

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 208**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2014 PCT/EP2014/052230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122167**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2014 E 14703332 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2954062**

54 Título: **Procedimiento para la producción de fructosa**

30 Prioridad:

06.02.2013 AT 500912013

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.09.2018

73 Titular/es:

**ANNIKKI GMBH (100.0%)
Dr. Auner Strasse 20/1
8074 Raaba-Grambach , AT**

72 Inventor/es:

**ERTL, ORTWIN;
SUT, MARTA y
BRANDNER, MARTINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 683 208 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de fructosa

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa.

5 Para la producción industrial de D-fructosa se emplea hasta la fecha convencionalmente un procedimiento en dos etapas, en el que se produce D-glucosa mediante la hidrólisis de polisacáridos, tal como por ejemplo almidón, y a continuación se realiza la isomerización de la D-glucosa obtenida de esta manera para dar D-fructosa. Mediante la isomerización de D-glucosa pueden obtenerse un 42% de D-fructosa, un 50% de D-glucosa y aproximadamente un 8% de polisacáridos restantes. A este respecto, un problema es que el aislamiento de D-fructosa pura a partir de esta mezcla requiere el empleo de técnicas de purificación laboriosas y costosas.

10 Una alternativa para la producción de D-fructosa mediante la isomerización de D-glucosa es un método en el que en una etapa enzimática y una química se transforma D-glucosa en D-fructosa.

En general se conoce un gran número de diferentes métodos para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa.

15 Así se conoce por ejemplo una reducción de D-glucosona para dar D-fructosa, que en la mayoría de los casos se realizaba por vía química, tal como se describe por ejemplo en el documento EP1048672. En este procedimiento se produce la D-fructosa mediante la hidrogenación catalítica de una disolución de glucosona con un alto contenido en materia seca utilizando condiciones de presión y de temperatura especiales.

En el documento US4321324 se describe la producción de D-glucosona a partir de D-glucosa en una etapa enzimática, en la que se oxida la D-glucosa mediante una piranosa-2-oxidasa para dar D-glucosona y el peróxido de hidrógeno generado se separa mediante una membrana semipermeable.

20 La reducción de D-glucosona para dar D-fructosa por vía enzimática con ayuda de una reductasa se propuso por ejemplo en el libro "Microbial Transformation of non-steroid cyclic compounds" de Kieslich, Georg Thieme Publishers, Stuttgart 1976 y en Biochem J., 15 de septiembre de 1997; 326 683-92, se describió que una xilosa-reductasa de *Candida tenuis* puede reducir D-glucosona para dar D-fructosa.

25 La producción de D-fructosa mediante la isomerización de D-glucosa en dos etapas (enzimática y químicamente) se describió por ejemplo en el documento US4246347. Según el procedimiento descrito en el mismo, se transformó D-glucosa en primer lugar enzimáticamente usando una piranosa-2-oxidasa para dar D-glucosona. El peróxido de hidrógeno que se genera a este respecto se separó y se reutilizó, o se degradó mediante una catalasa. En una segunda etapa se hizo reaccionar mediante hidrogenación la D-glucosona generada para dar D-fructosa. En este procedimiento se utilizó un 2% de glucosa y las dos etapas se realizaron por separado. Los problemas en los procedimientos son la alta presión y las altas temperaturas así como también las bajas concentraciones de los sustratos utilizados.

30 Los procedimientos conocidos para la producción/isomerización de D-fructosa a partir de D-glucosa presentan en la mayoría de los casos diferentes desventajas. Así, por ejemplo, una conversión eficiente del sustrato con alta selectividad es posible en la mayoría de los casos solo utilizando altas presiones y temperaturas y no puede evitarse fácilmente la formación de subproductos contaminantes, que son difíciles de separar.

Se encontró ahora sorprendentemente un procedimiento que posibilita una conversión eficiente del sustrato con alta selectividad y sin la utilización de altas presiones y temperaturas, pudiendo evitarse en su mayor parte la formación de subproductos contaminantes, de modo que no es necesaria la separación del sustrato del producto y puede prescindirse de la utilización de técnicas de purificación laboriosas y costosas.

