

# Le lipasi: catalizzatori regioselettivi nella sintesi dei carboidrati

di Luigi Lay e Laura Poletti

Le lipasi sono enzimi idrolitici ampiamente diffusi in natura. Usati in solvente organico, sono in grado di catalizzare acilazioni altamente regioselettive su un'ampia gamma di substrati.

Questa caratteristica, unita al loro basso impatto ambientale e alla semplicità operativa del loro utilizzo, li rende dei biocatalizzatori particolarmente utili nella sintesi organica, in particolare nella preparazione di oligosaccaridi complessi.

Uno dei principali problemi che il chimico organico deve affrontare nella preparazione di molecole complesse è quello dell'introduzione o rimozione dei gruppi protettivi. Infatti la presenza, nella stessa molecola, di gruppi funzionali con reattività simile limita necessariamente la varietà di trasformazioni effettuabili, e rende necessarie reazioni di protezione o deprotezione il più selettive possibili. Questo problema è particolarmente pressante nella sintesi di oligosaccaridi complessi, che necessariamente implica la manipolazione selettiva di un elevato numero di ossidrilici. D'altra parte l'ampia disponibilità di mono- e disaccaridi come sottoprodotti dell'industria agro-alimentare, unita al loro basso costo, incoraggia al loro utilizzo come prodotti di partenza per la sintesi, rendendoli una sorgente primaria di energia rinnovabile. A supporto di ciò, basti pensare che, nel solo 1999, la produzione europea di lattosio raggiunse le 350 mila tonnellate [1].

Nonostante la disponibilità di numerosi metodi chimici di protezione selettiva, alcuni problemi nella sintesi di molecole polifunzionali restano ancora irrisolti [2]. In questo contesto risulta particolarmente conveniente l'utilizzo dei biocatalizzatori come valida alternativa ai metodi chimici convenzionali [3].

Tradizionalmente si è sempre considerato l'uso degli enzimi limitato alle reazioni in ambiente acquoso, in cui però pochi substrati organici sono solubili. Questo era dovuto alla convinzione che gli enzimi in solvente organico siano soggetti a

L. Lay, L. Poletti, Dipartimento di Chimica organica e industriale - Università di Milano - Via Venezian, 21 - 20133 Milano.  
luigi.lay@unimi.it, lpoletti@mailserver.unimi.it

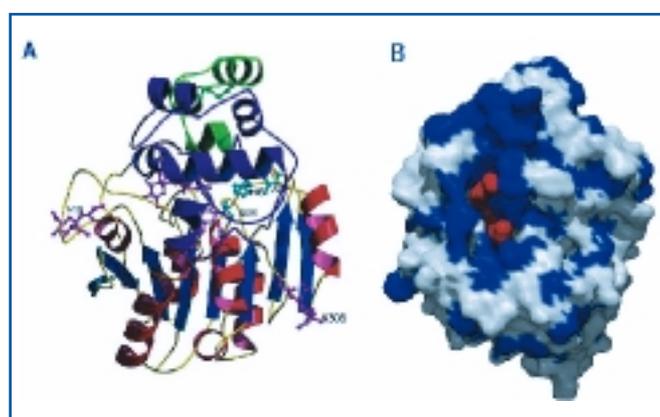


Figura 1 - Lipasi gastrica umana: a) la triade catalitica (Ser153, His 353, Asp 324) è evidenziata al centro; b) rappresentazione della superficie molecolare: il sito attivo è riprodotto in rosso, mentre i residui idrofobici sono in blu

facile denaturazione [4]. In realtà, ciò è vero solo quando questo è miscelato ad una certa parte di acqua, che agisce da "lubrificante molecolare" [5]; quando invece l'enzima è sospeso in un solvente organico puro e in assenza di acqua [6], esso assume una conformazione molto rigida. Di conseguenza, sebbene permanga la sua elevata tendenza a perdere il *fold*ing, la mancanza di flessibilità lo rende molto meno soggetto a denaturazione, e quindi più stabile. Per questo molti enzimi allo stato cristallino, una volta posti in solvente organico, mantengono integra la loro struttura originale esibendo una selettività che non solo eguaglia quella naturale, ma in alcuni casi la supera, quando non si rivela addirittura diversa e complementare. Condurre una reazione enzimatica in solvente organico quindi non solo si è rivelato vantaggioso per la solubilità dei substrati, ma ha anche apportato un notevole beneficio all'efficienza stessa delle reazioni. Ha inoltre comportato altri vantaggi [7]:

