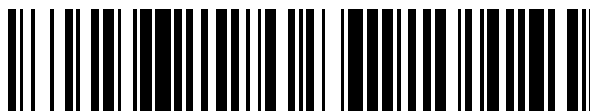


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 698**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/36	(2006.01)
C12P 33/00	(2006.01)
C12P 41/00	(2006.01)
C13K 11/00	(2006.01)
C07D 307/50	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/EP2013/052316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13117585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13703569 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2812440**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de derivados de furano a partir de glucosa**

30 Prioridad:

07.02.2012 EP 12450007
03.09.2012 EP 12182758
12.09.2012 WO PCT/EP2012/067781
10.12.2012 AT 12842012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2020

73 Titular/es:

ANNIKKI GMBH (50.0%)
Dr. Auner Strasse 20/1
8074 Raaba-Grambach, AT y
NOVOLANA GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

ERTL, ORTWIN;
STAUNIG, NICOLE;
SUT-VEJDA, MARTA;
MAYER, BERND;
MIHOVILOVIC, MARKO;
SCHÖN, MICHAEL y
HÖLBLING, JOHANNA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 746 698 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 preparación de derivados de furano a partir de glucosa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de derivados de furano a partir de D-glucosa.

Debido al aumento de los precios de las materias primas fósiles y a una disminución esperada en el suministro de tales materias primas, existe un gran interés en el uso de materias primas renovables. A este respecto, han de diferenciarse los sectores de generación de energía y producción de productos químicos básicos. La presente
10 invención hace referencia al último sector y se refiere a un procedimiento para la producción de derivados de furano a partir de D-glucosa.

La D-glucosa está presente en grandes cantidades en los más diversos biopolímeros, que son constituyentes de materias primas renovables. Ejemplos de ello son almidón (por ejemplo, almidón de maíz) o celulosa (por ejemplo, de
15 biomasa lignocelulósica). Sin embargo, la fructosa es mucho más adecuada como material de partida para la preparación de derivados de furano.

Una posibilidad habitual de convertir D-glucosa en D-fructosa tiene lugar con el uso de una D-glucosa isomerasa adecuada, por ejemplo, D-xilosa isomerasa, que acepta D-glucosa como sustrato. Tales procedimientos se conocen
20 desde hace mucho tiempo, por ejemplo, por el documento US2950228 y también son adecuados para el uso industrial, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos US3616221 o US3868304.

El documento WO 2011/124639 describe un procedimiento para la preparación del derivado de furano hidroximetilfurfural partiendo de fructosa, glucosa o manosa, estando prevista una conversión de D-glucosa en D-
25 fructosa con D-glucosa isomerasa.

Un problema a este respecto es que habitualmente puede convertirse como máximo aproximadamente el 42 % de la D-glucosa en D-fructosa. Puede conseguirse un enriquecimiento adicional de D-fructosa frente a D-glucosa mediante
30 procedimientos de separación. Una posibilidad para esto es el uso de métodos cromatográficos, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US5221478. Para el sector alimentario, a menudo únicamente se busca a este respecto un enriquecimiento parcial de D-fructosa. Principalmente, para la producción D-fructosa relativamente pura a altamente pura son muy costosos los procedimientos cromatográficos.

Además del uso de isomerasas, también se han descrito en la bibliografía reacciones redox enzimáticas en hidratos
35 de carbono.

Así, por ejemplo, en el documento DE69839381 se describe una sorbitol deshidrogenasa, que puede utilizarse para la conversión de D-sorbitol en L-sorbosa y puede emplearse en la producción de ácido ascórbico.

40 En el documento DE10247147 se describe un procedimiento en el que con el uso de D-manitol-2-deshidrogenasa se reduce D-fructosa dando D-manitol.

En el documento US4467033 se describe la oxidación enzimática de L-sorbitol para dar L-fructosa.

45 Ejemplos de la reducción de D-xilosa para dar xilitol se dan a conocer, por ejemplo, en el documento US20060035353 o en Woodyer R. et al., FEBS J., 2005, volumen 272, páginas 3816-3827.

Se mostró ya que pueden usarse xilosa reductasas adecuadas para reducir D-glucosa para dar D-sorbitol (por ejemplo, Wang X. et al., Biotechnol. Lett., 2007, volumen 29, páginas 1409-1412).
50

Las enzimas redox de azúcar, tales como sorbitol deshidrogenasa, se utilizan también con fines de diagnóstico (por ejemplo, documento DE60006330).

55 En estos procedimientos se trata de reacciones redox individuales, en las que para la formación de producto tiene lugar en cada caso o bien una reducción o bien una oxidación.

Las reacciones redox catalizadas por enzimas se usan en procesos industriales, por ejemplo en la producción de alcoholes quirales, α -aminoácidos y α -hidroxiácidos. Los procesos industriales conocidos hasta ahora usan por regla general una enzima redox para la síntesis de producto, así como, dado el caso, otra enzima para la regeneración del
60 cofactor. De estos han de distinguirse procedimientos en los que dos o más reacciones redox enzimáticas involucradas en la formación de producto así como las reacciones enzimáticas dado el caso necesarias para la regeneración del cofactor (simultánea o secuencialmente) se llevan a cabo en una preparación de reacción, sin que se aisle un producto intermedio. Recientemente, tales reacciones en cascada enzimáticas, denominadas en este caso reacciones de un solo recipiente, han recibido una atención significativa, dado que reducen efectivamente costes operativos, tiempo de funcionamiento y el impacto medioambiental. Adicionalmente, las cascadas enzimáticas de reacciones redox permiten
65 transformaciones, que no son fáciles de implementar por procedimientos químicos clásicos.

Entonces se describió un intento de llevar a cabo la desracemización de racematos de alcoholes secundarios a través de una cetona proquiral como producto intermedio con el uso de un sistema de un solo recipiente (J. Am. Chem. Soc., 2008, volumen 130, páginas 13969-13972). La desracemización de los alcoholes secundarios se logró mediante dos alcohol deshidrogenasas (específicas de S y R) con diferente especificidad de cofactor. Una desventaja del procedimiento es la muy baja concentración del sustrato utilizado del 0,2-0,5%, lo que no es adecuado para fines industriales.

Se describió otro sistema de un solo recipiente en el documento WO 2009/121785, en donde un estereoisómero de un alcohol secundario ópticamente activo se oxidó para dar cetona y entonces se redujo para dar la antípoda óptica correspondiente y en donde se usaron dos alcohol deshidrogenasas con estereoselectividades opuestas y diferentes especificidades de cofactor. Los cofactores se regeneraron por medio de un denominado "sistema de transferencia de hidruros" con el uso de solo una enzima adicional. Para regenerar los cofactores, se usaron distintas enzimas tales como, por ejemplo, formiato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa. Una desventaja de este procedimiento es la baja concentración de los sustratos usados.

Por el contrario, muchas reacciones redox enzimáticas individuales ya son conocidas. Un ejemplo de aplicación es la producción de compuestos hidroxí quirales partiendo de compuestos ceto proquirales correspondientes. En estos procedimientos, el cofactor se regenera por medio de una enzima adicional. Común a estos procedimientos es que representan una reacción de reducción aislada y regeneran NAD(P)H (véase, por ejemplo, el documento EP1152054).

Otros ejemplos de una producción enzimática de compuestos orgánicos quirales, enantioméricamente enriquecidos, tales como, por ejemplo, alcoholes o aminoácidos, han sido descritos (Organic Letters, 2003, volumen 5, páginas 3649-3650; documento US7163815; Biochem. Eng. J., 2008, volumen 39(2) páginas 319-327; documento EP1285962). En los sistemas, se usó como enzima de regeneración de cofactor una oxidasa dependiente de NAD(P)H de *Lactobacillus brevis* o *Lactobacillus sanfranciscensis*. En los ensayos se trata también de reacciones individuales para la formación de producto.

En las reacciones de oxidación o reducción que discurren individualmente mencionadas, se suprimen las ventajas de una reacción de un solo recipiente, tales como la rentabilidad por ahorro de tiempo y de material.

Un aislamiento de fructosa a partir de soluciones acuosas es posible, por ejemplo, de acuerdo con un procedimiento que se describe en los documentos US4895601 o US5047088.

En la bibliografía se conocen distintos ejemplos para la producción de derivados de furano a partir de hidratos de carbono.

En tales procedimientos, se usaron una pluralidad de catalizadores ácidos: ácidos inorgánicos (véase, por ejemplo, Chheda, J. N.; Roman-Leshkow, Y.; Dumesic, J. A. Green Chem. 2007, 9, 342-350), ácidos orgánicos (por ejemplo ácido oxálico), zeolitas (forma H), iones de metal de transición (véase, por ejemplo, Young, G.; Zhang, Y.; Ying, J. Y. Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 9345-9348; Tyrlík, S. K.; Szerszen, D.; Olejnik, M.; Danikiewicz, W. Carbohydr. Res. 1999, 315, 268-272), fosfatos metálicos disueltos heterogéneamente (véase, por ejemplo, Asghari, F. S.; Yoshida, H. Carbohydr. Res. 2006, 341, 2379-2387) o también intercambiadores catiónicos fuertemente ácidos (véase, por ejemplo, Villard, R.; Robert, F.; Blank, I.; Bernardinelli, G.; Soldo, T.; Hofmann, T. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 4040-4045).

Como disolvente en tales procesos, se examinó preferentemente agua como un disolvente verde. Aunque un sistema de biomasa y agua puede considerarse un "enfoque verde" (*green approach*), entonces a temperaturas de > 300 °C y presiones superiores a 20 MPa, que son necesarias para conseguir rendimientos aceptables, ya no puede hablarse de uno tal (véase, por ejemplo, Qi, X.; Watanabe, M.; Aida, T. M.; Smith Jr., R. S. Cat. Commun. 2008, 9, 2244-2249).

Un compuesto de furano especial que puede estar prepararse a partir de hidratos de carbono en presencia de catalizadores ácidos, lo representa hidroximetilfurfural (en adelante HMF). Procesos para la producción de HMF también se conocen de la bibliografía. HMF puede obtenerse en solución acuosa en presencia de ácidos homogéneos y heterogéneos a partir de hidratos de carbono. Los rendimientos alcanzados en este sentido ascienden, en función del sustrato de hidrato de carbono y las condiciones de reacción a entre el 30 y el 60 %. Si se usa agua como disolvente, entonces también se describen también en este caso las condiciones de reacción de 300 °C y 27 MPa. Además, se describe la formación de productos secundarios tales como ácido levulínico (LS) o ácidos húmicos insolubles (véase, por ejemplo, Bicker, M.; Kaiser, D.; Ott, L.; Vogel, H., J. of Supercrit. Fluids 2005, 36, 118-126; Szmant, H. H.; Chundury, D. D., J. Chem. Techn. Biotechnol. 1981, 31, 135-145; Srokol, Z.; Bouche, A.-G.; van Estrik, A.; Strik, R. C. J.; Maschmeyer, T.; Peters, J. A., Carbohydr. Res. 2004, 339, 1717-1726).

Un procedimiento de flujo en condiciones supercríticas partiendo de D-glucosa se describió por Aida et al. (Aida, T. A.; Sato, Y.; Watanabe, M.; Tajima, K.; Nonaka, T.; Hattori, H.; Arai, K. J. of Supercrit. Fluids, 2007, 40, 381-388).

Disolventes orgánicos pueden ser asimismo adecuados en la producción de HMF. Sin embargo, en este sentido, una

limitación importante es que en algunos casos son difíciles de separar del producto (véase, por ejemplo, Bao, Q.; Qiao, K.; Tomido, D.; Yokoyama, C. Catal. Commun. 2008, 9, 1383-1388; Halliday, G. A.; Young Jr., R. J.; Grushin, V. V. Org. Lett. 2003, 5, 2003-2005). Adicionalmente, muchos disolventes usados en el pasado no son adecuados para posibles reacciones secundarias, sino que generan productos secundarios, siempre que no se separen. Disolventes usados frecuentemente para la conversión de hidratos de carbono en HMF son dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF). En comparación con agua como disolvente, las reacciones de los hidratos de carbono para dar HMF pueden llevarse a cabo en estos casos ya a temperaturas relativamente bajas de 80 - 140 °C y producen rendimientos claramente más altos (hasta el 95 % en DMF) en tiempos de reacción más cortos (de 30 min a 2 h) (véase, por ejemplo, Halliday, G. A., Young Jr., R. J., Grushin, V. V., Org. Lett. 2003, 5, 2003-2005; documento WO2009076627. Se cree que DMSO actúa como un catalizador en la deshidratación de D-fructosa (u otros hidratos de carbono) para dar HMF (y compuestos comparables) (véase: Amarasekara, A. S.; Williams, L. D.; Ebede, C. C. Carbohydr. Res. 2008, 343, 3021-3024).

Mezclas de reacción de agua/DMSO o agua/tolueno se emplearon asimismo en un régimen de reacción continuo, necesiándose tiempos de reacción de 4-6 h a 140-180 °C, para obtener, en el mejor de los casos, un rendimiento del 80 % de HMF (véase Chheda, J. N., Roman-Leshkov, Y., Dumesic, J. A., Green Chem. 2007, 9, 342-350).

Líquidos iónicos pueden actuar tanto como disolventes neutros, y como ácidos de Brønsted activos, siguiendo representando un problema también la separación de los líquidos iónicos. Los líquidos iónicos inmovilizados se usaron además como catalizadores de ácido Brønsted (véase Bao, Q.; Qiao, K.; Tomido, D.; Yokoyama, C. Catal. Commun. 2008, 9, 1383-1388).

Todos los procesos conocidos hasta la fecha presentan distintas desventajas, por ejemplo, baja concentración inicial del sustrato, bajos rendimientos totales.

Se encontró ahora sorprendentemente una posibilidad de conseguir un mejor rendimiento total en la obtención de derivados de furano a partir de D-glucosa, con el que puede usarse la concentración inicial sorprendentemente alta de la D-glucosa.