40 En un aspecto, la presente invención pone a disposición un procedimiento para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa que está caracterizado porque en una reacción en un solo recipiente

a) se oxida D-glucosa con una piranosa-2-oxidasa enzimáticamente para dar D-glucosona, y

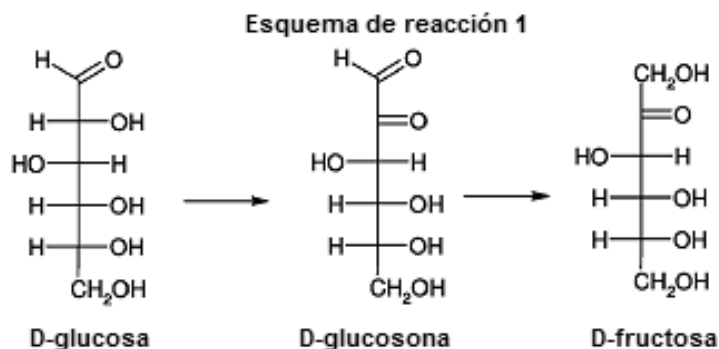
b) se reduce D-glucosona con una reductasa enzimáticamente para dar D-fructosa,

utilizándose en particular en la etapa b) un cofactor redox.

45 Un procedimiento, que se proporciona mediante la presente invención, se denomina en este caso también procedimiento de acuerdo con/según la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa en una reacción en un solo recipiente en dos etapas enzimáticas:

50 Una oxidación enzimática de D-glucosa para dar D-glucosona, seguida de una reducción enzimática de D-glucosona para dar D-fructosa, que transcurre según el siguiente esquema de reacción 1:



Un procedimiento de acuerdo con la presente invención ofrece una nueva posibilidad enzimática para la producción de D-fructosa, sin la necesidad de separar y purificar la D-glucosa restante. A este respecto, con respecto a las técnicas empleadas actualmente, la presente invención representa una mejora esencial de los procedimientos para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa. A diferencia de los procedimientos existentes, los compuestos tanto se oxidan enzimáticamente como se reducen enzimáticamente, sin tener que aislar un producto intermedio. Al mismo tiempo pueden utilizarse concentraciones de sustrato esencialmente mayores y también conseguirse una mayor conversión que lo que era posible en los procedimientos empleados hasta la fecha.

Fuentes adecuadas de D-glucosa en un procedimiento según la presente descripción son, por ejemplo, hidrolizados enzimáticos o no enzimáticos de almidón, en particular almidón de maíz, hidrolizados enzimáticos o no enzimáticos de sacarosa o hidrolizados enzimáticos o no enzimáticos de celulosa. La celulosa, que puede usarse en un procedimiento según la presente invención, puede obtenerse por ejemplo a partir de biomasa, preferiblemente a partir de biomasa lignocelulósica, como por ejemplo madera, paja, como paja de trigo, paja de maíz, bagazo, sisal, hierbas con fines energéticos. Para la hidrólisis enzimática de almidón de maíz pueden utilizarse, por ejemplo, amilasas. Para la escisión enzimática de sacarosa son adecuadas, por ejemplo, las invertasas. Para la escisión enzimática de celulosa pueden utilizarse, por ejemplo, celulasas. Para la escisión no enzimática de dichos azúcares múltiples es adecuada, por ejemplo, una escisión catalizada por ácido.

Un procedimiento según la presente descripción se realiza preferiblemente en un sistema acuoso. Al sistema acuoso también se le puede añadir un (sistema de) tampón. Se conocen tampones (sistemas de tampón) adecuados e incluyen los tampones (sistemas de tampón) habituales, por ejemplo tampón acetato, fosfato de potasio, Tris-HCl y glicina. Preferiblemente, un tampón que se utiliza en un procedimiento de acuerdo con la presente invención presenta un valor de pH de desde 5 hasta 10,5, preferiblemente desde 6 hasta 9,5. Al sistema acuoso, para la estabilización de las enzimas, se le pueden añadir estabilizadores, por ejemplo estabilizadores habituales, como por ejemplo iones, por ejemplo Mg^{2+} , u otros aditivos, por ejemplo aditivos habituales, como por ejemplo glicerina.

