



Gli enzimi

Catalizzatori biologici

Reazioni chimiche

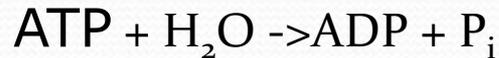
Una qualunque reazione chimica $A > B$ avviene spontaneamente se l'energia libera molare dei prodotti è minore di quella dei reagenti

$$G_B < G_A$$

Più in generale qualunque trasformazione avviene se e solo se:

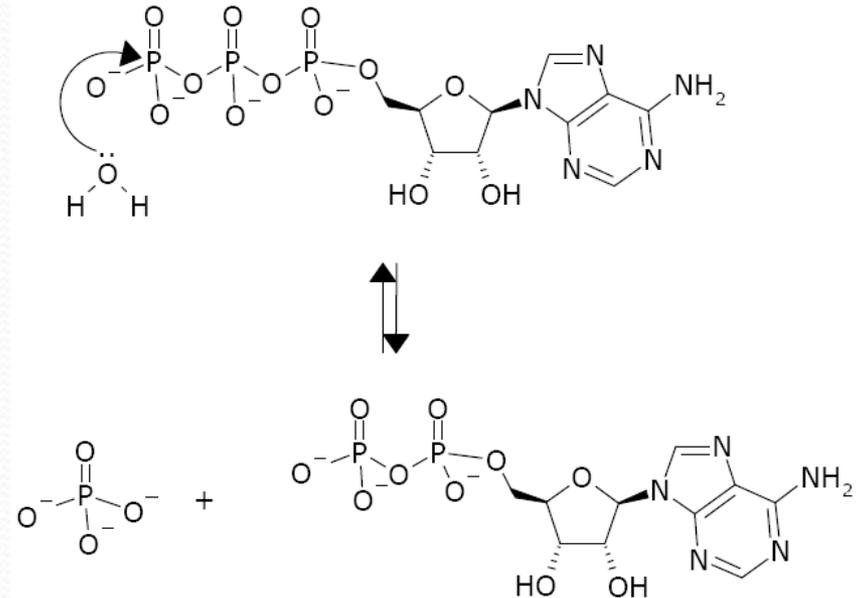
$$G_{\text{finale}} < G_{\text{iniziale}} \quad \text{ovvero} \quad \Delta G < 0$$

Anche se $\Delta G < 0$ la velocità della reazione dipende dall'energia di attivazione

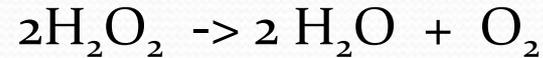


$$\Delta G^\circ \text{ a pH } 7 = -7.3 \text{ kcal mole}^{-1} \\ (-30.6 \text{ kJ mole}^{-1})$$

$$\Delta G^\circ \text{ a pH } 9 = -10 \text{ kcal mole}^{-1} \\ (-42 \text{ kJ mole}^{-1})$$



Il concetto di catalizzatore



Reazione lenta in assenza di catalizzatori

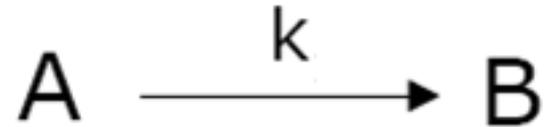
Se aggiungo ioni Fe^{+3} (FeCl_3) la reazione è 10^3 volte più veloce

Se aggiungo **emoglobina** la reazione è 10^6 volte più veloce
(il Fe^{+2} si ossida a Fe^{+3} e l'efficienza si perde)

Se aggiungo **catalasi** la reazione è 10^9 volte più veloce
(compito specifico di rimuovere l' H_2O_2 pericoloso per le cellule)

- Un vero catalizzatore non si altera durante la reazione (l'emoglobina non è un vero catalizzatore)
- Il catalizzatore varia la velocità della reazione ma non ne altera l'equilibrio (imposto dai parametri termodinamici)

Cinetica chimica

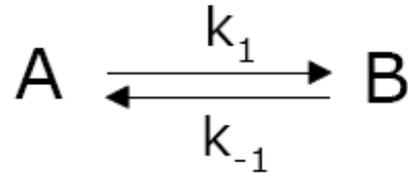


Velocità $v = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]$

$$\frac{d[A]}{[A]} = k dt \quad \int_{A_0}^{A_t} \frac{d[A]}{[A]} = \int_{t=0}^{t=t} k dt$$

$$\ln \frac{A_t}{A_0} = k t \quad A_t = A_0 e^{-k t}$$

Cinetica chimica



$$\text{Velocità diretta } v_1 = - \frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

$$\text{Velocità inversa } v_{-1} = - \frac{d[B]}{dt} = k_{-1}[B]$$

All'equilibrio

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

$\Delta G > 0$ equilibrio spostato a sinistra

$\Delta G < 0$ equilibrio spostato a destra

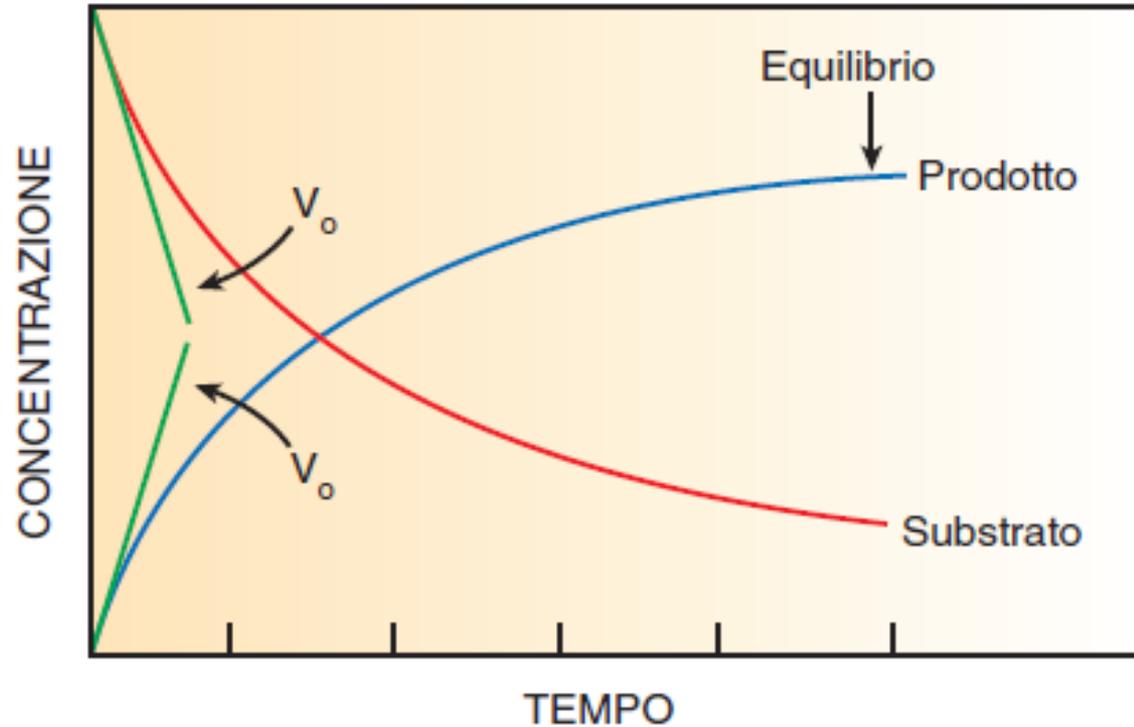
$\Delta G = 0$ equilibrio $K=1$

$$v_1 = v_{-1}$$

$$k_1[A]_{eq} = k_{-1}[B]_{eq}$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = K_{eq}$$

