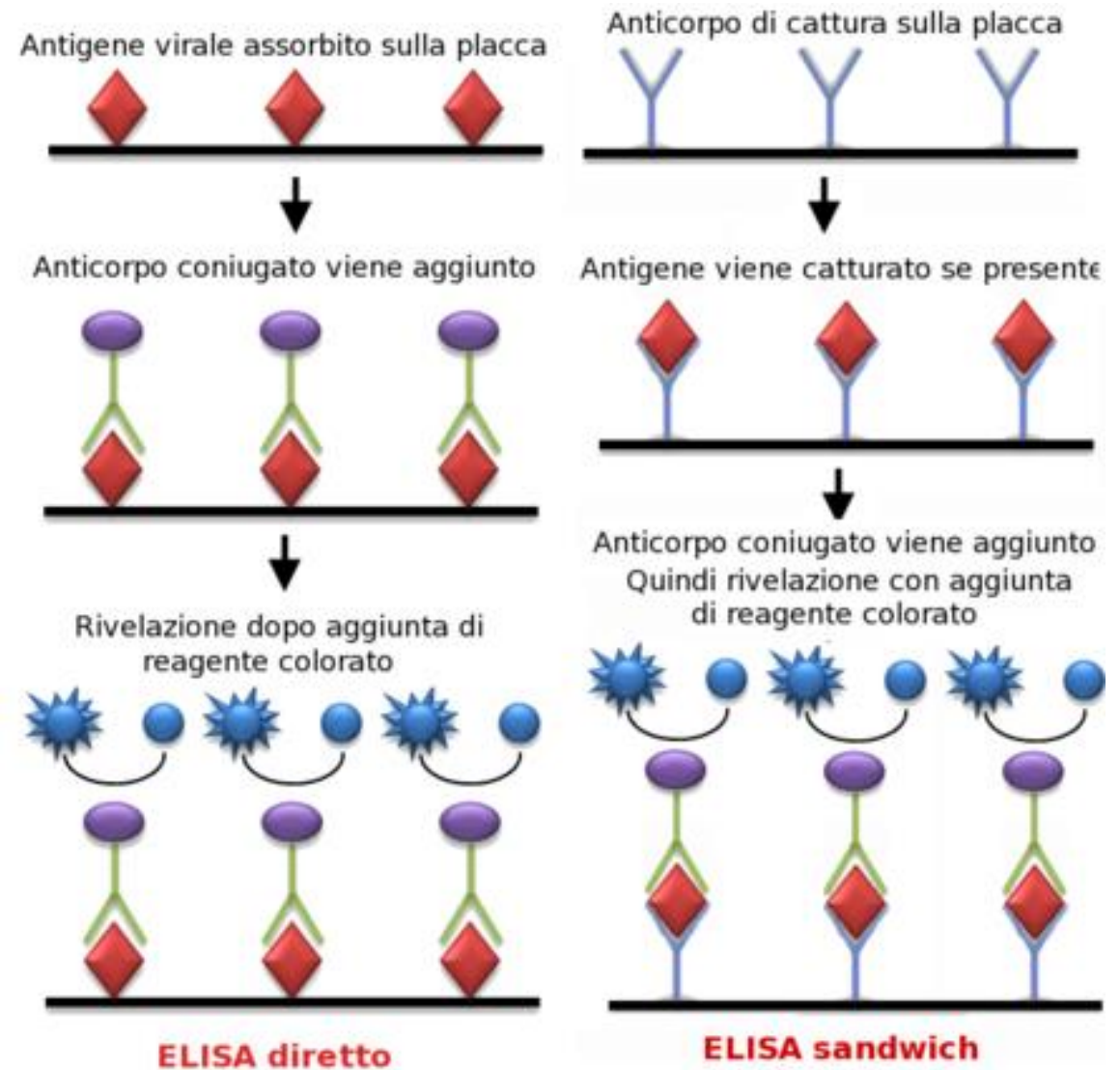
Inoltre il saggio può essere:

- **Competitivo** → Test quali-quantitativo, dunque fornisce un valore specifico con una deviazione standard
- **Non competitivo** → Test qualitativo e semi-quantitativo, dunque non fornisce un valore effettivo, ma afferma la presenza o l'assenza dell'analita

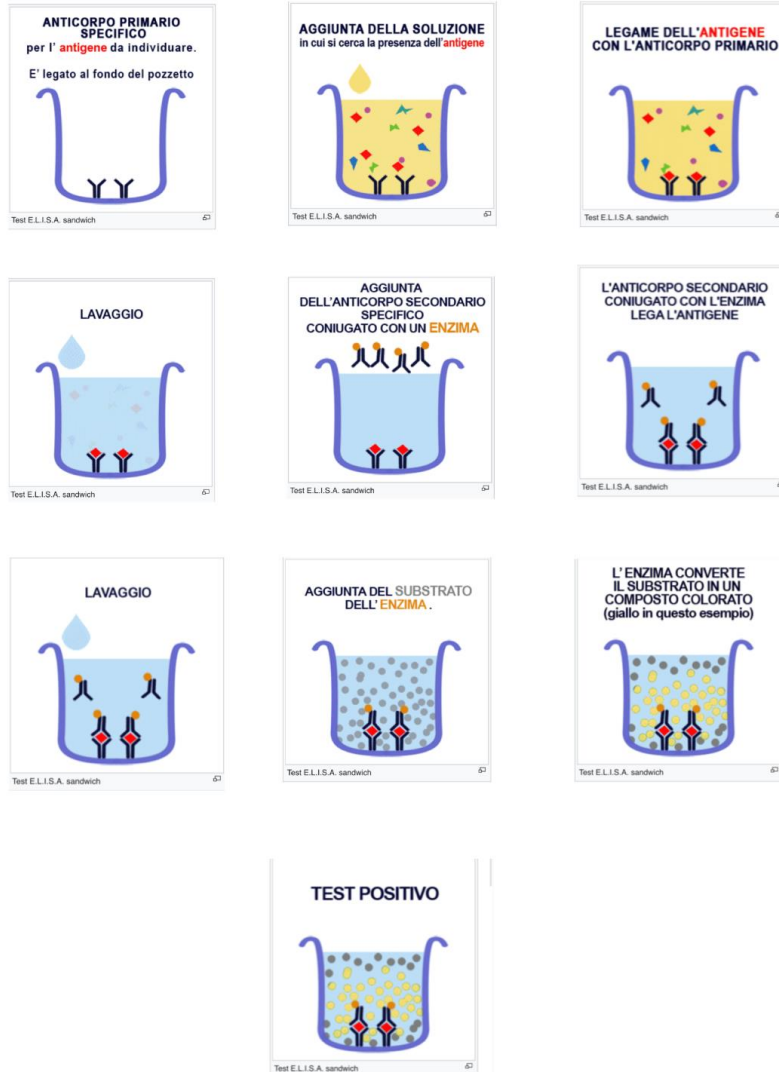
- In particolare:

## ELISA NON COMPETITIVO DIRETTO

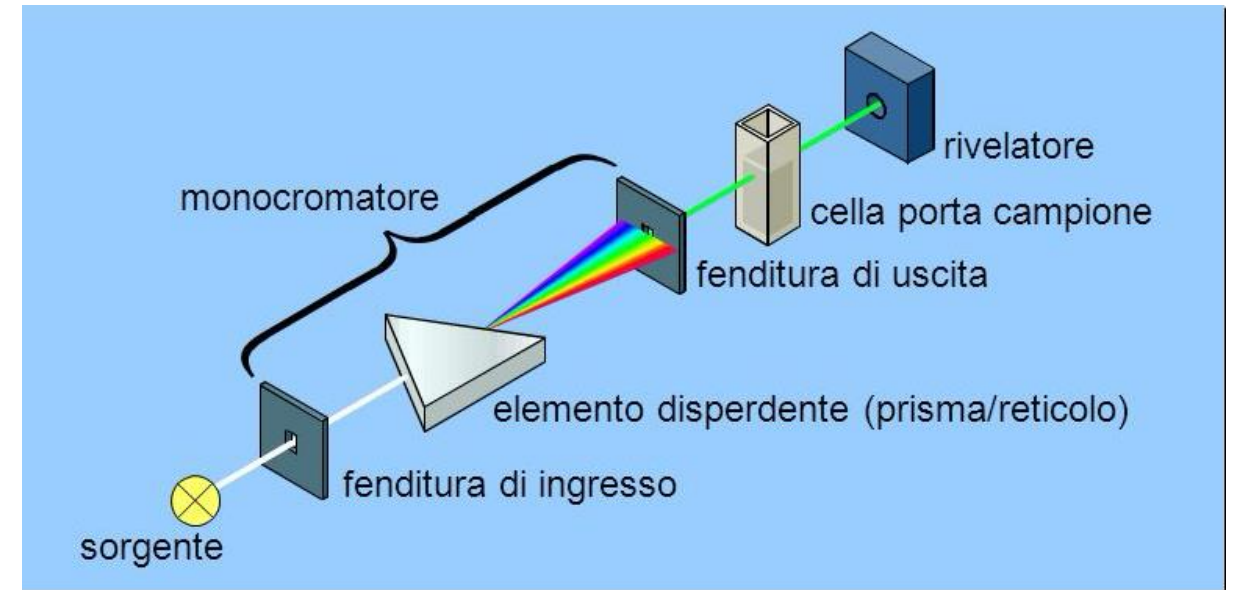
- SEMPLICE
- SANDWICH

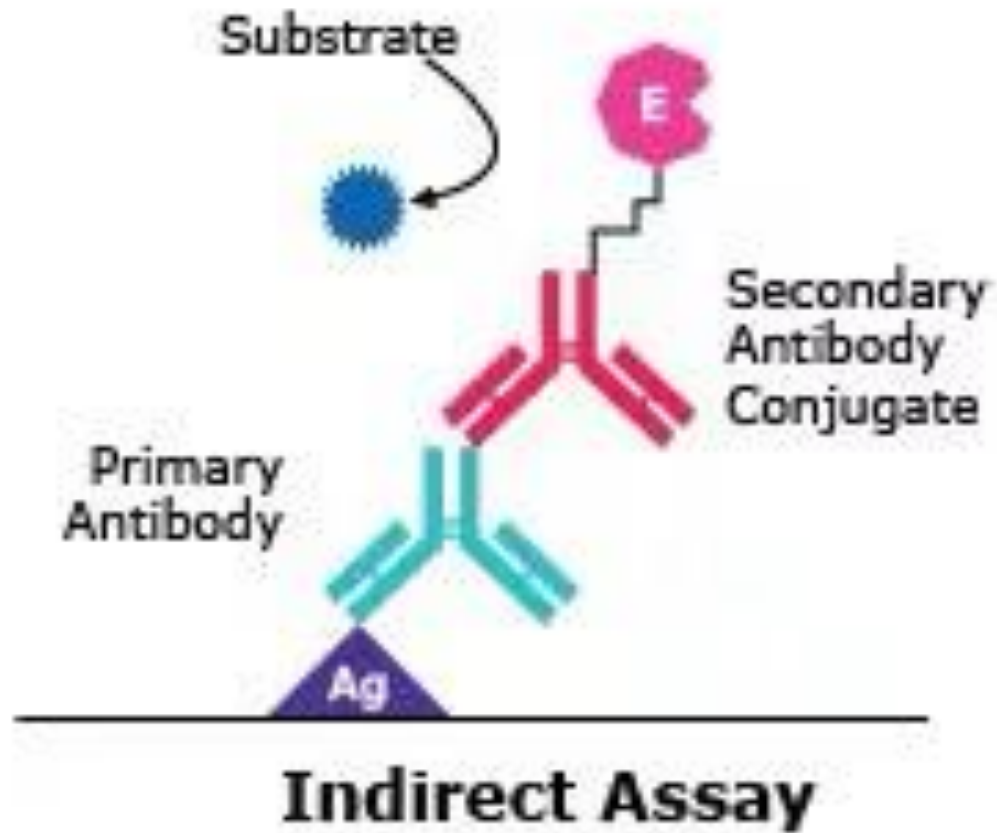


# ELISA DIRETTO : VARIANTE SANDWICH



Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene misurabile grazie al **spettrofotometro**:





METODO  
ELISA  
INDIRETTO

## *Vantaggi metodo ELISA*

- Può essere usato per verificare qualsiasi composto capace di dare risposta immunitaria.
- È estremamente sensibile, alcuni ormoni possono anche essere dosati anche se poco concentrati
- È altamente specifico
- Può essere automatizzato in modo da ridurre al minimo la manualità e l'elaborazione dei dati.

Questo metodo sta soppiantando il dosaggio radioimmunologico RIA, nonostante questo sia ben collaudato, automatizzato, e talora più sensibile; ma essendo il metodo ELISA meno costoso e non presenta rischi per gli operatori attraverso la manipolazione di materiale radioattivo.