En un procedimiento según la presente descripción se requiere oxígeno para la oxidación de D-glucosa para dar D-glucosona. Este oxígeno puede incorporarse tal como habitualmente y ponerse a disposición por ejemplo mediante el contacto con el aire del entorno o mediante un suministro de oxígeno aumentado, por ejemplo mediante aire comprimido o la introducción de oxígeno puro.

Un procedimiento de acuerdo con la presente descripción se realiza a temperaturas adecuadas, que pueden depender, por ejemplo, de las enzimas usadas. Las temperaturas adecuadas incluyen de 10°C a 70°C, preferiblemente de 20°C a 50°C, por ejemplo de 20°C a 45°C.

Como "reacción en un recipiente" se denomina en este caso un procedimiento, en el que la reacción de oxidación y la reacción de reducción se realizan en la misma mezcla básica de reacción sin aislamiento de productos intermedios, en particular en el que dos reacciones redox enzimáticas implicadas en la formación de producto y un sistema enzimático para la regeneración del cofactor se realizan en una mezcla básica de reacción, sin aislar un producto intermedio. A este respecto, o bien pueden añadirse todas las enzimas implicadas al mismo tiempo o bien se añade en primer lugar una parte de las enzimas, por ejemplo la(s) enzima(s) para la etapa a) y con un retardo de tiempo otra parte de las enzimas, por ejemplo la(s) enzima(s) para la etapa b). Antes de la adición de la segunda parte de las enzimas pueden inactivarse por ejemplo las enzimas ya presentes en la mezcla básica de reacción, por ejemplo con un procedimiento habitual, tal como por ejemplo aumento de la temperatura, por ejemplo hasta 65°C durante 10 min.

En un aspecto especial, un procedimiento de acuerdo con la presente invención está caracterizado porque el procedimiento tiene lugar sin aislamiento de productos intermedios.

La oxidación de D-glucosa para dar D-glucosona en un procedimiento de acuerdo con la presente descripción tiene lugar enzimáticamente, concretamente mediante catálisis enzimática, y puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido. La etapa de oxidación según la invención tiene lugar mediante catálisis con una piranosa-2-oxidasa. Las piranosa-2-oxidasas pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de *Coriolus sp.*, *Aspergillus sp.* o

Polyporus obtusus.

Durante la reacción de la piranosa-2-oxidasa se genera H_2O_2 , que se elimina de la mezcla de reacción. La eliminación de H_2O_2 puede tener lugar según métodos habituales y preferiblemente tiene lugar enzimáticamente, por ejemplo con ayuda de una catalasa. Por ejemplo se añade una catalasa a la mezcla de reacción.

- 5 Una forma de realización especial del procedimiento según la presente invención está caracterizada porque el H_2O_2 que se genera se elimina con ayuda de una catalasa.

Se conocen catalasas adecuadas y por ejemplo pueden obtenerse a partir de *Aspergillus sp.*, *Corynebacterium glutamicum* o de hígado de ternera.

- 10 La reducción enzimática de D-glucosona para dar D-fructosa en un procedimiento de acuerdo con la presente descripción puede tener lugar según un procedimiento adecuado, por ejemplo según un procedimiento habitual, o tal como se describe en el presente documento. Como enzima para la reducción pueden utilizarse enzimas adecuadas, por ejemplo habituales, que son adecuadas para la reducción de sustratos. Las enzimas adecuadas comprenden por ejemplo reductasas, en particular xilosa-reductasas. Se conocen xilosa-reductasas adecuadas y pueden obtenerse por ejemplo a partir de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* o *Debariomyces hansenii*.