- la possibilità, per esempio per gli enzimi idrolitici, di effettuare la reazione enzimatica inversa (transesterificazione al posto dell'idrolisi di un estere);
- la maggior stabilità termica degli enzimi, che permette reazioni a temperature elevate (fino a 100 °C). In alcuni casi, questo ha migliorato la resa delle reazioni [8];
- la possibilità di sfruttare la "memoria del pH" degli enzimi: poiché la loro attività catalitica riflette il pH dell'ultima soluzione acquosa alla quale sono stati esposti, è possibile in-



Figura 2 - Rappresentazione schematica dell'imprinting indotto da un legante nel sito attivo dell'enzima. L'enzima è raffigurato con un cerchio con una spaccatura triangolare, che rappresenta il sito attivo

crementarne l'attività liofilizzandoli da soluzioni acquose a pH ottimale per la catalisi, oppure ottimizzare lo stato di ionizzazione nel solvente mediante l'aggiunta di un tampone appropriato;

- gli enzimi sono dotati anche di una "memoria molecolare", cioè una volta sospesi nel mezzo organico sono in grado di mantenere la conformazione assunta durante la liofilizzazione. Liofilizzandoli in presenza di un opportuno legante, è possibile aumentarne l'attività fino a 100 volte. Naturalmente questo effetto scompare se viene aggiunta acqua al mezzo di reazione (Figura 2);
- la possibilità di modulare la loro selettività cambiando il solvente. Questa "medium engineering" (termine coniato da Klibanov) [9] offre una valida e veloce alternativa alla classica "protein engineering".

Tutti questi vantaggi hanno reso la biocatalisi un oggetto di grande interesse sia in campo accademico sia industriale, come dimostra l'ingente numero di enzimi il cui utilizzo è descritto nella letteratura degli ultimi anni [10].

**Tabella 1 - Alcune delle lipasi commercialmente disponibili per uso sintetico**

Origine	Codice
<b>Di origine animale</b>	
porcine pancreatic lipase	PPL
guinea pig pancreatic lipase	GPL-RP2
<b>Di origine fungina</b>	
<i>Candida rugosa</i> (cylindracea)	CRL
<i>Candida antarctica</i>	CAL
<i>Candida cylindracea</i>	CCL
<i>Humicola lanuginosa</i>	HLL
<i>Rhizopus japonicus</i>	RJL
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML
<b>Di origine batterica</b>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipasi P/ PSL
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PFL

### Le lipasi come biocatalizzatori nella sintesi organica

Le lipasi sono tra gli enzimi più studiati in campo sintetico, in quanto permettono di discriminare gruppi funzionali simili nella stessa molecola. Questi enzimi idrolitici sono infatti in grado di legare o rimuovere un gruppo acilico (generalmente di un acido grasso) da un gruppo ossidri-

co, distinguendo tra i diversi ossidrilici di un poliolo.

Sono enzimi ampiamente diffusi in natura [11], molti dei quali già commercialmente disponibili: la Tabella 1 ne riporta alcuni esempi. I numerosi vantaggi nel loro utilizzo li rendono particolarmente versatili [12]:

- possono accettare un'ampia gamma di strutture sintetiche, pur mantenendo la regio- o l'enantioselettività;
- sono particolarmente stabili in solvente organico;
- l'energia libera degli acidi grassi è vicina a 0 kJ mol<sup>-1</sup>. Di conseguenza, modificando le condizioni di reazione è possibile spostare l'equilibrio a favore dei reagenti o dei prodotti;
- la bassa specificità nei confronti del substrato rende l'acililipasi, che si forma nel primo passaggio della reazione, un agente acilante generico, in grado di agire non solo su ossidrilici, ma anche su idroperossidi, ammine o tioli.

Per contro, le lipasi presentano anche lo svantaggio di una selettività piuttosto ristretta riguardo al gruppo acilico: la maggior parte infatti accetta unità alifatiche lineari più volentieri di gruppi aromatici o stericamente ingombrati.

