

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6480416号
(P6480416)

(45) 発行日 平成31年3月13日(2019.3.13)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int. Cl.		F I
C 1 2 P	19/02	(2006.01)
C 1 2 P	17/04	(2006.01)
C 1 2 P	7/26	(2006.01)
C 1 2 P	7/02	(2006.01)
C 1 3 B	30/02	(2011.01)

C 1 2 P	19/02
C 1 2 P	17/04
C 1 2 P	7/26
C 1 2 P	7/02
C 1 3 B	30/02

請求項の数 28 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-504631 (P2016-504631)
(86) (22) 出願日	平成26年3月25日 (2014. 3. 25)
(65) 公表番号	特表2016-521121 (P2016-521121A)
(43) 公表日	平成28年7月21日 (2016. 7. 21)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055936
(87) 国際公開番号	W02014/154676
(87) 国際公開日	平成26年10月2日 (2014. 10. 2)
審査請求日	平成29年3月21日 (2017. 3. 21)
(31) 優先権主張番号	A50210/2013
(32) 優先日	平成25年3月27日 (2013. 3. 27)
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)

(73) 特許権者	511259474
	アニッキ ゲーエムペーハー
	ANNIKKI GMBH
	オーストリア共和国 8074 ラーバー
	グランバッハ, ドクトル アウナー シュ
	トラーセ 20/1
	Rankengasse 28a, A-8
	O2O Graz, Austria
(74) 代理人	230104019
	弁護士 大野 聖二
(74) 代理人	100119183
	弁理士 松任谷 優子
(74) 代理人	100114465
	弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルコースの異性化のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

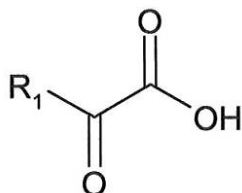
D - ソルビトールへの酵素触媒還元であって、この第 1 の酵素触媒生成物形成反応の結果として 2 つの酸化還元補因子 $NAD^+ / NADH$ および $NADP^+ / NADPH$ の一方がその酸化型として得られる還元と、

それに続く D - ソルビトールの D - フルクトースへの酵素触媒酸化であって、この第 2 の酵素触媒生成物形成反応の結果として 2 つの酸化還元補因子 $NAD^+ / NADH$ および $NADP^+ / NADPH$ の他方が還元型として得られる酸化と、による D - グルコースの異性化のための方法であって、

酸化還元補因子 $NAD^+ / NADH$ および $NADP^+ / NADPH$ が、生成物形成反応と同じ反応バッチで起こる 2 つの追加の酵素触媒酸化還元反応を含むワンポット反応で再生され、

a) 還元された前記補因子を元の酸化型に戻す再生反応において、酸素または一般式

【化 1】



I

10

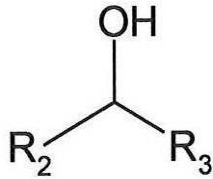
20

(式中、 R_1 は直鎖もしくは分枝状の (C_{1-4}) - アルキル基、もしくは (C_{1-4}) - カルボキシアルキル基である)

の化合物が還元され、

b) 酸化された前記補因子を元の還元型に戻す再生反応において、(C_{4-8}) シクロアルカノールまたは一般式

【化 2】



II

10

(式中、 R_2 および R_3 はそれぞれ独立して、アルキルが H、直鎖もしくは分枝状である (C_{1-6}) アルキル、アルケニルが直鎖もしくは分枝状でありかつ 1 ~ 3 個の二重結合を含有する (C_{2-6}) アルケニル、アリール、カルボキシルもしくは (C_{1-4}) カルボキシアルキル、シクロアルキルからなる群から選択される)

の化合物が酸化される

方法において、D - グルコースおよび D - フルクトースの混合物が出発原料として使用されることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

20

a) において、一般式 I (式中、 R_1 は置換または非置換の (C_{1-4}) アルキル基である) の化合物が還元され、b) において、一般式 II (式中、 R_2 および R_3 は独立して、H、アルキルが直鎖または分枝状である (C_{1-6}) アルキル、アルケニルが直鎖または分枝状でありかつ最大 3 個の二重結合を含有する (C_{2-6}) アルケニル、シクロアルキル、アリール、(C_{1-4}) カルボキシアルキル、化合物 I がビルベートの場合は更にカルボキシルからなる群から選択される) の化合物が酸化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

b) において、式 II (式中、 R_2 および R_3 は独立して、H、アルキルが直鎖もしくは分枝状である (C_{1-6}) アルキル、アルケニルが直鎖もしくは分枝状でありかつ 1 ~ 3 個の二重結合を含有する (C_{2-6}) アルケニル、アリール、カルボキシルまたは (C_{1-4}) カルボキシアルキルからなる群から選択される) の化合物が酸化される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

アリールが (C_{6-12}) アリールである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

シクロアルキルが C_{3-8} シクロアルキルである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

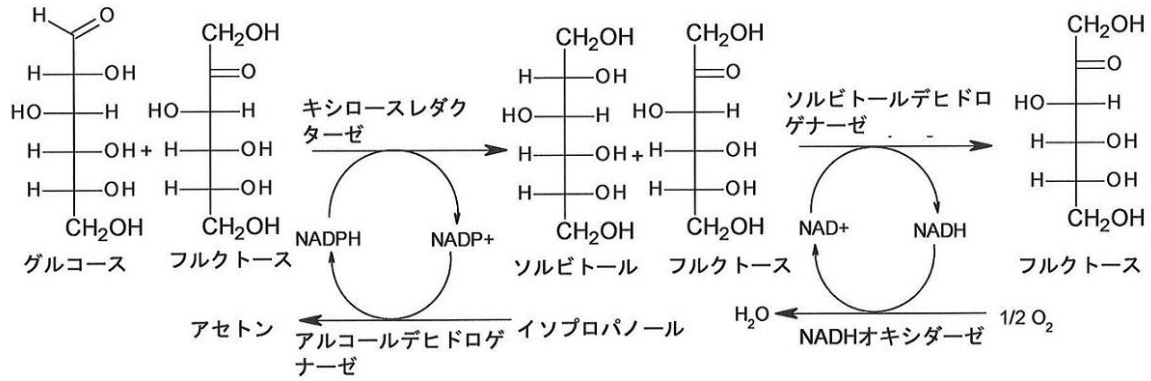
アリールが (C_{6-12}) アリールである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記反応が下記の反応スキーム 1