Cinetica chimica



Ordine di reazione

I ordine

$$v_1 = k_1[A]$$

II ordine

$$v_1 = k_1[A]^2$$

oppure

$$v_1 = k_1[A][B]$$

Ordine zero

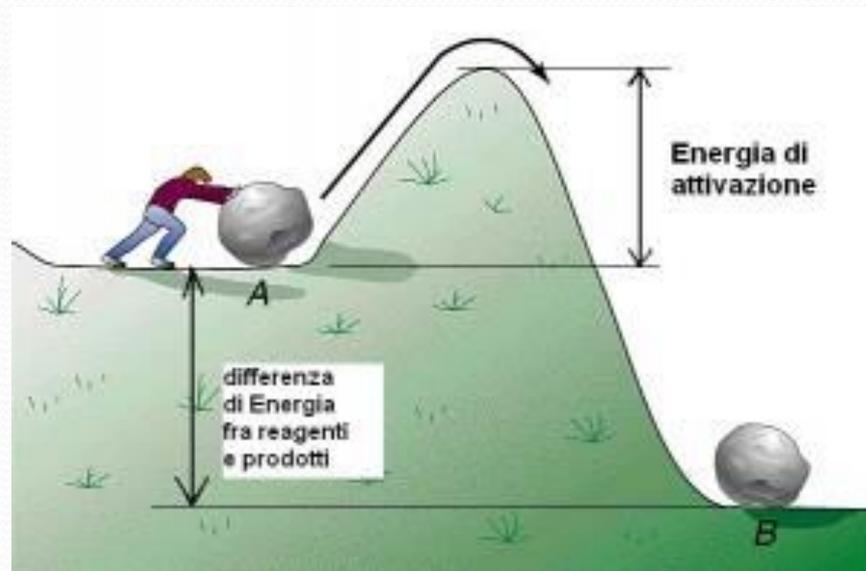
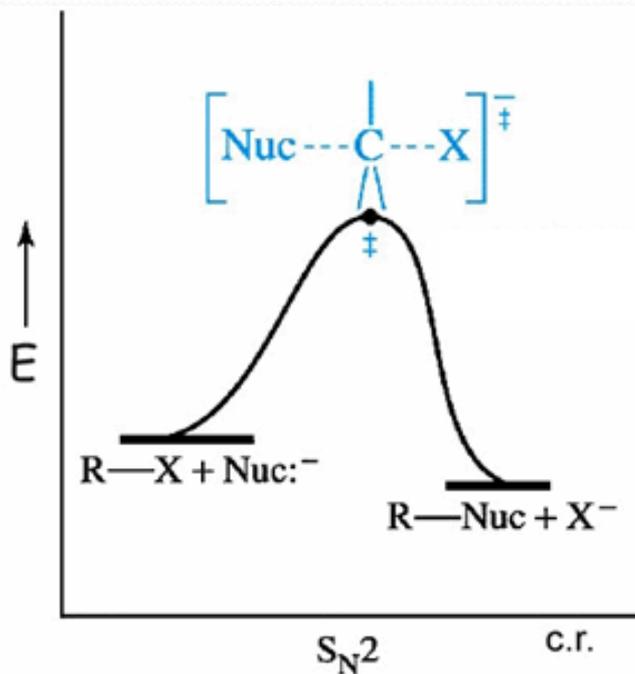
$$v_1 = k_1$$

Lo stato di transizione

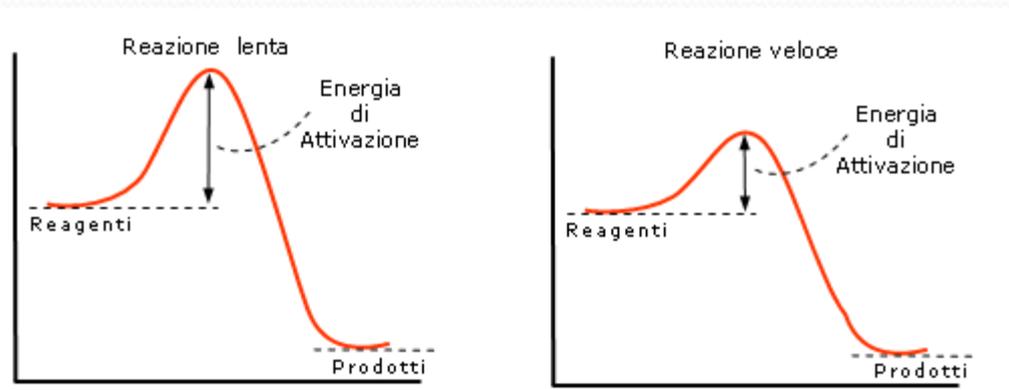
Barriera di energia libera per raggiungere lo stato attivato

Energia di attivazione

Stato di transizione



La velocità dipende dalla energia libera di attivazione ΔG^\ddagger



Lo stato di transizione

Equazione di Arrhenius

$$k = k_0 e^{-\frac{\Delta E^\ddagger}{RT}}$$

k	costante di velocità
ΔG^\ddagger	energia libera di Gibbs di attivazione
k_B	costante di Boltzmann
h	costante di Planck
ΔE^\ddagger	energia di attivazione

Equazione di Eyring

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

↑
Frequenza vibrazionale dei legami nello stato di transizione

$$\text{A } 37^\circ\text{C (310K)} = 6,4 \cdot 10^{12} \text{ sec}^{-1}$$

$$K_{\text{cat}} / K_{\text{non cat}} = 10^{13}$$

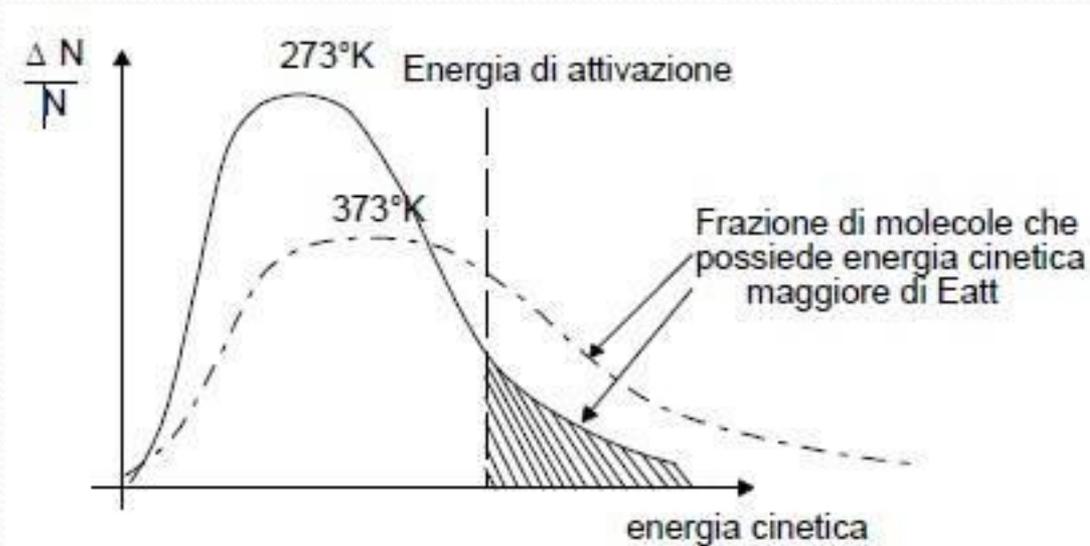
in presenza di catalizzatori enzimatici

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

$$k \cong (kT/h) \cdot \exp(-\Delta H^\ddagger/RT) \cdot \exp(\Delta S^\ddagger/R)$$

Per accelerare la reazione posso agire solo sui parametri termodinamici che concorrono a determinare il ΔG di attivazione
Entalpia, Entropia e Temperatura

Lo stato di transizione



Effetto della temperatura

L'energia cinetica associata alle singole molecole in una popolazione è in funzione della temperatura (distribuzione di Boltzman)

A^\ddagger frazione di molecole con energia sufficiente a superare la barriera energetica di attivazione

$$\frac{A^\ddagger}{A} = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

Aumentando la temperatura aumenta anche la frazione di molecole con energia sufficiente a superare la barriera di attivazione. La reazione procede con maggiore velocità.

Lo stato di transizione

Ridurre il ΔG di attivazione

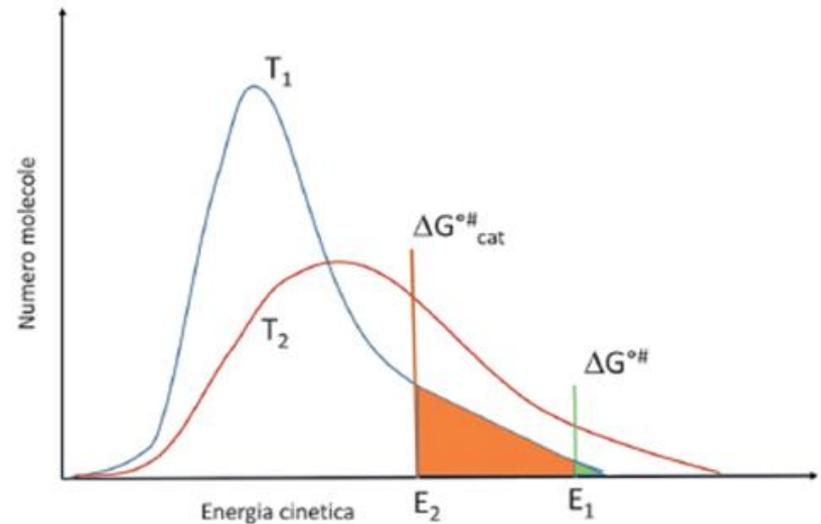
L'enzima riesce a ridurre il ΔG^\ddagger del processo stabilizzando lo stato di transizione e questo accelera la reazione.