### L'uso delle lipasi nella chimica dei carboidrati

L'efficacia delle lipasi nella chimica organica risalta particolarmente nella loro applicazione alla sintesi dei carboidrati. Questi, con i loro numerosi stereocentri, costituiscono un'economica fonte di intermedi chirali [13], oltre ad essere costituenti di membrane cellulari e rivestire un ruolo preminente in molti processi di riconoscimento e di modulazione di funzioni biologiche [14].

Hay fu il primo, nel 1969, ad applicare l'uso di questi enzimi idrolitici alla chimica dei carboidrati [15]. I primi lavori sistematici apparvero però nella seconda metà degli anni Ottanta, quando Klibanov [16a] e Wong [16b,c] descrissero la deacetilazione di esopiranosidi ed esopiranosidi ad opera di diverse lipasi. Da allora sono stati effettuati numerosissimi studi in questo campo e l'abbondante letteratura corrispondente è stata ampiamente esaminata [17].

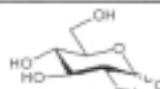
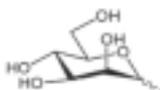
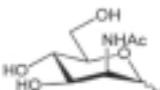
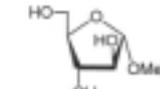
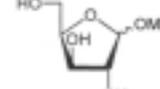
### Acilazione di monosaccaridi catalizzata dalle lipasi

Klibanov fu il primo a dimostrare l'attività acilante delle lipasi in solvente organico [18]. In questo mezzo di reazione "innaturale" le lipasi invertono la loro attività idrolitica, catalizzando reazioni di esterificazione o transesterificazione in presenza di agenti acilanti, secondo le equazioni 1 e 2. Per portare la reazione a completezza generalmente si può rimuovere l'acqua dal mezzo di reazione o usare un largo eccesso di agente acilante (per esempio è possibile utilizzare l'acetato di etile sia come agente acilante sia come solvente). Alternativamente, risulta molto efficiente l'uso di un buon gruppo uscente come R' nell'equazione 2, o l'impiego di reagenti di transesterificazione che si modifichino irreversibilmente nel corso della reazione, come il vinil acetato o esteri di ossime.

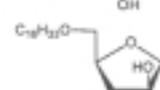
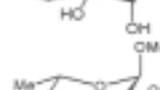


In generale, quando usate su zuccheri deprotetti, le lipasi acilano la posizione primaria; quando questa è già protetta o assente, la reattività cambia a seconda dell'enzima, del substrato

**Tabella 2 - Acilazioni sull'ossidrilico primario catalizzate da lipasi**

Struttura	Enzima	Solvente	Agente acilante	Posiz.	Resa (%)	Rif.
	PPL	Piridina	RCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	6	19-35	19
	CAL	Diossano	ROCO <sub>2</sub> N=CMe <sub>2</sub>	6	15-72	20
	PPL	Piridina	AcOCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	6	57	19
	PSL	Piridina	RCO <sub>2</sub> N=CMe <sub>2</sub>	6	70-85	21
	CAL	Diossano	ROCO <sub>2</sub> N=CMe <sub>2</sub>	6	43-68	20
	PPL	Piridina	AcOCH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	6	36	19
	PSL	Piridina	RCO <sub>2</sub> N=CMe <sub>2</sub>	6	65-80	21
	CAL	Diossano	ROCO <sub>2</sub> N=CMe <sub>2</sub>	6	44-53	20
	CCL	Benzene/ Py (2:1)	AcOC(Me)=CH <sub>2</sub>	6	n.d.	22
	PPL	THF	AcOCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	5	77	16c
	PPL	THF	AcOCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	5	84	16c

**Tabella 3 - Acetilazione su ossidrilici secondari condotta da lipasi. Agente acilante: tricloroetil propionato**

Struttura	R	Enzima	Solvente	Posiz.	Resa (%)	Rif.
	Butiril	CVL	THF	3	80	25
	Butiril	PPL	THF	2	52	25
	Trisil	CVL	THF	3	88	25
	t-Butyl Ph <sub>2</sub> Si	CVL	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2	45	25
		HLL	Benzene	2	66	26
		RJL	Benzene	3	79	26
		PFL	THF	2	40	27
		PPL	THF	4	70	27
		PFL	THF	4	60	27
		PFL	THF:Py 4:1	4	44	27

to o del solvente. Il principale svantaggio nell'uso delle lipasi su zuccheri totalmente deprotetti è la scarsa solubilità dei substrati in mezzo organico, ad eccezione di solventi altamente polari come la DMF, nei quali però questi enzimi non mostrano alcuna attività. Si può ovviare a questo problema usando miscele di solventi o utilizzando la piridina o il diossano, nei quali gli zuccheri sono solubili e l'enzima è attivo. In Tabella 2 sono riportati alcuni esempi.