# A sensitive sandwich ELISA using a modified biotin-streptavidin amplified system for histamine detection in fish, prawn and crab



Fanfan Yang<sup>a</sup>, Lungo Xu<sup>a</sup>, Alberto C.P. Dias<sup>a</sup>, Xiaoying Zhang<sup>a b</sup>

<sup>a</sup>Centro di Biologia Molecolare e Ambientale, Università del Minho, Dipartimento di Biologia, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portogallo

<sup>b</sup>Istituto congiunto cinese-tedesco per la ricerca sui prodotti naturali, College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, Cina

➤ versione del record il 16 febbraio 2021.

## ISTAMINA

⚠️ **Attenzione** ⚠️

L'istamina è un composto azotato normalmente prodotto dal nostro organismo nel corso di reazioni immunitarie ed infiammatorie

la sua produzione a dosi eccessive caratterizza le reazioni allergiche.

Quando questa viene assunta attraverso l'alimentazione in concentrazioni rilevanti da soggetti sensibili può rendersi responsabile di un **intossicazione alimentare**, solitamente chiamata "sindrome sgombroide" perché è comunemente associata al consumo di pesci appartenenti alla famiglia degli Scombridae.







Non esistono ancora metodi di trattamento efficaci per la disintossicazione o la riduzione dell'istamina, tra cui: congelamento, grigliatura e frittura

### **CODEX: Commissione internazionale per gli standard alimentare**

- Limitazione istamina a meno di 100 ppm nel pesce surgelato o in scatola

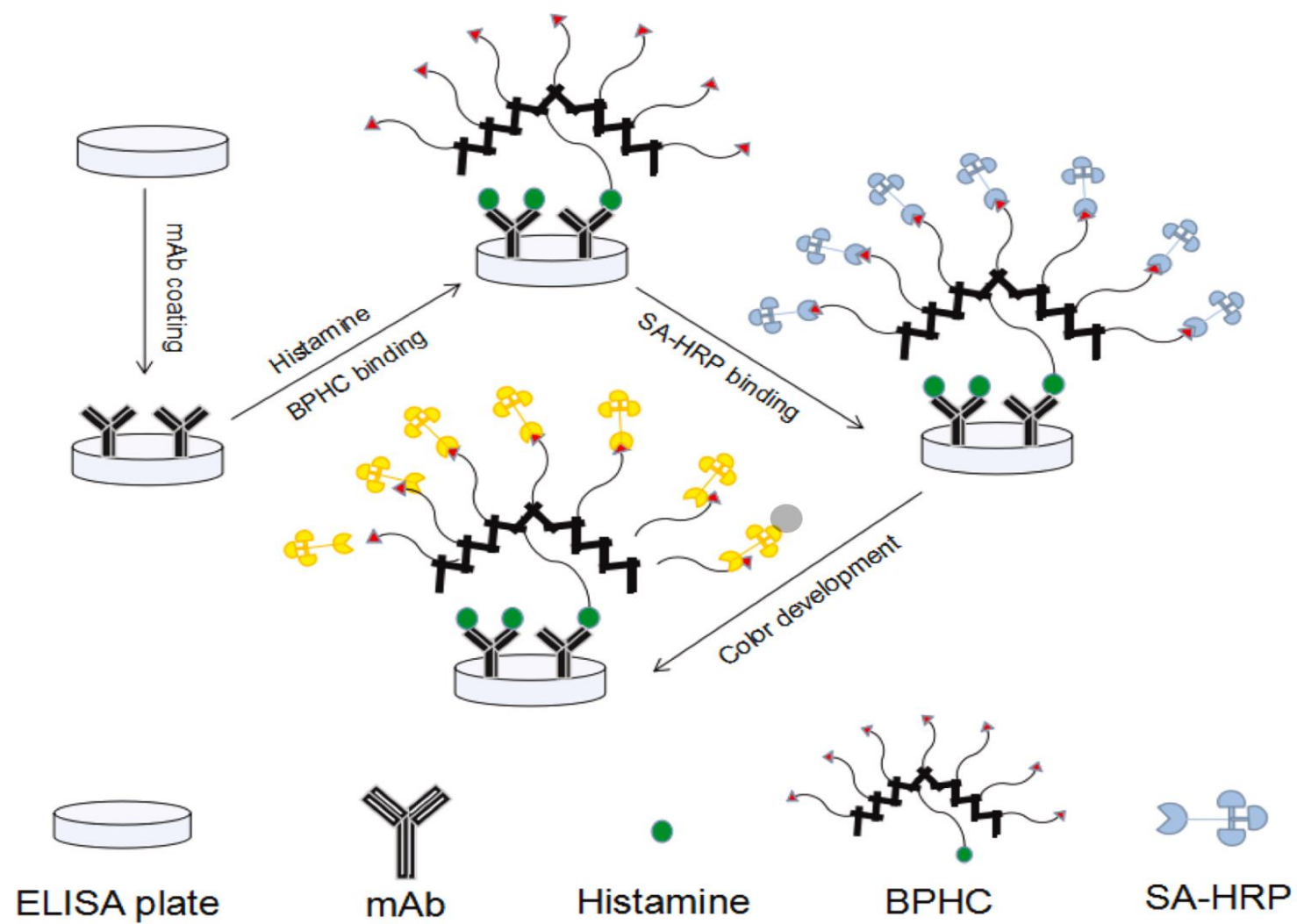


Fig. 1. Schematic illustration of sandwich ELISA for histamine detection.

# DIAGNOSTICA ENZIMATICA

La diagnostica enzimatica utilizza la misurazione dell'attività dell'enzima per diagnosticare malattie, monitorare il loro decorso e valutare l'efficacia del trattamento. Poiché molte malattie causano alterazioni dell'attività enzimatica, misurare tali variazioni può fornire importanti informazioni diagnostiche e prognostiche.



## METODI DI MISURA DIRETTI

- Sono utilizzati per rilevare e quantificare la presenza di enzimi in campioni biologici o ambientali.
- Si basano sulla misurazione diretta dell'attività degli enzimi senza la necessità di interazioni antigene-anticorpo o di reazioni immunitarie.

## METODI SELETTIVI

- Misurazioni accurate e affidabili.
- Rilevano specificamente l'attività di un particolare enzima o classe di enzimi all'interno di un campione biologico.
- Si ha l'utilizzo di inibitori specifici per bloccare l'attività degli enzimi interferenti.

L'inibitore differisce a seconda di ciò che si vuole analizzare:

- Inibizione chimica
- Inibizione fisica
- Inibizione immunologica

## METODI NON SELETTIVI

- Questi metodi non sono specifici per un enzima particolare e possono rilevare l'attività di più enzimi contemporaneamente o misurare attività enzimatica generale.
- Esistono varie tecniche non selettive: *elettroforesi* e *cromatografia*

# CROMATOGRAFIA

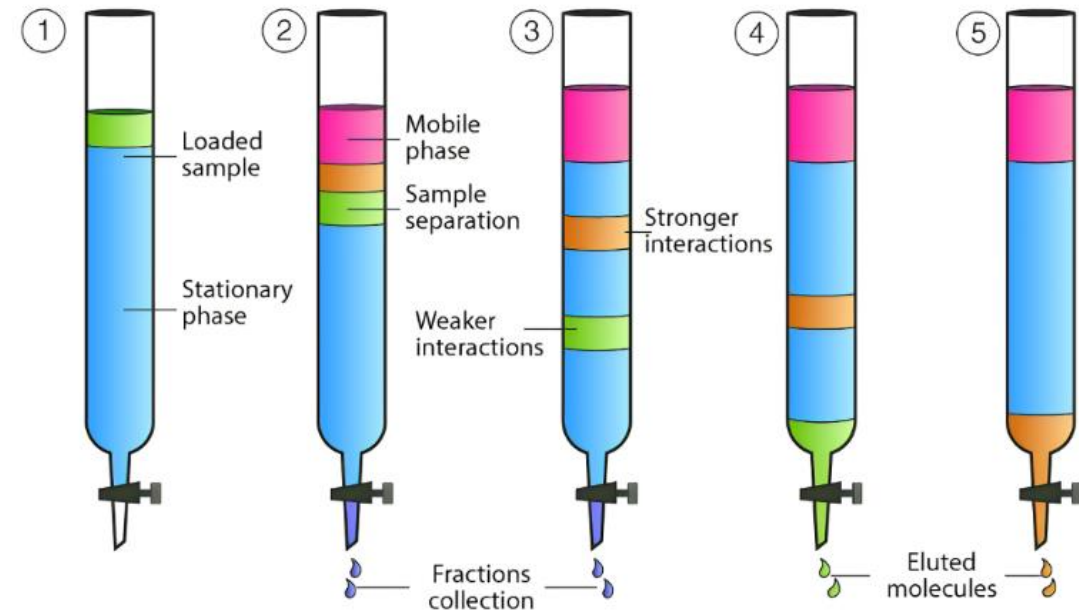
La cromatografia è una tecnica che permette la separazione dei costituenti di una miscela, permettendo la determinazione qualitativa e quantitativa dei vari componenti.

Due fasi immiscibili:

- Fase stazionaria (o fissa) → solida, liquida, gel, miscela solido/liquida
- Fase mobile (o eluente) → liquida o gassosa; è tipicamente una soluzione tampone