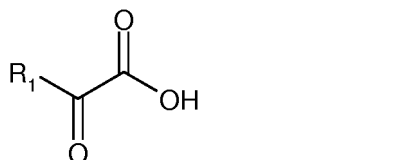
En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de derivados de furano a partir de D-glucosa, caracterizado por que

A) D-glucosa se convierte en D-fructosa en un procedimiento enzimático con el uso y regeneración de cofactores redox, en el que D-glucosa se convierte en D-fructosa con la participación de dos o más oxidoreductasas, se convierte en D-fructosa y en la conversión de D-glucosa en D-fructosa en primer lugar se llevan a cabo una reducción catalizada enzimáticamente para dar D-sorbitol y a continuación una oxidación catalizada enzimáticamente de D-sorbitol para dar D-fructosa, en el que como cofactores redox se usan NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ y en el que como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente adicionales que discurren en la misma preparación de reacción, uno de los dos cofactores redox se produce en su forma reducida y el otro respectivo en su forma oxidada,

y
B) D-fructosa se convierte en derivados de furano y

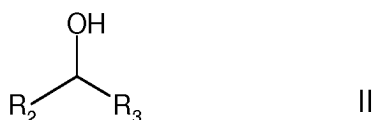
en el paso A)

- en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor reducido de nuevo en su forma oxidada original, se reduce oxígeno o un compuesto de fórmula general



en la que R_1 representa un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) de cadena lineal o de cadena ramificada o representa un grupo carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$),

y
- en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, se oxida un cicloalcanol ($\text{C}_4\text{-C}_8$) o un compuesto de fórmula general



5 en la que R₂ y R₃, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₆), siendo alquilo de cadena lineal o ramificado, alqueno (C₁-C₆), siendo alqueno de cadena lineal o ramificado y contiene de uno a tres dobles enlaces, arilo, en particular arilo C₆-C₁₂, carboxilo, o carboxialquilo (C₁-C₄), en particular también cicloalquilo, por ejemplo cicloalquilo C₃-C₈.

En otro aspecto, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, R₁ es un grupo alquilo C1-C4 sustituido o no sustituido, por ejemplo un grupo alquilo C1-C4 no sustituido.

10 En otro aspecto, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₆), siendo alquilo de cadena lineal o ramificado, alqueno (C₁-C₆), siendo alqueno de cadena lineal o ramificado y contiene de uno a tres dobles enlaces, arilo, en particular arilo C₆-C₁₂, carboxilo, o carboxialquilo (C₁-C₄).

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

20 Como "reacción/reacciones de oxidación" y "reacción/reacciones de reducción" se denominan en este caso aquellas reacciones redox catalizadas por enzimas, que no forman parte de la regeneración del cofactor y están implicadas en la formación del producto en un procedimiento de acuerdo con la presente invención. Las "reacción/reacciones de oxidación" y "reacción/reacciones de reducción" se agrupan bajo el término "reacciones de formación de producto". Las reacciones de formación de producto en un procedimiento de acuerdo con la presente invención incluyen en cada caso al menos una reacción de oxidación así como al menos una reacción de reducción.

25 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que la reacción de oxidación y la reacción de reducción discurren en paralelo en el tiempo.

30 Las enzimas y enzimas redox en un procedimiento de acuerdo con la presente invención incluyen oxidorreductasas. Las oxidorreductasas son enzimas, que catalizan reacciones redox. Las oxidorreductasas incluyen, por ejemplo, deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, catalasas.

35 La mención de un ácido o la sal de un ácido incluye en este caso el término no mencionado en cada caso. Asimismo incluye la mención de ácidos, en particular ácidos biliares, en este caso todos los ésteres derivados de los mismos. Además, en este caso (parcialmente), están incluidos compuestos provistos de grupos protectores en la denominación de las sustancias subyacentes.

40 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que como compuesto de la fórmula I se utiliza piruvato (de 2-oxoácido) (cosustrato redox), que se reduce a lactato por medio de una lactato deshidrogenasa, es decir, que en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor reducido de nuevo en su forma oxidada original, por medio de una lactato deshidrogenasa se reduce piruvato a lactato.

45 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que, como compuesto de fórmula II (cosustrato redox), se utiliza un alcohol secundario, en particular 2-propanol (alcohol isopropílico, IPA), que se oxida a acetona por medio de una alcohol deshidrogenasa, es decir, que en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, por medio de una alcohol deshidrogenasa se oxida 2-propanol a acetona.

50 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que como cosustrato redox se utilizan oxígeno, que se reduce por medio de una NADH oxidasa.

55 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que como cosustrato redox se utilizan un malato de alcohol secundario, que por medio de una malato deshidrogenasa oxalacetato-descarboxilante ("enzima malato") se oxida a piruvato y CO₂, por ejemplo, que en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, por medio de un malato deshidrogenasa se oxida malato a piruvato y CO₂.

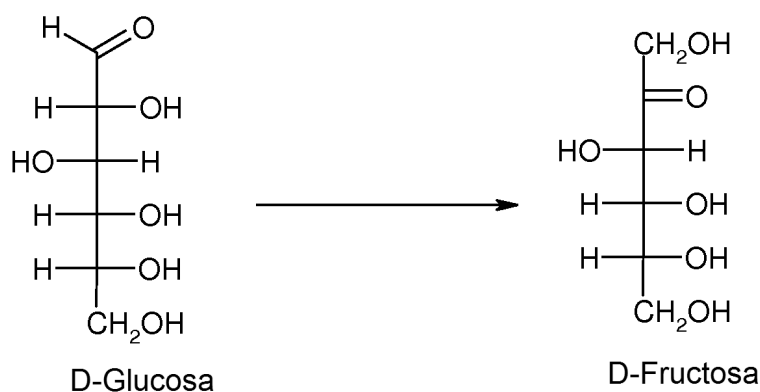
El piruvato generado se hace reaccionar en esta forma de realización en una reacción redox adicional, que no sirve para la formación de producto, sino que representa la segunda reacción de regeneración del cofactor.

60 Fuentes adecuadas de D-glucosa en un procedimiento según la presente invención incluyen, 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. Celulosa, que se usa en un procedimiento según la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, a partir de biomasa, preferentemente de biomasa lignocelulósica, tal como, por ejemplo, madera, paja, tal como paja de trigo, tallos de maíz, bagazo, sisal, plantas energéticas. Para la hidrólisis enzimática del almidón de maíz, pueden utilizarse, por ejemplo, amilasas. Para la escisión enzimática de sacarosa son adecuadas, por ejemplo, invertasas. Para la escisión enzimática de celulosa pueden emplearse, por

ejemplo, celulasas. Para la escisión no enzimática de los poliazúcares mencionados es adecuada por ejemplo una escisión catalizada por ácido.

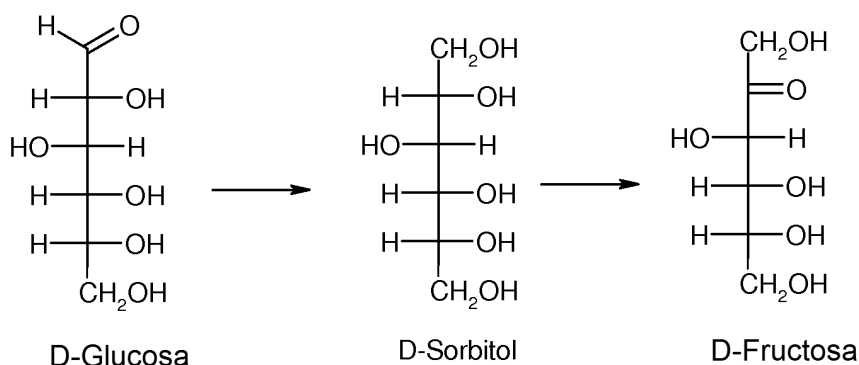
- El paso A) en un procedimiento de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en un sistema acuoso, al que se añade dado el caso un tampón. Tampones adecuados incluyen, por ejemplo, tampón de acetato, de fosfato de potasio, de Tris-HCl y de glicina, por ejemplo, con un valor de pH de 5 a 10,5, preferentemente de 6 a 10. Además, o como alternativa, pueden añadirse al sistema durante la reacción de D-glucosa para dar D-fructosa, iones para la estabilización de las enzimas, tales como, por ejemplo Mg^{2+} u otros aditivos tales como, por ejemplo, glicerol.
- 10 En un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el paso A) se convierte D-glucosa en D-fructosa de acuerdo con el esquema de reacción 1

Esquema de reacción 1



- 15 La presente invención se caracteriza por que en la conversión de D-glucosa en D-fructosa, en primer lugar se lleva a cabo una reducción catalizada enzimáticamente y a continuación una oxidación catalizada enzimáticamente. En un aspecto particular, la presente invención se caracteriza por que tiene lugar una isomerización de D-glucosa mediante reducción a D-sorbitol, que se oxida a D-fructosa, en particular según el siguiente esquema de reacción 2
- 20

Esquema de reacción 2



- 25 El procedimiento según la presente invención se caracteriza por que tanto la(s) reacción/reacciones de reducción como de oxidación para la conversión de D-glucosa en D-fructosa tienen lugar en la misma preparación de reacción sin aislamiento de productos intermedios.
- 30 Enzimas adecuadas para la reducción de D-glucosa a D-sorbitol son conocidas e incluyen, por ejemplo, xilosa reductasas, que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de *Candida tropicalis* o de *Candida parapsilosis*.
- Enzimas adecuadas para la oxidación de D-sorbitol a D-fructosa son conocidas e incluyen, por ejemplo, sorbitol deshidrogenasas, que pueden obtenerse, por ejemplo, de hígado de oveja, *Bacillus subtilis* o *Malus domestica*.
- 35 Una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que en la conversión de D-glucosa en D-fructosa se utiliza al menos una deshidrogenasa.

Tanto las enzimas, como los cofactores redox pueden emplearse a este respecto o bien en forma soluble o bien

inmovilizados sobre un soporte (sólido).

Enzimas redox, que son adecuadas para regenerar NAD^+/NADH y/o $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ son conocidas y habituales para el experto en la materia e incluyen, por ejemplo, deshidrogenasas.

5 En un procedimiento según la presente invención, en el paso A) se emplean tanto enzimas individuales como proteínas de fusión que comprenden dos enzimas redox.

10 Otra forma de realización particular del procedimiento según la presente invención se caracteriza por que las reacciones redox enzimáticas para la conversión de D-glucosa en D-fructosa son catalizadas por aquellas deshidrogenasas que usan los cofactores redox NAD^+/NADH y/o $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$.

15 A este respecto, NAD^+ designa la forma oxidada y NADH la forma reducida de dinucleótido de nicotinamida y adenina mientras que NADP^+ la forma oxidada y NADPH la forma reducida de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina. Una adición de cofactores redox no es necesaria en determinados casos, cuando las soluciones enzimáticas contienen ya los mismos en una concentración suficiente. En caso de que los cofactores redox NAD(P)^+ y/o NAD(P)H se añadan durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa, la concentración añadida en un procedimiento de acuerdo con la presente invención asciende habitualmente a de 0,001 mM a 10 mM, preferentemente de 0,01 mM a 1 mM.

20 Otras enzimas redox para la regeneración de los factores redox son conocidas por el experto en la materia e incluyen, por ejemplo, alcohol deshidrogenasas, NADH oxidasas, hidrogenasas, lactato deshidrogenasas o formiato deshidrogenasas.

25 Otra forma de realización particular del procedimiento según la presente invención se caracteriza por que NAD^+ se regenera durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa en la misma preparación de reacción por una NADH oxidasa.

30 Otra forma de realización particular del procedimiento según la presente invención se caracteriza por que NADPH se regenera durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa en la misma preparación de reacción por una alcohol deshidrogenasa.

35 Las NADH oxidasas y alcohol deshidrogenasas son conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, las alcohol deshidrogenasas incluyen aquellas de *Lactobacillus kefir*. Se pueden obtener NADH oxidasas adecuadas, por ejemplo de *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium aminovalericum*.

40 Otra forma de realización particular del procedimiento según la presente invención se caracteriza por que NADPH se regenera durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa en la misma preparación de reacción por la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*.

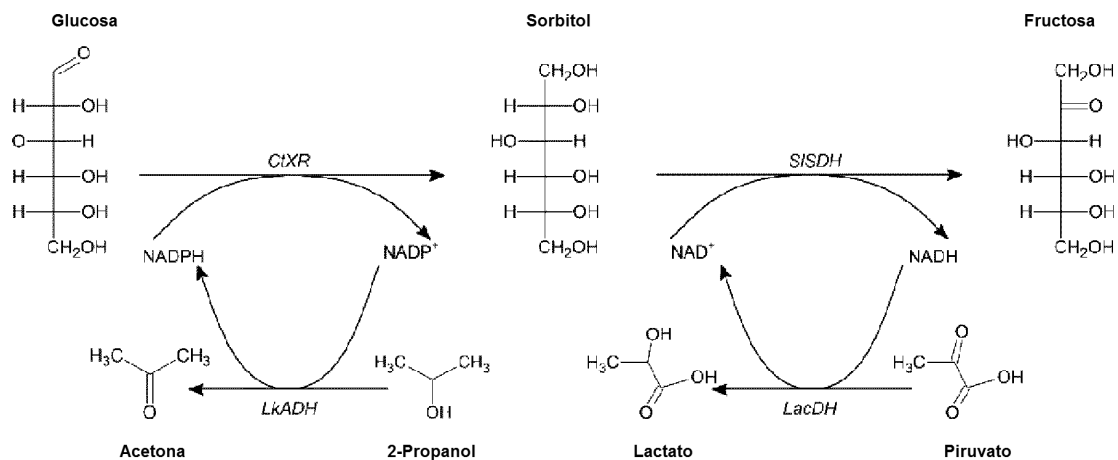
Para la regeneración de los cofactores redox, los cosustratos tienen que estar presentes y añadirse dado el caso.

45 Se denominan cosustratos las sustancias, que durante la regeneración de NAD^+/NADH y/o $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (u otros cofactores redox) se reducen u oxidan. Cosustratos adecuados en un procedimiento según la presente invención incluyen, por ejemplo, alcoholes (por ejemplo, 2-propanol), ácido láctico y sus sales, ácido pirúvico y sus sales, oxígeno, hidrógeno y/o ácido fórmico y sus sales.

50 Por ejemplo, NADPH puede regenerarse mediante la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir* con la adición del cosustrato 2-propanol (isopropanol), que se oxida a acetona.