Se i substrati sono zuccheri parzialmente funzionalizzati, co-

me alchil glicosidi (Tabella 3) o 1,6-anidrozuccheri, è comunque possibile condurre la reazione in solventi meno polari, quali il THF. L'uso di 1,6-anidrozuccheri ha anche permesso lo studio della selettività dell'enzima sui diversi ossidrilici secondari [23]. Per ovviare ai problemi di solubilità alcuni autori hanno anche applicato l'uso di alcune proteasi, attive in DMF, su substrati carboidratici [24].

Come è stato già accennato, la funzionalizzazione selettiva degli ossidrilici secondari dipende da diversi fattori. Klibanov, studiando l'acilazione di monosaccaridi protetti in posizione primaria, ha rilevato come, a seconda della lipasi usata, l'acilazione avvenga al C2 o al C3 [25]. Anche Nicotra *et al.* [26], esaminando l'attività acilante di più di venti lipasi diverse sull'1,4-anidro-5-O-esadecil-D-arabinitolo, hanno evidenziato come quattro di queste agiscono preferenzialmente sulla posizione 2, mentre una sola agisce sulla posizione 3. Ciuffreda *et al.* [27] hanno invece riportato come, su altri substrati, la posizione di attacco preferenziale sia la 4. Questi studi, riassunti nella Tabella 3, evidenziano come la conformazione relativa degli ossidrilici del substrato incida sulla selettività dell'enzima. Ulteriori prove di selettività, in dipendenza dalla configurazione anomeric, sono state effettuate da due gruppi di ricerca su monosaccaridi protetti come 4,6-O-benzilidene (Figura 3). In particolare, Panza *et al.* hanno esteso la potenzialità di questa selezione applicandola ad agenti acilanti sinteticamente utili diversi dall'acetile [31].

Infine, in alcuni casi si può valutare l'influenza del solvente come mezzo per modulare la selettività dell'enzima. Citiamo come esempio alcune prove di selettività effettuate con Lipasi P su un ottile xilopiranoside: mentre l'esano indirizza l'introduzione dell'acile prevalentemente al C-2, l'acetonitrile porta al prodotto 4-acilato, sebbene con minor efficienza [32].

#### Acilazione di disaccaridi: protezioni ortogonali mediate da lipasi

Mentre l'acilazione su monosaccaridi ad opera delle lipasi è stata ampiamente studiata negli ultimi 15 anni, sul loro utilizzo con di- e trisaccaridi naturali sono stati riportati in letteratura solo pochi esempi, sebbene questi zuccheri a basso costo costituiscano dei *building blocks* fondamentali per la costruzione di zuccheri più complessi. In studi pionieristici Riva *et al.* effettuarono l'acilazione di saccarosio, maltosio, cellobiosio e lattosio in DMF ad opera della subtilisina [33]. Il primo studio siste-

matico con le lipasi fu però riportato qualche anno più tardi da Lay *et al.* [34], i quali esaminarono la reattività della CAL (Lipasi da *Candida antarctica*) e della Lipasi P su differenti dodecil disaccaridi (Figura 4). Entrambi gli enzimi mostrarono un attacco preferenziale alla posizione 6', con l'interessante eccezione che la Lipasi P mostrò attività anche sulla posizione 2' del β-lattoside 1. A partire da questo risultato, furono studiate le reazioni anche con altri agenti acilanti sinteticamente utili. Un esempio importante è la sintesi del composto 4, pre-