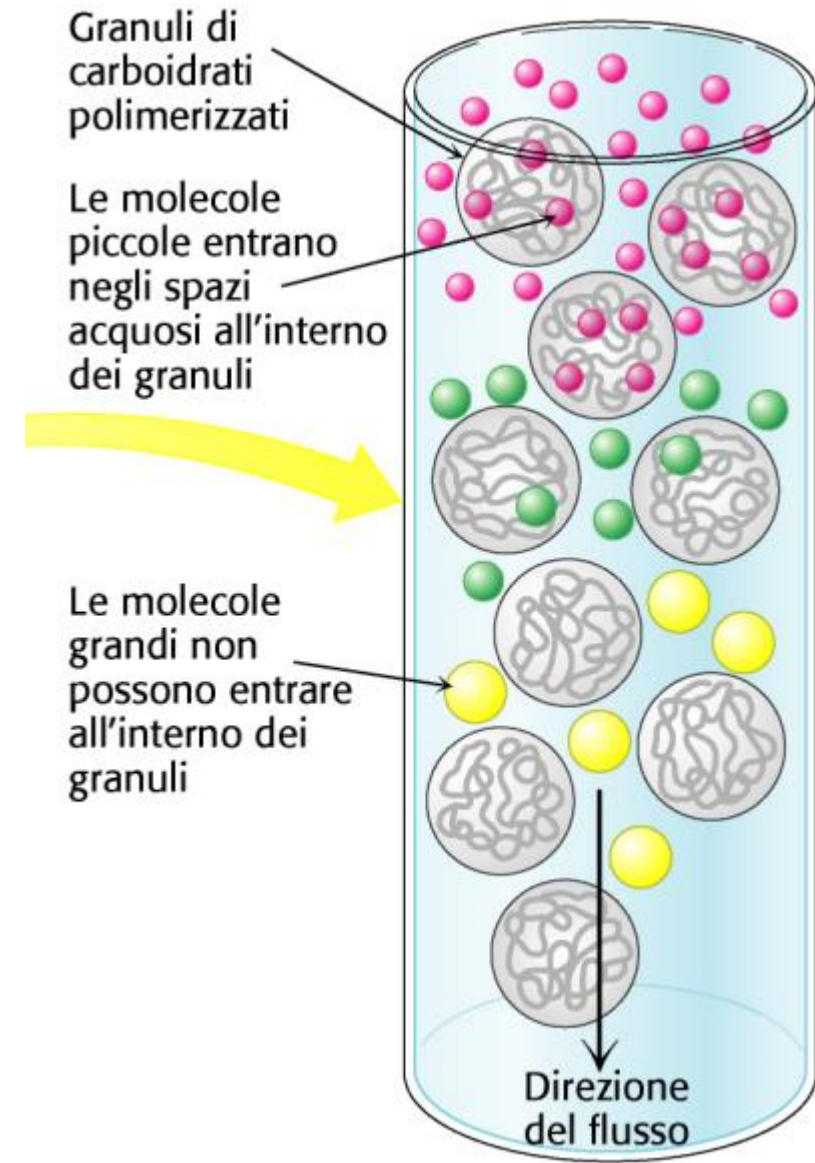
## COLONNA CROMATOGRAFICA

- Tubo cavo all'interno  
Può essere di vetro o di acciaio



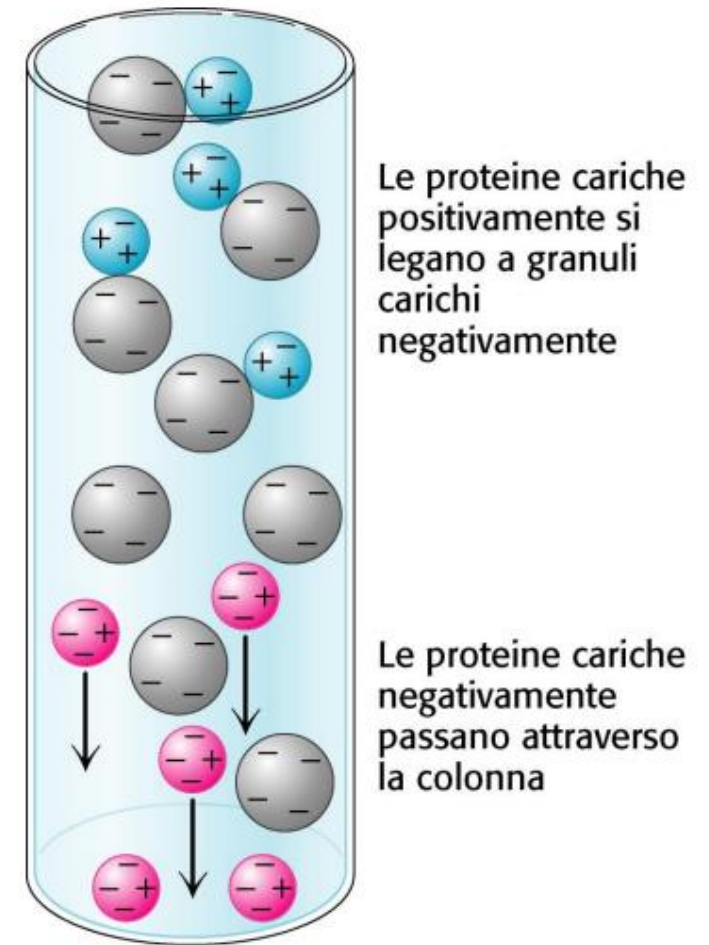
# CROMATOGRAFIA PER FILTRAZIONE SU GEL

- Principio cromatografico utilizzato: esclusione molecolare
- L'eluizione avviene in base alla dimensione (peso e forma dell'enzima):
  - Gli enzimi di dimensioni maggiori vengono eluite per prime
  - Gli enzimi più piccole entrano nei pori e attraversano la colonna e velocità più bassa, allungando il percorso che devono compiere per essere eluite



# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

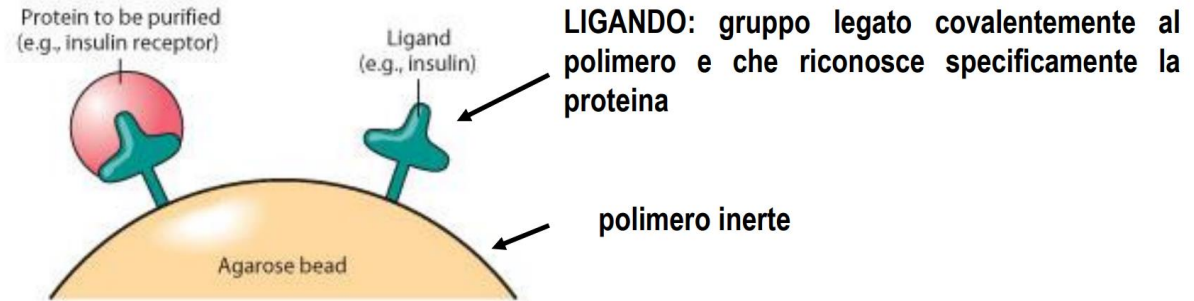
- Questo tipo di cromatografia sfrutta le differenze nella carica dei componenti del campione per separarli. Può essere utilizzata per separare gli enzimi in base alle loro cariche ioniche.
- Separazione in base alla densità di carica:
  - Proteine con maggior densità di carica si legano più fortemente alla fase stazionaria e vengono eluite per ultime
- Due tipi di *scambiatori*:
  - *Anionici* → carichi positivamente, separano proteine con carica netta negativa
  - *Cationici* → carichi negativamente, separano proteine con carica netta positiva



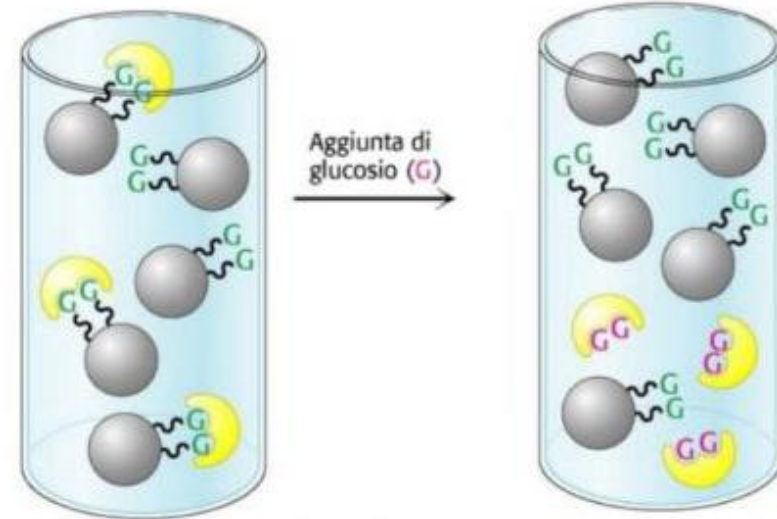
**esempio di separazione di proteine cationiche (scambio cationico)**

# CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

- Interazione proteina-ligando
- Separa gli enzimi in base alla loro specificità di legame
- Sfrutta la capacità di interagire in modo specifico con un ligando attaccato covalentemente ad un supporto inerte (fase stazionaria)
- È molto usata per la separazione di anticorpi o fattori di trascrizione



## ESEMPIO: eluzione di una proteina che lega specificamente il glucosio



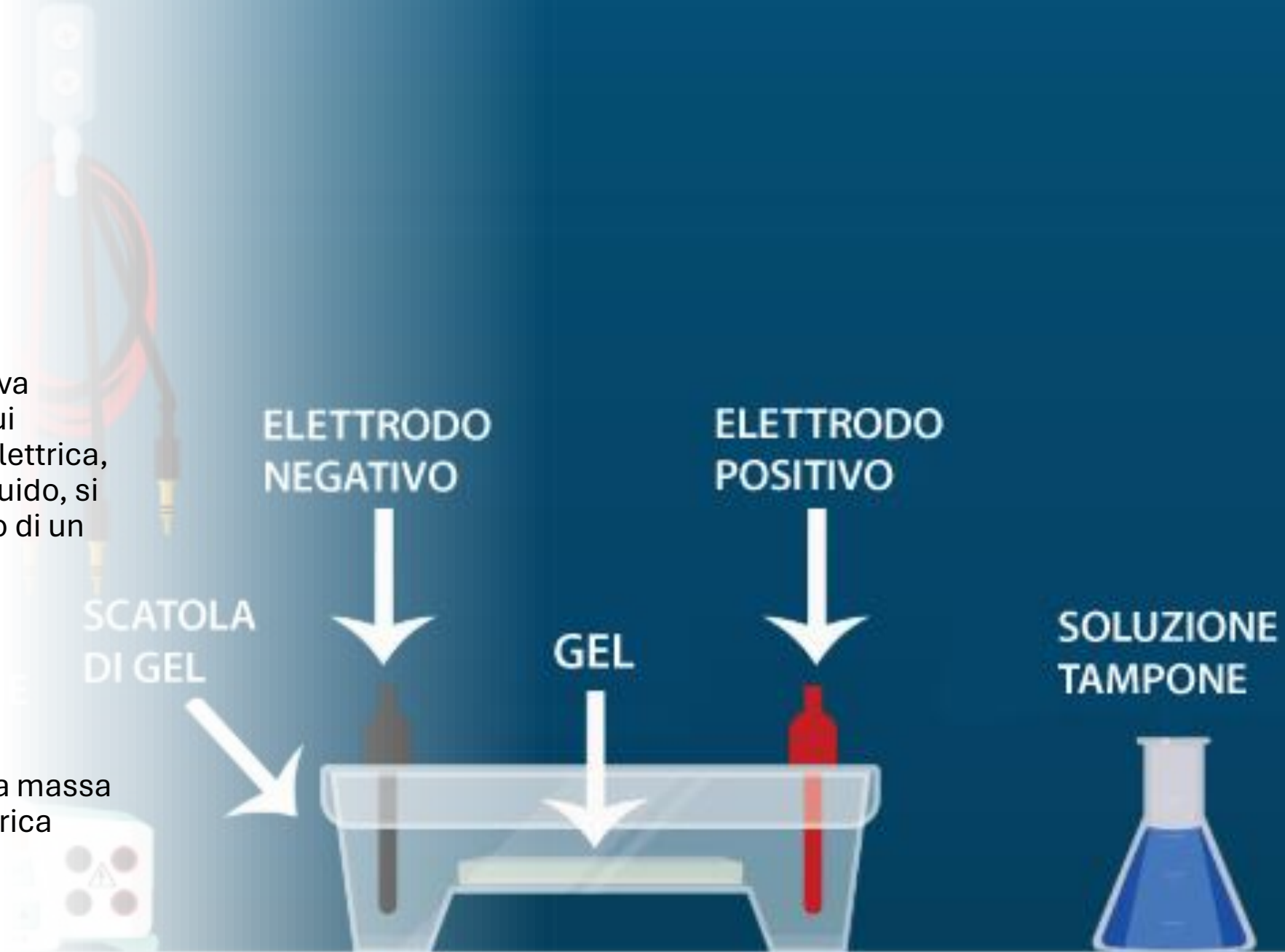
La proteina che lega il glucosio si attacca ai residui di glucosio (G) presenti sui granuli di fase stazionaria

La proteina che lega il glucosio viene eluita per aggiunta di glucosio



# Elettroforesi

- Tecnica analitica e separativa basata sulla velocità con cui particelle dotate di carica elettrica, immerse in un opportuno fluido, si muovono in esso per effetto di un campo elettrico.
- Può dare indicazioni di tipo qualitativo e quantitativo
- La separazione si basa sulla massa molecolare o la carica elettrica delle proteine



# MOBILITÀ ELETTROFORETICA

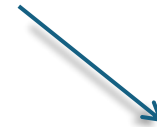
- Velocità con cui si muovono le particelle nel sistema elettroforetico.

Fattori che influenzano la mobilità elettroforetica



## **Nel campione**

- Carica elettrica
- Massa
- Dimensioni
- Forma



## **Nel mezzo**

- Supporto
- Tampone

# MEZZI DI SEPARAZIONE

## Tecniche non setaccianti

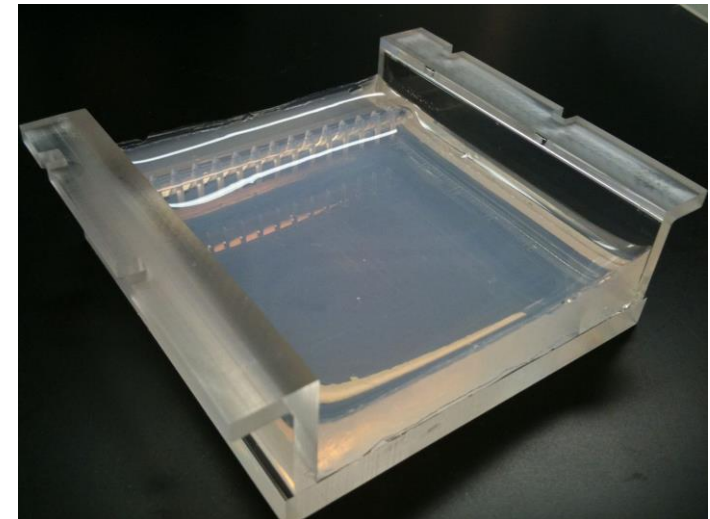
- Carta
- Foglio di acetato di cellulosa



[Questa foto](#) di Autore sconosciuto è concesso in licenza da [CC BY](#)