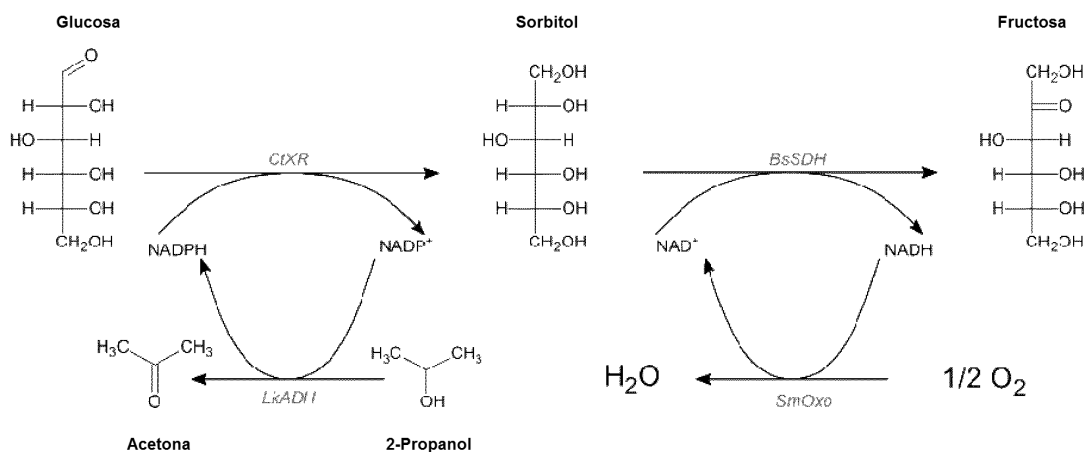
Posibles rutas de reacción para la conversión de D-glucosa en D-fructosa de acuerdo con un procedimiento según la presente invención se muestran en los siguientes esquemas de reacción 3 y 4:

Esquema de reacción 3



- 5 CtXR = xilosa reductasa de *Candida tropicalis*
- S1SDH = sorbitol deshidrogenasa del hígado de oveja
- 10 LkADH = alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*, dependiente de NADP(H)
- LacDH = lactato deshidrogenasa, dependiente de NAD(H)

Esquema de reacción 4



- 15 CtXR = xilosa reductasa de *Candida tropicalis*
- 20 BsSDH = sorbitol deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*
- LkADH = alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*, dependiente de NADP(H)
- SmOxo = NADH oxidasa de *Streptococcus mutans*

25 Se ha encontrado que en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, durante la conversión de D-glucosa en D-fructosa, puede utilizarse una alta concentración inicial de D-glucosa en la mezcla de reacción acuosa de $\geq 5\%$ (p/v) de D-glucosa, preferentemente $\geq 10\%$ (p/v) de D-glucosa, de manera especialmente preferentemente $\geq 15\%$ (p/v) de D-glucosa.

30 En otra forma de realización preferida, la D-glucosa en un procedimiento de acuerdo con la presente invención está

en la mezcla de reacción acuosa en una concentración de $\geq 5\%$ (p/v) de D-glucosa, preferentemente $\geq 10\%$ (p/v) de D-glucosa, de manera especialmente preferente $\geq 15\%$ (p/v) de D-glucosa, no debiendo superarse una concentración del 50% (p/v), preferentemente del 40% (p/v), de manera especialmente preferente del 35% (p/v).

- 5 Debido a la solubilidad dependiente de la temperatura de la D-glucosa, durante la realización del procedimiento, la concentración de glucosa ha de adaptarse a la temperatura de reacción respectiva.

Las enzimas pueden usarse como tal en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, 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 además preferentemente los lisados celulares correspondientes sin purificación adicional. En función de la enzima que va a producirse, pueden utilizarse también otros microorganismos para la expresión, por ejemplo, microorganismos que son conocidos por el experto en la materia. Los constituyentes sólidos de los microorganismos respectivos pueden o bien separarse en un procedimiento de acuerdo con la presente invención o bien utilizarse conjuntamente en la reacción (por ejemplo, biocatalizadores de células completas). Pueden utilizarse también sobrenadantes de cultivo o lisados de microorganismos, que sin tecnología de ADN recombinante presentan ya suficientes actividades enzimáticas. En un procedimiento de acuerdo con la presente invención, pueden utilizarse tanto enzimas como cofactores redox o bien en forma soluble o bien inmovilizados en sólidos. La unidad enzimática 1 U corresponde, a este respecto, a la cantidad de enzima que se necesita para hacer reaccionar $1\ \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto.

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que en un procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede lograr una alta conversión en la reacción de D-glucosa a D-fructosa, por ejemplo, una conversión de $\geq 70\%$ (p/v), tal como $\geq 90\%$ (p/v), por ejemplo $\geq 98\%$ (p/v) y hasta el $99,9\%$ (p/v), o incluso se puede lograr una conversión completa.

- 25 Dependiendo de las enzimas usadas, el procedimiento según la presente invención, por ejemplo en el paso A), puede llevarse a cabo a temperaturas de $10\ ^\circ\text{C}$ a $70\ ^\circ\text{C}$, preferentemente a temperatura ambiente, por ejemplo, de $20\ ^\circ\text{C}$, a $50\ ^\circ\text{C}$.

30 La D-fructosa, que puede obtenerse de acuerdo con el paso A) de la presente invención, puede aislarse por ejemplo, con ayuda de una cristalización.

El porcentaje de D-glucosa del 50% que se produce durante la escisión de sacarosa puede convertirse en D-fructosa con un procedimiento redox enzimático, de dos pasos, según la presente invención, produciéndose un aumento del porcentaje de D-fructosa en el contenido de azúcar total. Por lo tanto, un material de partida adecuado está disponible para su posterior conversión en derivados de furano, encontrándose sorprendentemente que el producto intermedio D-fructosa, que se obtiene según un procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede emplearse de manera especialmente adecuada para una conversión adicional en derivados de furano.

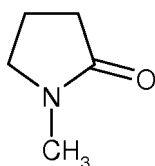
40 La reacción de la D-fructosa para dar derivados de furano en el paso B) de acuerdo con la presente invención puede tener lugar según un método adecuado, por ejemplo, según un método habitual, o tal como se describe en el presente documento.

45 De acuerdo con métodos habituales, la reacción de la D-fructosa para dar derivados de furano en un procedimiento de acuerdo con la presente invención puede tener lugar en presencia de un catalizador, por ejemplo, de un catalizador ácido, tal como un ácido inorgánico, ácido orgánico, por ejemplo ácido oxálico, de una zeolita (forma H), de iones de metal de transición, de un fosfato metálico disuelto heterogéneamente, de un intercambiador catiónico fuertemente ácido.

50 Como disolventes en tales procesos, puede usarse agua o un disolvente orgánico, por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona.

Preferentemente, la reacción de la D-fructosa para dar derivados de furano en el paso B) de acuerdo con la presente invención en presencia de un catalizador ácido y en presencia de N-metil-pirrolidona (N-metil-2-pirrolidona, NMP) de la fórmula

55



60 La reacción de la D-fructosa para dar derivados de furano en el paso B) de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo como proceso por lotes (discontinuo) o como proceso continuo.

En una forma de realización preferida, el paso B) de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo bajo

calentamiento por microondas.

5 Formas de realización particulares del procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracterizan por que, en la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano, se usa N-metil-2-pirrolidona (NMP) o bien como disolvente de reacción, o bien como codisolvente, en concreto como una mezcla con otro disolvente.

En una forma de realización particular de un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el paso b) se usa NMP como (co)disolvente, por ejemplo, como disolvente de reacción o una mezcla con otro disolvente.

10 En un procedimiento de acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza NMP como disolvente, NMP puede utilizarse como único disolvente, o NMP se usa junto con un codisolvente, pudiendo emplearse en el caso de usar un codisolvente, una concentración de NMP de hasta el 70 % (v/v), por ejemplo, hasta el 60 % (v/v) con respecto a la cantidad de disolvente total. Como codisolventes se tienen en cuenta, por ejemplo, agua o disolventes orgánicos, por ejemplo aquellos que se conocen del estado de la técnica, tales como N,N-dimetilsulfóxido (DMSO) o N,N-dimetilformamida (DMF).

20 En un procedimiento de acuerdo con el paso B) de la presente invención, la D-fructosa puede utilizarse en una cantidad de hasta el 40 % (p/v) y en general en una cantidad del 5 al 20 %, aunque la reacción discurre también a una concentración más baja, por ejemplo, en una concentración de D-fructosa de (aproximadamente) el 1 % (p/v). El valor mínimo está definido a este respecto por la rentabilidad y no químicamente.

25 Catalizadores ácidos en el paso B) en un procedimiento según la presente invención incluyen catalizadores ácidos habituales, que pueden utilizarse en la conversión de fructosa en derivados de furano. Preferentemente, el catalizador es un ácido de Brønsted. A este respecto, pueden usarse catalizadores ácidos homogéneos, por ejemplo, ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, o catalizadores ácidos heterogéneos, por ejemplo, resinas de intercambio catiónico tales como montmorillonitas, preferentemente montmorillonita KSF® o Amberlite, por ejemplo, Amberlite®, preferentemente Amberlite 15®. Además, en un procedimiento según la presente invención, pueden utilizarse catalizadores ácidos de Lewis, tales como CrCl₂, AlCl₃, SiO₂-MgCl₂ o un catalizador SILP (*silica supported ionic liquid phase*, (fase líquida iónica soportada en sílice)). En general, sin embargo, estos no proporcionan tan buenos resultados como los catalizadores mencionados anteriormente.

En otro aspecto, un procedimiento según la presente invención se caracteriza por que en la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano en el paso B) se emplea como catalizador ácido

- 35 - un catalizador ácido homogéneo, preferentemente ácido sulfúrico o ácido clorhídrico;
 - un catalizador ácido heterogéneo, preferentemente un intercambiador iónico, por ejemplo, una montmorillonita, tal como la montmorillonita KSF® o una Amberlite, tal como Amberlite®, preferentemente Amberlite 15®
 - un catalizador ácido de Lewis tal como CrCl₂, AlCl₃ o SiO₂-MgCl₂
 - un catalizador SILP,
 40 preferentemente un catalizador ácido homogéneo o heterogéneo.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de catalizador necesario en el paso B) mediante ensayos previos sencillos. La cantidad depende a este respecto del tipo de catalizador usado.

45 A modo de ejemplo, se indican a continuación las cantidades de catalizador con respecto a la cantidad de fructosa empleada, en particular en el caso de que se use NMP como disolvente:

Catalizador	Cantidad
HCl 1 N	del 20 al 200 % (v/p)
HCl (al 37%)	del 2 al 25 % (v/p)
H ₂ SO ₄ 1 N	del 20 al 200 % (v/p)
H ₂ SO ₄ conc.	del 2 al 25 % (v/p)
Montmorillonitas KSF®	del 1 al 50% (p/p)
Amberlite 15®	del 1 al 50% (p/p)
CrCl ₂ , AlCl ₃	del 1 al 20 % (p/p)
SiO ₂ -MgCl ₂	del 20 al 200 % (p/p)
SILP	10-200 % (p/p)

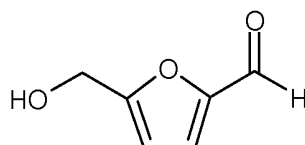
50 A este respecto, a una concentración de aproximadamente el 10 % (p/v) de D-fructosa, los valores indicados no son problemáticos, a concentraciones de fructosa más altas, la cantidad de los catalizadores debe ser limitada de modo que la fructosa pueda ser disuelta aún en la cantidad de disolvente restante.

El procedimiento en el paso B) de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo a temperaturas adecuadas. Temperaturas adecuadas incluyen, en particular cuando se usa NMP como disolvente, temperaturas de 100 a 220 °C, preferentemente de 115 a 200 °C, de manera especialmente preferente de 135 a 185 °C.

5 Las reacciones en el paso B) con el uso de NMP como disolvente se llevaron a cabo experimentalmente de forma general en recipientes cerrados (por lotes, microondas), sin control de presión activo. Desde las ejecuciones de microondas se puede aplicar como presión máxima en NMP aproximadamente 2-4 bar, fuertemente dependiente de los aditivos. Si, por ejemplo, se emplea HCl como catalizador, entonces la presión generada aumenta hasta 15 bar. En funcionamiento continuo, se aplicó una contrapresión constante para evitar la ebullición del disolvente, aproximadamente hasta 40 bar. La presión se genera o bien como presión de vapor de disolvente(s) o aditivos o bien se aplica una presión (de bombeo) sistémica. Para el mecanismo de reacción, la presión no parece decisiva.

10 Se ha encontrado que el derivado de furano generado principalmente en un procedimiento de acuerdo con la presente invención es hidroximetilfurfural (HMF) de la fórmula.

15

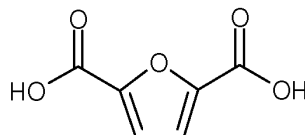


Hidroximetilfurfural (HMF)

20 En otro aspecto, un procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que el derivado de furano es hidroximetilfurfural.

En un procedimiento según la presente invención, por "selectividad de HMF" se entenderá aquella fracción de la D-fructosa consumida que se convierte en HMF.

25 Derivados de furano, que se producen con un procedimiento según la presente invención, pueden usarse o bien directamente o bien convertirse en productos secundarios en reacciones químicas adicionales. Por ejemplo, hidroximetilfurfural puede oxidarse adicionalmente para dar ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) de la fórmula.



Ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA)

30 Se sabe que FDCA es adecuado como monómero para la producción de polímeros, tales como, por ejemplo, poli(furanoato de etileno) (PEF), que puede emplearse de manera similar al poli(tereftalato de etileno) (PET), por ejemplo para cuerpos huecos, en particular botellas tales como botellas de bebidas, botellas para cosméticos o botellas para agentes de limpieza. Con el uso simultáneo de etilenglicol de fuentes regenerativas y FDCA, que es accesible desde HMF, producido en un procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede obtenerse PEF, que se compone prácticamente en su totalidad de materias primas renovables.

35 En otro aspecto, la presente invención se caracteriza por que los derivados de furano producidos se hacen reaccionar adicionalmente, por ejemplo, por que el hidroximetilfurfural se oxida adicionalmente para dar ácido 2,5-furanodicarboxílico, que dado el caso se somete a una polimerización, por ejemplo, para la producción de polímeros, tal como, por ejemplo poli(furanoato de etileno) (PEF).