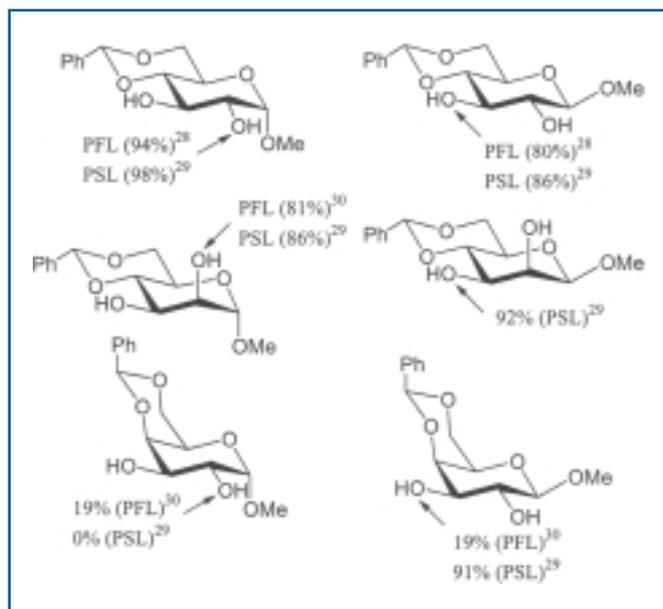


Figura 3 - Acetilazione selettiva in dipendenza dalla conformazione anomERICA

parato con una resa totale del 65% dalla reazione del lattoside 1 con CAL e il carbonato 2 seguita dalla digestione con Lipasi P in presenza del trifluoroetil levulinato 3.

La potenzialità di questi risultati si comprende osservando come questi enzimi permettano la protezione ortogonale di due posizioni del lattosio, che attraverso metodi chimici classici richiederebbero molti passaggi.

Per questo essi furono applicati alla sintesi di oligosaccaridi complessi del latte umano, sviluppando un protocollo sintetico che, attraverso la preparazione di *building blocks* lattosidici, portasse a diversi regioisomeri del fucosil lattosio, del sialil lattosio e di suoi analoghi [35].

Sfruttando la capacità della CAL di acilare selettivamente la posizione 6' del lattosio, furono preparati i suoi derivati 5 e 6 (Schema 1), la cui manipolazione portò ai *building blocks* 7-9 che permisero la glicosidazione selettiva in diverse posizioni.

Un cambio di solvente dal THF all'acetonitrile permise una nuova e più efficiente sintesi del 2'-O-fucosil lattosio, il componente più abbondante nel latte umano dopo il lattosio (Schema 2) [36].

La capacità acilante della CAL fu studiata anche su altri substrati di interesse biologico, quali i 2'-azioderivati 12 e 13 (Schema 3). Questi due composti sono precursori dell'isolattosammina e della lattosammina, due tra i più importanti componenti di glicoproteine, glicolipidi e oligosaccaridi del latte umano.

La loro elevata importanza biologica, unita alla loro scarsa disponibilità e al loro alto costo, li rendono due *target* di rilievo per la sintesi di oligosaccaridi. Ancora una volta, con questi due sub-

strati l'enzima mostrò differenti selettività in funzione del solvente di reazione. L'acetilazione della lattosammina 12 in THF fornì il derivato 6'-O-acetilato 14, mentre la stessa reazione in acetonitrile condusse inaspettatamente al composto 6,6'-O-diacetilato.

Al contrario, 13 subì esclusivamente monoacetilazione in 6', indipendentemente dal solvente impiegato [37]. Questo comportamento insolito non era mai stato osservato in precedenza, in quanto le lipasi solitamente acilano solo l'unità non riducente del disaccaride. Questi risultati furono sfruttati per una protezione differenziata delle due posizioni primarie, obiettivo che richiede parecchi passaggi di sintesi chimica tradizionale: il composto 15 fu ottenuto da 12 in soli due passaggi e con una resa globale dell'81%.

Questi esempi evidenziano ulteriormente l'efficacia delle lipasi come strumenti per l'acilazione regioselettiva di carboidrati, anche parzialmente protetti.