Questo può essere fatto agendo su entrambi i contributi entalpici ed entropici

Ridurre il contributo entalpico

Entalpia di attivazione: cambi nelle energie di legame e interazioni deboli

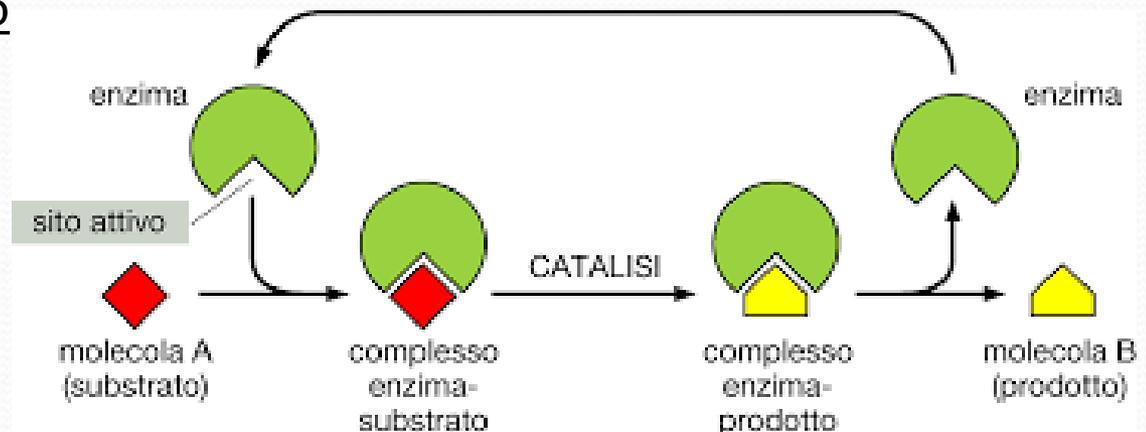
Forte legame tra l'enzima e lo stato di transizione ($\Delta H_{\text{cat}} < \Delta H_{\text{non cat}}$)



Aumentare contributo entropico

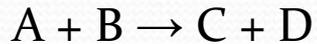
Entropia di attivazione: costi di orientamento dei reagenti (minor disordine), perdita di flessibilità conformazionale, effetti della concentrazione e solvente

Vicinanza e orientamento favoriscono la formazione dello stato di transizione ($\Delta S_{\text{cat}} > \Delta S_{\text{non cat}}$)



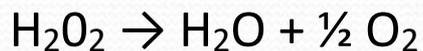
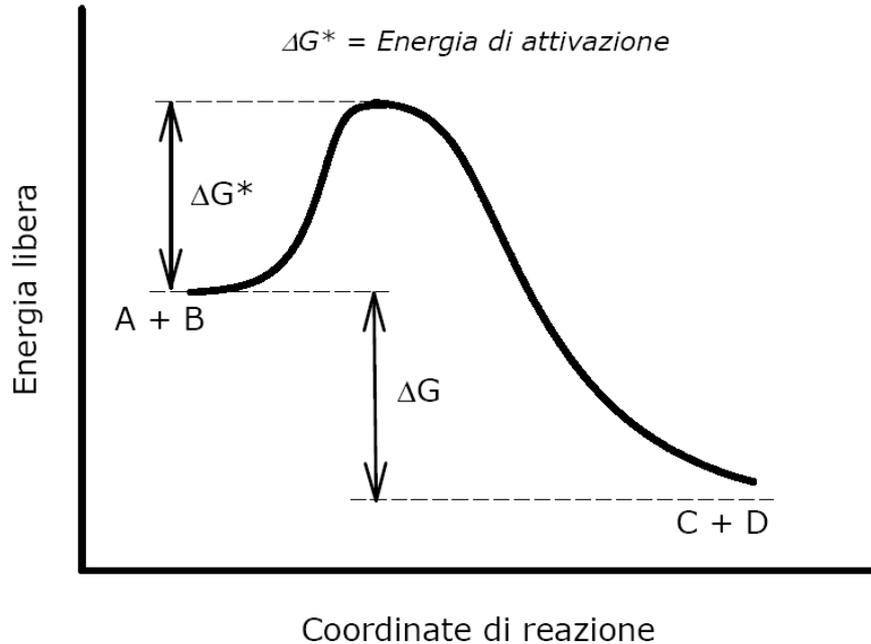
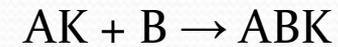
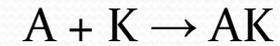
Energia di attivazione

In assenza di catalizzatore:

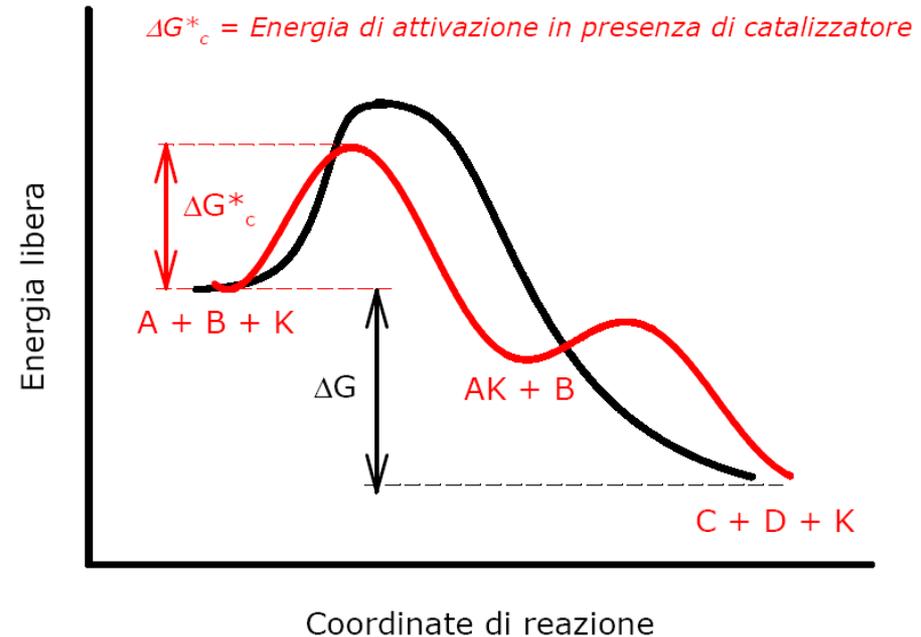


Il catalizzatore biologico abbassa l'energia di attivazione rendendo la reazione più veloce
L'equilibrio della reazione (basato sui parametri termodinamici) non viene alterato

In presenza di catalizzatore:



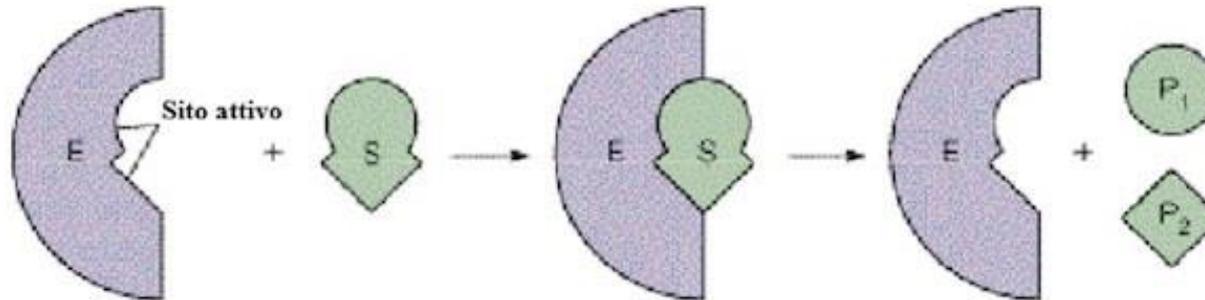
($\Delta H^* = \text{energia di attivazione}$)



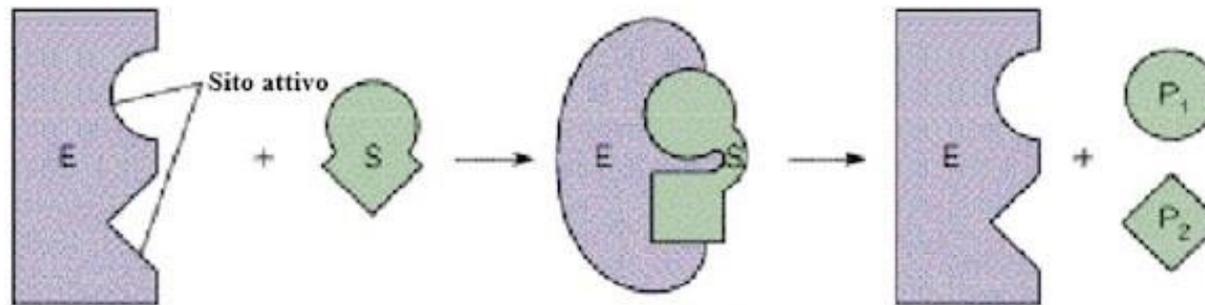
Catalizzatore :

- Nessuno $\Delta H^* = 18 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
- Platino $\Delta H^* = 11.7 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$
- Catalasi $\Delta H^* = 5.5 \text{ kcal}\cdot\text{mole}^{-1}$