40

Descripción de las figuras

Figura 1

45 Muestra resultados en la deshidratación de D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona con ácido sulfúrico como catalizador de acuerdo con el Ejemplo 5

Figura 2 y Figura 3

50 Muestran resultados en la deshidratación de D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona con ácido sulfúrico como catalizador - realización en el reactor de microondas de acuerdo con el Ejemplo 12

Figura 4 y Figura 5

Muestra resultados en la deshidratación de D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona con ácido clorhídrico como catalizador - realización en el reactor de microondas de acuerdo con el Ejemplo 13

5 Figura 6

Muestra resultados en la deshidratación de D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona con montmorillonita KSF® como catalizador - realización en el reactor de microondas de acuerdo con el Ejemplo 14

Figura 7

10 Muestra resultados en la deshidratación de D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona con ácido clorhídrico como catalizador - reacción en el reactor de flujo de acuerdo con el Ejemplo 15

Figura 8

15 Muestra una visión general de las condiciones probadas en la deshidratación de D-fructosa

Figura 9

Muestra una estructura de reacción esquemática para flujo detenido (*stopped flow*) reacciones de microondas y reacciones de flujo continuo (*continuous flow*) para la producción de derivados de furano a partir de D-fructosa

20 En los siguientes ejemplos, todos los datos de temperatura están en grados Celsius (°C).
Se usan las siguientes abreviaturas:

EtOAc	acetato de etilo
FDCA	ácido furanodicarboxílico
h	hora(s)
HMF	5-hidroximetilfurfural
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPA	alcohol isopropílico (2-propanol)
LS	ácido levulínico
MeOH	metanol
NMP	N-metilpirrolidona (N-metil-2-pirrolidona)
PET	poli(tereftalato de etileno)
PEF	poli(furanoato de etileno)
TA	temperatura ambiente
SILP	fase líquida iónica soportada
TFA	ácido trifluoroacético

Ejemplo 1

25 **Conversión de D-glucosa en D-fructosa por una xilosa reductasa y una sorbitol deshidrogenasa con el uso de una alcohol deshidrogenasa para reciclar el NADPH y una lactato deshidrogenasa para reciclar el NAD⁺**

30 Una preparación de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de D-glucosa y 6 U/ml de xilosa reductasa recombinante *Candida tropicalis* (sobrexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) y NADP⁺ 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor se añade el 7% (v/v) de IPA y 6 U/ml de alcohol deshidrogenasa recombinante *Lactobacillus kefir* (sobrexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)). Las enzimas se emplean en forma de lisado celular. La reacción tiene lugar durante 24 h a 40 °C y pH = 9 (tampón Tris-HCl 50 mM) con agitación continua (900 rpm) en un sistema abierto. El sistema abierto conduce a la eliminación de la acetona formada, lo que impulsa la reacción en dirección a la formación de D-sorbitol. En el sistema

35 abierto se evaporan asimismo agua e IPA, de modo que se dosifican posteriormente tras 6 h y 21 h. A este respecto, en cada caso, se ajusta de nuevo un volumen total de 0,5 ml así como una concentración de IPA del 7 % (v/v). Después de 24 h, el recipiente de reacción se incuba a 60 °C a vacío, para desactivar las enzimas y evaporar los disolventes orgánicos. Después de enfriar a TA, se añaden la D-sorbitol deshidrogenasa recombinante de *Bacillus subtilis* (sobrexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) en una concentración final de 5 U/ml, ZnCl₂ en una concentración final de 1

40 mM y NAD⁺ en una concentración final de 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor, se emplean 5 U/ml (concentración final) de lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (Sigma Aldrich) y piruvato 300 mM. La preparación se completa hasta 0,5 ml con agua. La reacción tiene lugar durante otras 24 h a 40 °C con agitación continua (900 rpm) en el sistema cerrado. Se consigue una conversión de D-glucosa en D-fructosa de > 90 %.

45 **Ejemplo 2**

Conversión de D-glucosa en D-fructosa por una xilosa reductasa y una sorbitol deshidrogenasa con el uso de una alcohol deshidrogenasa para reciclar el NADPH y una oxidadas para reciclar el NAD⁺

50 Una mezcla de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de D-glucosa, 6 U/ml de la xilosa reductasa recombinante de *Candida*

tropicalis (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) y NADP⁺ 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor se añade el 7% (v/v) de IPA y 6 U/ml de alcohol deshidrogenasa recombinante *Lactobacillus kefir* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)). Las enzimas se emplean en forma de lisado celular. La reacción tiene lugar durante 24 h a 40 °C y pH = 8 (tampón Tris-HCl 50 mM) con agitación continua (900 rpm) en un sistema abierto. El sistema abierto conduce a la eliminación de la acetona generada, lo que impulsa la reacción en dirección a la formación de D-sorbitol. En el sistema abierto se evaporan asimismo agua e IPA, de modo que se dosifican posteriormente tras 6 h y 21 h. A este respecto, en cada caso, se ajusta de nuevo un volumen total de 0,5 ml así como una concentración de IPA del 7 % (v/v). Después de 24 h, el recipiente de reacción se incuba a 60 °C a vacío, para desactivar las enzimas e IPA, así como evaporar la acetona generada. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añaden la D-sorbitol deshidrogenasa recombinante de *Bacillus subtilis* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)) en una concentración final de 5 U/ml, CaCl₂ en una concentración final de 1 mM y una mezcla (1:1) de NAD⁺ y NADH en una concentración final de 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor se emplean 10 U/ml (concentración final) de la NADH oxidasa de *Leuconostoc mesenteroides* (sobreeexpresada en *E. coli* BL21 (DE3)). Las enzimas se emplean en forma de lisado celular. La preparación se completa hasta 0,5 ml con agua. La reacción tiene lugar durante otras 24 h a 40 °C con agitación continua (900 rpm) en el sistema abierto, para garantizar un suministro de oxígeno suficiente para la NADH oxidasa del aire. En el sistema abierto a 40 °C el agua se evapora. Por lo tanto, se completa hasta 0,5 ml después de 6 h y 21 h con agua. Se consigue una conversión de D-glucosa en D-fructosa de aproximadamente > 98 %.

Ejemplo 3

Procesamiento y análisis de los azúcares

La preparación se incuba durante 10 minutos a 65 °C para desactivar las enzimas y a continuación se centrifuga. El sobrenadante se filtra entonces a través de un filtro de PVDF 0,2 µm y se analiza por medio de HPLC de intercambio de ligando (Agilent Technologies, Inc.). Los azúcares y los polioles se separan a este respecto a través de una columna de plomo de Showa Denko K.K. (Shodex® Sugar SP0810) con un flujo de 0,5 ml/min de agua (VWR International GmbH, Grado HPLC) a 80 °C. La detección tiene lugar por medio de un detector de refracción (RID, Agilent 1260 Infinity®, Agilent Technologies, Inc.). Se usa un filtro en línea de Agilent Technologies, Inc. y como precolumnas una columna de intercambio aniónico (Shodex® Axpak-WAG), una columna de fase inversa (Shodex® Asahipak® ODP-50 6E) y una precolumna de azúcar (SUGAR SP-G), en cada caso de Showa Denko K.K.

Ejemplo 4

Materiales y procedimientos para la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano

En el contexto de esta invención, las reacciones de deshidratación de D-fructosa para dar HMF se llevaron a cabo bajo distintas condiciones de reacción, opcionalmente como un procedimiento por lotes convencional, bajo calentamiento asistido por microondas o por medio de condiciones de "flujo continuo". La figura 8 muestra una visión general de las condiciones probadas. Sorprendentemente, se ha encontrado que NMP como disolvente en la reacción en comparación con los sistemas conocidos hasta ahora en combinación con catalizadores homogéneos o heterogéneos tanto en el procedimiento asistido por microondas como en condiciones de "flujo continuo" proporciona conversiones más altas.

Síntesis de SiO₂-MgCl₂

SiO₂-MgCl₂ se preparó siguiendo las instrucciones de Yasuda et al. (Yasuda, M.; Nakamura, Y.; Matsumoto, J.; Yokoi, H. Shiragami, T. Bull. Chem. Soc. Jpn. **2011**, 84, 416-418).

Síntesis de SILP

El catalizador SILP se preparó de manera correspondiente las instrucciones conocidas (Fu, S.-K.; Liu, S.-T. Synth. Commun. **2006**, 36, 2059-2067) con el uso de N-metilimidazol. Para la inmovilización, el líquido iónico obtenido se mezcló con 200 % en peso de gel de sílice en cloroformo seco (100 ml por 10 g de SiO₂) y se calentó a 70 °C durante 24 h. El sólido obtenido se separó por filtración, se lavó con cloroformo y se secó a presión reducida. El gel de sílice obtenido presentaba una carga de aproximadamente el 16 % en peso de catalizador.

Condiciones generales de reacciones por lotes

A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones por lotes se llevaron a cabo en frascos con tapa roscada de 4 ml. El calentamiento se llevó a cabo en bloques de aluminio adecuados hasta la temperatura deseada.

Reacciones de microondas en el procedimiento por lotes

Las reacciones de microondas se llevaron a cabo en el procedimiento por lotes en un microondas de laboratorio Biotage-Initiator Sixty, que estaba equipado con un automuestreador, para permitir ejecuciones de reacción secuenciales. El nivel de absorción se ajustó al valor máximo, mediante lo cual el suministro de energía máximo se reguló automáticamente a 400 W.

Reacciones de microondas de flujo detenido y reacciones de flujo continuo

Se llevaron a cabo reacciones de flujo detenido para optimizar un control de proceso semicontinuo en un sistema

CEM® Discover con CEM® Voyager Upgrade y por medio de un sensor de presión externo. Para las reacciones en el control de proceso continuo, ThalesNano® desarrolló un sistema de reactor X-Cube basado en cartuchos, equipado con un automuestreador Gilson® GX-271 para la recogida de producto automatizada. Dos cartuchos de arena de cuarzo (CatCart®, 70 x 4 mm) se incorporaron en este sentido como zona de reacción.

Como alternativa, se empleó un capilar de perfluoroalcoxicano (capilar PFA, 0,8 mm de diámetro interior, 1,6 mm de diámetro exterior), que estaba enrollado alrededor de un cilindro de aluminio calentable. Los sustratos se añadieron usando una bomba de HPLC Shimadzu LC-10AD en el caudal deseado. Se determinaron volúmenes exactos (columna 16,0 ml; volúmenes muertos antes y después de la columna, en cada caso 1,0 ml), en el que se siguieron los caudales definidos del disolvente puro con un cronómetro digital. La estructura de reacción está representada en la Figura 9.

Análisis de las reacciones para la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano

Para el análisis de HPLC cuantitativo, las muestras de las muestras de reacción (22 µl a menos que se indique lo contrario) se diluyeron con agua desionizada hasta a 1 ml. En el caso de muestras de reacción, que presentaban una concentración diferente, la dilución se adaptó de modo que la concentración máxima no supera 2 mg/ml.

A esta solución se añadieron 100 µl de alcohol 3-hidroxibencílico como patrón interno, con lo cual la muestra se mezcló completamente. Los residuos sólidos se separaron por medio de centrifugación (5 min, 20000 G) o filtración (Phenex PTFE, 4 mm, 0,2 micrones). La cuantificación tuvo lugar partiendo de las áreas de los picos en el espectro de RI en comparación con el patrón interno.

Las muestras se analizaron por medio de HPLC en un sistema Thermo Scientific® Surveyor Plus o un sistema Shimadzu® Nexera en cada caso equipado con PDA Plus y detector RI. Para la separación, como fase estacionaria se usó una columna de intercambio iónico de Phenomenex® (monosacáridos Rezex RHM H+ (8 %), 150 x 7,8 mm, formada por matriz reticulada de estireno sulfonado y divinilbenceno, forma H⁺) y una mezcla de eluyente de agua (grado HPLC) y TFA al 0,1% (grado HPLC) utilizada como eluyente. La temperatura de columna se mantuvo constante y a 85 °C, optimizándose el tiempo de ejecución a 25 minutos. La cuantificación de producto se llevó a cabo por medio de un patrón interno mediante integración de la señal RI. Por medio de PDA, se registraron adicionalmente las longitudes de onda de 200 nm, 254 nm y 280 nm para análisis de reacción adicionales.

GP1 - Deshidratación de D-fructosa en un procedimiento por lotes

En una reacción convencional para la optimización de reacción, se añadieron 100 mg de D-fructosa (0,56 mmol) y el catalizador respectivo en la cantidad deseada a un vial de vidrio y se añadió 1 ml de NMP recién destilada. La solución/suspensión obtenida se calentó hasta la temperatura seleccionada y se dejó reaccionar durante el tiempo deseado.

GP2 - Deshidratación de D-fructosa en el procedimiento por lotes de microondas

En una reacción convencional para la optimización de reacción, se añadieron 100 mg de D-fructosa (0,56 mmol) y el catalizador respectivo en la cantidad deseada en un recipiente de microondas (0,5 - 2,0 ml). El recipiente se equipó con un imán agitador y se llenó con 1 ml de NMP. La intensidad de radiación de microondas se ajustó automáticamente mediante un algoritmo de regulación patentado, para alcanzar la temperatura deseada. Se realizó un enfriamiento rápido del recipiente de reacción por medio de aire comprimido inyectado de al menos 6 bar.

GP3 - Deshidratación de D-fructosa en el procedimiento de flujo detenido de microondas

En una reacción estándar para la optimización de reacción, se cargaron una solución estándar de D-fructosa (1 ml; c = 100 mg/ml en NMP) y ácido clorhídrico (100 µl; c = 1 mol / l) en un recipiente para microondas y se dotó de un imán agitador. Después de sellar el vial con un tapón a presión, la solución se calentó a la temperatura deseada durante el tiempo deseado. Para provocar el calentamiento más rápido posible, la energía suministrada se ajustó de manera correspondiente a la siguiente Tabla 1.