### Conclusioni

Per brevità non è stato possibile riportare tutti gli aspetti, sintetici e non, dell'uso delle lipasi nella chimica organica. Sono stati omessi settori rilevanti quali l'uso di altre lipasi la cui applicazione nel settore di carboidrati è ancora in fase esplorativa, anche se i risultati riportati sono incoraggianti [38]. In moltissimi lavori di sintesi l'uso delle lipasi è impiegato nella preparazione di zuccheri con proprietà detergenti o di cristalli liquidi [39], mentre ancora in pochi casi le lipasi sono state usate su zuccheri totalmente protetti [40].

Ampiamente esplorato è invece il campo delle lipasi come reagenti enantioselettivi [41]. I risultati riportati, e quelli evidenziati dalla gran mole di letteratura in merito, lasciano comunque intravedere l'elevata potenzialità ancora in parte non sfruttate, dall'impiego degli enzimi come biocatalizzatori nella sintesi organica.

In particolare, l'ampia disponibilità delle lipasi, unita al loro basso impatto ambientale e alla semplicità operativa del loro utilizzo, incoraggia ulteriori studi volti, per esempio, ad esplorarne la reattività in sistemi più complessi o in mezzi di reazione non classici.

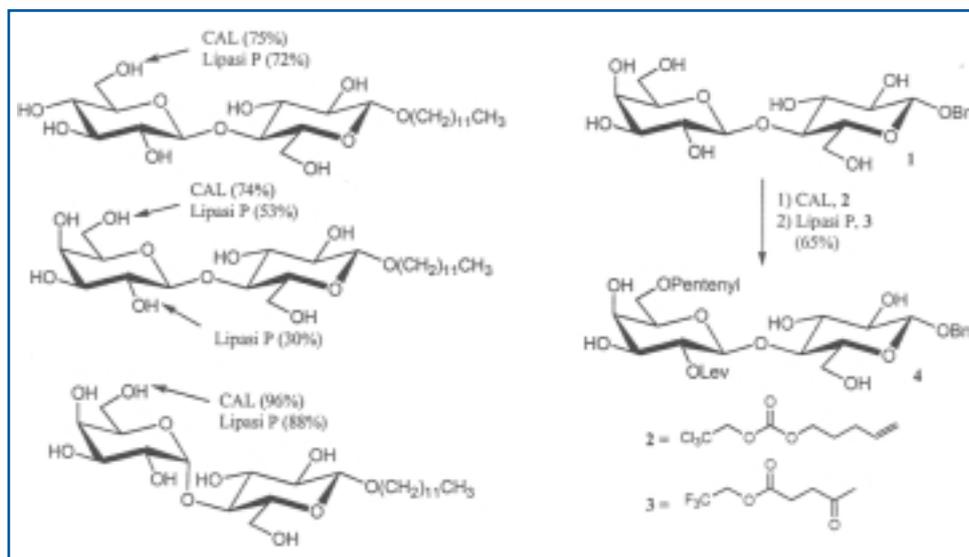
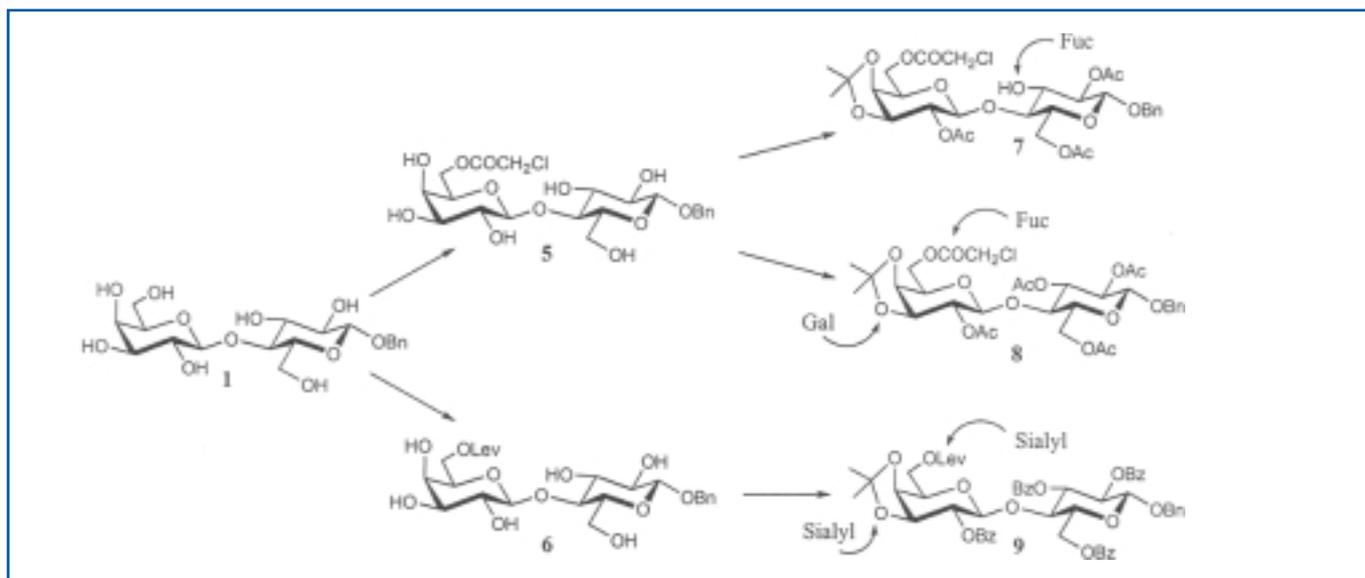
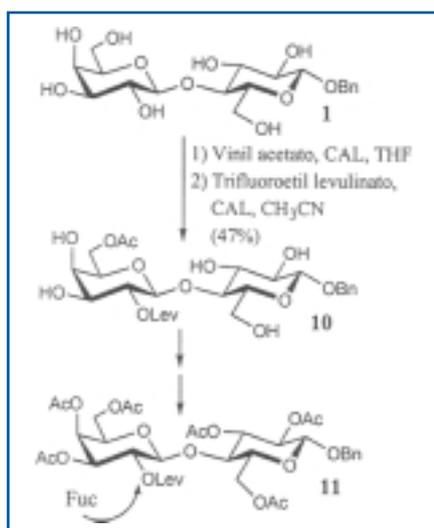