Enzimi: catalizzatori biologici



(a) Modello chiave-serratura



(b) Modello dell'adattamento indotto

Conformazione dello stato di transizione

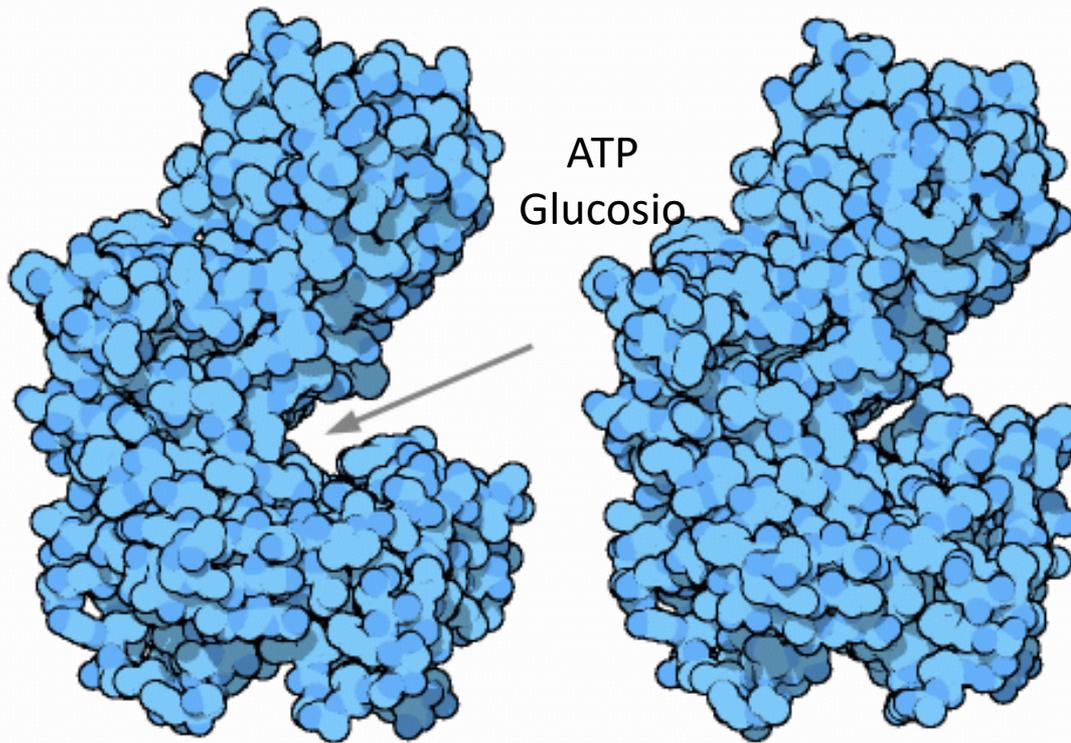
Modello chiave-serratura (più datato): il sito attivo si adatta al proprio substrato

Il substrato e l'enzima sono avvicinati e correttamente orientati per consentire la reazione

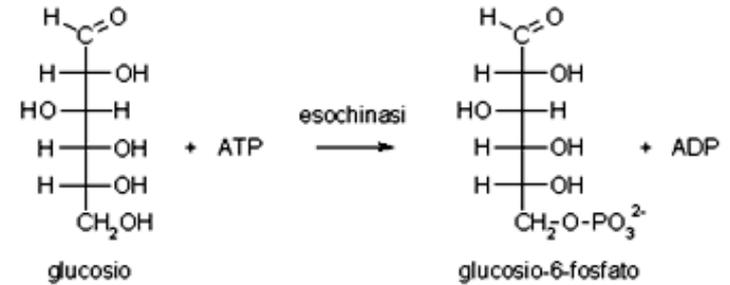
Modello adattamento indotto: sito attivo e substrato vengono distorti dopo l'interazione assumendo una conformazione più simile a quella dello stato di transizione

Adattamento indotto

ESOCINASI



Variazione conformazionale indotta da substrato



Nella forma senza substrato legato il sito attivo è aperto ed accessibile ad acqua e piccole molecole. Una volta legati ATP e glucosio il sito va incontro ad un cambiamento conformazionale chiudendosi attorno ad i substrati impedendo l'accesso all'acqua. Una volta effettuata la reazione il sito si riapre per rilasciare i prodotti

Enzimi: catalizzatori biologici

Reazione	Enzima	V_{enz} (sec^{-1})	V_{nonenz} (sec^{-1})	V_{enz}/V_{nonenz}
$R-O-PO_3^{2-} + H_2O \rightarrow R-OH + HPO_4^{2-}$	Fosfatasi alcalina	1×10^{-15}	14	1.4×10^{16}
$\begin{array}{c} O \\ \\ H_2N-C-NH_2 \end{array} + 2H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2$	Ureasi	3×10^{-10}	3×10^4	1×10^{14}
$Glicogeno + P_i \rightarrow glicogeno_{(n-1)} + glucosio-1-P$	Glicogeno-fosforilasi	$< 5 \times 10^{-15}$	1.6×10^{-3}	$> 3.2 \times 10^{11}$
$Glucosio + ATP \rightarrow glucosio-6-P + ADP$	Esochinasi	$< 1 \times 10^{-13}$	1.3×10^{-3}	$> 1.3 \times 10^{10}$
$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$	Anidrasi carbonica	10^{-2}	10^5	1×10^7
$\begin{array}{c} O \\ \\ CH_3-CH_2OH \end{array} + NAD \rightarrow \begin{array}{c} O \\ \\ CH_3-C-H \end{array} + NADH$	Alcooldeidrogenasi	$< 6 \times 10^{-2}$	2.7×10^{-5}	$> 4.5 \times 10^6$
$Creatina + ATP \rightarrow Creatina-P + ADP$	Creatina chinasi	$< 3 \times 10^{-9}$	4×10^{-5}	$> 1.33 \times 10^4$

Velocità di alcune reazioni biologicamente importanti in presenza o assenza di catalizzatore enzimatico

Vantaggi e svantaggi degli enzimi come biocatalizzatori nei confronti della catalisi chimica

Vantaggi

- Selettività
- Basse temperature richieste (0—110 °C)
- Basso consumo di energia
- Attivi nel range di pH 2—12
- Minore quantità di prodotti secondari (byproducts)

Blande condizioni di reazione

Gli enzimi reagiscono in condizioni blande (pH=5-8, T=20-40°C) evitando o minimizzando in questo modo le reazioni collaterali (racemizzazioni, isomerizzazioni, decomposizioni, riarrangiamenti ecc)

Compatibilità nelle reazioni

Gli enzimi sono compatibili tra loro e lavorando in condizioni simili possono essere usati in reazioni a cascata che evitano l'accumulo di prodotti intermedi instabili o permettono di spostare reazioni di equilibrio sfavorevoli

Condizioni di lavoro favorevoli

Possono avere elevate tolleranze verso il substrato e lavorare in solventi diversi dall'acqua.

Catalizzano ampie classi di reazioni

SELETTIVITA'

La selettività rappresenta uno dei vantaggi più importanti che un enzima possiede ed è fondamentale per la loro affermazione Industriale come biocatalizzatori.

Può essere divisa in tre categorie

Stereo-selettività

E' la capacità di un enzima di discriminare centri chirali eventualmente presenti nella struttura del proprio substrato portando alla selezione dei diversi isomeri ottici, o stereoisomeri. Molti composti utilizzati nelle biotrasformazioni sono presenti come miscele racemiche costituite dai due enantiomeri, molecole che sono l'una immagine speculare dell'altra. L'enzima agisce come un sistema asimmetrico tridimensionale in grado di interagire con un singolo stereoisomero e catalizzare la sua selettiva trasformazione.

Regio-selettività

E' l'abilità di un enzima di riconoscere e localizzare un particolare gruppo reattivo presente sulla molecola substrato. Ad esempio se una molecola possiede due gruppi carbossilici, uno in posizione α e l'altro in posizione β , l'enzima è in grado di reagire con uno lasciando inalterato l'altro.

Chemo-selettività

Consiste nella capacità di un enzima di agire direttamente e selettivamente su di un gruppo funzionale in presenza di altri gruppi con reattività uguale o maggiore.

SELETTIVITÀ

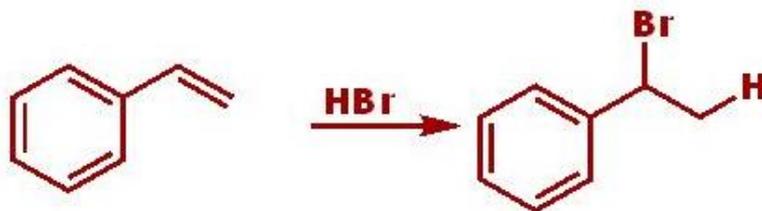
CHEMOSELETTIVITÀ

è *chemoselettiva* una reazione che modifica selettivamente un gruppo funzionale della molecola, lasciando inalterati gli altri gruppi presenti



REGIOSELETTIVITÀ

è *regioselettiva* una reazione che produce selettivamente uno solo dei possibili prodotti ottenibili dall'attacco di un reattivo in siti differenti



Stereospecificità

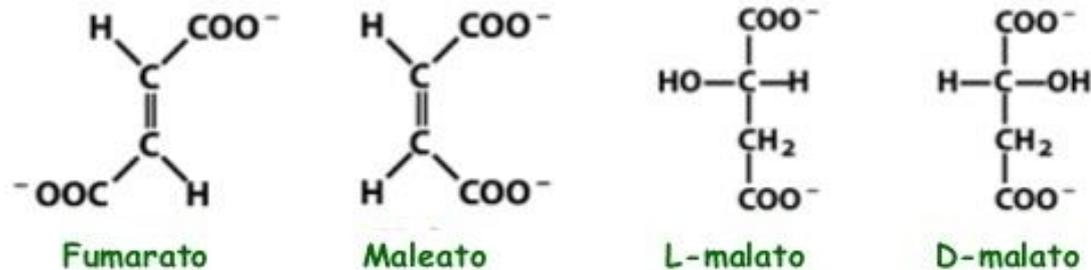
7 - Idratazione del fumarato a L-malato



$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$

La reazione è altamente stereospecifica.