40

【化 3】



10

に従うことを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記生成物形成酸化反応および生成物形成還元反応が時間的に並行して起こることを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記生成物形成酸化反応および生成物形成還元反応が時間的に並行して起こらないことを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 10】

酸化された前記補因子 **NADP⁺** を元の還元型 **NADPH** に戻す再生反応において、アルコールデヒドロゲナーゼにより、2 - プロパノールがアセトンに酸化されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 11】

還元された前記補因子 **NADH** を元の酸化型 **NAD⁺** に戻す再生反応において、**NADH** オキシダーゼにより、酸素が水に還元されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記生成物形成に関与する前記酸化反応の基質が、反応バッチ中に濃度 5 % (w/v) 以上で存在することを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記生成物形成に関与する前記酸化反応の基質が、反応バッチ中に濃度 7 % (w/v) 以上で存在することを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 14】

前記生成物形成に関与する前記酸化反応の基質が、反応バッチ中に濃度 9 % (w/v) 以上で存在することを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 15】

得られる D - フルクトースが単離されることを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 16】

得られる D - フルクトースが、結晶化した形態で単離されることを特徴とする、請求項 1 または 7 に記載の方法。

40

【請求項 17】

D - グルコースおよび D - フルクトースの混合物からフラン誘導体を得る方法であって、

A) D - グルコースおよび D - フルクトースの混合物が、酵素法で、酸化還元補因子の使用および再生により D - フルクトースに変換されることであって、同じ反応バッチで起こる少なくとも 2 つの追加の酵素触媒酸化還元反応の結果、前記 2 つの酸化還元補因子 **NAD⁺ / NADH** および **NADP⁺ / NADPH** のうちの一方の酸化還元補因子が、還元型として得られ、他方の酸化還元補因子が酸化型として得られ、D - グルコースは 2 つ以上

50

の酸化還元酵素が関与することでD - フルクトースに変換され、前記2つ以上の酸化還元酵素は、

- D - グルコースのD - ソルビトールへの還元であって、この第1の酵素触媒生成物形成反応の結果として2つの酸化還元補因子 $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ および $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ の一方が酸化型として得られる還元と、
 - D - ソルビトールのD - フルクトースへの酸化であって、この第2の酵素触媒生成物形成反応の結果として2つの酸化還元補因子 $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ および $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ の他方が還元型として得られる酸化と、を触媒することと、
- B) A) で得られた前記D - フルクトースがフラン誘導体に変換されることとを特徴とする、方法。

10

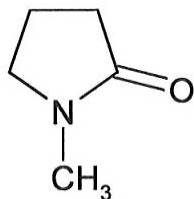
【請求項18】

段階B)において、酸性触媒と溶媒が使用される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

次式のN - メチル - 2 - ピロリドン

【化4】



20

が反応溶媒または共溶媒のいずれかとして使用されることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への前記変換が、バッチプロセスまたは連続プロセスとして実施されることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への前記変換が、バッチプロセスまたは連続プロセスとして実施されることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への前記変換が、マイクロ波加熱下で実施されることを特徴とする、請求項20に記載の方法。

30

【請求項23】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される酸性触媒が、

- 均一酸性触媒、
- 不均一酸性触媒、
- ルイス酸触媒、または
- S I L P触媒

であることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

40

【請求項24】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される前記酸性触媒が、硫酸または塩酸から選ばれる均一酸性触媒であることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される前記酸性触媒が、イオン交換体である不均一酸性触媒であることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

段階B)におけるD - フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される前記酸性

50

触媒が、モンモリロナイトまたはアンバーライトから選ばれる不均一酸性触媒であることを特徴とする、請求項 25 に記載の方法。

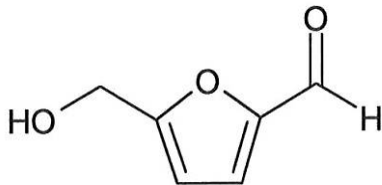
【請求項 27】

段階 B) における D - フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される前記酸性触媒が、 CrCl_2 、 AlCl_3 または $\text{SiO}_2 - \text{MgCl}_2$ から選ばれるルイス酸触媒であることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記フラン誘導体が、次式のヒドロキシメチルフルフラル

【化 5】



10

であることを特徴とする、請求項 17 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルコースの異性化ならびにフルクトースおよびグルコースの混合物中のフルクトースの富化のための方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

D - グルコースは、再生可能原料の一部である様々なバイオポリマー中に大量に存在している。その例は、デンプン（例えばコーンスターチ）またはセルロース（例えばリグノセルロースバイオマス）である。

【0003】

D - グルコースを D - フルクトースに変換する一般的な可能性は、D - グルコースを基質として受け取る、適切な D - グルコースイソメラーゼ、例えば D - キシロースイソメラーゼの使用により始まる。このような方法は、例えば US 2950228 から長い間知られており、また、例えば US 3616221 または US 3868304 に記載されるように、産業上の使用に適している。

30

【発明の概要】

【0004】

この場合の 1 つの課題は、一般に、最高でおおよそ 42% の D - グルコースが D - フルクトースに変換される可能性があることである。D - グルコースに対して D - フルクトースを更に富化することは、分離方法を通じてのみ達成可能である。従来、1 つの可能性は、例えば US 5221478 に記載されるように、クロマトグラフィ法の使用である。食物部門はしばしば、部分的な D - フルクトースの富化のみを求める。特に、比較的純粋 ~ 非常に純粋な D - フルクトースを製造するクロマトグラフィ法は、幾分手間が掛かる。