Tabla 1
Ajuste de potencia del microondas y temperaturas asociadas

Temperatura	Ajuste de potencia	Temperatura	Ajuste de potencia
100 °C	50 W	180 °C	125 W
125 °C	65 W	200 °C	140 W
150 °C	100 W	220 °C	160 W

Se realizó un enfriamiento rápido del recipiente de reacción por medio de aire comprimido inyectado de al menos 6 bar.

GP4 - Deshidratación de D-fructosa en el sistema de reactor basado en cartucho

En una reacción estándar para la optimización de reacción, se mezcló una solución estándar de D-fructosa (1 ml; c = 100 mg/ml en NMP) con ácido clorhídrico (c = 1 mol / l) y se bombeó a través de una bomba de reactivo al sistema de reacción. Durante el proceso de calentamiento se tomaron varias muestras previas, para controlar una temperatura estable y un caudal estable. Como temperatura de reacción se seleccionaron 150 °C, 180 °C y 200 °C, regulándose la presión de reacción a 40 bar. Para ello, se seleccionaron caudales entre 0,2 y 0,6 ml/min. Se recogieron muestras

de reacción en cantidades de 2,5 ml y se analizaron.

Ejemplo 5

5 Uso de ácido sulfúrico como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Se compararon distintas temperaturas, tiempos de reacción y concentraciones de ácido. Las reacciones se llevaron a cabo según "GP1" (Ejemplo 4). Como catalizador se usó o bien 100 µl de ácido sulfúrico 1 N o bien 10 µl de ácido sulfúrico concentrado. En la tabla 2 están resumidos los resultados.

10

Tabla 2
Ácido sulfúrico como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Catalizador	Temperatura	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
EN H ₂ SO ₄	100 °C	3 h	69 %	45 %	65 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ 1 N	120 °C	4 h	95 %	77 %	81 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ 1 N	150 °C	15 min	98 %	88 %	90 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ 1 N	180 °C	10 min	100 %	85 %	85 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ conc.	120 °C	45 min	98 %	85 %	90 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ conc.	150 °C	10 min	100 %	90 %	90 %	< 1 %
H ₂ SO ₄ conc.	180 °C	5 min	100 %	82 %	82 %	< 1 %

15 La formación de polímeros negros insolubles y huminas no se observó en las condiciones óptimas usadas. Para analizar el curso de la reacción, se registró una serie temporal para una reacción representativa (H₂SO₄ conc., 150 °C, véase la Figura 1.

Ejemplo 6

20 Uso de cloruro de cromo (II) como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Tal como se describe por Zhao, H.; Holladay, J. E.; Brown, H.; Zhang, Z. C. Science **2007**, 316, 1597-1600, cloruro de cromo (II) puede emplearse como catalizador eficiente para la deshidratación de D-fructosa. En este ejemplo, se muestra el efecto de CrCl₂ en N-metil-2-pirrolidona. Los experimentos se llevaron a cabo según las instrucciones "GP1" (Ejemplo 4). Si bien se consiguieron rendimientos relativamente bajos de HMF, pudieron observarse cantidades significativas de compuestos alquitranados (Tabla 3).

25

Tabla 3
Cloruro de cromo (II) como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Cantidad de catalizador	Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
10 mg de CrCl ₂	100 °C	3 h	86 %	51 %	59 %	< 1 %
10 mg de CrCl ₂	150 °C	3 h	100 %	39 %	39 %	< 1 %

30

Ejemplo 7

Uso de montmorillonita KSF® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

35 Se incubaron 100 mg de D-fructosa con agitación en presencia de 1 ml de N-metil-2-pirrolidona (especificación "GP1", Ejemplo 4). Como tiempo de reacción se seleccionó uniformemente 3 horas. A este respecto se añadieron diferentes cantidades de montmorillonitas KSF® como catalizador. La Tabla 4 resume los resultados. En las mejores condiciones, pudo conseguirse un rendimiento de HMF del 61 % con una selectividad de HMF del 63 %.

40

Tabla 4
Montmorillonita KSF® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Catalizador	Temp.	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS	Alquitrán
1 mg	120 °C	37 %	11 %	31 %	< 1 %	no
3 mg	120 °C	54 %	20 %	38 %	< 1 %	no
5 mg	120 °C	65 %	30 %	46 %	< 1 %	no
7 mg	120 °C	73 %	32 %	44 %	< 1 %	no
10 mg	120 °C	80 %	41 %	52 %	< 1 %	no
20 mg	120 °C	90 %	43 %	48 %	< 1 %	no
40 mg	120 °C	94 %	43 %	46 %	< 1 %	no
1 mg	130 °C	31 %	11 %	35 %	< 1 %	no
3 mg	130 °C	73 %	35 %	48 %	< 1 %	no
5 mg	130 °C	87 %	46 %	53 %	< 1 %	no
7 mg	130 °C	92 %	50 %	55 %	< 1 %	no
10 mg	130 °C	94 %	49 %	52 %	< 1 %	no
20 mg	130 °C	96 %	54 %	57 %	< 1 %	no
40 mg	130 °C	97 %	54 %	55 %	< 1 %	sí
1 mg	140 °C	72 %	30 %	42 %	< 1 %	no
3 mg	140 °C	91 %	46 %	51 %	< 1 %	no
5 mg	140 °C	95 %	53 %	56 %	< 1 %	no
7 mg	140 °C	96 %	53 %	55 %	< 1 %	no
10 mg	140 °C	98 %	55 %	56 %	< 1 %	no
20 mg	140 °C	98 %	56 %	57 %	< 1 %	no
40 mg	140 °C	99 %	56 %	56 %	< 1 %	sí
1 mg	150 °C	94 %	44 %	46 %	< 1 %	no
3 mg	150 °C	96 %	52 %	54 %	< 1 %	no
5 mg	150 °C	98 %	56 %	57 %	< 1 %	no
7 mg	150 °C	98 %	57 %	59 %	< 1 %	no
10 mg	150 °C	98 %	58 %	59 %	< 1 %	sí
20 mg	150 °C	97 %	61 %	63 %	< 1 %	sí
40 mg	150 °C	97 %	61 %	63 %	< 1 %	sí

Ejemplo 8

5

Uso de Amberlite 15® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

10

Este ejemplo muestra el uso de un intercambiador iónico fuerte con restos de ácido sulfónico basados en una resina macrorreticulada. Se incubaron 100 mg de D-fructosa en presencia de 1 ml de N-metil-2-pirrolidona durante 3 horas a 100°C con agitación (especificación "GP1", Ejemplo 4). A este respecto se añadió Amberlite 15® como catalizador. En la Tabla 5 se muestra el resultado de este experimento. A diferencia de la montmorillonita KSF®, pudo conseguirse un mayor rendimiento a una temperatura relativamente baja. Se evitó la formación de compuestos alquitranados.

Tabla 5
Amberlite 15® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Cantidad de catalizador	Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
10 mg	100 °C	3 h	70 %	50 %	71 %	< 1 %

Ejemplo 9

5

Uso de SiO₂-MgCl₂ como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Dado que un complejo de gel de sílice-cloruro de magnesio mostró actividad catalítica en la deshidratación de hidratos de carbono en acetonitrilo (Yasuda, M.; Nakamura, Y.; Matsumoto, J.; Yokoi, H. Shiragami, T. Bull. Chem. Soc. Jpn. **2011**, 84, 416-418), este catalizador se probó para determinar su idoneidad en N-metil-2-pirrolidona. En condiciones de reacción como en "GP1" (Ejemplo 4), se consiguió en el mejor de los casos un rendimiento del 26 % de HMF (véase la Tabla 6). No obstante, si únicamente se usó gel de sílice, el rendimiento cayó por debajo del 1 %. A este respecto se observó la formación de grandes cantidades de compuestos alquitranados.

15

Tabla 6
SiO₂-MgCl₂ como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Cantidad de catalizador	Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
200 mg	150 °C	30 min	99 %	26 %	26 %	4 %

Ejemplo 10

Uso de AlCl₃ como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

AlCl₃ se probó como ejemplo de un catalizador ácido de Lewis en condiciones de reacción "GP1" (Ejemplo 4). Para esto se usó AlCl₃ recién sublimado. Se consiguieron resultados similares a los de Amberlite 15®. No obstante, el catalizador es sensible a la hidrólisis y, por lo tanto, no puede usarse para aplicaciones repetidas o en procedimientos continuos. También hubo mayores cantidades de compuestos alquitranados (véase Tabla 7 para los resultados).

25

Tabla 7
AlCl₃ como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Cantidad de catalizador	Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
10 mg	100 °C	3 h	100 %	50 %	50 %	< 1 %

Ejemplo 11

Uso de SILP combinados con cloruro de cromo (II) como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Usando las condiciones de reacción "GP1" (Ejemplo 4), se probó una combinación de CrCl₂ y SILP (*fase líquida iónica soportada en sílice*, véase el ejemplo 4). Después de 20 minutos, pudo conseguirse un rendimiento de casi el 50 % de HMF. No obstante, esto no podría aumentarse en tiempos de reacción más largos. Además, los tiempos de reacción más cortos indicaron una conversión de D-fructosa en D-glucosa (Tabla 8).

40

Tabla 8
SILP combinados con CrCl₂ como catalizador para la deshidratación de D-fructosa

Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de glucosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
120 °C	5 min	85 %	5 %	39 %	46 %	< 1 %
120 °C	10 min	94 %	3 %	45 %	48 %	< 1 %
120 °C	15 min	99 %	1 %	44 %	45 %	< 1 %
120 °C	20 min	97 %	2 %	49 %	51 %	< 1 %
120 °C	25 min	97 %	1 %	47 %	48 %	< 1 %

Temp.	Tiempo de reacción	Consumo de fructosa	Rendimiento de glucosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
120 °C	30 min	98 %	< 1 %	49 %	50 %	< 1 %
120 °C	45 min	99 %	< 1 %	48 %	49 %	< 1 %
120 °C	1 h	99 %	< 1 %	52 %	52 %	< 1 %

Ejemplo 12

Uso de ácido sulfúrico como catalizador para la deshidratación de D-fructosa (calentamiento por microondas)

5 Para lograr un mejor control sobre la fase de calentamiento y la fase de enfriamiento, así como la temperatura de reacción, se empleó un sistema de ajuste de temperatura basado en microondas. Usando N-metil-2-pirrolidona, se prepararon muestras como se describe en la especificación "GP2" (Ejemplo 4). En las condiciones de reacción usadas no se encontró formación de compuestos alquitranados. Pudo conseguirse un máximo de conversión completa de D-fructosa y un rendimiento del 83 % de HMF (Figuras 2 y 3).

Ejemplo 13

Uso de ácido clorhídrico como catalizador para la deshidratación de D-fructosa (calentamiento por microondas)

15 La deshidratación de D-fructosa se llevó a cabo en reactor de microondas de flujo detenido de acuerdo con la especificación "GP3" (Ejemplo 4). Fueron necesarias temperaturas más altas para lograr una conversión completa de D-fructosa. Mientras que a temperaturas más bajas, los tiempos de reacción más largos mejoraron el rendimiento de HMF, este disminuyó a temperaturas más altas al aumentar el tiempo de reacción (Figuras 4 y 5). Con la conversión completa de D-fructosa pudo conseguirse un rendimiento máximo del 89 % de HMF.

Ejemplo 14

Uso de montmorillonita KSF® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa (calentamiento por microondas)

25 Dado que con los procedimientos de microondas puede producirse un calentamiento/enfriamiento rápido y un muy buen control de la temperatura en el recipiente de reacción, el catalizador heterogéneo montmorillonita KSF® también se usó para deshidratar D-fructosa en N-metil-2-pirrolidona. Se usaron las condiciones de reacción según "GP2" (Ejemplo 4). El tiempo de reacción fue de 5 min. Aunque únicamente se lograron conversiones de D-fructosa y rendimientos de HMF relativamente bajos, pudo evitarse la formación de compuestos alquitranados (véase Tabla 9 para los resultados).

35 Tabla 9
Montmorillonita KSF® como catalizador para la deshidratación de D-fructosa (calentamiento por microondas)

Cantidad de catalizador	Temp.	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS	Alquitrán
5 mg	150 °C	51 %	20 %	39 %	< 1 %	no
7 mg	150 °C	61 %	26 %	43 %	< 1 %	no
10 mg	150 °C	64 %	30 %	46 %	< 1 %	no
15 mg	150 °C	76 %	38 %	50 %	< 1 %	no
20 mg	150 °C	82 %	43 %	52 %	< 1 %	no

40 Para encontrar las mejores condiciones de reacción, se probaron distintos tiempos de reacción usando 20 mg de catalizador a 150 °C (Figura 6).

Ejemplo 15

Uso de ácido sulfúrico para la catálisis de la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano (proceso continuo)

45 D-fructosa (10 % p/v) y ácido sulfúrico concentrado (1 % v/v) se disolvieron en N-metil-2-pirrolidona. La mezcla se bombeó a través del reactor con flujo continuo por medio de un capilar de PFA (temperatura de reacción 150 °C).

Después se desecharon los primeros 18 ml, se recogieron 10 ml adicionales para el análisis. A través de una serie de caudales, se probó el efecto de diferentes tiempos de residencia en el reactor (Tabla 10).

Tabla 10

5 **Ácido sulfúrico para la catálisis de la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano (proceso continuo)**

Caudal (ml/min)	Tiempo de permanencia	Consumo de fructosa	Rendimiento de HMF	Selectividad de HMF	Rendimiento de LS
0,8 ml/min	20 min	100 %	74 %	74 %	< 1 %
1,6 ml/min	10 min	100 %	75 %	75 %	< 1 %
3.2 ml/min	5 min	100 %	76 %	76 %	< 1 %

En las condiciones examinadas, no se observó formación de polímeros negros insolubles y huminas.

10 **Ejemplo 16**

Uso de ácido clorhídrico para la catálisis de la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano (proceso continuo)

15 En este ejemplo, se usó ácido clorhídrico como catalizador para la deshidratación de D-fructosa en NMP bajo flujo continuo (condiciones de reacción, véase la especificación "GP4", Ejemplo 4). Pudo conseguirse un rendimiento máximo del 75 % de HMF a una temperatura de reacción de 180 °C y un flujo de 0,6 ml/min. A este respecto se consiguió una selectividad del 76 % de HMF. Generalmente, el porcentaje de ácido levulínico (LS) fue inferior al 1 % (para los resultados véase la Figura 7).