La struttura del sito catalitico dell'enzima è tale da non poter utilizzare come substrato il maleato, isomero geometrico del fumarato, e da produrre esclusivamente come prodotto di idratazione il malato in configurazione L.



Vantaggi e svantaggi degli enzimi come biocatalizzatori nei confronti della catalisi chimica

Svantaggi:

- instabili ad alta temperatura
- instabili a valori di pH estremi
- soggetti ad inibizione da parte di sostanze chimiche o alcuni ioni metallici
- idrolizzati da proteasi

Condizioni di reazioni molto specifiche

Sebbene possano lavorare in condizioni blande gli enzimi richiedono parametri specifici (temperatura, pH ecc) che non possono essere troppo modificati per forzare la reazione

Massima attività in acqua

L'acqua spesso non è il miglior solvente per reazioni organiche (alta t_{eb} e bassa volatilità). Inoltre pochi solventi organici sono solubili con l'acqua. Anche se possono lavorare in solventi organici l'attività degli enzimi è molto ridotta (almeno un ordine di grandezza).

Richiesta di cofattori

Diversi gli enzimi richiedono cofattori naturali specifici.

Gli enzimi possono essere inattivati

Molte reazioni enzimatiche possono essere inibite sia dai reagenti che dai prodotti, il che comporta un forte calo di attività a concentrazioni elevate di substrato o prodotto. Sono inoltre sensibile a sostanze anche diverse da substrati e prodotti. Possono essere inattivati per rottura dei legami peptidici (idrolisi) o la modifica di alcune catene laterali.

Meccanismi coinvolti nel processo catalitico

1. Catalisi acido-basica
2. Catalisi covalente
3. Catalisi da ioni metallici
4. Catalisi elettrostatica
5. Effetti di prossimità e orientamento
6. Legame preferenziale dello stato di transizione

Meccanismi coinvolti nel processo catalitico

Prossimità e orientamento dei reagenti

Durante la reazione catalizzata dall'enzima i substrati vengono riuniti in stretta prossimità nel sito attivo.

Questo processo:

- aumenta la concentrazione locale di substrato rispetto alla soluzione
- riduce l'energia di desolvatazione richiesta per la reazione.

Il sito attivo è progettato per riorientare il substrato e ridurre l'energia di attivazione. il sito attivo può manipolare l'orbitale molecolare del substrato in un adeguato orientamento per ridurre l'energia di attivazione.

Ad esempio se lo stato di transizione comporta la formazione di un centro ionico nel substrato, la presenza di una catena laterale aminoacidica con carica opposta produrrà un'interazione favorevole.

Catalisi acido/base

H^+ e OH^- possono agire direttamente come catalizzatori (catalisi acido- e basico- specifica) ma più spesso sono i gruppi funzionali presenti nel substrato e nel sito attivo che agiscono come acido e base di Brønsted-Lowry (catalisi acido- e basico- generale). La maggior parte degli enzimi ha un pH ottimale tra 6 e 7 mentre i gruppi funzionali presenti nelle catene laterali degli amminoacidi hanno un pKa compreso tra 4 e 10. I residui aminoacidici più coinvolti sono: aspartato e glutammato ($-COOH/-COO^-$), lisina e arginina ($-NH_2/-NH_3^+$), istidina (imidazolo/base coniugata), cisteina ($-SH/-S^-$) e tirosina ($-ArOH/-ArO^-$). Questi acidi/basi possono stabilizzare il nucleofilo/elettrofilo formatosi durante la catalisi fornendo cariche positive e negative.

Sebbene l'istidina sia un aminoacido piuttosto raro, è abbastanza comune negli enzimi e molto spesso indispensabile per la loro attività catalitica. L'anello imidazolico dell'istidina ha un pKa di circa 6 e pertanto a valori di pH fisiologici può essere presente sia nella forma protonata (che agisce da acido) sia nella forma non protonata (che agisce da base).

Meccanismi coinvolti nel processo catalitico

Catalisi covalente

Molti enzimi (serin- e cistein-proteasi, protein- chinasi e fosfatasi si sono evoluti per formare legami covalenti transitori con i substrati per abbassare l'energia di attivazione.

Processo diviso in 2 fasi: formazione e rottura. La fase di formazione del legame è quella limitante mentre la seconda serve a rigenerare l'enzima intatto.

Catalisi nucleofila: donazione di elettroni da parte di un centro nucleofilo dell'enzima al substrato per formare un legame covalente. La forza di questa interazione dipende da due aspetti: capacità nucleofila del donare ed elettrofila dell'accettore. La capacità nucleofila è principalmente influenzata dalla basicità (la capacità di donare coppie di elettroni) della specie, mentre la quella elettrofila è collegata al pKa. Entrambi i gruppi sono anche influenzati dalle loro proprietà chimiche come polarizzabilità, elettronegatività e potenziale di ionizzazione. Amminoacidi con caratteristiche nucleofile: serina, cisteina, aspartato e glutammina.

Catalisi elettrofila: meccanismo del processo analogo a quello della catalisi nucleofila, con i residui amminoacidici nel sito attivo che agiscono da elettrofili mentre i substrati da nucleofili. Questa reazione di solito richiede cofattori poiché le catene laterali amminoacidiche non sono abbastanza forti per attrarre elettroni.

Meccanismi coinvolti nel processo catalitico

Catalisi da ioni metallici

In alcuni enzimi gli ioni metallici hanno più ruoli nella catalisi.

- Interagire con gruppi carichi negativamente del substrato in modo ridurre la repulsione elettrostatica con le coppie elettroniche dei gruppi nucleofili del sito attivo e favorire l'avvicinamento del substrato.
- attrarre elettroni per aumentare l'elettrofilicità.
- creare collegamenti tra il sito attivo e il substrato.
- cambiare la struttura conformazionale del substrato per favorire la reazione.

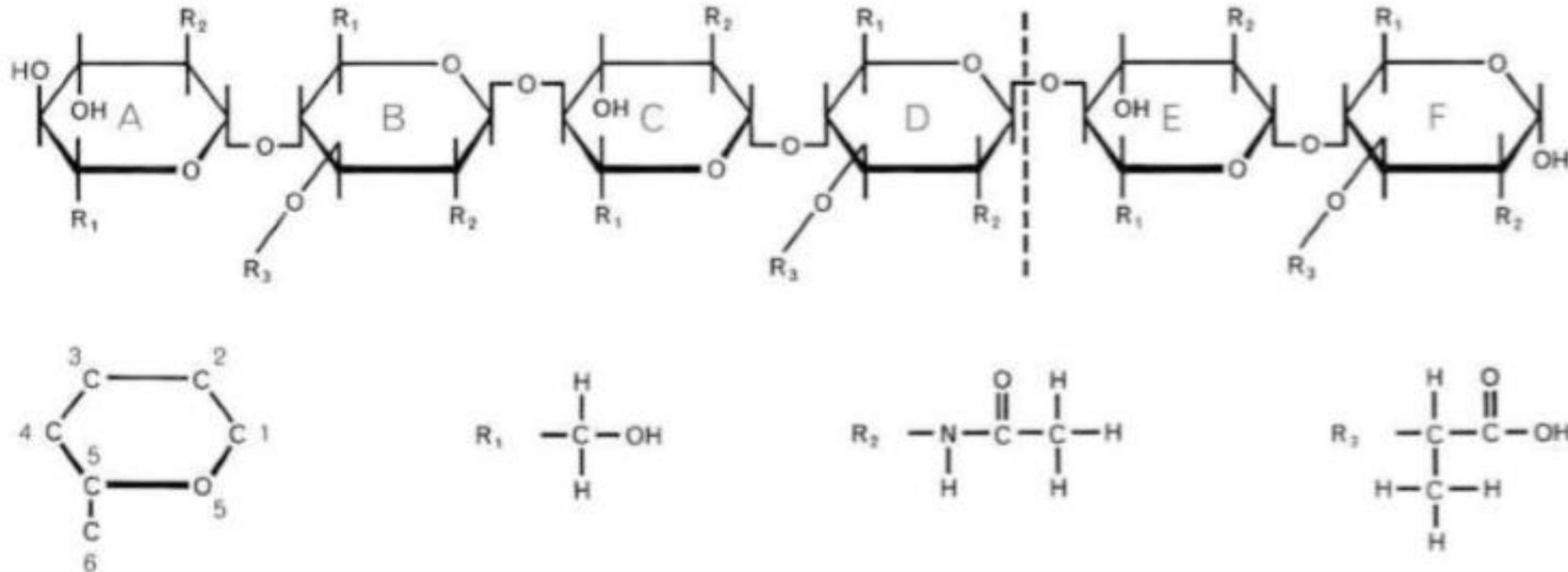
Distorsione conformazionale

L'accelerazione della velocità di reazione chimica spesso non può essere completamente spiegata con l'avvicinamento dei reagenti, la catalisi acido/base e quella elettrofila/nucleofila. Oltretutto nelle reazioni enzimatica reversibili se il sito attivo si adatta perfettamente ai substrati, la reazione inversa verrà rallentata poiché i prodotti non possono adattarsi perfettamente al sito attivo. Quindi è stato introdotto il meccanismo della distorsione conformazionale, che prevede che sia il sito attivo che il substrato possono subire modifiche conformazionali per adattarsi l'un l'altro continuamente.