40

【0005】

イソメラーゼの使用に加えて、文献は炭水化物での酵素の酸化還元反応も記載する。

【0006】

例えば DE 69839381 は、D - ソルビトールを L - ソルビトールに変換するために使用され、アスコルビン酸の製造のために使用できるソルビトールデヒドロゲナーゼを記載している。

【0007】

DE 10247147 は、D - マンニトール - 2 - デヒドロゲナーゼの使用により、D - フルクトースを D - マンニトールに還元する方法を記載する。

【0008】

50

US 4 4 6 7 0 3 3 は、L - ソルビトールから L - フルクトースへの酵素酸化を記載している。

【0009】

D - キシロースからキシリトールへの還元の場合は、例えば、US 2 0 0 6 0 0 3 5 3 5 3、または Woodyer R.ら、FEBS J.、2005年、272巻、3816 ~ 3827 ページに開示されている。

【0010】

適切なキシロースレダクターゼを使用して、D - グルコースを D - ソルビトールに還元できることが示されている（例えば、Wang X.ら、Biotechnol. Lett.、2007年、29巻、1409 ~ 1412 頁）。

【0011】

ソルビトールデヒドロゲナーゼなどの糖酸化還元酵素は、診断目的のためにも使用される（例えば、DE 6 0 0 0 6 3 3 0）。

【0012】

これらの方法は、それぞれの生成物の形成のために、還元または酸化のいずれかが起こる、個別の酸化還元反応である。産業プロセスでは、酵素触媒酸化還元反応は、例えばキラルアルコール、 α -アミノ酸、および β -ヒドロキシ酸の製造で使用される。これまでに既知の産業プロセスは通常、生成物の合成のために酸化還元酵素を使用しており、また、補因子の再生のため、任意で別の酵素も使用している。これと対照的なのが、生成物の形成、および補因子再生に必要な任意の酵素反応に關与する2つ以上の酵素の酸化還元反応が、（同時にまたは順次）1つの反応バッチで、いずれの中間体も単離することなく実施される方法である。最近では、このような酵素カスケード反応 - 本明細書ではワンポット反応と呼ぶ - は、著しい注目を集めている。なぜなら、ワンポット反応が効果的に作業コスト、作業時間および環境影響を減少するためである。加えて、酵素の酸化還元反応のカスケードは、古典的な化学的方法によっては簡単に実行できない転換を可能にする。

【0013】

第二級アルコールのラセミ体の脱ラセミ化を、中間体としてプロキラルケトンを経由して、ワンポットシステムを使用して達成する試みが記載された（J. Am. Chem. Soc.、2008年、130巻、13969 ~ 13972 頁）。第二級アルコールの脱ラセミ化は、異なる補因子特異性を有する2つのアルコールデヒドロゲナーゼ（S - および R - 特異的）によって達成された。この方法の不利益は、使用される基質の濃度が、0.2 ~ 0.5 % と非常に低いことであり、これは産業目的には適さない。

【0014】

別のワンポットシステムが WO 2 0 0 9 / 1 2 1 7 8 5 に記載されており、ここでは光学活性な第二級アルコールの立体異性体がケトンに酸化された後、対応する光学対掌体に還元され、また逆の立体選択性および異なる補因子特異性を有する2つのアルコールデヒドロゲナーゼが使用された。補因子は、いわゆる「ハイブリッド転移システム」により、追加の酵素を1つだけ使用して再生された。補因子を再生するために、異なる酵素、例えばホルメートデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼなどが使用された。この方法の不利益は、使用される基質の濃度が低いことである。

【0015】

これとは対照的に、多数の個別の酵素の酸化還元反応が知られている。キラルなヒドロキシ化合物の製造の1つの代表的な適用は、対応するプロキラルケト化合物に基づく。この方法では、補因子は追加の酵素によって再生される。これらの方法は全て共通して、独立した還元反応を表し、NAD(P)Hを再生する（例えば、EP 1 1 5 2 0 5 4 参照）。

【0016】

キラルでエナンチオマー富化した有機化合物、例えばアルコールまたはアミノ酸の酵素製造の更なる例が記載されている（Organic Letters、2003年、5巻、3649 ~ 3650 頁；US 7 1 6 3 8 1 5；Biochem. Eng. J.、200

10

20

30

40

50

8年、39巻(2号)319~327頁; EP1285962)。これらのシステムでは、*Lactobacillus brevis*または*Lactobacillus sanfranciscensis*からのNAD(P)Hに依存するオキシダーゼが、補因子再生酵素として使用された。これらの試みは、生成物の形成のための個別の反応も表す。

【0017】

上述のように、別々に進行する酸化または還元反応は、ワンポット反応の利点、例えば時間および材料の減少による効率性を欠く。

【0018】

水溶液からフルクトースを単離することは、例えば、US4895601またはUS5047088に記載される方法により可能である。

10

【0019】

今日までに既知の全てのプロセスは、異なる不利益を有する。例えば、基質の初期濃度が低いこと、全体としての収率が低いことである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

驚くべきことに、グルコースからフルクトースへの異性化中に、より高いフルクトースの富化の達成の可能性が、今回見出だされた。

【0021】

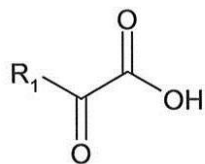
1つの態様では、本発明は、ソルビトールへの還元とそれに続くフルクトースへの酸化によるグルコースの異性化のための方法であって、酸化還元補因子NAD⁺/NADHおよびNADP⁺/NADPHがワンポット反応で再生され、同じ反応バッチで起こる少なくとも2つの追加の酵素触媒酸化還元反応(生成物形成反応)の結果、2つの酸化還元補因子のうち的一方が還元型として得られ、他方が酸化型として得られ、