REIVINDICACIONES

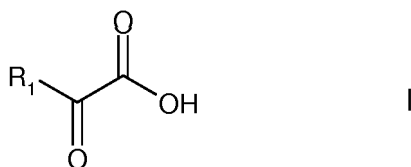
1. Procedimiento para la obtención de derivados de furano a partir de D-glucosa, caracterizado por que

5 A) D-glucosa se convierte en D-fructosa en un procedimiento enzimático con el uso y regeneración de cofactores redox, en el que D-glucosa se convierte en D-fructosa con la participación de dos o más oxidoreductasas en las reacciones de formación del producto, y en la conversión de D-glucosa en D-fructosa primero se lleva a cabo una reducción catalizada enzimáticamente a D-sorbitol seguido de una oxidación catalizada enzimáticamente de D-sorbitol a D-fructosa,

10 en el que como cofactores redox se usan NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ y como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente adicionales que discurren en la misma preparación de reacción, uno de los dos cofactores redox se produce en su forma reducida y el otro respectivo en su forma oxidada, y

15 B) D-fructosa se convierte en derivados de furano y en el paso A)

- en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor reducido de nuevo en su forma oxidada original, se reduce oxígeno o un compuesto de fórmula general



20 en la que R_1 representa un grupo alquilo (C_1-C_4) de cadena lineal o de cadena ramificada o representa un grupo carboxialquilo (C_1-C_4), y

- en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, se oxida un cicloalcanol (C_4-C_8) o un compuesto de fórmula general



30 en la que R_2 y R_3 , independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en H, alquilo (C_1-C_6), siendo alquilo de cadena lineal o ramificado, alqueno (C_1-C_6), siendo alqueno de cadena lineal o ramificado y contiene de uno a tres dobles enlaces, arilo, en particular arilo C_6-C_{12} , carboxilo, o carboxialquilo (C_1-C_4), en particular también cicloalquilo, en particular cicloalquilo C_3-C_8 .

35 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la conversión de D-glucosa en D-fructosa se emplea al menos una deshidrogenasa.

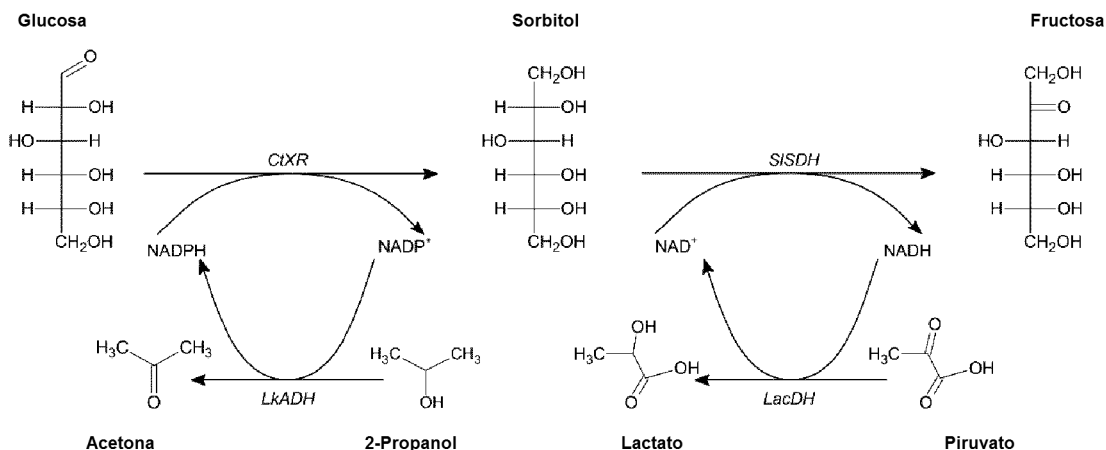
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que como cofactor(es) redox se emplean NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, o bien en forma soluble o bien inmovilizados sobre sólidos.

40 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que al menos un cofactor redox en la reacción de D-glucosa para dar D-fructosa en la misma preparación de reacción se regenera mediante al menos una enzima redox adicional, seleccionada de alcohol deshidrogenasas, NADH oxidasas, hidrogenasas, lactato deshidrogenasas o formiato deshidrogenasas con consumo de cosustratos.

45 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que los cosustratos se seleccionan de alcoholes, ácido láctico y sus sales, ácido pirúvico y sus sales, oxígeno, hidrógeno y/o ácido fórmico y sus sales.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la reacción en el paso a) transcurre según el esquema de reacción 3

50

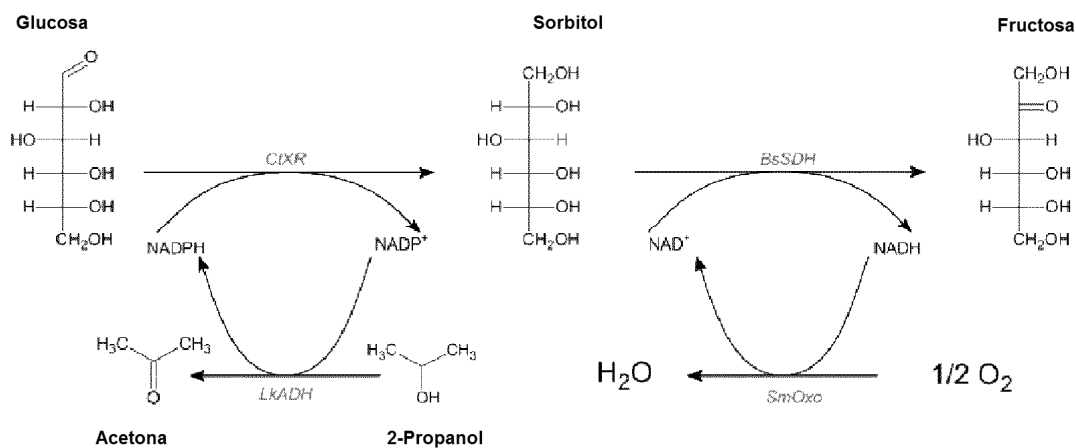


en el que

- 5
 CtXR = xilosa reductasa de *Candida tropicalis*
 SisDH = sorbitol deshidrogenasa del hígado de oveja
 LkADH = alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir*, dependiente de NADP(H)
 LacDH = lactato deshidrogenasa, dependiente de NAD(H),

o según el esquema de reacción 4

10



en el que

- 15
 CtXR = xilosa reductasa de *Candida tropicalis*
 BsSDH = sorbitol deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*
 LkADH = alcohol deshidrogenasa de *kefir de Lactobacillus* dependiente de NADP(H)
 SmOxo = NADH oxidasa de *Streptococcus mutans*.

7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se aísla la D-fructosa, que se obtiene de acuerdo con el paso A) de la presente invención.

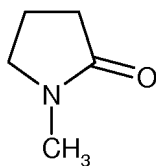
20

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que la D-fructosa se aísla en forma cristalizada.

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en el paso B) se emplean un catalizador ácido y un disolvente.

25

10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que como disolvente se emplea N-metil-2-pirrolidona de la fórmula



11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que se usa N-metil-2-pirrolidona o bien como disolvente de reacción o bien como codisolvente.

5 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la conversión de D-fructosa en derivados de furano en el paso B) se lleva a cabo como proceso por lotes o como proceso continuo.

10 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que la conversión de D-fructosa en derivados de furano en el paso B) se lleva a cabo bajo calentamiento por microondas.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado por que en la reacción de D-fructosa para dar derivados de furano en el paso B) como catalizador ácido se emplea

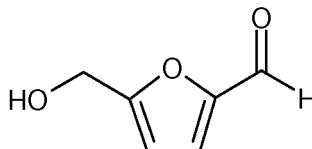
- 15
- un catalizador ácido homogéneo;
 - un catalizador ácido heterogéneo,
 - un catalizador ácido de Lewis,
 - un catalizador SILP.

20 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que como catalizador ácido homogéneo se emplea ácido sulfúrico o ácido clorhídrico.

25 16. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que como catalizador ácido heterogéneo se emplea un intercambiador iónico, en particular una montmorillonita o un Amberlite.

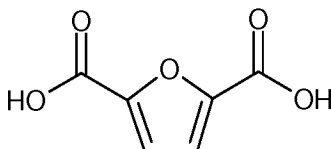
17. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que como catalizador ácido de Lewis se emplea CrCl_2 , AlCl_3 o $\text{SiO}_2\text{-MgCl}_2$.

30 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el derivado de furano es hidroximetilfurfural de la fórmula



35 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los derivados de furano producidos se hacen reaccionar adicionalmente.

20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado por que hidroximetilfurfural se oxida adicionalmente para dar ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) de fórmula



40 que dado el caso se somete a una polimerización, en particular para la producción de poli(furanoato de etileno).