Complementarietà del sito attivo con lo stato di transizione

Meccanismo simile al modello chiave-serratura dove però il sito attivo è preprogrammato per legarsi perfettamente al substrato nello stato di transizione piuttosto che nello stato fondamentale. La formazione dello stato di transizione in soluzione richiede una grande quantità di energia per ricollocare le molecole di solvente e la velocità di reazione è quindi rallentata. In questo modello il sito attivo può sostituire le molecole di solvente e circondare i substrati per minimizzare l'effetto controproducente imposto dalla soluzione. La presenza di gruppi carichi con il sito attivo attirerà i substrati e assicurerà la complementarità elettrostatica.

Meccanismo di azione

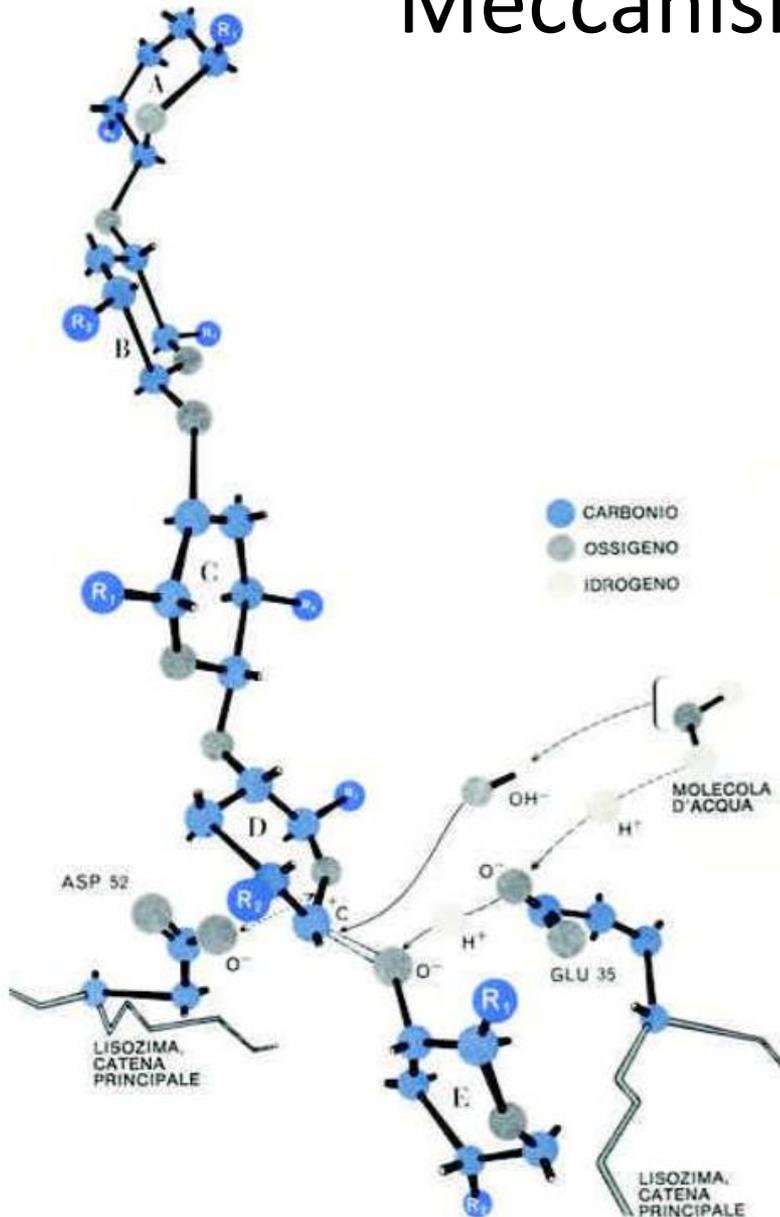


Peptidogligano:

copolimero alternato formato da N-acetilglucosammina (NAG) e da acido N-acetilmuramico (NAM), uniti da ponti glicosidici 1,4

Meccanismo di azione del lisozima

Meccanismo di azione



Meccanismo di azione del lisozima

Il lisozima idrolizza il legame che unisce il carbonio 1 del NAM con l'ossigeno glicosidico, unito a sua volta al carbonio 4 del NAG.

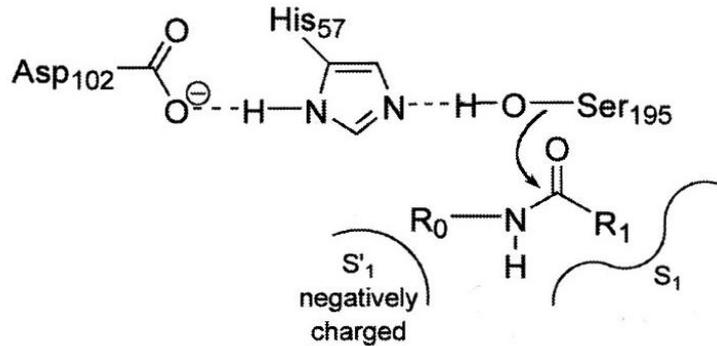
Il substrato è trattenuto da una complessa rete di legami a idrogeno e di interazioni non polari.

I gruppi COOH dell'acido glutammico 35 (GLU35) e dell'acido aspartico 52 (ASP 52) agiscono in modo concertato, rispettivamente come donatore ed accettore di protoni.

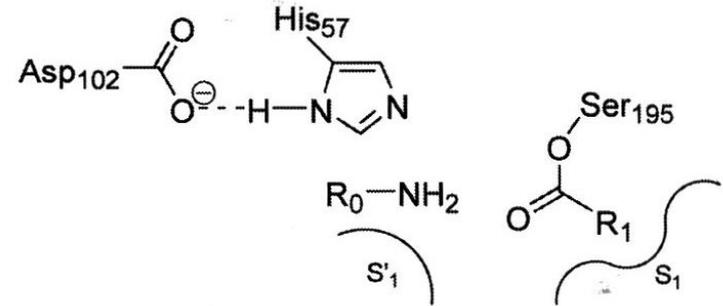
GLU 35 trasferisce uno ione idrogeno sull'ossigeno glicosidico favorendo la rottura del legame etero C-O, mentre il gruppo carbossilato di ASP 52 contribuisce a stabilizzare il carbocatione intermedio, finchè questo non viene attaccato dall'acqua.

Il diverso comportamento di due gruppi funzionali identici è dovuto all'ambiente circostante: ASP 52 è in un ambiente polare e stabilisce legami a idrogeno con ASN 46 e ASN 59 (ASN = asparagina). Ciò gli consente di restare carico negativamente anche in soluzione decisamente acida. GLU 35, invece, è circondato da gruppi non polari e probabilmente trattiene molto di più il suo idrogeno.

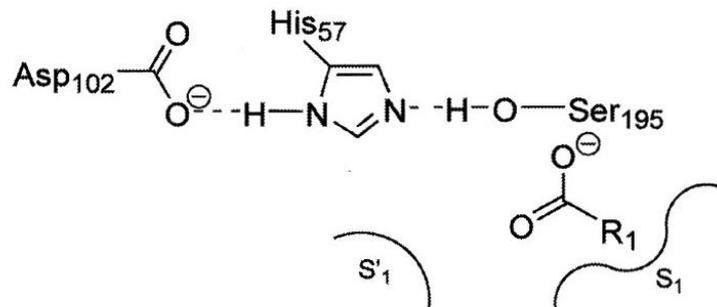
Meccanismo di azione



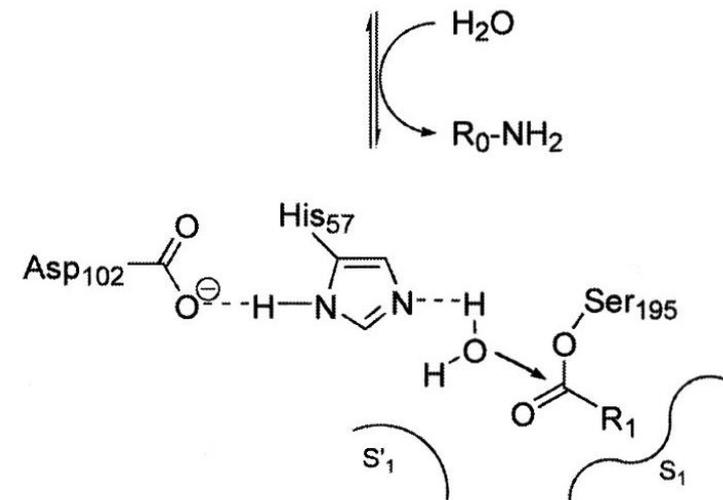
1. Substrate binding and proton transfer in the catalytic triad (Asp-His-Ser)