20

a)還元された補因子を元の酸化型に戻す再生反応において、酸素または一般式

【0022】

【化1】



I

30

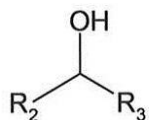
(式中、R₁は直鎖もしくは分枝状の(C₁~₄)-アルキル基、もしくは(C₁~₄)-カルボキシアルキル基である)

の化合物が還元され、

b)酸化された補因子を元の還元型に戻す再生反応において、(C₄~₈)シクロアルカノールまたは一般式

【0023】

【化2】



II

40

(式中、R₂およびR₃がそれぞれ独立して、H、アルキルが直鎖もしくは分枝状である(C₁~₆)アルキル、アルケニルが直鎖もしくは分枝状でありかつ1~3個の二重結合を含有する(C₂~₆)アルケニル、アリール、特に(C₆~₁₂)アリール、カルボキシルもしくは(C₁~₄)カルボキシアルキル、特にまたシクロアルキル、例えば、(C₃~₈)シクロアルキルからなる群から選択される)

の化合物が酸化される

方法において、グルコースおよびフルクトースの混合物が出発原料として使用されることを特徴とする、方法を提供する。

50

【0024】

本発明により提供される方法は、本明細書中において「本発明による(の)方法」とも呼ばれる。

【0025】

更なる態様では、本発明は、本発明による方法であって、a)において、一般式I(式中、 R_1 は置換または非置換の($C_1 \sim 4$)アルキル基である)の化合物が還元され、b)において、一般式II(式中、 R_2 および R_3 は独立して、H、アルキルが直鎖または分枝状である($C_1 \sim 6$)アルキル、アルキルが直鎖または分枝状でありかつ任意で最大3個の二重結合を含有する($C_2 \sim 6$)アルケニル、シクロアルキル、特に($C_3 \sim 8$)シクロアルキル、アリール、特に($C_6 \sim 12$)アリール、($C_1 \sim 4$)カルボキシアルキル、化合物Iがピルベートの場合は任意で更にカルボキシルからなる群から選択される)の化合物が酸化される、方法を提供する。

10

【0026】

更なる態様では、本発明による方法において、 R_2 および R_3 が独立して、H、アルキルが直鎖もしくは分枝状である($C_1 \sim 6$)アルキル、アルケニルが直鎖もしくは分枝状でありかつ1~3個の二重結合を含有する($C_2 \sim 6$)アルケニル、アリール、特に($C_6 \sim 12$)アリール、カルボキシルまたは($C_1 \sim 4$)カルボキシアルキルからなる群から選択される。

【0027】

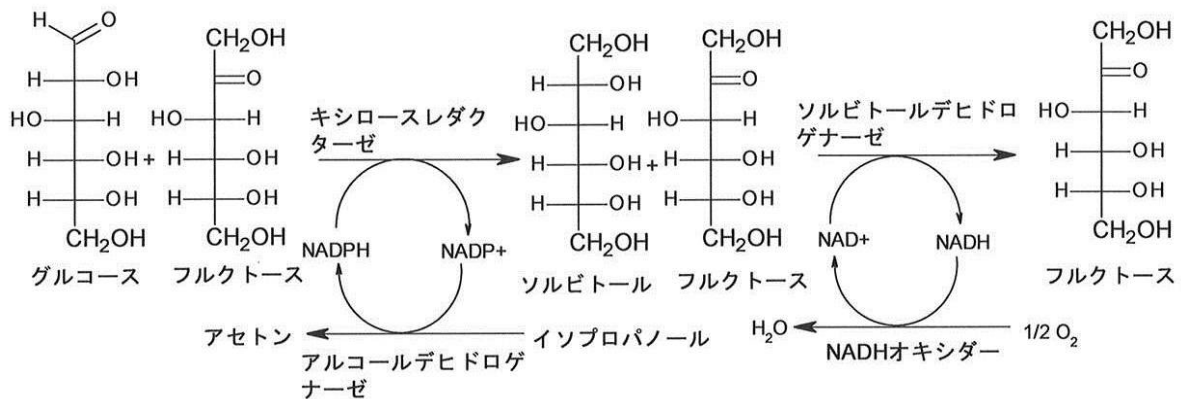
特定の態様では、本発明による反応は、以下の反応スキーム1に従って進行する。

20

【0028】

【化3】

反応スキーム1



30

【0029】

最新技術と比較して、本発明による方法は、化合物が酵素により酸化および還元される方法の大幅な改善といえる。その理由は、この方法が、1つの反応バッチで同時になされる必要な酸化および還元反応、ならびに対応する補因子再生反応で、最新技術による基質濃度よりも大幅に高い基質濃度の使用を可能にするからである。

40

【0030】

本発明による方法では、補因子NADHおよびNADPHが使用される。ここで、NAD+はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの酸化型を意味し、NADHはその還元型を意味するのに対し、NADP+はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソンの酸化型を意味し、NADPHはその還元型を意味する。

【0031】

本明細書で、用語「酸化反応」および「還元反応」は、補因子再生の一部でなく、本発明による方法で、生成物の形成に参与する酵素触媒酸化還元反応を意味する。「酸化反応」および「還元反応」は、まとめて「生成物形成反応」と呼ばれる。本発明による方法での生成物形成反応はそれぞれ、少なくとも1つの酸化反応および少なくとも1つの還元反

50

応を含む。

【0032】

NAD⁺が酸化反応のための補因子として使用される場合、NADPHが還元反応のための補因子である。NADP⁺が酸化反応のための補因子として使用される場合、NADHが還元反応のための補因子である。

【0033】

本発明による方法では、酸化反応および還元反応は、時間的に並行して、または時間的に並行せずに、すなわち順次、同じ反応バッチで実施され得る。

【0034】

本明細書では、基質は、生成物の形成を目的として使用される化合物を指す。本明細書では、補基質 (c o s u b s t r a t e) は、補因子再生中に変換される化合物を指す。

10

【0035】

本発明による方法では、いくつかの基質、すなわちグルコースおよびソルビトールが使用される。ここで、還元および/または酸化反応は、同じ基質 (分子骨格) で起こる。加えて、本発明による方法では、還元および酸化反応は、2つの異なる官能基で、分子骨格の異なる位置で起こる。