- 15 Una forma de realización especial del procedimiento según la presente invención está caracterizada porque para la reducción de D-glucosona para dar D-fructosa se utiliza una xilosa-reductasa.

- En un procedimiento según la presente invención se utiliza un cofactor redox, en particular $NAD(P)H/NAD(P)^+$, en particular durante la reducción de la D-glucosona para dar D-fructosa se utiliza $NAD(P)H$ como cofactor redox. A este respecto, NAD^+ designa la forma oxidada y $NADH$ la forma reducida de dinucleótido de nicotinamida-adenina, mientras que $NADP^+$ designa la forma oxidada y $NADPH$ designa la forma reducida de dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina. Mediante el uso de un lisado celular del microorganismo que expresa las enzimas implicadas, por ejemplo *E. coli*, tal como por ejemplo *E. coli* BL21 (DE 3), en el que está contenido el $NAD(P)$ necesario, puede suprimirse eventualmente la costosa adición de este cofactor. En el caso de que los cofactores redox $NAD(P)^+$ y/o $NAD(P)H$ se añadan durante la conversión de D-glucosa para dar D-fructosa, la concentración añadida en un procedimiento de acuerdo con la presente invención asciende habitualmente a desde 0,001 mM hasta 10 mM, preferiblemente desde 0,01 mM hasta 1 mM.
- 20
25

Una forma de realización especial del procedimiento según la presente invención está caracterizada porque, en particular durante la reducción de D-glucosona, se utilizan cofactores redox, en particular $NAD(P)H$, en particular porque la enzima que se usa en la etapa b) depende de $NADP(H)$.

- 30 Los cofactores redox pueden regenerarse mediante un sistema de regeneración de cofactores adecuado, concretamente se someten a un reciclado, transformándose los cofactores de nuevo en la forma utilizada originariamente.

- Una forma de realización especial del procedimiento según la presente invención está caracterizada porque los cofactores redox utilizados se someten a un reciclado, en particular mediante un sistema de regeneración de cofactores adecuado.
- 35

La regeneración de cofactores redox requiere en general la presencia de un cosustrato adecuado, que se consume durante la regeneración de los cofactores redox. Los cosustratos que pueden usarse por ejemplo en el caso de usar los cofactores $NAD(P)H/NAD(P)^+$ incluyen por ejemplo alcoholes, como por ejemplo alcohol isopropílico (2-propanol, IPA), ácido láctico y sus sales, ácido pirúvico y sus sales, oxígeno, hidrógeno y/o ácido fórmico y sus sales.

- 40 En un aspecto especial, un procedimiento de la presente invención está caracterizado porque se regenera el cofactor redox durante el uso de los cofactores $NAD(P)H/NAD(P)^+$, en particular durante la reducción de D-glucosona, consumiendo un cosustrato, en particular seleccionado de un alcohol, ácido láctico y sus sales, ácido pirúvico y sus sales, oxígeno, hidrógeno y/o ácido fórmico y sus sales.

- Una forma de realización especial de un procedimiento según la presente invención está caracterizada porque durante la regeneración de los cofactores redox, en particular durante la reducción de D-glucosona para dar D-fructosa, se utilizan cosustratos.
- 45

- En la regeneración de cofactores redox se utiliza una enzima redox. Las enzimas redox, que se tienen en cuenta en el caso de usar $NAD(P)H/NAD(P)^+$ como cofactores redox, incluyen por ejemplo deshidrogenasas, por ejemplo alcohol deshidrogenasas, lactato deshidrogenasas, formiato deshidrogenasas, preferiblemente alcohol deshidrogenasas. Se conocen alcohol deshidrogenasas adecuadas e incluyen por ejemplo una alcohol deshidrogenasa que puede obtenerse a partir de *Lactobacillus kefir*.
- 50