2. Acylation of Ser in the catalytic site



4. Enzyme-product complex



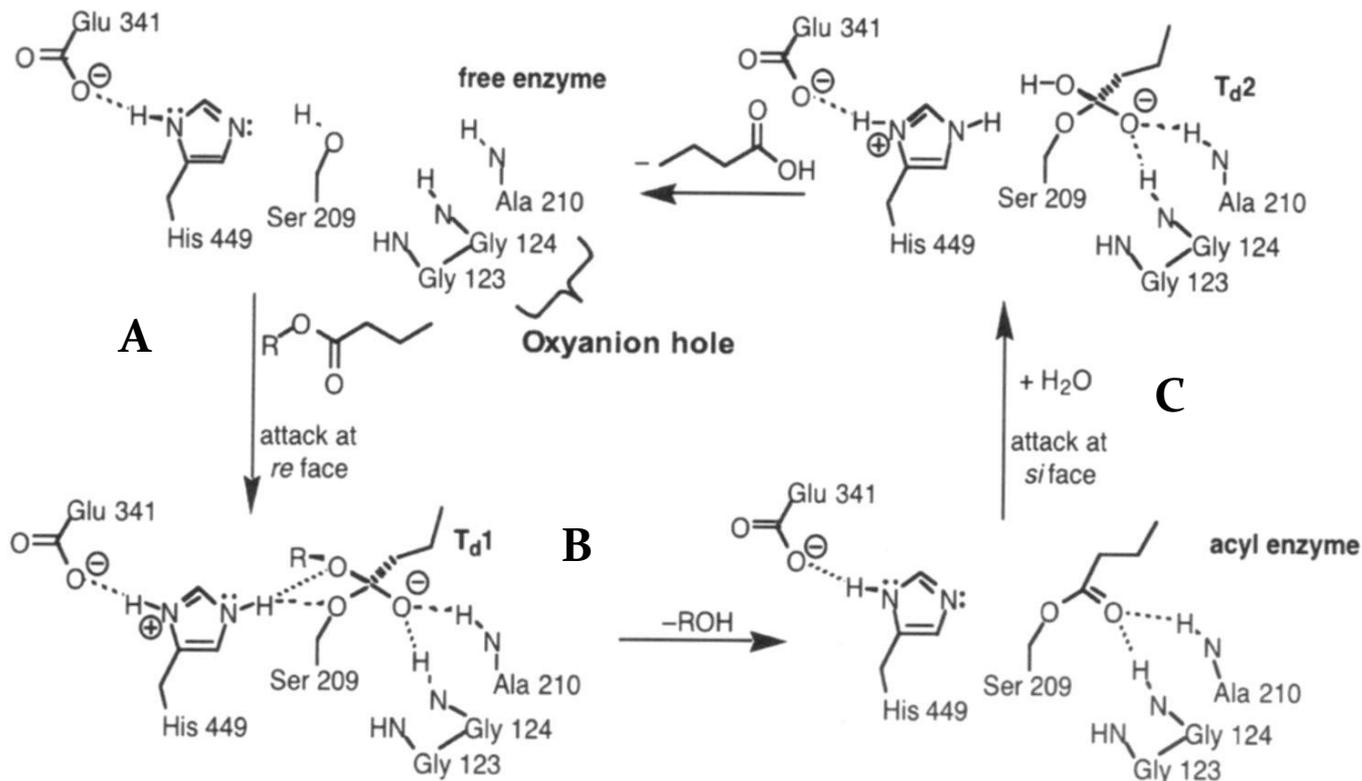
3. Deacylation of the acyl enzyme by H₂O

Meccanismo di azione di una serin-proteasi

Meccanismo di azione

Meccanismo di azione delle lipasi – idrolisi di un estere

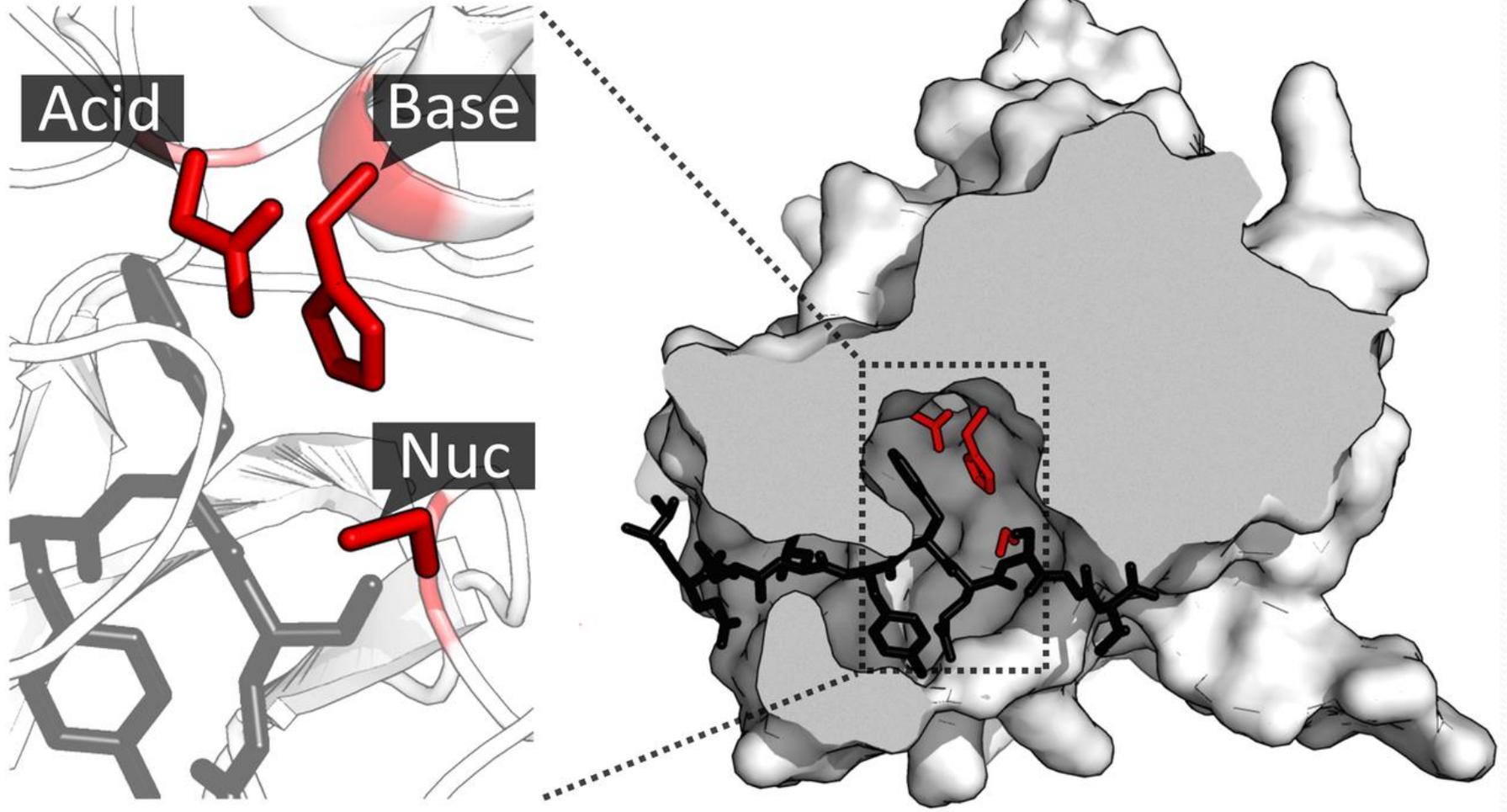
A: Le caratteristiche nucleofile del residuo di Ser sono rafforzate dal trasferimento di un protone all'His del sito catalitico, con la formazione di un ossianione che attacca il gruppo carbonilico del legame estereo da idrolizzare. Si forma un intermedio tetraedrico con una carica negativa sull'atomo di ossigeno carbonilico del legame estereo, che è stabilizzata attraverso legami idrogeno con i gruppi NH (di Gly124 e Ala210 della catena principale dell'enzima).



C: La deacilazione dell'enzima avviene ad opera di una molecola d'acqua che idrolizza l'intermedio covalente

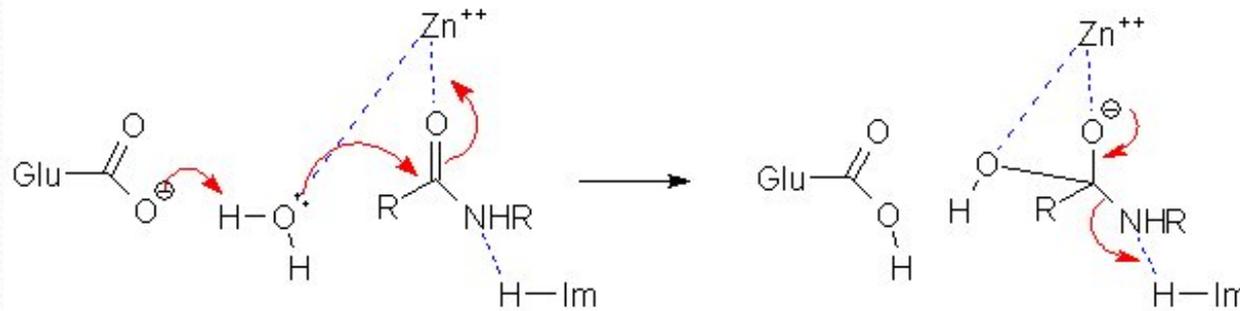
B: Il protone dell'His viene poi trasferito all'ossigeno del legame estere che viene tagliato e si forma un acil-enzima intermedio (residuo di Ser dell'enzima esterificato con l'acido grasso del substrato).