## Tecniche setaccianti

- Gel di agarosio
- Gel di poliacrilammide

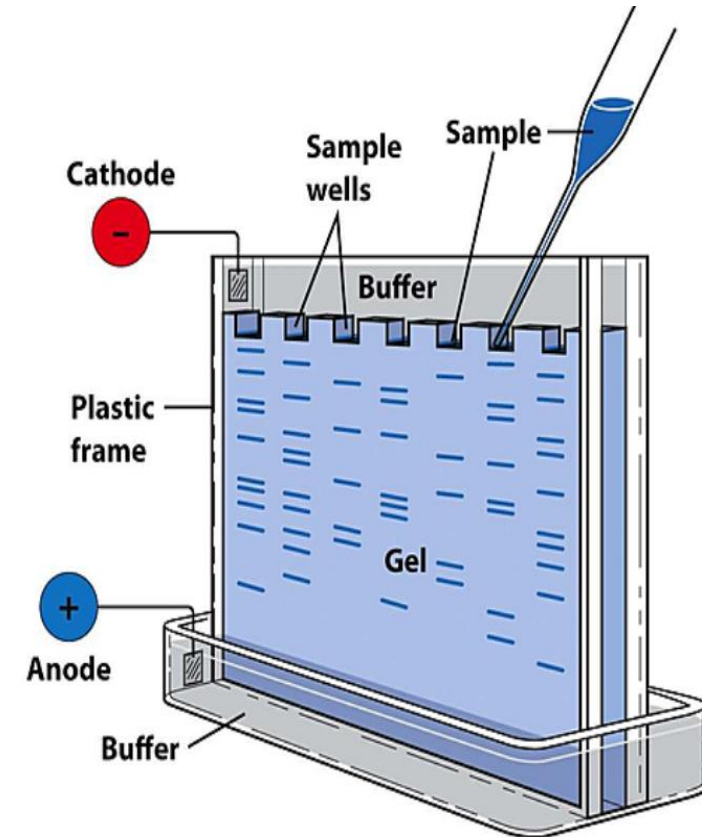


# PREPARAZIONE DEL GEL

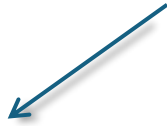
- Inseriamo una soluzione liquida fra 2 vetri separati da spaziatori
- Prima della polimerizzazione viene posizionato un “pettine”
- Utilizziamo dei traccianti per monitorare la corsa elettroforetica: xilene cianolo e blu di bromofenolo
- Dopo la corsa elettroforetica le proteine non sono visibili sul gel. Vengono visualizzate con tecniche di colorazione o marcatori fluorescenti



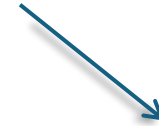
Coomassie brilliant blu allo 0.1% in metanolo, acqua e acido acetico glaciale



La migrazione è influenzata dalle condizioni in cui effettuiamo la corsa elettroforetica



- In condizioni denaturanti → la separazione delle proteine avviene in base al solo **peso molecolare**. Le proteine sono denaturate e perdono la loro struttura terziaria o quaternaria;



- In condizioni native → la separazione delle proteine avviene in base al **rapporto carica/massa** viene aggiunto un tampone non riducente e non denaturante che mantiene la struttura terziaria e della densità di carica

# ELETTROFORESI IN CONDIZIONI DENATURANTI

- Utilizzo del sodio dodecilsolfato (SDS) e  $\beta$ -mercaptoetanololo come agenti denaturanti
- Consente determinazioni di tipo qualitativo e quantitativo
- Le proteine vengono separate solo sulla base del loro peso molecolare
  
- In condizioni denaturanti si opera in maniera discontinua
  
- Un sistema discontinuo è costituito da due gel:
  1. **Stacking gel** → pori larghi, non restrittivo
  2. **Resolving gel** → pori più piccoli che consentono di separare le proteine con risoluzione maggiore di un sistema continuo (un solo tipo di gel).

# ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE

- Proteine preparate e separate in condizioni non riducenti e non denaturanti
- La mobilità è determinata da una complessa combinazione di fattori
- La separazione è basata sul rapporto carica/massa
- Utilizzata per applicazioni che richiedono la purificazione dell'enzima attivo o il rilevamento di un anticorpo che riconosce solo la forma nativa della proteina
- Con un gel di gradiente otteniamo una separazione più raffinata

## FOCALIZZAZIONE ISOELETTRICA (IEF)

- Si utilizza un capo elettrico e di gradiente di pH per separare le proteine in base al punto isoelettirco sfruttando la carica netta.
- Viene utilizzata nell'identificazione di proteine da campioni complessi (ad esempio, lisati di cellule e tessuti, plasma), nell'analisi delle modifiche post-traduzionali e nella separazione di campioni per le analisi di spettrometria di massa.

## ELETTROFORESI BIDIMENSIONALI

- Vengono applicate a una stessa miscela 2 tecniche elettroforetiche
- Maggior grado di separazione
- Utilizzata per studiare patologie connesse a difetti di trascrizione o espressione delle proteine



# ISOENZIMI

- Gli isoenzimi sono famiglie di enzimi che catalizzano la stessa reazione chimica pur presentando differenti proprietà (punto isoelettrico, solubilità, diversa affinità per il substrato).
- *Differenti isoenzimi presentano origini differenti.*
- Possono essere di grande utilità in ambito clinico e soprattutto diagnostico in quanto è importante evidenziare la presenza di particolari isoforme.

# PRINCIPALI ENZIMI DI INTERESSE CLINICO

---

*ENZIMA LATTATO-DEIDROGENASI (LDH o LAD)*

---

*ENZIMA CREATINFOSFOCHINASI (CK)*

---

*ENZIMI ASPARTATO AMINOTRANSFERASI (AST o GOT)  
ed ALANINA AMINOTRANSFERASI (ALT o GPT)*

---

*FOSFATASI ALCALINA (ALP)*

---

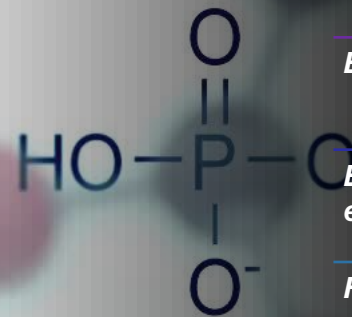
*FOSFATASI ACIDA (ACP)*

---

*Y-GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASI (Y-GT o GGT)*

---

*COLINESTERASI (CHE)*



# Serum Enzyme Alterations in Chronic Muscle Disease

## A Biopsy-Based Diagnostic Assessment

DANIEL HOOD, M.D., FREDERICK VAN LENTE, Ph.D., AND MELINDA ESTES, M.D.

➤ L'articolo confronta retrospettivamente i risultati delle biopsie muscolari con l'attività degli enzimi e isoenzimi sierici in 137 pazienti;

➤ Enzimi sierici valutati: CK (creatinfosfochinasi), AST (asparato aminotransferasi), LD (lattato-deidrogenasi) e aldolasi (ALS), così come la percentuale di isoenzima CK-MB (creatina chinasi isoforma MB);

TABLE 2. DESCRIPTIVE STATISTICS OF CASES WITHOUT IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

Diagnosis	CK (U/L)			CK MB (%)			LD (U/L)			AST (U/L)			ALS (U/L)		
	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N
No diagnostic abnormality	89.3	(51.4)	4	1.5	(0.7)	2	169.8	(82.6)	6	28.5	(15.9)	6	4.9	(1.1)	3
Neurogenic atrophy	195.3	(218.7)	25	3.6	(3.1)	8	176.6	(115.1)	43	20.0	(9.5)	43	5.1	(2.2)	14
Fiber Type II atrophy	188.6	(322.7)	17	3.0	(1.6)	5	203.6	(70.6)	19	27.1	(17.2)	19	5.7	(4.1)	11
Fiber Type I atrophy	150.0		1			0	136.0		1	19.0		1			0
Inclusion body myositis	655.8	(616.9)	8	6.1	(3.3)	7	250.5	(56.7)	9	28.0	(11.7)	9	16.3	(14.3)	3
Polymyositis	3,935.0	(5,061.2)	12	9.0	(5.5)	10	602.0	(585.0)	13	204.7	(280.2)	13	44.9	(50.1)	12
Granulomatous myositis	34.0		1			0	247.0		1	48.0		1	7.5		1
Polyarteritis nodosa	214.0		1			0	281.5	(252.4)	2	36.5	(12.0)	2	13.5		1
Duchenne's muscular dystrophy	26,525.3	(11,781.2)	5	5.3	(2.1)	3	1,483.0	(373.2)	4	285.0	(127.4)	5	26.8		1
Unclassified myopathy	2,824.9	(3,605.5)	9	4.3	(2.6)	7	418.8	(373.2)	8	72.2	(65.2)	9	26.7	(30.7)	8

TABLE 3. DESCRIPTIVE STATISTICS OF CASES WITH IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

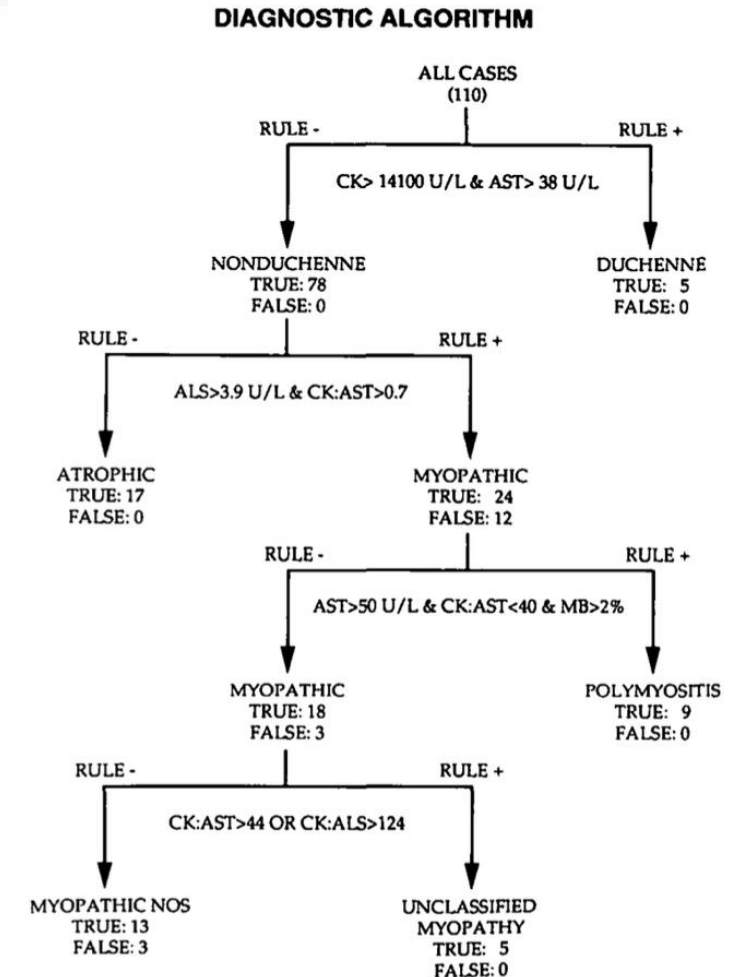
Diagnosis	CK (U/L)			CK MB (%)			LD (U/L)			AST (U/L)			ALS (U/L)		
	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N	Mean	(SD)	N
No diagnostic abnormality	291.0		1			0	290.0		1	55.0		1	7.0		1
Neurogenic atrophy	144.5	(133.2)	6	4.0		1	196.6	(69.7)	5	22.8	(11.0)	4	2.3		1
Fiber Type II atrophy	66.7	(59.3)	3			0	211.7	(92.6)	3	34.3	(32.7)	3	6.2	(3.9)	3
Inclusion body myositis	533.8	(650.5)	4	7.5	(2.1)	2	282.7	(102.9)	3	49.3	(37.0)	3	10.6	(9.2)	3
Polymyositis	1,165.8	(1,254.9)	12	4.8	(3.2)	6	333.3	(110.2)	11	64.7	(45.7)	11	16.6	(10.0)	9
Unclassified myopathy	6,910.0		1	4.0		1	445.0		1	86.0		1	69.0		1

# Serum Enzyme Alterations in Chronic Muscle Disease

## *A Biopsy-Based Diagnostic Assessment*

DANIEL HOOD, M.D., FREDERICK VAN LENTE, Ph.D., AND MELINDA ESTES, M.D.

- Sono state eseguite: statistiche descrittive, analisi della varianza Kruskal-Wallis a via singola applicata per confrontare le variabili degli enzimi tra le classificazioni diagnostiche o i trattamenti; mentre la regressione logistica graduale è stata utilizzata per identificare le variabili degli enzimi associate indipendentemente alla presenza di infiammazione
- È stato sviluppato un algoritmo diagnostico utilizzando un programma di generazione di regole assistito da computer che ha permesso di separare le miopatie dalle atrofie e ha identificato i casi di distrofia muscolare di Duchenne e polimiosite



# Serum Enzyme Alterations in Chronic Muscle Disease

## *A Biopsy-Based Diagnostic Assessment*

DANIEL HOOD, M.D., FREDERICK VAN LENTE, Ph.D., AND MELINDA ESTES, M.D.

- il tessuto è stato preparato dividendo i campioni di biopsia in 3 parti: una è stata congelata per colorazioni citochimiche e colorazioni speciali; un'altra è stata fissa in glutaraldeide per microscopia ottica; la terza è stata fissata nel fissativo di Hollander
- I risultati mostravano che le malattie miopatiche hanno un maggior aumento medio dell'attività degli enzimi sierici rispetto alle malattie atrofiche. In particolare, aumenti nell'attività di AST e CK erano associati all'infiammazione muscolare
- Complessivamente, l'uso combinato di variabili enzimatiche può fornire un'importante applicazione diagnostica e potrebbe ridurre la necessità di biopsie muscolari in alcuni pazienti. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare e migliorare questi approcci diagnostici.