Figura 4 - Acilazioni su glicosidi del lattosio mediante lipasi.

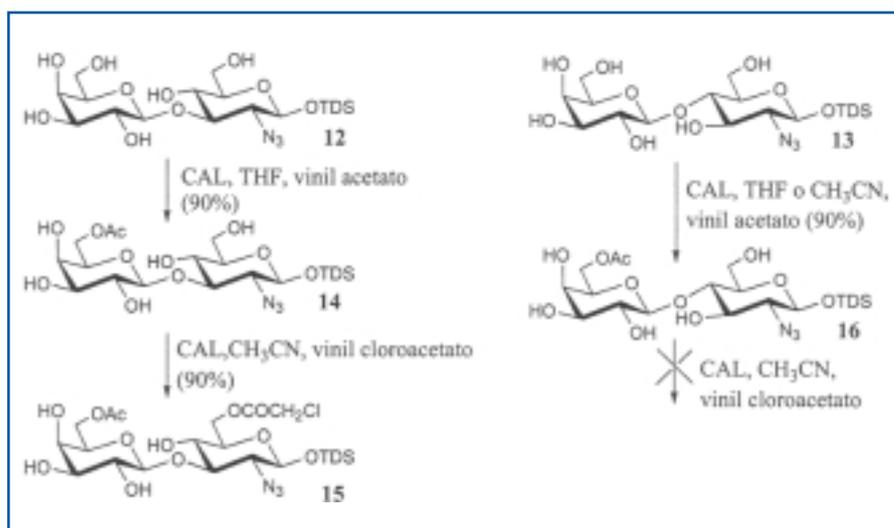
Solvente: alcool tert-amilico; agente acilante (dove non specificato): vinil acetato