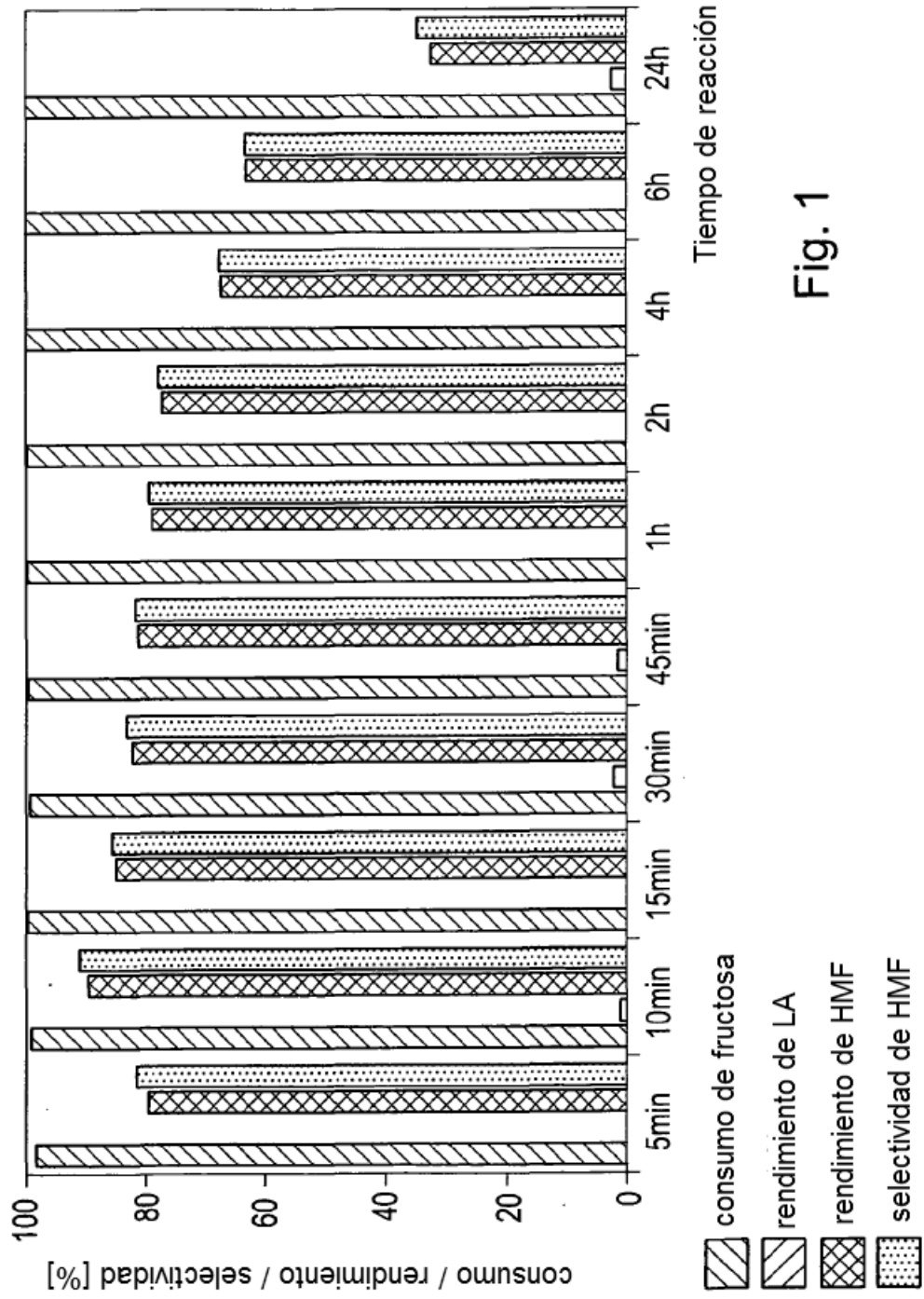


Fig. 1

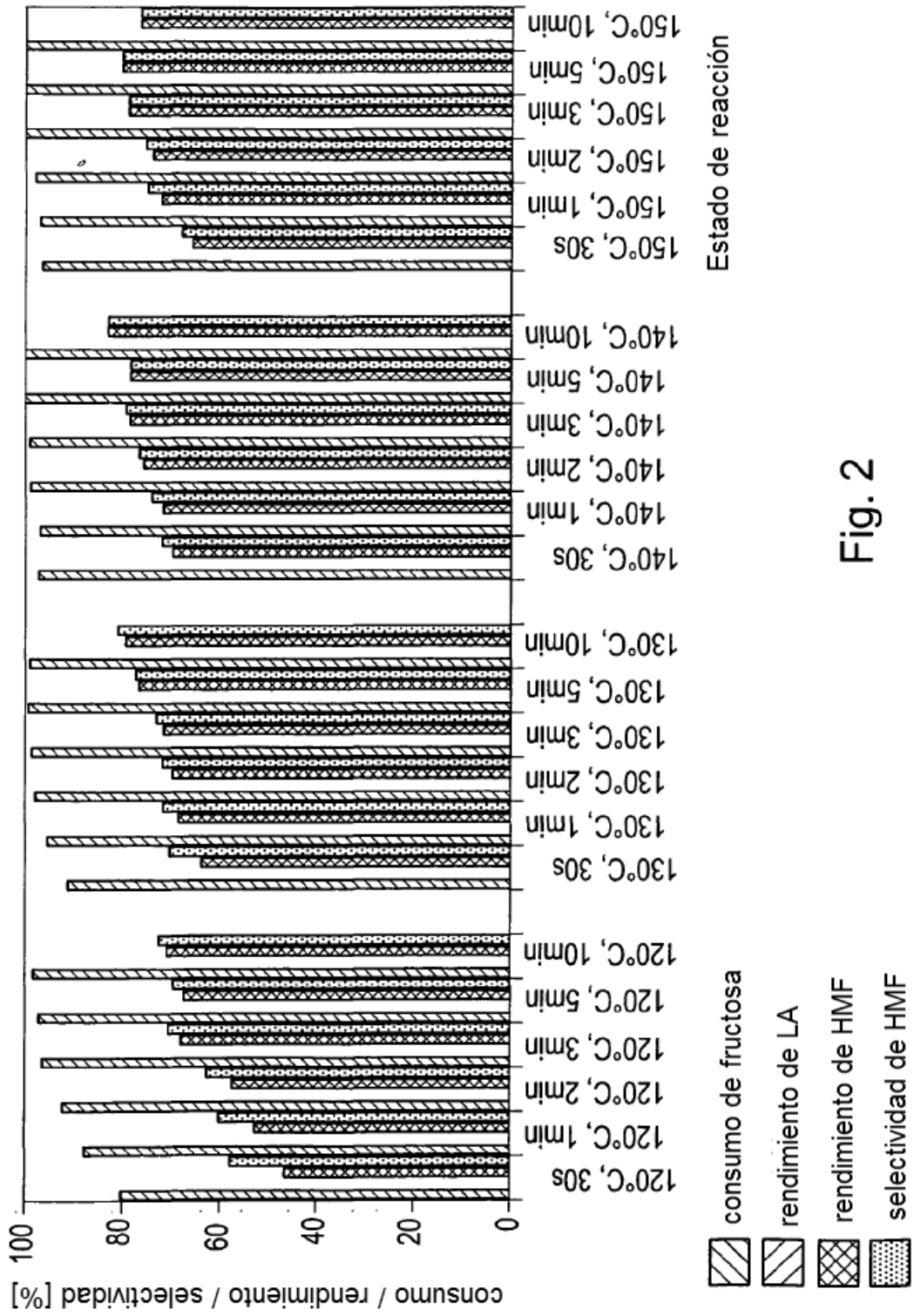
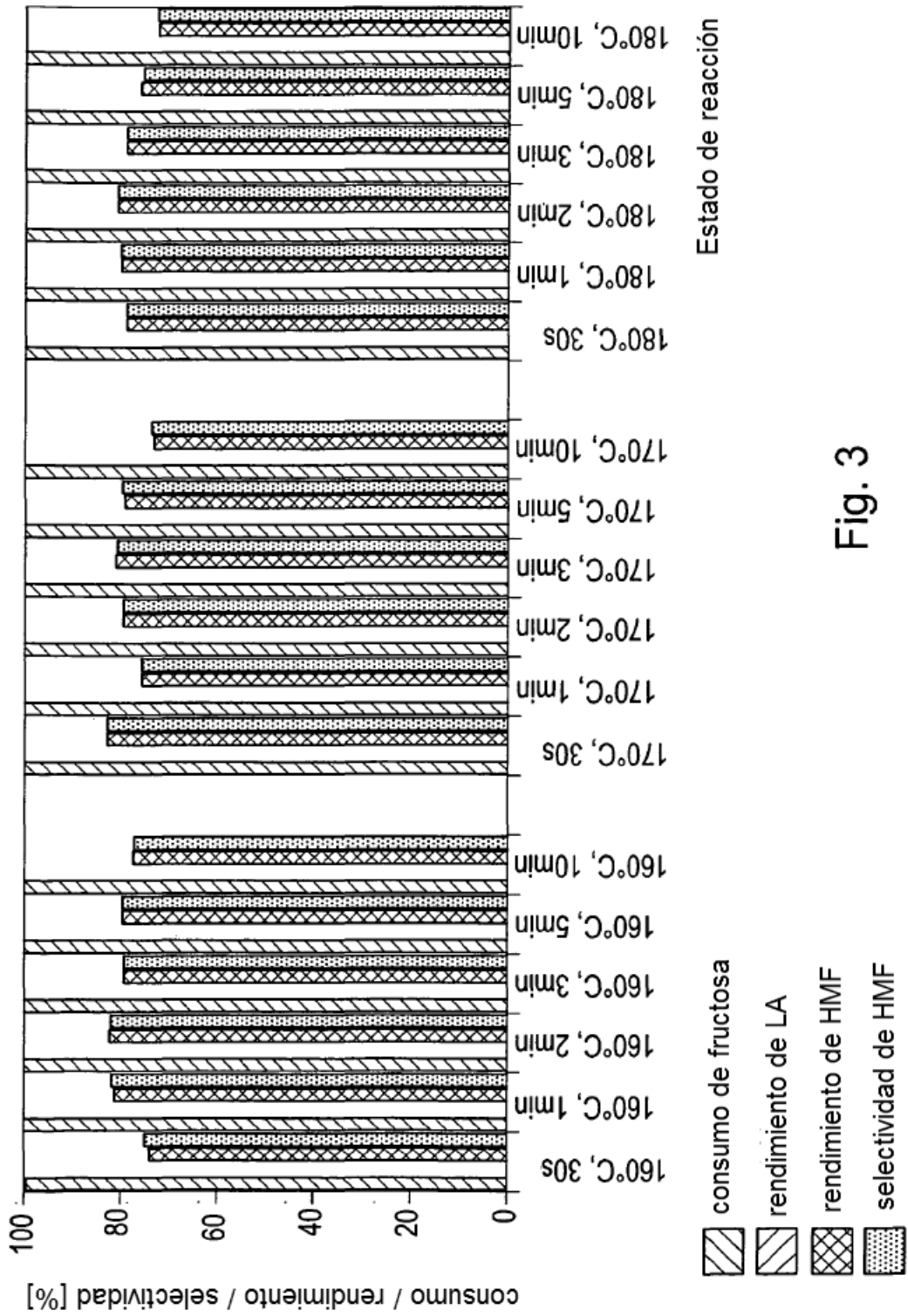