By Thomas Shafee - Thomas, Shafee, (2014). "Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity". PhD Thesis. University of Cambridge., CC BY 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=28958186>



La proteasi TEV una cistein proteasi (triade catalitica: aspartato, istidina, cisteina)

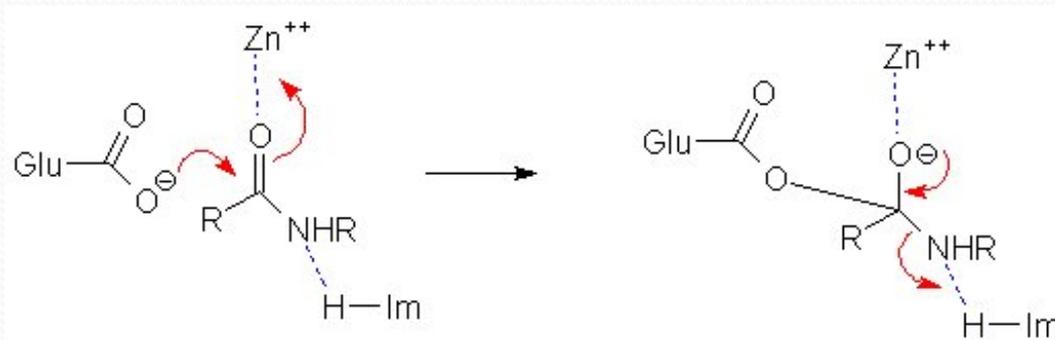
Meccanismo di azione



His231 nella
termolisina

Nessun intermedio covalente

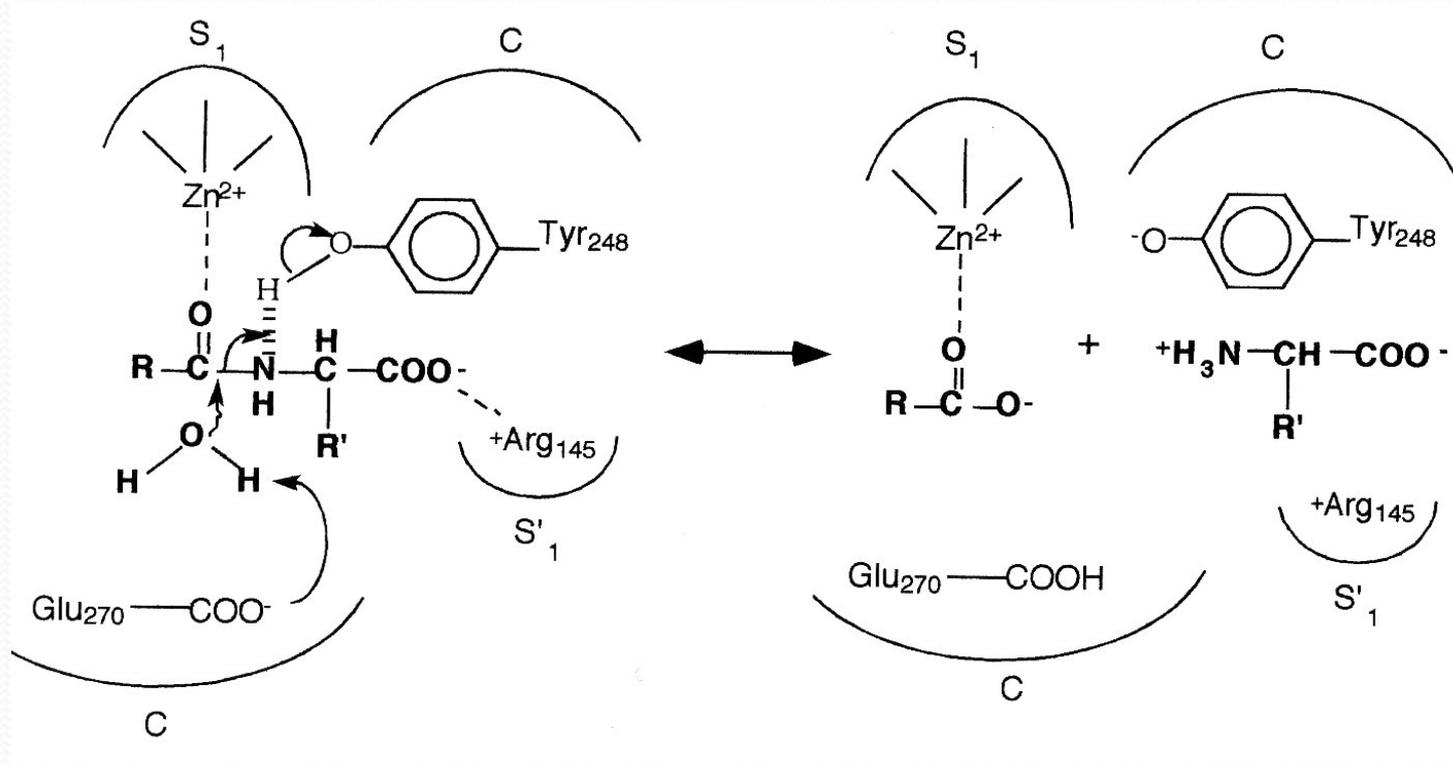
Tyr248 nella
carbossipeptidasi



Intermedio covalente acil-enzima

Meccanismi di azione per la catalisi operata dalle zinco-proteasi

Meccanismo di azione



Meccanismo di azione della carbossipeptidasi

Classificazione degli enzimi

Gli enzimi vengono classificati in base alla reazione che catalizzano:

EC X.Y.Z.T

- X = classe
- Y = sottoclasse
- Z = sotto-sottoclasse
- T = numero dell'enzima nella sotto-sottoclasse

Classi enzimatiche:

1. Ossidoreduttasi

- Catalizzano una reazione redox.

2. Transferasi

- Catalizzano il trasferimento di un gruppo da una molecola ad un'altra:



3. Idrolasi

- Catalizzano la scissione idrolitica di legami C=O, C-N, C-C, P-O-P,...

4. Liasi

- Catalizzano scissioni di legami con meccanismi diversi dalle Ossidoreduttasi e dalle Idrolasi.

5. Isomerasi

- Catalizzano modificazioni geometriche.

6. Ligasi (Sintetasi)

- Catalizzano l'unione di due molecole accoppiata al consumo di ATP o di un altro nucleotide trifosfato.

Classificazione degli enzimi

Numero E.C.	Nome sistematico, classi (in corsivo) e sottoclassi	Numero E.C.	Nome sistematico, classi (in corsivo) e sottoclassi
1. 1.1. 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. 1.2. 1.2.1. 1.2.2. 1.3. 1.3.1. 1.3.2.	Ossidoreduttasi (reazioni di ossido-riduzione) Azione su gruppi donatori =CH-OH con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore con FAD o FMN come accettore con O ₂ come accettore Azione su gruppi donatori =C=O con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore con O ₂ come accettore Azione su gruppi -CH=CH- come donatori con NAD ⁺ o NADP ⁺ come accettore con FAD o FMN come accettore	4. 4.1. 4.1.1. 4.1.2. 4.2. 4.2.1. 4.3. 4.3.1.	Liasi (azione anche reversibile su doppi legami) Liasi su gruppi =C=C= Carbossiliasi Aldeideliasi Liasi su gruppi =C=O Con aggiunta o rimozione di H ₂ O Liasi su gruppi =C=N-
2. 2.1. 2.1.1. 2.1.2. 2.1.3. 2.2. 2.3. 2.4. 2.6. 2.6.1. 2.7. 2.7.1.	Transferasi (reazioni di trasferimento di gruppi funzionali) Trasferimento di gruppi C1 metiltransferasi idrossimetiltransferasi e formiltransferasi carbossiltransferasi e carbamiltransferasi Trasferimento di gruppi aldeidici e chetonici Aciltransferasi Glicosiltransferasi Trasferimento di gruppi contenenti azoto Amminotransferasi Trasferimento di gruppi contenenti fosforo con un gruppo alcolico come accettore	5. 5.1. 5.1.3. 5.2.	Isomerasi (reazioni di isomerizzazione) Racemasi e epimerasi Attive su carboidrati Isomerasi cis-trans
3. 3.1. 3.1.1. 3.1.3. 3.1.4.	Idrolasi (reazioni di idrolisi) Rottura di legami esterei Idrolasi degli esteri carbossilici Idrolasi dei monoesteri fosforici Idrolasi dei diesteri fosforici	6. 6.1. 6.1.1. 6.2. 6.3. 6.4. 6.4.1.	Ligasi (formazione di legami con contemporaneo intervento e rottura di ATP) Formazione di Legami C-O Ligasi amminoacil-mRNA Formazione di legami C-S Formazione di legami C-N Formazione di legami C-C Carbossilasi