【0036】

本明細書では、「ワンポット反応」は、生成物の形成、および補因子再生のための2つの酵素のシステムに関与する2つ以上の酸化還元反応が、中間体を単離せずに、1つの反応バッチで起こる方法を指す。

20

【0037】

本明細書での酸または酸の塩の記述は、記述されないそれぞれの他の用語を含む。また、本明細書での酸の記述は、酸から誘導される全てのエステルを含む。加えて、(部分的に)保護基が設けられた化合物は、元となる物質の記述に含まれる。

【0038】

本発明の好ましい実施形態では、本発明による方法は、酸化反応および還元反応が、時間的に並行して起こることを特徴とする。

【0039】

本発明の好ましい実施形態では、本発明による方法は、酸化反応および還元反応が、同じ分子骨格で起こることを特徴とする。

30

【0040】

本発明の好ましい実施形態では、本発明による方法は、(第二級アルコール)2-プロパノール(イソプロピルアルコール、IPA)(補基質)が式IIの化合物として使用され、アルコールデヒドロゲナーゼによりアセトンに酸化され、これは酸化された補因子NAD(P)⁺を元の還元型NAD(P)Hに戻す再生反応で、アルコールデヒドロゲナーゼにより、2-プロパノールがアセトンに酸化されることを意味することを特徴とする。

【0041】

本発明の好ましい実施形態では、本発明による方法は、還元された補因子NAD(P)Hを元の酸化型NAD(P)⁺に戻す再生反応で、NADHオキシダーゼにより、酸素が水に還元されることを特徴とする。

40

【0042】

本発明による方法は、好ましくは水性システムで実施される。

【0043】

特定の実施形態では、本発明による方法は、フルクトースが反応バッチに基質として濃度少なくとも5%(w/v)以上、好ましくは7%(w/v)以上、最も好ましくは9%(w/v)以上、例えば5%(w/v)~20%(w/v)、例えば5%(w/v)~15%(w/v)、例えば5%(w/v)~12%(w/v)、例えば5%(w/v)~10%(w/v)で存在することを特徴とする。

【0044】

特定の実施形態では、本発明による方法は、生成物形成反応中に、70%以上、特に9

50

0%以上の全ターンオーバーが達成されることを特徴とする。

【0045】

本発明による方法では、緩衝液を水性システムに添加してもよい。適切な緩衝液は、例えば、pH値が5~10、好ましくは6~9のリン酸カリウム、トリスHCl、およびグリシンである。加えて、または代わりに、酵素を安定化するために、 Mg^{2+} などのイオンをシステムに添加してもよく、またはグリセロールなどの他の添加剤を添加してもよい。本発明による方法では、添加される補因子NAD(P)⁺およびNAD(P)Hの濃度は通常、0.001mM~10mMの間の範囲であり、好ましくは0.01mM~1mMの間の範囲である。

【0046】

使用される酵素によって、本発明による方法は、温度10~70、好ましくは20~45で行ってもよい。

【0047】

本発明による方法では、酵素は、任意で細胞溶解物の形態で、任意で組換え過剰発現蛋白質として、例えば、大腸菌(*E. coli*)で組換えにより過剰発現された蛋白質として使用してもよく、対応する細胞溶解物液は、好ましくは更に精製せずに使用してもよい。製造されるべき酵素によって、発現のために他の微生物、例えば当業者に既知の微生物も使用してもよい。それぞれの微生物の一体部分は、本発明による方法で、分離されてもよく、または同様に反応で使用してもよい(例えば、細胞全体の生体触媒(*whole-cell biocatalyst*))。微生物の培養上清または溶解液であって、DNA組換え技術なしに十分な酵素活性を既に有するものも、使用してもよい。本発明による方法では、酵素および酸化還元補因子は、可溶形態で使用してもよく、または固体に固定化してもよい。ここで、酵素単位1Uは、1分当たり1 μ molの基質を変換するために必要な酵素の量に対応する。

【0048】

本発明による方法では、酵素は好ましくは、大腸菌で組換えにより過剰発現された蛋白質として使用され、対応する細胞溶解物は、より好ましくは更に精製せずに使用される。

【0049】

可能性のある酵素は、特にグルコースをソルビトールに還元する酵素、ソルビトールをフルクトースに還元する酵素、およびNADHもしくはNADPHを還元できるか、またはNAD⁺もしくはNADP⁺を酸化できる酵素である。

【0050】

グルコースをソルビトールに変換できる酵素としては、例えば、キシロースレダクターゼなどのアルドースレダクターゼが挙げられる。適切なキシロースレダクターゼは、例えば、*Candida tropicalis*から得ることができる。

【0051】

ソルビトールをフルクトースに変換できる酵素としては、例えば、ソルビトールデヒドロゲナーゼが挙げられる。適切なソルビトールデヒドロゲナーゼは、例えば、羊の肝臓、*Bacillus subtilis*、または*Malus domestica*から得ることができる。

【0052】

アルドースレダクターゼは、グルコースの還元と同時に、酸化還元補因子NAD(P)HをNAD(P)⁺に酸化する。ソルビトールデヒドロゲナーゼは、ソルビトールの酸化と同時に、酸化還元補因子NAD(P)⁺をNAD(P)Hに還元する。

【0053】

酸化還元補因子NAD(P)HおよびNAD(P)⁺を再生するために、デヒドロゲナーゼ、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、またはオキシダーゼ、特にNAD(P)Hオキシダーゼを使用してもよい。

【0054】

適切なアルコールデヒドロゲナーゼは、例えば、*Lactobacillus kefir*

10

20

30

40

50

irから得ることができる。適切なラクテートデヒドロゲナーゼは、例えば、*Oryctolagus cuniculus*から得ることができる。適切なNADHオキシダーゼは、例えば、*Leuconostoc mesenteroides*、*Streptococcus mutans*、*Clostridium aminovalericum*から得ることができる。