Fig. 2



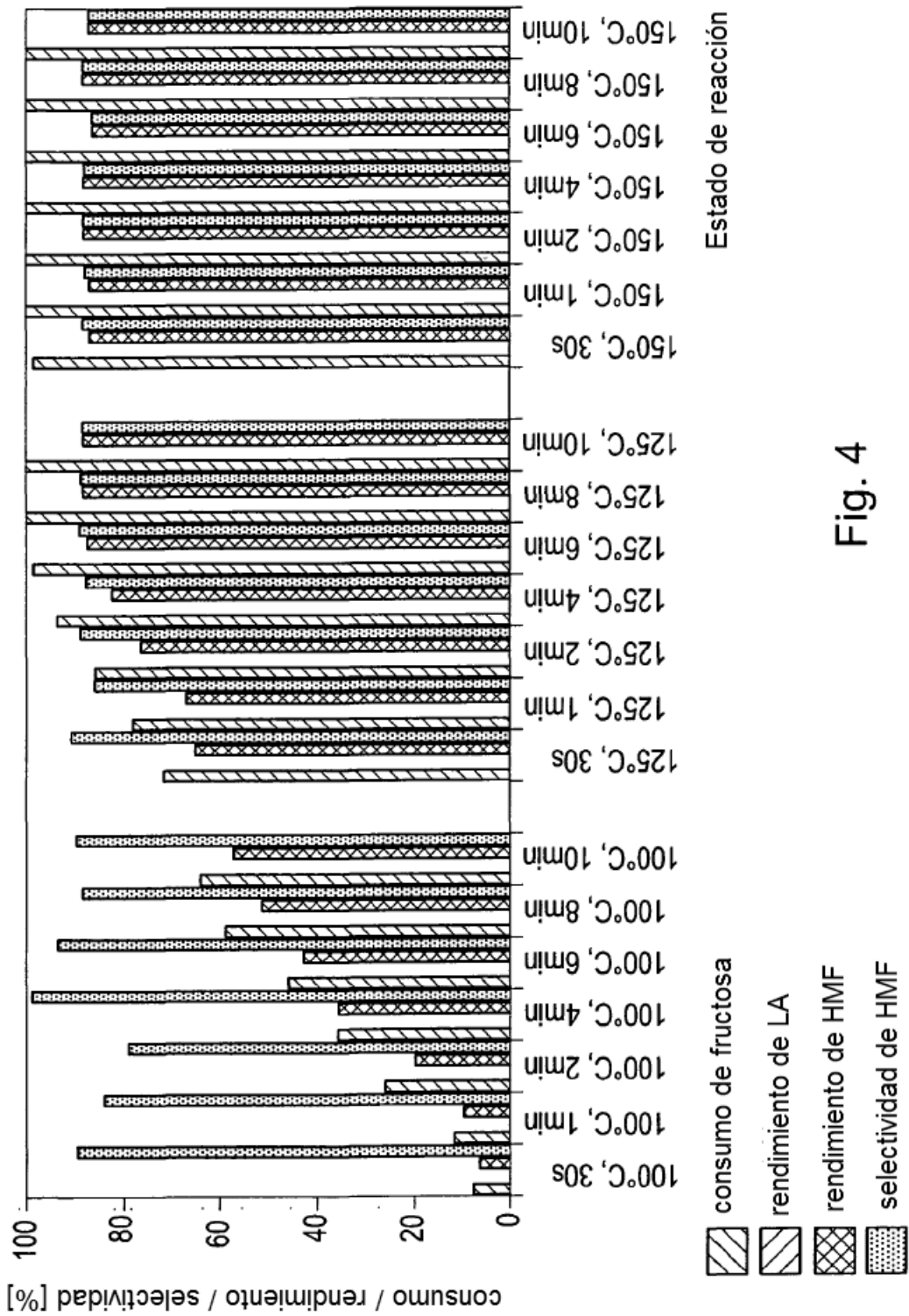


Fig. 4

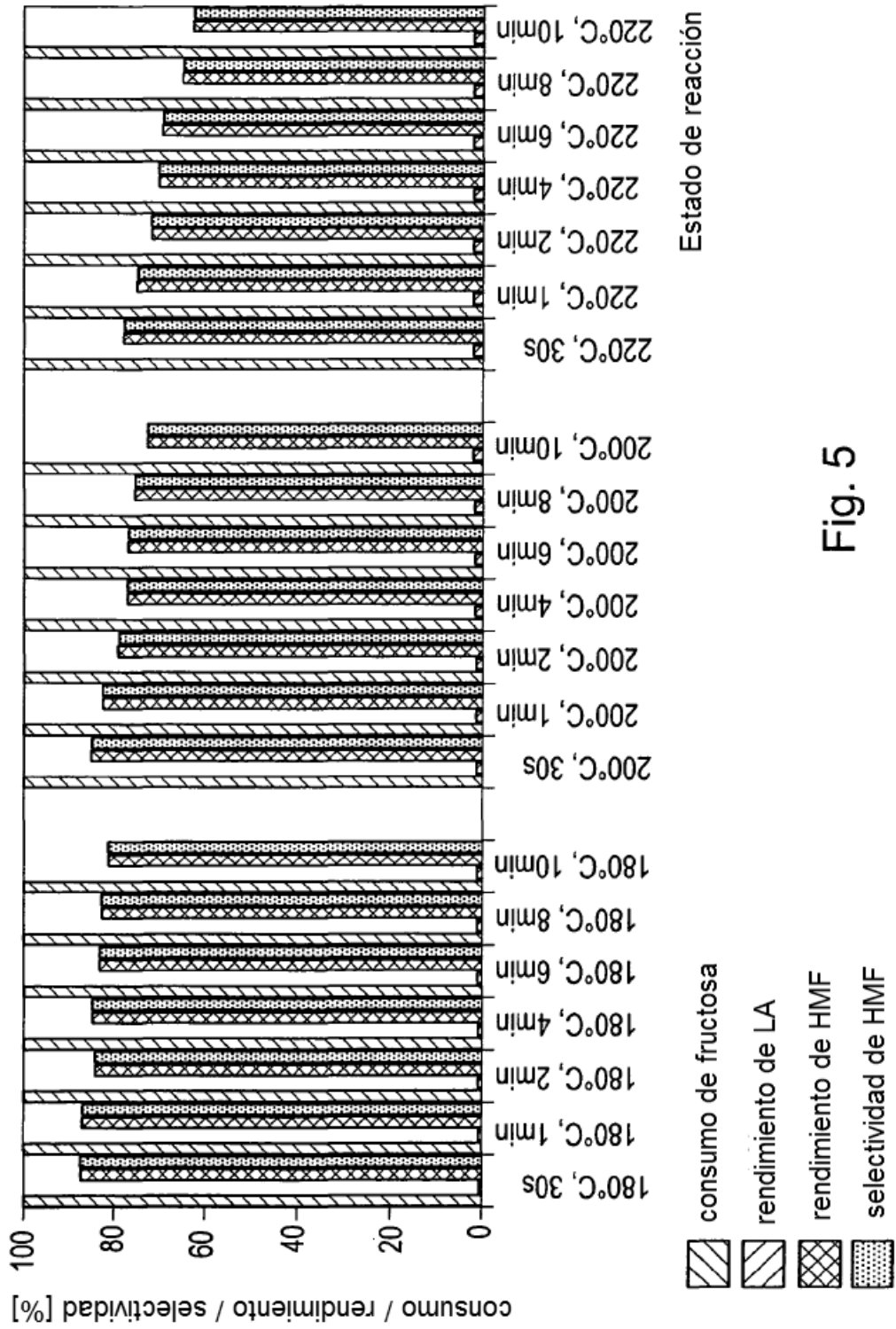


Fig. 5

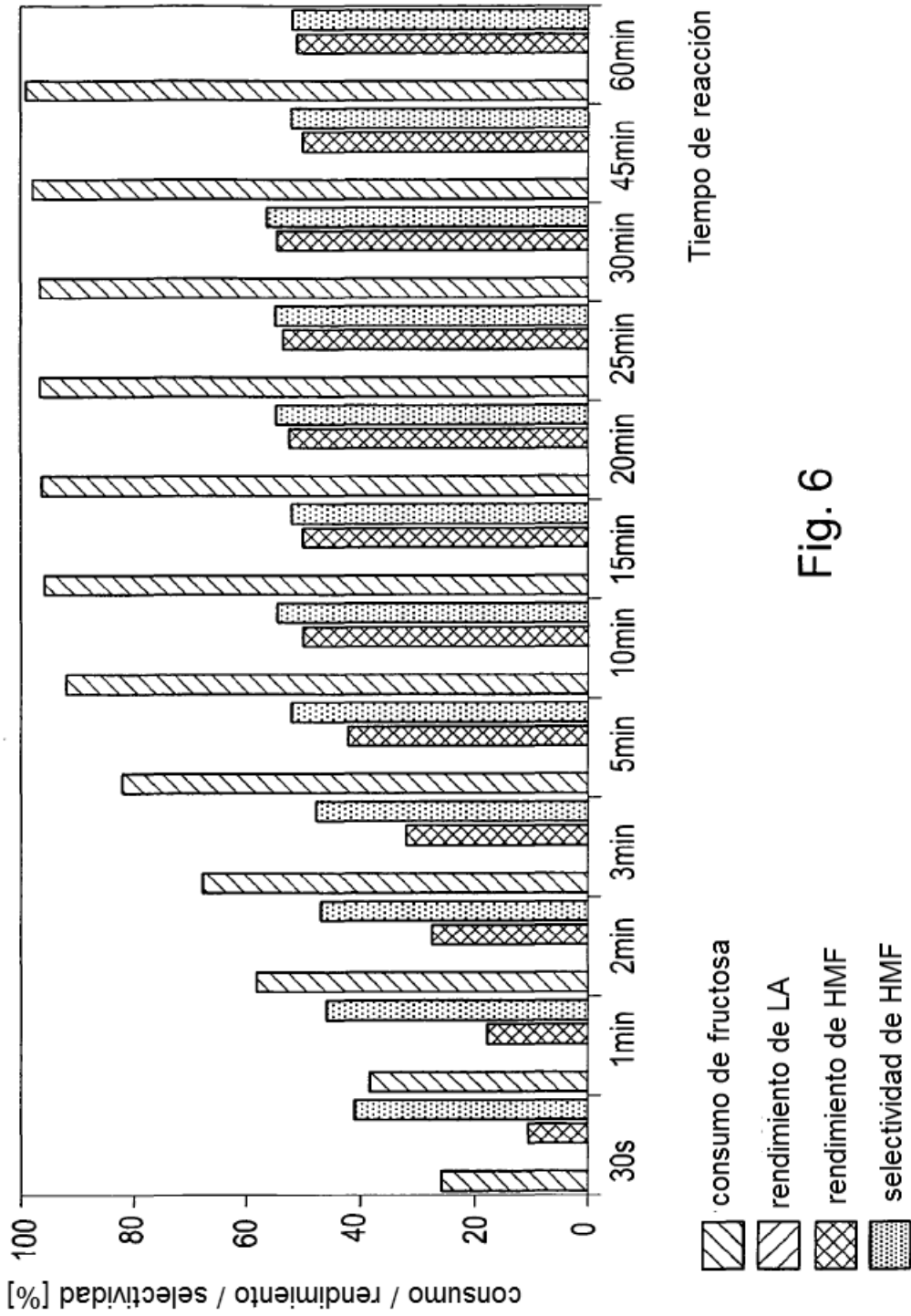


Fig. 6

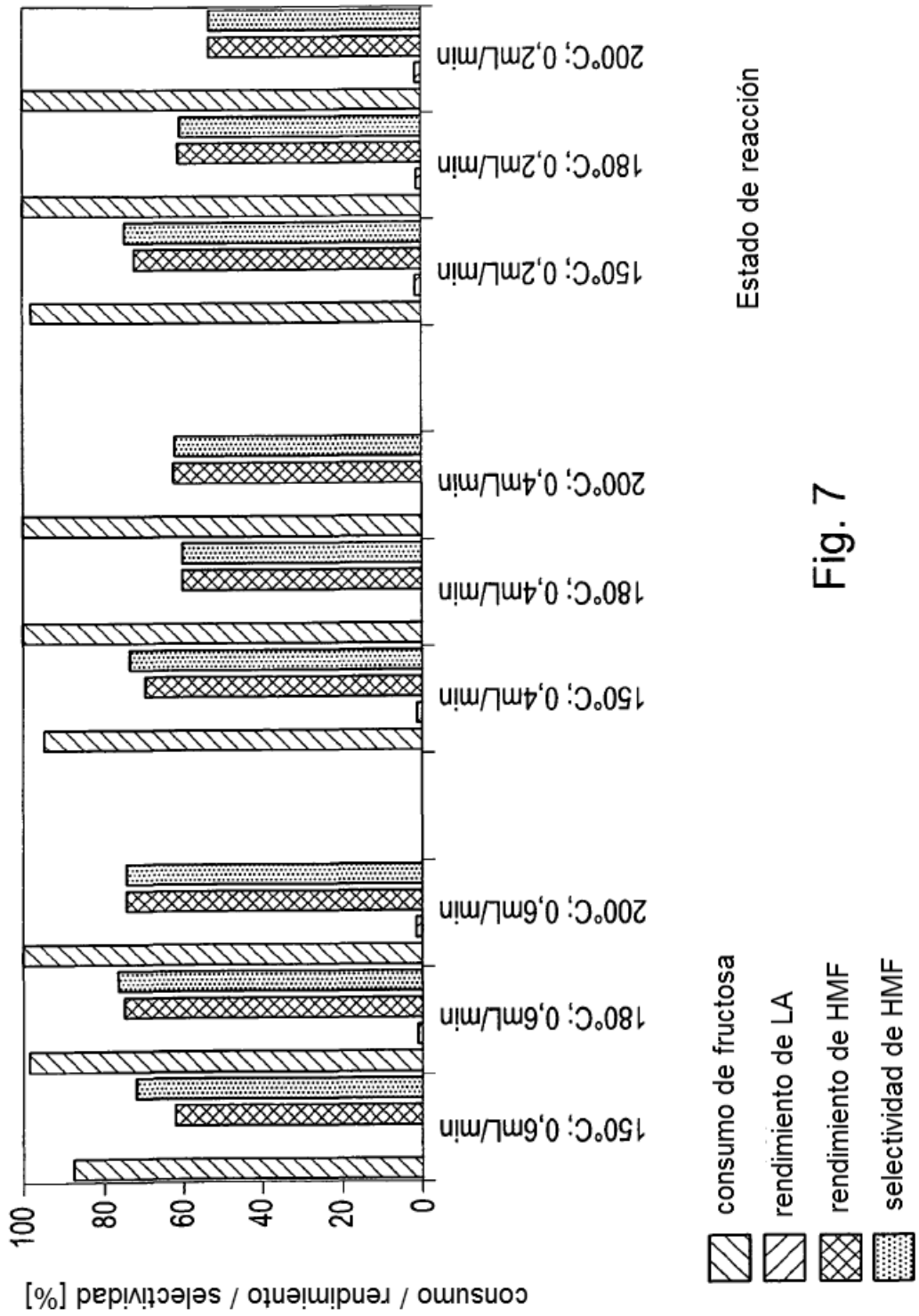


Fig. 7

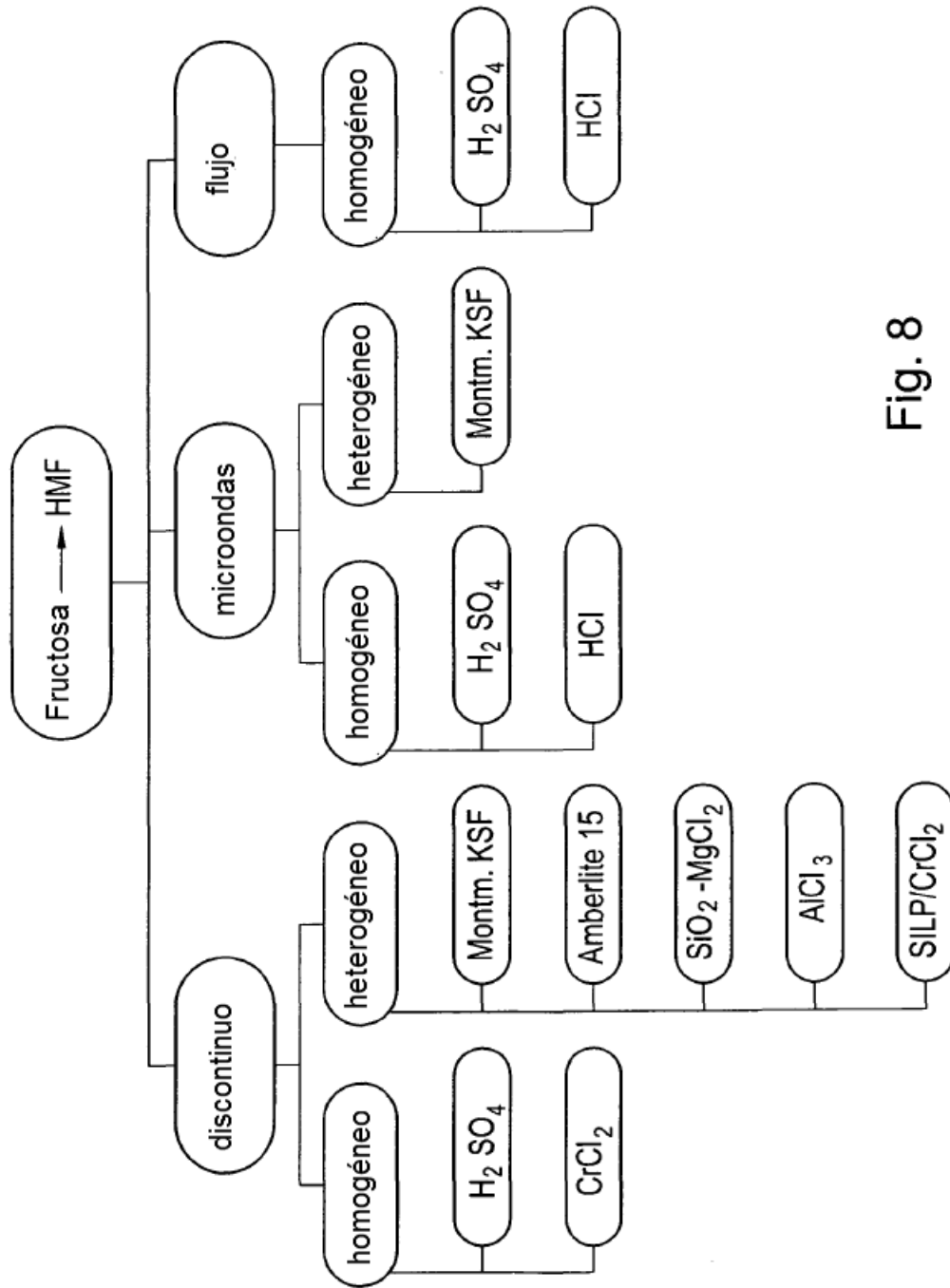


Fig. 8

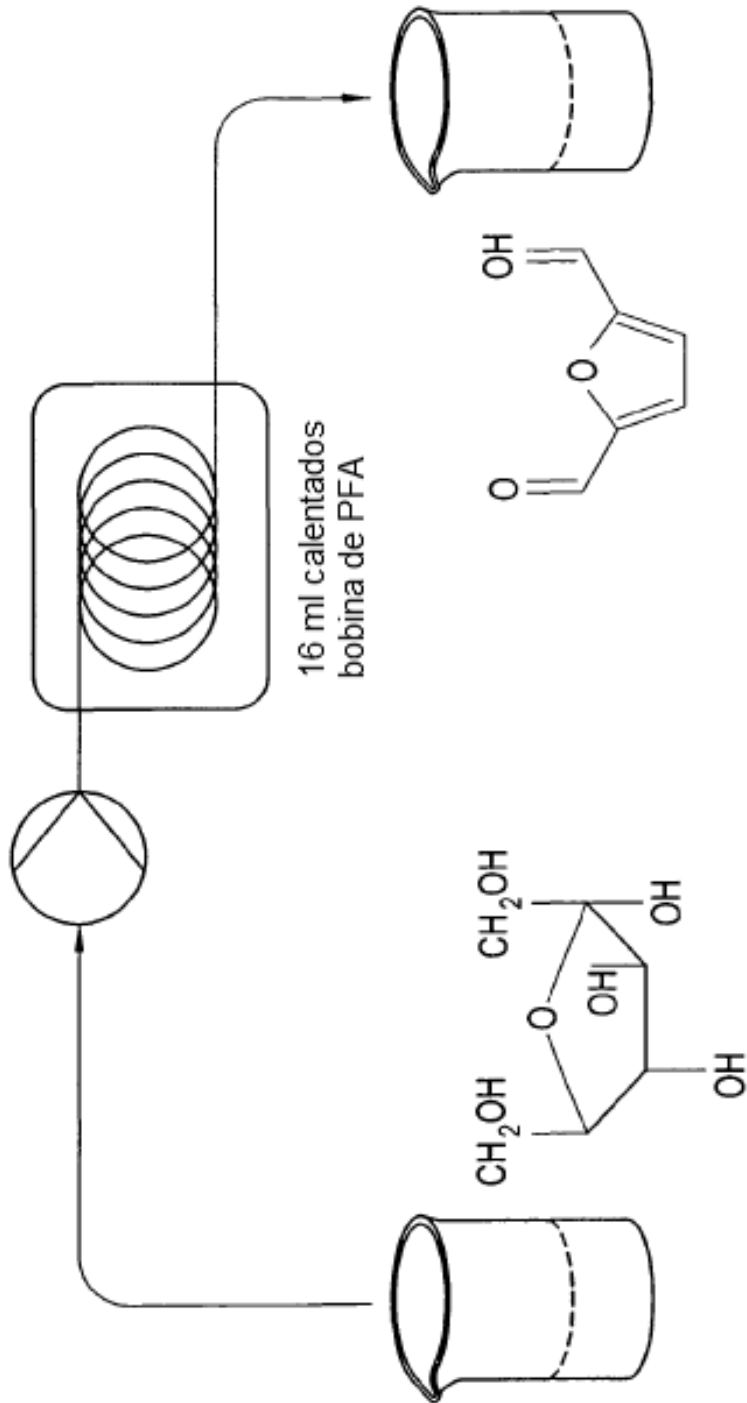


Fig. 9