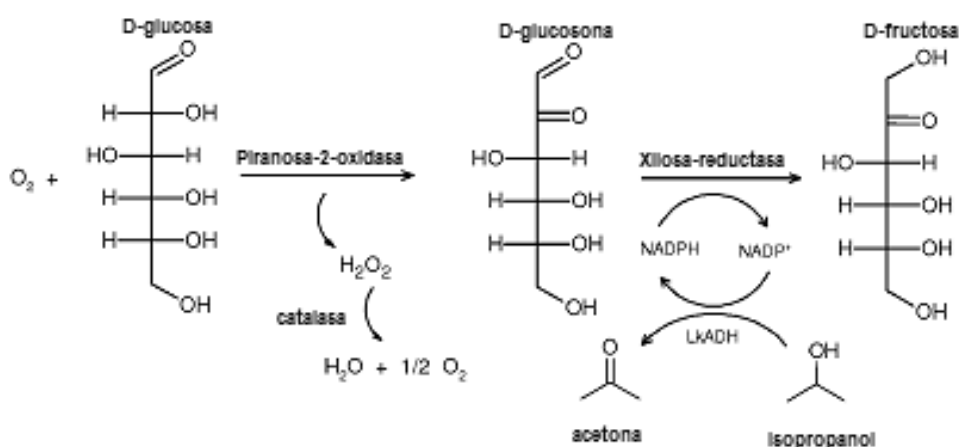
En una forma de realización especial adicional del procedimiento según la presente invención, el cofactor redox se regenera mediante una enzima redox, en particular mediante una alcohol deshidrogenasa.

Las enzimas pueden usarse en un procedimiento de acuerdo con la presente invención como tales, dado el caso en

forma de lisados celulares, dado el caso como proteínas sobreexpresadas de manera recombinante, por ejemplo como proteínas sobreexpresadas de manera recombinante en *E. coli*, pudiendo utilizarse preferiblemente los lisados celulares correspondientes sin purificación adicional. Según la enzima que debe producirse pueden utilizarse también otros microorganismos para su expresión, por ejemplo microorganismos que conoce el experto en la técnica. Los componentes sólidos de los respectivos microorganismos o bien pueden separarse en un procedimiento de acuerdo con la presente invención o bien utilizarse conjuntamente en la reacción (por ejemplo biocatalizadores de células completas). También pueden utilizarse sobrenadantes de cultivo o lisados de microorganismos, que sin la tecnología de ADN recombinante ya presentan actividades enzimáticas suficientes. A este respecto, la unidad enzimática 1 U corresponde a aquella cantidad de enzima que se necesita para convertir 1 μmol de sustrato por min.

- 5
- 10 En un procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse tanto una o varias enzimas, como uno o varios cofactores redox en la transformación de D-glucosa en D-fructosa, ya sea en forma soluble o inmovilizada en vehículos (sólidos).

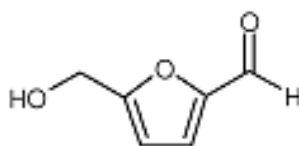
En un aspecto adicional, un procedimiento de acuerdo con la presente invención está caracterizado porque transcurre según el siguiente esquema de reacción 2



- 15 en el que LkADH significa una alcohol deshidrogenasa, en particular una alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*, que depende de NADP(H).

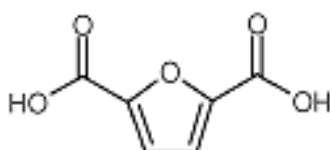
La D-fructosa, que se obtuvo de acuerdo con la presente invención, puede aislarse de la mezcla de reacción, por ejemplo según un procedimiento habitual, por ejemplo por medio de cristalización.