## REFERENCES

1. Arenas J, Diaz V, Liras G, et al. Activities of creatine kinase and its isoenzymes in serum in various skeletal muscle disorders. *Clin Chem* 1988;34:2460-2462.
2. Bohan A, Peter JB. Medical progress: polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-407.
3. Hooshmand H, Dove J, Suter C. The use of serum lactate dehydrogenase isoenzymes in the diagnosis of muscle diseases. *Neurology* 1969;19:26-31.
4. Keshgejian AA, Feinberg NV. Serum creatine kinase MB isoenzyme in chronic muscle disease. *Clin Chem* 1984;30:575-578.
5. Panitch HS, Franklin GM. Elevation of serum creatine phosphokinase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1972;22:964-966.
6. Ringel SP, Kenny CE, Neville HE, Giorno R, Carry MR. Spectrum of inclusion body myositis. *Arch Neurol* 1987;44:1154-1157.
7. Vignos PJ, Goldwyn J. Evaluation of laboratory tests in diagnosis and management of polymyositis. *Am J Med Sci* 1972;263:291-308.
8. Yasmineh WG, Ibrahim GA, Abbanezhad M, Awad EA. Isoenzyme distribution of creatine kinase and lactate dehydrogenase in serum and skeletal muscle in duchenne muscular dystrophy, collagen disease, and other muscular disorders. *Clin Chem* 1978;24:1985-1989.
9. Pinto PVD, Kaplan A, Van Dreal. Aldolase: spectrophotometric determination using an ultraviolet procedure. *Clin Chem* 1980;15:349-360.
10. Engelman L. Stepwise logistic regression. In: Dixon WJ, ed. *BMDP statistical software manual*. Berkeley: University of California Press, 1985, pp 330-344.
11. DeGirolami U, Smith TW. Pathology of skeletal muscle diseases. *Am J Pathol* 1982;107:235-276.
12. Plotz PH, Dalakas M, Leff RL, Love LA, Miller FW, Cronin ME. Current concepts in the idiopathic inflammatory myopathies: polymyositis, dermatomyositis, and related disorders. *Ann Intern Med* 1989;111:143-157.
13. Lotz BP, AG Engel, Nishino H, Stevens JC, Litchy WJ. Inclusion body myositis: observations in 40 patients. *Brain* 1989;112:727-747.
14. Lott JA, Landesman PW. The enzymology of skeletal muscle disorders. *CRC Critical Rev Clin Lab Sci* 1984;20:153-190.
15. Foxall CD, Emery EH. Changes in creatine kinase and its isoenzymes in human fetal muscles during development. *J Neurol Sci* 1975;24:483-492.
16. Mastaglia FL, Walton JN. Histological and histochemical changes in skeletal muscle from cases of chronic juvenile and early adult spinal muscular atrophy (the Kugelberg-Welander syndrome). *J Neurol Sci* 1971;12:14-44.
17. Lott JA, Wolf PL. *Clinical enzymology: a case oriented approach*. New York: Field, Rich, and Associates, 1986, p 178.

# Dehydrogenase Activity as a Biological Indicator of Soil Health

Jupinder Kaur\* and Gurpreet Kaur

Department of Microbiology, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004

- La salute del suolo è un fattore critico per la produzione agricola sostenibile e deve essere valutata per la gestione delle pratiche agricole e altri interventi umani.
- Per misurare la salute del suolo, gli **enzimi del suolo** sono un fattore funzionale direttamente collegato ai microrganismi.
- **DEIDROGENASI** → rappresentante più critico e significativo dell'attività microbica
  - È presente a livello intracellulare
  - Misura diretta dell'attività microbica del suolo
  - Indica il numero vitale di microrganismi, eventuali interruzioni dei cicli biogeochimici, attività antropiche e perturbazioni climatiche o dell'ecosistema.

# Dehydrogenase Activity as a Biological Indicator of Soil Health

Jupinder Kaur\* and Gurpreet Kaur

Department of Microbiology, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004

## **RUOLO DELL'ENZIMA DEIDROGENASI COME BIOINDICATORE**

L'attività deidrogenasica diminuisce:

- Nei suoli deturpati
- Con l'abbassamento della temperatura
- Inquinamento da xenobiotici: pesticidi e contaminazione da metalli pesanti

**Una diminuzione dell'attività deidrogenasica può essere indicativa di condizioni ambientali sfavorevoli.**

# Dehydrogenase Activity as a Biological Indicator of Soil Health

Jupinder Kaur\* and Gurpreet Kaur

Department of Microbiology, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004

## **CAMBIAMENTI NELLE PRATICHE AGRICOLE**

- **PRATICHE DI FERTILIZZAZIONE** → L'applicazione di diversi fertilizzanti ha aumentato l'attività deidrogenasica e le comunità microbiche del suolo
- **LAVORAZIONE DEL TERRENO** → Attività deidrogenasica più elevata con l'aratura poco profonda
- **IRRIGAZIONE** → Una quantità adeguata di umidità sostiene una migliore crescita microbica e quindi una migliore attività enzimatica del suolo

**Un aumento dell'attività deidrogenasica può indicare una maggiore attività microbica nel suolo. Spesso associata a condizioni favorevoli.**



# Dehydrogenase Activity as a Biological Indicator of Soil Health

Jupinder Kaur\* and Gurpreet Kaur

Department of Microbiology, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004

## **CONCLUSIONE**

- La deidrogenasi è un enzima coinvolto nei processi di ossidazione-reduzione all'interno del suolo. La sua attività può essere utilizzata come indicatore biologico della salute del suolo.
- Monitorare l'attività della deidrogenasi può fornire agli agricoltori e agli scienziati del suolo un'indicazione importante sulla salute e sulla funzionalità del suolo, consentendo loro di adottare pratiche di gestione sostenibili e di preservare la fertilità del suolo a lungo termine.

**Questo enzima può svolgere un ruolo di strumento diagnostico per la salute del suolo.**

# SAGGIO ENZIMATICO E TECNICHE SPETTROFOTOMETRICHE



- 1. Preparazione del saggio enzimatico**
- 2. Misurazione dell'assorbanza tramite uno spettrofotometro UV/Vis**
- 3. Monitoraggio della reazione enzimatica**
- 4. Determinazione della concentrazione dell'enzima e dei parametri cinetici**

# Saggio enzimatico

Il saggio enzimatico consente di identificare e quantificare l'enzima di interesse. La quantità di un enzima si esprime come **attività** perché è importante sapere quante molecole di enzima sono attive. La misurazione si basa sulla valutazione della variazione di concentrazione del substrato (consumo) o del prodotto (formazione) della reazione enzimatica.

I saggi enzimatici continui sono metodi che consentono la misurazione in tempo reale della cinetica di una reazione enzimatica in maniera continua nel tempo.



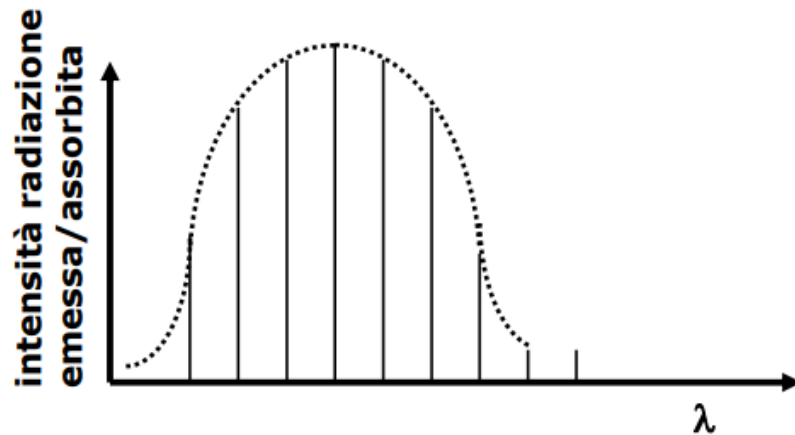
Unità di misura dell'attività enzimatica: Unità internazionale (U)

1 U: quantità di enzima che trasforma 1  $\mu\text{mol}$  di substrato in 1 min

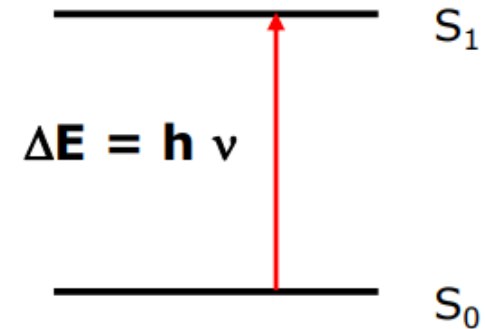
# Tecniche spettrofotometriche

I metodi spettrofotometrici per il dosaggio dell'attività enzimatica sfruttano la capacità dei substrati o dei prodotti di assorbire e di emettere radiazioni elettromagnetiche: ogni molecola ha una sua specifica emissione e un suo specifico assorbimento.

Il dato sperimentale che si ottiene è lo **spettro di assorbimento** o **di emissione**:



La quantità di luce assorbita o emessa dalla materia è quantizzata e comporta un passaggio da uno stato fondamentale ( $S_0$ ) o eccitato ( $S_1$ ):



## Legge di Lambert-Beer

La legge di Lambert-Beer è un principio fondamentale utilizzato per la determinazione della concentrazione di analiti in soluzione, sia in modo quantitativo che in modo qualitativo.

Questa legge stabilisce una relazione lineare tra l'assorbanza di una soluzione e la concentrazione del soluto:

$$A = abc$$



$$c = \frac{A}{ab}$$

**A** = l'assorbanza, quantità di luce che viene assorbita

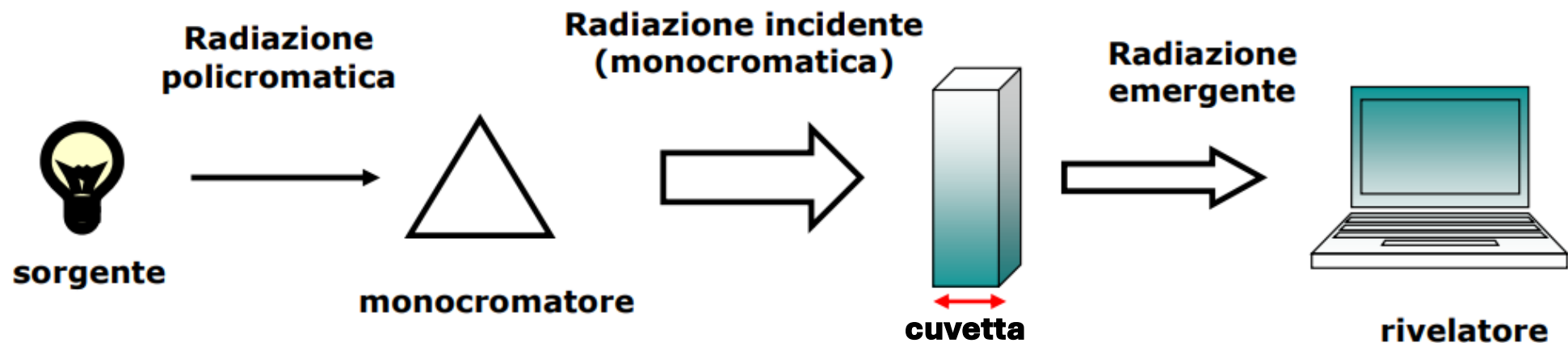
**a** = coefficiente di estinzione molare. I valori di a sono tabulati.

**b** = lunghezza cammino ottico [cm], ossia la lunghezza del materiale che viene attraversato

**c** = concentrazione molare della specie

# Spettrofotometro UV-Vis

Uno spettrofotometro UV-Vis (ultravioletto-visibile) è uno strumento utilizzato per misurare l'**assorbanza** della luce da parte di una soluzione in funzione della lunghezza d'onda. Questo strumento è costituito da:



**+ unità di controllo, display e software**

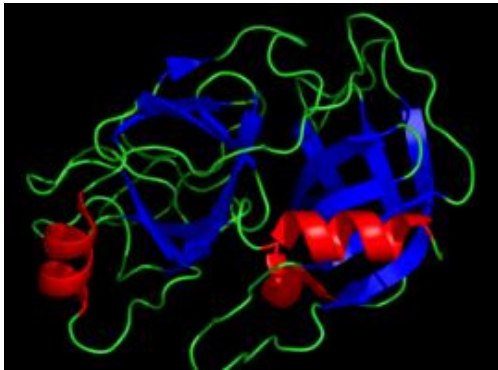
# Trypsin-Catalyzed Deltamethrin Degradation

Chunrong Xiong<sup>1,2#a</sup>, Fujin Fang<sup>1,2</sup>, Lin Chen<sup>1,2</sup>, Qinggui Yang<sup>1,2#b</sup>, Ji He<sup>1,2#c</sup>, Dan Zhou<sup>1,2</sup>, Bo Shen<sup>1,2</sup>, Lei Ma<sup>1,2</sup>, Yan Sun<sup>1,2</sup>, Donghui Zhang<sup>1,2\*</sup>, Changliang Zhu<sup>1,2</sup>

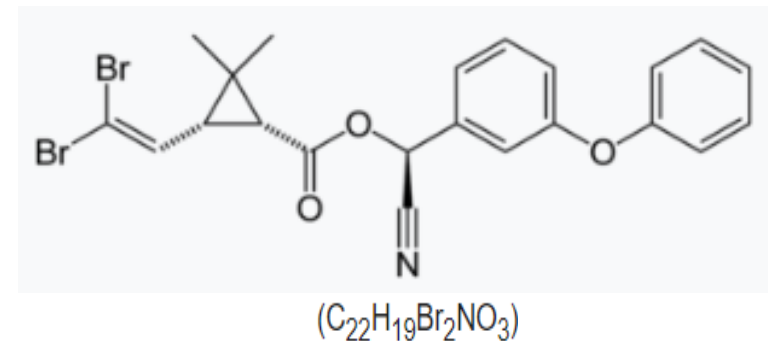
<sup>1</sup> Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, <sup>2</sup> Jiangsu Province Key Laboratory of Modern Pathogen Biology, Nanjing, Jiangsu, China

## Introduzione

La **tripsina**, una proteasi presente nel sistema digestivo dei vertebrati e degli invertebrati.