【0055】

本発明による方法の出発原料は、グルコースおよびフルクトース、好ましくはD-グルコースおよびD-フルクトースの混合物である。このような混合物は、異なる方法で製造してもよい。

【0056】

例えば、出発原料としてグルコースを使用してもよく、グルコースを部分的にフルクトースに異性化してもよい。異性化は既知の方法、例えば、イオン交換樹脂を均一酸性触媒として使用することにより、または酵素により、例えば、グルコースイソメラーゼなどの固定化されたイソメラーゼの助けにより達成でき、グルコースイソメラーゼは例えば、*Streptomyces murinus*からのキシロースイソメラーゼである。

【0057】

好ましくは、グルコースおよびフルクトースの混合物は、固定化されたグルコースイソメラーゼの使用により、グルコースから製造される。

【0058】

グルコースの異性化は平衡反応であり、酵素反応中のグルコースとフルクトースとの間の化学平衡は、温度に依存する。これまで文献で見出だされた最大値は、出典によって、混合物中55%~58.9%のフルクトースである。しかし今のところ、最適化された技術的プロセスは、酵素量が少なく、かつ反応時間が短いために、おおよそ42%の値を使用する。より高い値は、今まで、より高い温度でのみ可能である。しかし、アセトンの90%の異性化も記載されている。ここで、フルクトースの最大60%の変換が達成される。しかし、ここで必要な酵素は、これらの反応条件下で、あまり安定ではない。

【0059】

対照的に、本発明による、フルクトースをソルビトール経由でグルコースに変換するための2つの酸化還元反応は、適切な補因子リサイクルシステムにより、大いに生成物へと押し進められる。

【0060】

本発明による方法の出発混合物は、好ましくは、フルクトース部分が最大55重量%、例えば10重量%~55重量%、例えば20重量%~50重量%、例えば23重量%~45重量%、例えば25重量%~43重量%に達する混合物である。

【0061】

本発明による方法の段階a)、すなわちグルコースからソルビトールへの変換では、存在するグルコースの少なくとも80%、例えば少なくとも90%、特に、少なくとも95%が、ソルビトールに還元され得ることが示された。例えば、出発混合物中に存在するグルコースの80%~99.99%、例えば90%~99.95%、例えば95%~99.9%が変換され得る。

【0062】

加えて、本発明による方法の段階b)の実行後、すなわちソルビトールからフルクトースへの変換後、混合物中の全ての糖の全フルクトース比率が少なくとも70%、80%、90%、95%または更に最大99.9%を達成でき、例えば混合物中の全ての糖の全フルクトース比率が60%~99.99%、例えば70%~99.95%、例えば80%~99.9%、90%~99.8%、更に95%~99.5%が達成できることが示された。加えて、本発明による方法の段階b)から得られる混合物であって、フルクトースが例えば既に60%に富化された混合物を、本発明による方法で再使用してもよい。

【0063】

フルクトースは、グルコースよりも高い甘味を有し、特に米国では、グルコースおよび

10

20

30

40

50

フルクトースの混合物である甘味料が、ほとんど純粋なグルコースであるコーンスターチから、酵素により製造される。このようなグルコース - フルクトース混合物としては、グルコース - フルクトースシロップ (高フルクトースコーンシロップ - H F C S (: h i g h - f r u c t o s e c o r n s y r u p)) が挙げられる。コーンシロップは例えば、ドイツ食品で含有量が5%のフルクトースから始まる成分のグルコース - フルクトースシロップとして列挙され、糖濃縮物として使用される。シロップが50%よりも高い割合のフルクトースを含有する場合、対応して「フルクトース - グルコースシロップ」として列挙される。

【0064】

本発明による方法により、所望のフルクトース含有量、例えば60%以上の当該グルコース - フルクトースシロップを、面倒な分離方法なしに製造できる。

10

【0065】

更なる態様では、本発明は、所望のフルクトース含有量、特に60%以上のフルクトース - グルコースシロップを製造するための本発明による方法の使用を提供する。

【0066】

本発明の段階a)により得ることのできるD - フルクトースは、例えば、結晶化により単離できる。

【0067】

全糖含有量中のD - フルクトースの割合が非常に高い材料は、例えば、フラン誘導体への更なる変換のための適切な出発原料である。

20

【0068】

本発明による段階B)で、D - フルクトースをフラン誘導体に変換することは、例えば従来の方法などの適切な方法により、または本明細書に記載されるように、実施してもよい。

【0069】

本発明の方法により製造されるフルクトースを、更にフラン誘導体に変換してもよい。

【0070】

更なる態様では、本発明は、グルコースおよびフルクトースの混合物からフラン誘導体を得る方法において、

A) グルコースおよびフルクトースの混合物が、酵素法で、酸化還元補因子の使用および再生によりフルクトースに変換されることであって、同じ反応バッチで起こる少なくとも2つの追加の酵素触媒酸化還元反応の結果、2つの酸化還元補因子のうちの一方の酸化還元補因子が還元型として得られ、他方の酸化還元補因子が酸化型として得られ、2つ以上のオキシドレダクターゼが関与することでD - グルコースがD - フルクトースに変換されることと、

30

B) A) で得られるフルクトースがフラン誘導体に変換されることとを特徴とする、方法を提供する。

【0071】

本明細書では、本発明により提供されるグルコースおよびフルクトースの混合物からフラン誘導体を得る方法は、「本発明による(の)フラン方法」とも呼ばれる。

40

【0072】

従来の方法によると、D - フルクトースから本発明によるフラン方法のフラン誘導体への変換は、触媒、例えば酸性触媒、例えば無機酸、有機酸、例えばシュウ酸、遷移金属イオンのゼオライト(H体)、不均一溶解金属リン酸塩、強酸性カチオン交換体の存在下で起こり得る。