- 20 La D-fructosa representa un material de partida importante para el procesamiento adicional en la industria química. Por ejemplo, puede procesarse adicionalmente la D-fructosa de manera conocida en derivados de furano, tal como por ejemplo hidroximetilfurfural (HMF) de fórmula



Hidroximetilfurfural (HMF)

- 25 El hidroximetilfurfural es de manera conocida un producto de partida para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) de fórmula

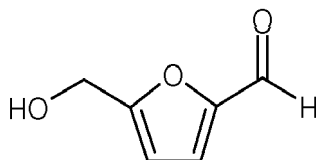


Ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA)

que es adecuado de manera conocida como monómero para la producción de polímeros, tal como por ejemplo

poli(furanoato de etileno) (PEF). El PEF puede utilizarse de manera similar como el poli(tereftalato de etileno) (PET), por ejemplo para la producción de cuerpos huecos, en particular botellas, tal como por ejemplo botellas de bebida, botellas para cosméticos o botellas para productos de limpieza. Con el uso simultáneo de etilenglicol de fuentes regenerativas y FDCA, que puede obtenerse a partir de HMF, que se produce en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede obtenerse PEF, que consiste completamente en materias primas renovables.

En una forma de realización especial del procedimiento de acuerdo con la presente descripción se convierte la fructosa producida adicionalmente en derivados de furano, tal como por ejemplo hidroximetilfurfural (HMF) de fórmula



En los siguientes ejemplos, todos los datos de temperatura están en grados Celsius (°C). A este respecto, la unidad enzimática "1 U" corresponde a aquella cantidad de enzima que se necesita para convertir 1 μmol de sustrato por min.

Se usan las siguientes abreviaturas:

h hora(s)

min minuto(s)

Ejemplo 1

Bioconversión de D-glucosa para dar D-glucosona mediante piranosa-oxidasa usando catalasa para eliminar el H_2O_2 formado a este respecto

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene un 2,5% (p/v) de D-glucosa y 1 U de piranosa-2-oxidasa (Sigma Aldrich). Para convertir el H_2O_2 formado en esta reacción se utilizan 50 U de catalasa (Sigma Aldrich), que convierte el H_2O_2 generado en $\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. La reacción se realiza en un tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) a 30°C con agitación continua (850 rpm). Se usa un sistema abierto para conseguir un suministro de oxígeno suficiente. Tras 48 h se había convertido el 99% de la D-glucosa en D-glucosona.

Ejemplo 2

Bioconversión de D-glucosona para dar D-fructosa mediante xilosa-reductasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene un 2,5% (p/v) de D-glucosona y 10 U de la xilosa-reductasa recombinante de *Candida tropicalis* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)). Para la regeneración de NADPH se utilizan 10 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) e inicialmente un 5% (p/v) de 2-propanol. La reacción se realiza sin adición de NADPH. El cofactor está disponible del extractor celular del *E. coli* BL21 (DE3) usado para la expresión de la xilosa-reductasa y de la alcohol deshidrogenasa. La reacción se realiza en un tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) a 30°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa un sistema abierto para posibilitar la evaporación de la acetona y desplazar la reacción en el sentido de la D-fructosa. Se dosifican posteriormente un 2,5% (p/v) de IPA tras 6 h, un 5% de IPA (p/v) tras 18 h y un 2,5% (p/v) de IPA tras 24 h. Tras 48 h se había convertido ~90% de la D-glucosona en D-fructosa.