La **deltametrina** è un insetticida appartenente alla classe dei piretroidi sintetici.



Residui eccessivi di pesticidi nei prodotti agricoli e nell'ambiente rappresentano una minaccia per la salute umana. È importante sviluppare metodi sicuri ed efficaci per degradare i pesticidi come parte del controllo dell'inquinamento.

<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0089517&type=printable>

# Trypsin-Catalyzed Deltamethrin Degradation

Chunrong Xiong<sup>1,2<sup>aa</sup></sup>, Fujin Fang<sup>1,2</sup>, Lin Chen<sup>1,2</sup>, Qinggui Yang<sup>1,2<sup>bb</sup></sup>, Ji He<sup>1,2<sup>bc</sup></sup>, Dan Zhou<sup>1,2</sup>, Bo Shen<sup>1,2</sup>, Lei Ma<sup>1,2</sup>, Yan Sun<sup>1,2</sup>, Donghui Zhang<sup>1,2\*</sup>, Changliang Zhu<sup>1,2</sup>

**1** Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, **2** Jiangsu Province Key Laboratory of Modern Pathogen Biology, Nanjing, Jiangsu, China

<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0089517&type=printable>

## Metodi

Per esplorare la potenziale funzione della tripsina, si sono studiate le reazioni idrolitiche in vitro della deltametrina catalizzate dalla tripsina:

- 1) Degradazione della deltametrina**
- 2) Estrazione**
- 3) Spettrofotometria ultravioletto-visibile (UV/Vis):** La tripsina (1 mg/mL) è stata disciolta in tampone Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) ed è stata aggiunta a deltametrina (23,34  $\mu$ mol), in cuvette da 3 mL. Si è utilizzato uno spettrofotometro UV/Vis Cary 5000 e il software Cary WinUV Bio Package.

L'assorbanza a 264 nm è data rilevata ogni minuto in un periodo di tempo di 10 minuti e allo stesso tempo è stata costruita la curva standard della deltametrina.



# Trypsin-Catalyzed Deltamethrin Degradation

Chunrong Xiong<sup>1,2<sup>aa</sup></sup>, Fujin Fang<sup>1,2</sup>, Lin Chen<sup>1,2</sup>, Qinggui Yang<sup>1,2<sup>ab</sup></sup>, Ji He<sup>1,2<sup>bc</sup></sup>, Dan Zhou<sup>1,2</sup>, Bo Shen<sup>1,2</sup>, Lei Ma<sup>1,2</sup>, Yan Sun<sup>1,2</sup>, Donghui Zhang<sup>1,2\*</sup>, Changliang Zhu<sup>1,2</sup>

**1** Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China, **2** Jiangsu Province Key Laboratory of Modern Pathogen Biology, Nanjing, Jiangsu, China

<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0089517&type=printable>

## Risultati

Nel test UV/Vis, gli spettri ottenuti della deltametrina prima e dopo la reazione erano diversi, indicando che almeno una parte della deltametrina veniva convertita nei suoi prodotti di degradazione.

I dati dimostrano che la tripsina può degradare direttamente la deltametrina in vitro e ridurre significativamente la sua tossicità nei mammiferi.

Trypsin concentration (mg/mL)	0	1.25	2.5	5	10	20
GC peak area	525867	270343	111366	48176	27196	12475
Amount of unconverted deltamethrin (µg)	20	10.28	4.23	1.83	1.03	0.47
Degree of reaction completion (%)	0	48.6	78.9	90.9	94.9	97.7

La tripsina, una nuova promettente candidata come biocatalizzatore per controllare l'inquinamento da pesticidi senza causare contaminazione secondaria?

**TECNICHE DI  
RILEVAZIONE  
MEDIANTE  
LUMINESCENZA**





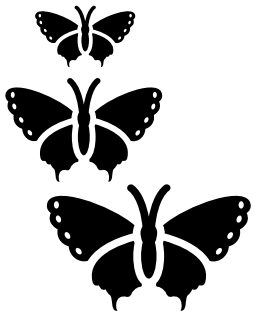
# **COS'È LA LUMINESCENZA?**

---

## COS'E' LA LUMINESCENZA?

---

- **LUMINESCENZA:** emissione di radiazione elettromagnetica da parte di un atomo(o molecola) a seguito di una transizione di stato.
- **CHEMILUMINESCENZA:** L'energia deriva da una reazione chimica.
- **BIOLUMINESCENZA:** fenomeno di chemiluminescenza nello spettro del visibile (si presenta in organismi viventi).



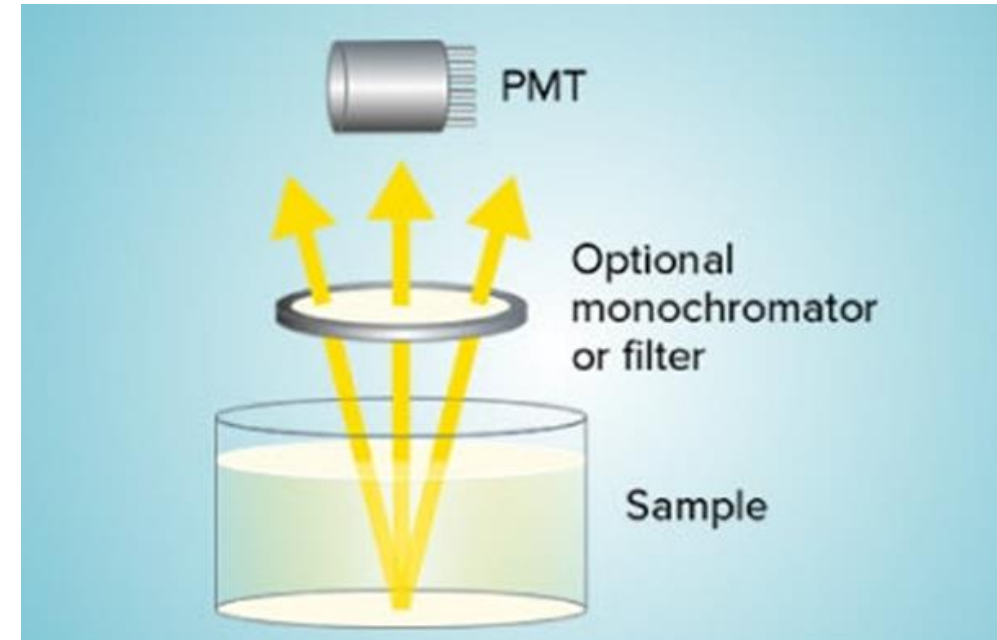
# TECNICHE DI RILEVAZIONE TRAMITE LUMINESCENZA

## MATERIALE

- MICROPIASTRA
- LUMINOMETRO
- CAMERA DI LETTURA
- PMT (TUBO FOTOMOLTILICATORE)
- ACCESSORI (FILTRI – MONOCROMATORI...)

## UNITA' DI LETTURA

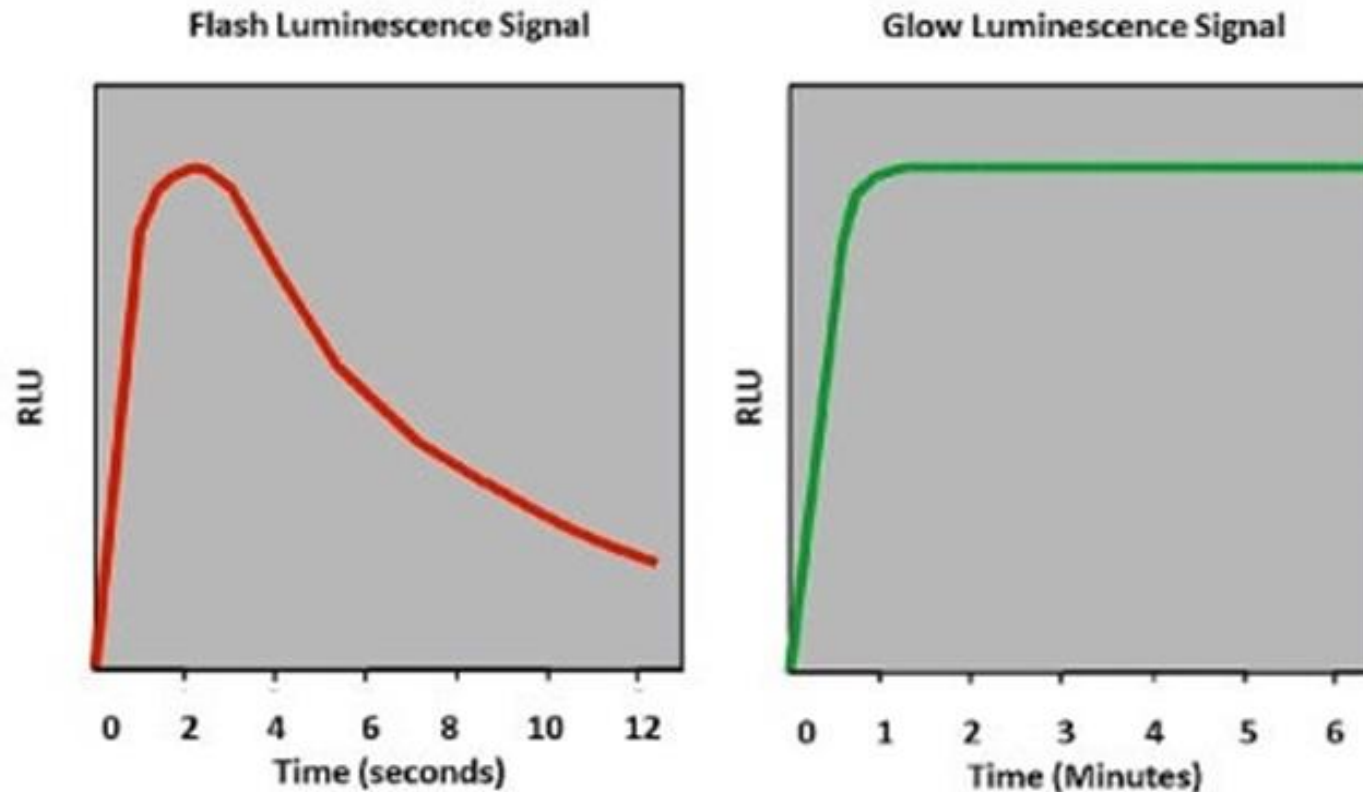
RLU (RELATIVE LIGHTS UNIT)



## Come funziona la rilevazione della luminescenza?

---

# TECNICHE DI RILEVAZIONE MEDIANTE LUMINESCENZA



**GLOW:** Segnale molto stabile nel tempo, ma più debole.

**FLASH:** Segnale molto luminoso, ma poco duraturo nel tempo.

**REAZIONE DI TIPO «FLASH» O «GLOW»**

---

# TECNICHE DI RILEVAZIONE MEDIANTE LUMINESCENZA

## APPLICAZIONE DI SISTEMI CHEMILUMINESCENTI E BIOLUMINESCENTI NELL'ANALISI ENZIMATICA

---

<i>Sistema</i>	<i>Applicazione</i>
Luminolo	Determinazione di enzimi coinvolti in reazioni che producono $H_2O_2$ o di loro substrati mediante reazioni enzimatiche accoppiate Determinazione di specie reattive all'ossigeno (ROS)
1,2-Diossietani	Rivelazione di enzimi
Luciferina/luciferasi da lucciola	Determinazione di enzimi coinvolti in reazioni che producono o utilizzano ATP o di loro substrati mediante reazioni enzimatiche accoppiate
Luciferina/luciferasi batterica	Determinazione di enzimi che producono o consumano NAD(P)H o di loro substrati mediante reazioni enzimatiche accoppiate



# **SISTEMA LUCIFERINA/LUCIFERASI IN AMBITO TOSSICOLOGICO**

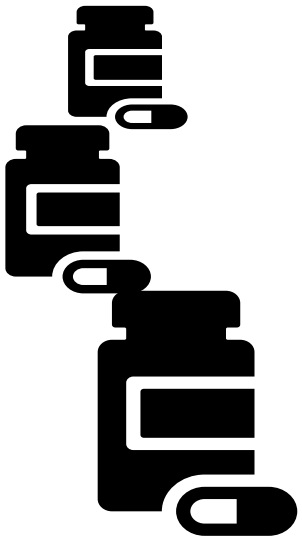
---



# SISTEMA LUCIFERINA/LUCIFERASI IN AMBITO TOSSICOLOGICO

---

- La luciferina-luciferasi è ampiamente utilizzata in tossicologia per valutare vari parametri legati alla tossicità delle sostanze chimiche.
- Viene impiegata per valutare la viabilità cellulare, rilevare lo stress ossidativo, monitorare l'attività enzimatica e screening di composti tossici.
- L'utilizzo della luciferina-luciferasi consente misurazioni sensibili, rapide e in tempo reale degli effetti tossici delle sostanze chimiche.




## Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials

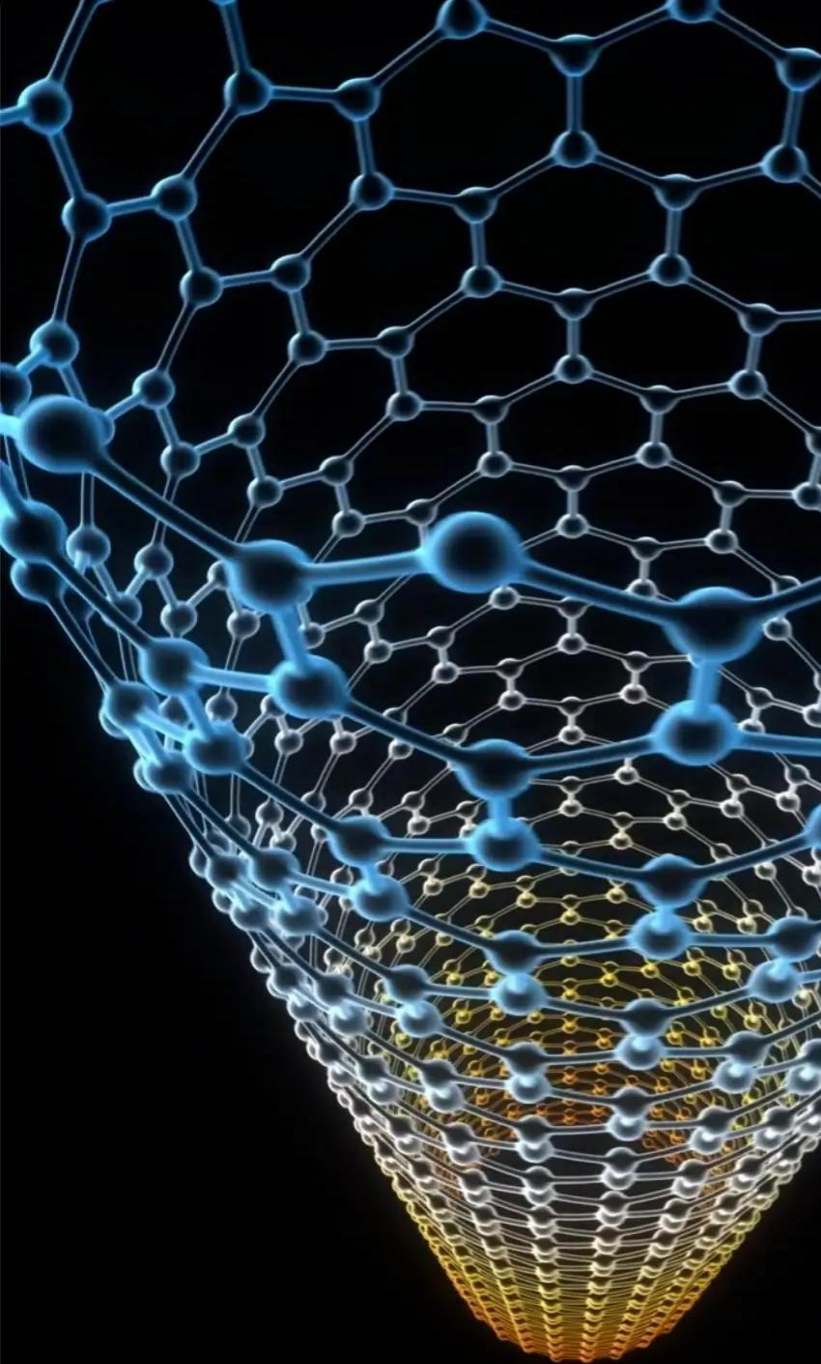
Elena N. Esimbekova<sup>a,b,\*</sup>, Elena V. Nemtseva<sup>b,a</sup>, Anna E. Bezrukikh<sup>b</sup>, Galina V. Jukova<sup>b</sup>, Albert E. Lisitsa<sup>b</sup>, Viktoriya I. Lonshakova-Mukina<sup>b</sup>, Nadezhda V. Rimatskaya<sup>b</sup>, Oleg S. Sutormin<sup>b</sup>, Valentina A. Kratasyuk<sup>b,a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center 'Krasnoyarsk Science Center SB RAS', 660036 Krasnoyarsk, Russia

<sup>b</sup> Siberian Federal University, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, 660041 Krasnoyarsk, Russia

- 
- Mancanza della valutazione della sicurezza dei nuovi materiali;
  - Nanomateriali ingegnerizzati presenti nell'industria della medicina, della cosmetica e alimentare;
  - Potrebbero quindi nuocere alla salute dell'uomo, degli ecosistemi e della biosfera;

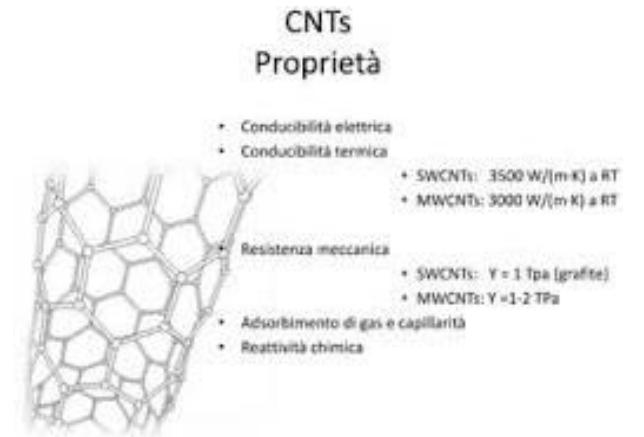




Essi possono essere utilizzati in:

- Nanoelettronica come diodi e transistori
- supercondensatori
- attuatori elettromeccanici
- sensori chimici
- nelle celle a combustibile
- negli schermi piatti
- impianti biomedici
- dispositivi nanoelettronici

Anche se i campi di applicazione appaiono illimitati e ancora oggetto di studi.



## COSA SONO I CNT?

---

# MATERIALI E METODI

---

- In questo lavoro, il sistema enzimatico batterico accoppiato NAD(P)H:FMN-ossidoreduttasi e luciferasi (Red+ Luc), è stato utilizzato come sistema di prova nel tentativo di sostituire i batteri luminescenti
- Saggio basato sull'inibizione del sistema enzimatico accoppiato solubile e immobilizzato Red + Luc
- Per i test sono stati scelti i seguenti CNM:
  - nanotubi carbossilati di carbonio a parete singola c-SWCNT-90A
  - nanofibra di carbonio a parete multipla ' MWCNT.

# MATERIALI E METODI

---

- 1) Registrazione dell'intensità di luminescenza di controllo ( $I_c$ )
- 2) Registrazione dell'intensità di luminescenza in presenza del nanomateriale ( $I_{exp}$ )
- 3) Misurazione dell'attività del reagente immobilizzato
- 4) Calcolo della luminescenza residua
- 5) Determinazione dei valori dei parametri di inibizione IC20 e IC50

**Questi passaggi dimostrano l'effetto inibitorio dei nanomateriali sui sistemi enzimatici accoppiati solubili e immobilizzati Red + Luc.**

# RISULTATI E DISCUSSIONE

---

- I nanotubi di carbonio (SWCNT e MWCNT) e i fullereni idrati C<sub>60</sub>H<sub>y</sub>F<sub>n</sub> hanno mostrato un effetto inibitorio sull'attività del sistema enzimatico accoppiato Red + Luc.
- Le sospensioni di MWCNT hanno mostrato un'inibizione più forte rispetto a quelle di SWCNT.
- Il sistema enzimatico Red + Luc è più sensibile all'effetto dei nanomateriali rispetto ai test in vivo basati su batteri luminescenti.
- Le concentrazioni ambientali previste dei nanotubi di carbonio sono più basse dei valori di inibizione, ma considerando il rapido aumento della produzione e dell'uso di CNT, si può ipotizzare una potenziale tossicità a livello molecolare.

# CONCLUSIONE

---

- -I nanomateriali analizzati mostrano un effetto inibitorio sugli enzimi dei batteri luminescenti, suggerendo un effetto negativo a livello molecolare.
- Il metodo enzimatico bioluminescente è adatto a rilevare la potenziale tossicità dei nanomateriali e può essere utilizzato come base per nuovi metodi di screening.
- L'analisi è semplice, rapida e competitiva con altri metodi di tossicologia.



# FONTE

---

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882704/#:~:text=PMID%3A%2028882704-,DOI%3A%2010.1016/j.tiv.2017.08.022,-Abstract>



# IMMOBILIZZAZIONE

L'immobilizzazione è una tecnica applicata sugli enzimi che gli permette di essere riutilizzabili al termine delle reazioni mantenendo le proprie capacità catalitica, questo è un ottimo vantaggio in quanto gli enzimi sono reattivi molto costosi.

## PUÒ ESSERE

```
graph TD; A[PUÒ ESSERE] --> B[CHIMICA]; A --> C[FISICA];
```

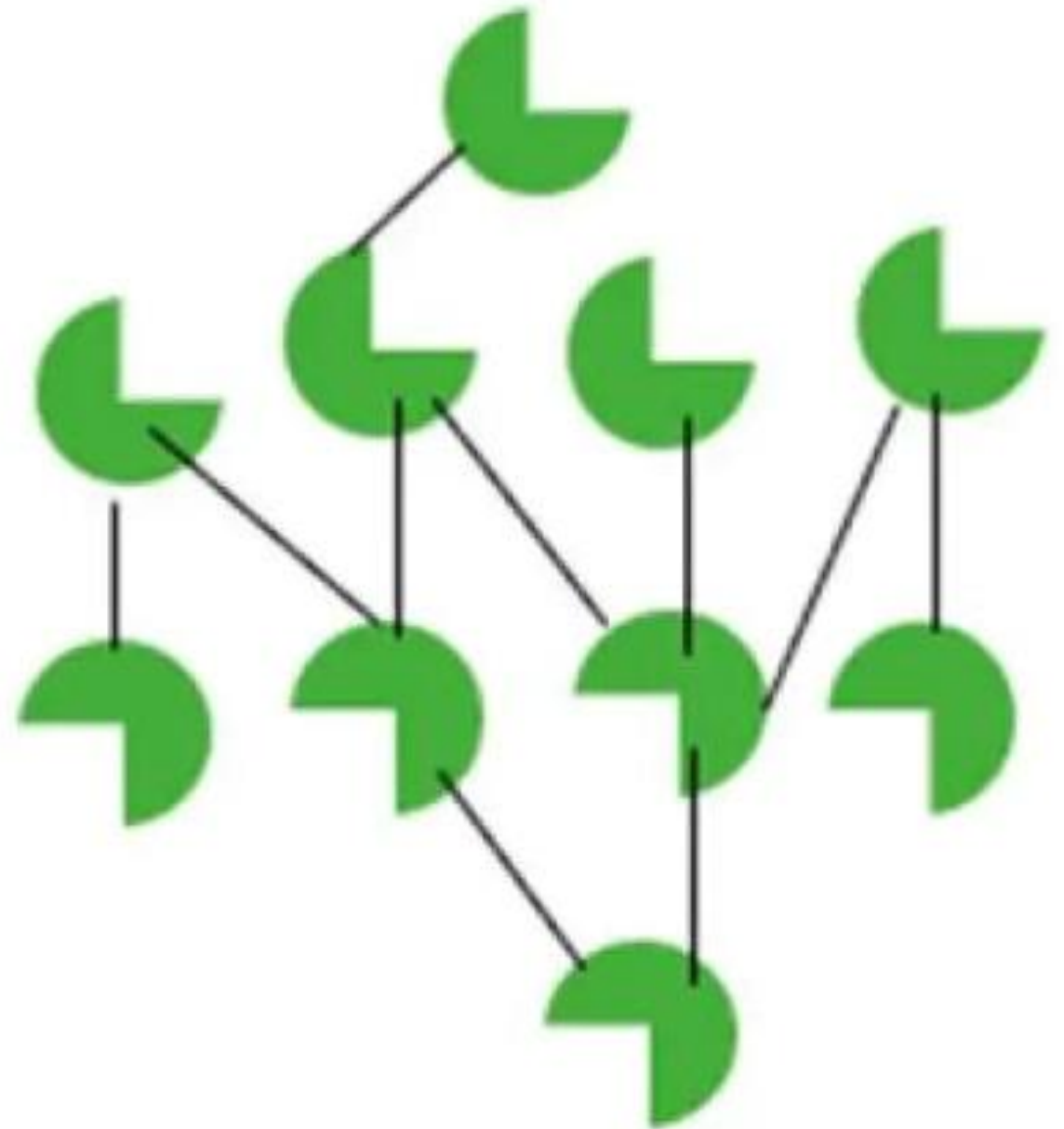
CHIMICA: quando si associano le molecole enzimatiche a un supporto solido mediante legami covalenti, tale supporto può essere rappresentato da cellulosa o polimeri sintetici.