【0073】

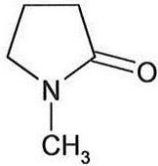
本発明によるフラン方法での溶媒は、水または有機溶媒、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)、N - メチルピロリドンであってもよく、本発明による段階B)でのD - フルクトースからフラン誘導体への変換は、好ましくは酸性触媒の存在下で、かつ下記の式のN - メチルピロリドン(N - メチル - 2 - ピロリド

50

ン、NMP)の存在下で起こる。

【0074】

【化4】



【0075】

本発明によるフラン方法の段階B)でのD-フルクトースからフラン誘導体への変換は、バッチプロセスまたは連続プロセスのいずれかとして実施してもよく、好ましい実施形態では、本発明による段階B)は、マイクロ波加熱下で実施される。

10

【0076】

本発明のフラン方法の特定の実施形態は、D-フルクトースからフラン誘導体への変換が、N-メチル-2-ピロリドン(NMP)を、反応溶媒または共溶媒、すなわち別の溶媒への添加剤のいずれかとして使用することを特徴とする。

【0077】

本発明によるフラン方法の特定の実施形態では、段階B)は、NMPを(共)溶媒として、例えば反応溶媒として、または別の溶媒への添加剤として使用する。

【0078】

本発明によるフラン方法では、NMPが溶媒として使用される場合、NMPは唯一の溶媒として使用されてもよく、またはNMPは別の共溶媒と一緒に使用されてもよい。共溶媒が使用される場合、全溶媒量に対してNMP濃度は最大70%(v/v)、例えば最大60%(v/v)を使用してもよい。可能性のある共溶媒は、例えば水または有機溶媒、例えば最新技術から既知の有機溶媒、例えばN,N-ジメチルスルホキシド(DMSO)またはN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)である。

20

【0079】

本発明の段階B)によるフラン方法では、D-フルクトースは、最大40%(w/v)の量で使用されてもよく、一般に5~20%の量で使用される。ただし反応は、より低い濃度、例えばD-フルクトース濃度(おおよそ)1%(w/v)でも起こる。最小値はむしろコスト効果により規定され、化学的には規定されない。

30

【0080】

本発明によるフラン方法の段階B)の酸性触媒は通常、フルクトースからフラン誘導体への変換に使用できる酸性触媒を含む。好ましくは、触媒はブレンステッド酸である。

【0081】

ここで、均一酸性触媒、例えば硫酸もしくは塩酸、または不均一酸性触媒、例えばカチオン交換樹脂、例えばモンモリロナイト、好ましくはモンモリロナイトKSF(登録商標)、もしくはアンバーライト、例えばアンバーライト(登録商標)、好ましくはアンバーライト15(登録商標)を使用してもよい。加えて、ルイス酸触媒、例えばCrCl₂、AlCl₃、SiO₂-MgCl₂、またはSILP(シリカ担持イオン性液体相:silica supported ionic liquid phase)触媒を、本発明の方法で使用してもよい。しかし、一般に、その結果は上記の触媒の結果ほど良くはない。

40

【0082】

更なる態様では、本発明のフラン方法は、段階B)におけるD-フルクトースからフラン誘導体への変換中に使用される酸性触媒が、

- 均一酸性触媒、好ましくは硫酸または塩酸、
- 不均一酸性触媒、好ましくはイオン交換体、例えばモンモリロナイト、例えばモンモリロナイトKSF(登録商標)、またはアンバーライト、例えばアンバーライト(登録商標)、好ましくはアンバーライト15(登録商標)、

50

- ルイス酸触媒、例えば CrCl_2 、 AlCl_3 または $\text{SiO}_2 - \text{MgCl}_2$ 、
 - SILP 触媒、
- であり、好ましくは均一または不均一酸性触媒であることを特徴とする。

【0083】

当業者は、段階 B) での触媒の必要量を、単純な予備テストによって簡単に決定できる。量は、使用される触媒の種類に依存する。

【0084】

使用されるフルクトース量に基づく下記の触媒量は、特に NMP が溶媒として使用される場合の例として示す。

【0085】

触媒	量	
1 N HCl	20 ~ 200 % (v/w)	
HCl (37%)	2 ~ 25 % (v/w)	
1 N H_2SO_4	20 ~ 200 % (v/w)	
濃縮 H_2SO_4	2 ~ 25 % (v/w)	
モンモリロナイト KSF (登録商標)	1 ~ 50 % (w/w)	
アンバーライト 15 (登録商標)	1 ~ 50 % (w/w)	
CrCl_2 、 AlCl_3	1 ~ 20 % (w/w)	
$\text{SiO}_2 - \text{MgCl}_2$	20 ~ 200 % (w/w)	
SILP	10 ~ 200 % (w/w)	20

【0086】

おおよそ 10 % (w/v) の D - フルクトースの濃度では、記述された値は問題が無く、より高いフルクトース濃度では、フルクトースが残りの溶媒量になお溶解できるように、触媒の量が制限されるべきである。

【0087】

本発明によるフラン方法の段階 B) は、適切な温度で実施される。適切な温度としては、特に NMP が溶媒として使用される場合、温度 100 ~ 220、好ましくは 115 ~ 200、最も好ましくは 135 ~ 185 が挙げられる。

【0088】

溶媒として NMP を使用する際の段階 B) での反応は、実験全体に亘って、積極的に圧力制御せずに、密閉容器 (バッチ、マイクロ波) 内で実施した。マイクロ波の実行から、NMP のための最大圧力は、添加剤によって、2 ~ 4 bar と推測してもよい。例えば HCl が触媒として使用される場合、展開圧力 (developing pressure) は、最大 15 bar まで上昇する。連続作業時、溶媒の沸騰を防ぐために、最大 40 bar の一定の背圧を加えた。圧力は、溶媒もしくは添加剤のいずれかからの蒸気圧として生じるか、またはシステム関連の (ポンプ) 圧力が加えられる。しかし、圧力は反応機構に対して決定的であるとは思われない。