Schema 1



Schema 2



Schema 3

### Bibliografia e note

- [1] E. Timmermanns, *Carbohydr. Eur.*, 1999, **25**, 14.  
 [2] H. Kunz, H. Waldmann, *Comprehensive Organic Synthesis*, B.M. Trost *et al.* (Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1991, Vol. VI, 631.  
 [3] a) A. Riedel, H. Waldmann, *J. Prakt. Chem.*, 1993, **335**, 109; b) D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., Worth, New York, 2000, 192.  
 [4] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed., Worth, New York, 2000, 192.  
 [5] a) I.D. Kunz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, 1974, **28**, 293; b) J.A. Rupley, G. Careri, *Adv. Protein Chem.*, 1991, **41**, 37.  
 [6] K. Griebenow, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **47**, 11695.  
 [7] A.M. Klivanov, *Nature. Insight* (reprinted from 2001), **409**, 241.  
 [8] K.-F. Hsiao *et al.*, *Synlett*, 1996, 966.  
 [9] C.R. Wescott, A.M. Klivanov, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1206**, 1.  
 [10] A questo proposito si può, tra gli altri, consultare il database disponibile al sito web: <http://www.cds3.dl.ac.uk/cds/bio-cat.html>.  
 [11] a) K.J. Jaeger *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, **15**, 29; b) A.H.C. Huang, *Lipases*, Elsevier, Amsterdam, 1984, 419; c) K.D. Mukherjee, M.J. Hills, *Lipases: their Structure, Biochemistry and Application*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994, 49.  
 [12] a) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, 1995; b) K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, 1995.  
 [13] S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products: the Chiron Approach*, Pergamon, Oxford, 1983.  
 [14] a) R.A. Dwek, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 685; b) K.C. Nicolaou, H.J. Mitchell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 1576.  
 [15] A. Fink, G.W. Hay, *Can. J. Biochem.*, 1969, **47**, 353.  
 [16] a) J.F. Shaw, A.M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.*, 1987, **29**, 648. b) H.M. Sweers, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 6421; c) W.J. Henner *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 4939.

- [17] Some representative examples are: a) S. Riva, in *Enzymatic Reactions in Organic Media*, A.M.P. Koskinen, A.M. Klivanov (Eds.), Blackie Academic & Professional, London, 1996, 140; b) N.B. Bashir *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1995, 2203.
- [18] A.M. Klivanov, *Trends in Biochem. Sci.*, 1989, **14**, 141.
- [19] D.G. Drueckhammer *et al.*, *Synthesis*, 1991, 499.
- [20] R. Pulido, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1993, 589.
- [21] M. Therisod, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 3977.
- [22] Y.-F. Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 7200.
- [23] a) C. Chon *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1993, **4**, 2441; b) M. Woudembarg-van Oosterom *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, 1995, **14**(2), 237.
- [24] a) M.J. Kim, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 6481; b) L.-C. Liu, Shen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3901; c) W. Fitz, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 8279.
- [25] M. Therisod, A.M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 3977.
- [26] F. Nicotra *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 1703.
- [27] a) P. Ciuffreda *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4187; b) D. Colombo *et al.*, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 103.
- [28] N.J. Chimm *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1992, 661.
- [29] L. Panza *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, 1993, **12**, 125.
- [30] G. Icazio, S.M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1993, 1099.
- [31] L. Panza *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1993, **4**, 931.
- [32] R. Lopez *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 7027.
- [33] S. Riva *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 584.
- [34] L. Lay *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 1996, **291**, 197.
- [35] a) B. La Ferla *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, 2000, **19**(3), 331; b) A. Rencurosi *et al.*, *Carbohydr. Res.* 2002, in corso di stampa.
- [36] A. Rencurosi *et al.*, *J. Carbohydr. Chem.*, 2001, **20**(7 e 8), 761.
- [37] B. La Ferla *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3647.
- [38] a) B. Danieli *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 1997, 193; b) Y. Kodera *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 1998, **20**(2), 177; c) G. Pagani, M. Terreni, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 633; d) S. Riva, G. Roda, *Methods and Tools in Bioscience and Medicine*, M.N. Gupta (Ed.), Birkhäuser Verlag Basel (Switzerland), 2000, 146.
- [39] Per dare alcuni esempi citiamo: a) C. Boyat *et al.*, *J. Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2000, **30**(4), 281; b) C. Lingju *et al.*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1999, **6**(3), 279; c) A.R.M. Yahya *et al.*, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1998, **23**, 438.
- [40] L. Poletti *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 2727.
- [41] Per dare alcuni esempi citiamo: a) C.-H. Wong, G.M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Trowbridge, 1994; b) G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 2226 e riferimenti ivi citati; c) F. Theil, *Methods Biotechnol.*, 2001, **15**, 277; d) P. Berlung, K. Hult, *Stereosel. Biocatal.*, 2000, 633.