FISICA: quando si sfruttano interazioni fisiche come ad esempio fenomeni di assorbimento.

# Abbiamo quattro tipi diversi di tecniche di immobilizzazione

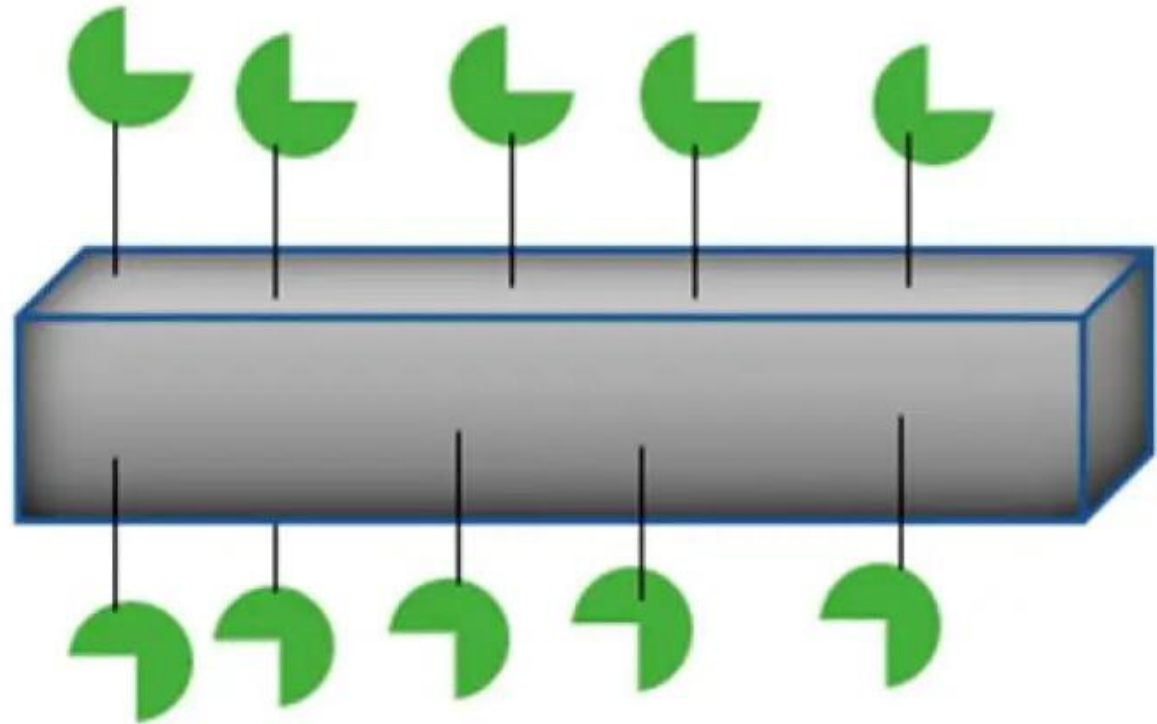
- **1. IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA SU SUPPORTO SOLIDO MEDIANTE MOLECOLE BIFUNZIONALI:**

- Consiste nell' utilizzare molecole bifunzionali che fanno da ponte tra il supporto e l'enzima, attraverso la formazione di legami covalenti



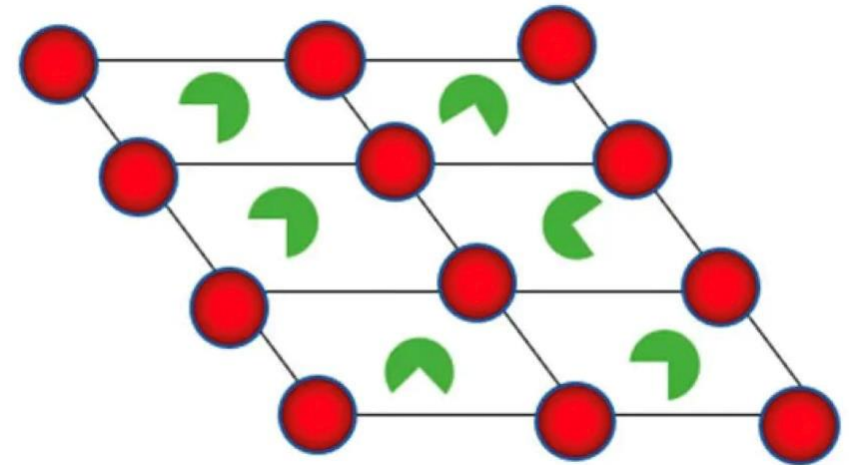
## 2. Immobilizzazione enzimatica mediante formazione di un gel tridimensionale

- Consiste nel formare legami covalenti tra diverse molecole enzimatiche, con conseguente reazione di un reticolo tridimensionale, il quale non consente più alle molecole di rimanere in soluzione. Affinché le molecole enzimatiche più interne possano svolgere la propria funzione catalitica, il diametro dei pori deve avere dimensioni appropriate per permettere l'accesso dei substrati.



# 3. Immobilizzazione enzimatica per intrappolamento

- Consiste nel mancato coinvolgimento delle molecole enzimatiche con la formazione del reticolo tridimensionale, la formazione di quest'ultimo infatti, avviene attraverso polimerizzazione di una certa sostanza che non reagisce con l'enzima; in questo caso il substrato penetra attraverso i pori del reticolo, che non permettono il passaggio dell'enzima.



# 4. IMMOBILIZZAZIONE ENZIMATICA PER ADSORBIMENTO SU SUPPORTO SOLIDO

- Avviene grazie alla capacità delle molecole enzimatiche di creare interazione con superfici solide. Il fenomeno è di tipo fisico, si realizza attraverso la formazione di legami deboli ed è quindi facilmente reversibile. Nel momento in cui il supporto solido viene immerso nella soluzione, c'è una progressiva diminuzione della concentrazione enzimatica in soluzione, fino a raggiungere l'equilibrio. La concentrazione enzimatica iniziale è direttamente proporzionale alla massa di enzima assorbita per unità di superficie del solido.



# VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'IMMOBILIZZAZIONE



## VANTAGGI:

- Rende gli enzimi riutilizzabili
- stabilità enzimatica
- possibilità di automazione

## SVANTAGGI:

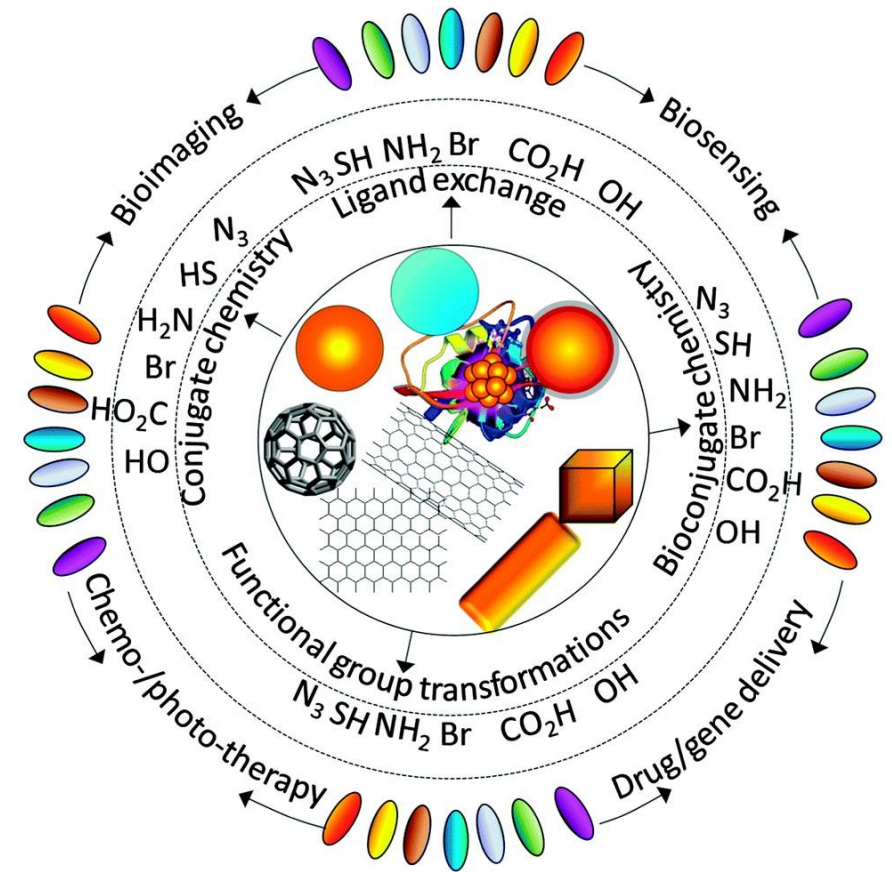
- modificazioni conformazione li dell'enzima
- minor diffusione del substrato nei confronti dell'enzima

# Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update

[Zahra Ashkan](#)<sup>1</sup>, [Roohullah Hemmati](#)<sup>2</sup>, [Ahmad Homaei](#)<sup>3</sup>, [Ali Dinari](#)<sup>4</sup>, [Marzieh Jamlidoost](#)<sup>5</sup>, [Amin Tashakor](#)<sup>6</sup>

- Nonostante l'uso diffuso in vari settori, l'instabilità e la non riutilizzabilità degli enzimi ne limitano le applicazioni che possono essere superate mediante immobilizzazione. La natura del materiale di supporto dell'enzima e il metodo di immobilizzazione influenzano l'attività, la stabilità e le proprietà cinetiche degli enzimi. Qui riportiamo uno studio comparativo degli effetti dei materiali di supporto inorganici sugli enzimi immobilizzati. Di conseguenza, l'immobilizzazione degli enzimi su materiali di supporto nanoinorganici ha migliorato significativamente la stabilità termica e del pH. Inoltre, le immobilizzazioni degli enzimi sui materiali hanno principalmente aumentato i valori  $K_m$  mentre hanno diminuito i valori  $V_{max}$  degli enzimi. Gli enzimi immobilizzati su materiali di supporto nanoinorganici hanno mostrato l'aumento del valore  $\Delta G$  e la diminuzione dei valori  $\Delta H$  e  $\Delta S$ . Contrariamente all'immobilizzazione per adsorbimento fisico debole, gli enzimi immobilizzati legati in modo covalente e attaccati su più punti non vengono rilasciati dalla superficie di supporto per contaminare il prodotto e quindi il costo diminuisce mentre la qualità del prodotto aumenta.

- Tuttavia, i nanomateriali possono diffondersi nell'ambiente e aumentare i rischi per la salute e l'ambiente e dovrebbero essere utilizzati con cautela. Nel complesso, si può prevedere che i materiali di supporto ibridi, i metodi di immobilizzazione diretta, la mutagenesi sito-diretta, la tecnologia delle proteine di fusione ricombinanti, i nanomateriali verdi e i supporti realizzati in sperimentazione verranno utilizzati sempre più spesso per produrre enzimi industriali immobilizzati più efficienti nel prossimo futuro.





The background features a large, faint, circular seal of the University of Naples Parthenope. The seal contains a central figure, likely a personification of the city, surrounded by the text 'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI' and 'PARTHENOPE' at the bottom.

# GRAZIE DELL'ATTENZIONE

- BORRONE ANTONELLA [0123002784]
- DI FRANCO FEDERICA [0123002850]
- IACAMPO MARTINA [0123002857]
- MALLARDO ANNA [0123002755]
- PALERMO MORENA [0123002886]
- SCARDINO GIOVANNI [0123002849]