Ejemplo 3

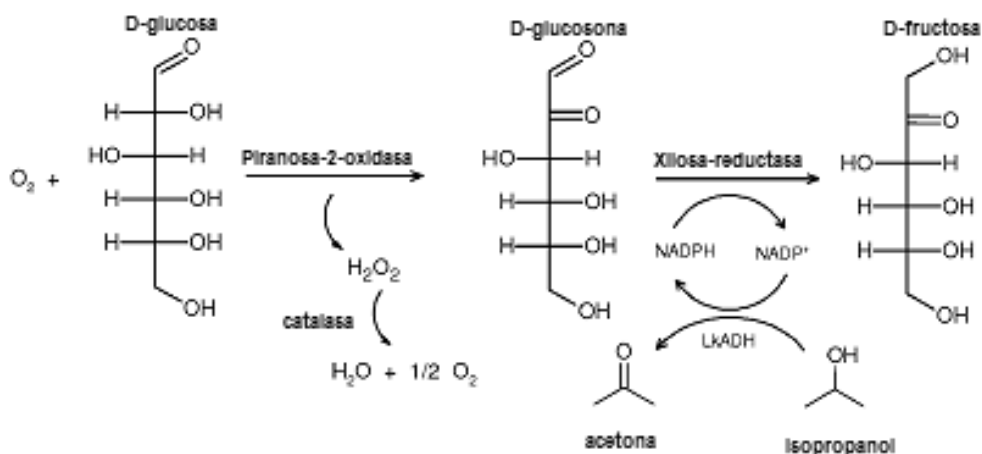
Bioconversión de D-glucosa para dar D-glucosona y además para dar D-fructosa en una reacción de un recipiente (dos etapas sucesivas sin aislamiento del producto intermedio) usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene un 2,5% (p/v) de D-glucosa y 1 U de piranosa-2-oxidasa (Sigma Aldrich). Para convertir el H_2O_2 formado en esta reacción se utilizan 50 U de catalasa, que convierte el H_2O_2 generado en $\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. La reacción se realiza en un tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) a 30°C con agitación continua (850 rpm). Por lo demás, se usa un sistema abierto para conseguir un suministro de oxígeno suficiente. Tras 24 h se calienta la mezcla de reacción durante 10 minutos hasta 65°C, para desactivar las enzimas. A continuación se añaden a la mezcla de reacción 10 U de la xilosa-reductasa recombinante de *Candida tropicalis* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)). Para la regeneración de NADPH se utilizan 10 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) e inicialmente un 5% (p/v) de 2-propanol. La reacción se realiza sin adición de NADPH. El cofactor está disponible del extracto celular del *E. coli* BL21 (DE3) usado para la expresión de la xilosa-reductasa recombinante y de la alcohol deshidrogenasa recombinante. La reacción se realiza

a 30°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa un sistema abierto para posibilitar la evaporación de la acetona y desplazar la reacción en el sentido de la D-fructosa. Se dosifican posteriormente un 2,5% (p/v) de IPA tras 6 h, un 5% (p/v) de IPA tras 18 h y un 2,5% (p/v) de IPA tras 24 h. Tras 48 h se había convertido el 91% de la D-glucosa utilizada en D-fructosa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de D-fructosa a partir de D-glucosa, caracterizado porque en una reacción en un solo recipiente
 - a) se oxida D-glucosa con una piranosa-2-oxidasa enzimáticamente para dar D-glucosona, y
 - b) se reduce D-glucosona con una reductasa enzimáticamente para dar D-fructosa, utilizándose en particular en la etapa b) un cofactor redox.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el procedimiento tiene lugar sin aislamiento de productos intermedios.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el H₂O₂ generado se elimina con ayuda de una catalasa.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque para la reducción de D-glucosona para dar D-fructosa se utiliza una xilosa-reductasa.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque, en particular durante la reducción de D-glucosona para dar D-fructosa, se utilizan cofactores redox, en particular NAD(P)H, en particular porque la enzima que se usa en la etapa b) depende de NADP(H).
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se añaden los cofactores redox NAD(P)⁺ y/o NAD(P)H durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque los cofactores redox utilizados se someten a un reciclado, en particular mediante un sistema de regeneración de cofactores adecuado.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque el cofactor redox se regenera durante el uso de los cofactores NAD(P)H/NAD(P)⁺, en particular durante la reducción de D-glucosona para dar D-fructosa, consumiendo un cosustrato, en particular seleccionado de un alcohol, ácido láctico y sus sales, ácido pirúvico y sus sales, oxígeno, hidrógeno y/o ácido fórmico y sus sales.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el cofactor redox se regenera mediante una enzima redox, en particular mediante una alcohol deshidrogenasa.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque transcurre según el siguiente esquema de reacción 2



en el que LkADH significa una alcohol deshidrogenasa, en particular una alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*, que depende de NADP(H).

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la D-fructosa producida se convierte adicionalmente para dar derivados de furano.