【0089】

本発明によるフラン方法で生じる主なフラン誘導体は、下記の式のヒドロキシメチルフルフラル (HMF) であることが見出だされた。

【0090】

【化5】



ヒドロキシメチルフルフラル(HMF)

【0091】

10

20

30

40

50

更なる態様では、本発明によるフラン方法は、フラン誘導体がヒドロキシメチルフルフルアルであることを特徴とする。

【0092】

本発明のフラン方法では、「HMF選択性」は、HMFに変換された、消費されたD-フルクトースの部分を表すと理解されるべきである。

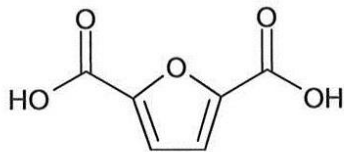
【0093】

本発明のフラン方法で製造されるフラン誘導体は、直接使用されてもよく、または更なる化学反応で二次生成物に変換してもよい。例えば、ヒドロキシメチルフルフルアルは、下記の式の2,5-フランジカルボン酸(FDCA: 2,5-furan dicarboxonic acid)に更に酸化されてもよい。

10

【0094】

【化6】



2,5-フランジカルボン酸(FDCA)

【0095】

既知の通り、FDCAは、ポリエチレンテレフタレート(PET)と同様に、例えば中空体、特にボトル、例えば飲料ボトル、化粧品用ボトル、または洗浄剤用ボトルに使用され得るポリエチレンフタレート(PEF)などのポリマーの製造のためのモノマーとして使用できる。再生源からのエチレングリコール、および本発明による方法で製造されるHMFから入手可能なFDCAの同時使用で、ほとんど完全に再生可能原料からなるPEFを得ることができる。

20

【0096】

更なる態様では、本発明は、製造されるフラン誘導体が更に変換されること、例えばヒドロキシメチルフルフルアルが2,5-フランジカルボン酸に更に酸化されることを特徴とし、この2,5-フランジカルボン酸は、例えば、ポリエチレンフタレート(PEF)などのポリマーを製造するために、任意で重合されることを特徴とする。

30

【実施例1】

【0097】

グルコースイソメラーゼおよびそれに続く2段階酸化還元プロセスによるグルコース-フルクトースシロップからのフルクトースの製造

750mgのD-グルコースを50mMのトリス緩衝液(25でpH=8.0)に溶解させ、全体積5mLとした。この混合物に、250mgのStreptomyces murinusからの固定化されたグルコースイソメラーゼ(Sigma-Aldrich、Novozymes Sweetzyme IT(登録商標))を加え、懸濁液を50で6時間、穏やかに振とうした。これにより、グルコースのおおよそ33%がフルクトースに変換された。グルコースイソメラーゼを、遠心分離(5000g、1分間)により除去した。その後、2mLのガラス容器で、400μLの溶液を、10μLのトリスHCl(0.5M、pH=8.0)、20μLのCandida tropicalisからのキシロースレダクターゼ(大腸菌BL21(DE3)で過剰発現、280U/mL)、30μLのLactobacillus kefirからのアルコールデヒドロゲナーゼ(大腸菌BL21(DE3)で過剰発現、130U/mL)、および35μLの2-プロパノールで処理した。反応は開放系で実施し、ガラス容器を24時間40で振とうした(Eppendorf Thermomix(登録商標)、850rpm)。開放系では反応生成物のアセトンの蒸発が可能であるため、反応はソルビトール形成の方へと駆動される。4時間後に15μLの2-プロパノール、18時間後に25μLの2-プロパノール、および18時間後に50μLの水を補充した。存在していたグルコースの98.5

40

50

%がソルビトールに変換された。混合物は、合計でおおよそ71%のソルビトール、28%のフルクトース、および1%のグルコースを含有した。更なる反応工程では、60 μ Lの*Leuconostoc mesenteroides*からのNADHオキシダーゼ(大腸菌BL21(DE3))で過剰発現、350U/mL)、および40 μ Lの*Bacillus subtilis*からのソルビトールデヒドロゲナーゼ(大腸菌BL21(DE3))で過剰発現、50U/mL)が添加された。NADHオキシダーゼ反応への酸素供給を保証するため、開放系で再度反応させた。反応容器を48時間、25 $^{\circ}$ Cで振とうした(Eppendorf Thermomix(登録商標)、850rpm)。60%のD-フルクトース、35.2%のD-ソルビトール、および4.7%のD-グルコースの混合物が得られた。

10

【実施例2】

【0098】

D-フルクトースからフラン誘導体への変換のための材料および方法

D-フルクトースからHMFへの脱水反応は、異なる反応条件下で、任意でマイクロ波に補助された加熱下で標準バッチプロセスとして、または連続フロー条件により、実施した。驚くべきことに、既知のシステムと比較して、反応でNMPを溶媒として使用し、均一または不均一触媒を併用することにより、マイクロ波に補助された方法と、連続フロー条件下とで、より高い収率が得られることが見出された。

【0099】

SiO₂-MgCl₂の合成

SiO₂-MgCl₂は、Yasudaら(Yasuda, M.; Nakamura, Y.; Matsumoto, J.; Yokoi, H. Shiragami, T. Bull. Chem. Soc. Jpn. 2011, 84, 416~418)によるプロトコルと同様に製造した。

20

【0100】

SILPの合成

SILP触媒は、既知のプロトコルにより(Fu, S.-K.; Liu, S.-T. Synth. Commun. 2006, 36, 2059~2067)、N-メチル-イミダゾールを使用して製造した。固定化のために、得られたイオン液体を、乾燥クロロホルム中の200重量%のシリカゲル(10gのSiO₂当たりクロロホルム100mL)と混合し、24時間70 $^{\circ}$ Cまで加熱した。得られた固体を濾過し、クロロホルムで洗浄して、減圧下で乾燥させた。この得られたシリカゲルは、触媒充填量がおおよそ16重量%であった。

30

【0101】

バッチ反応の一般条件

特に記述しない場合、全てのバッチ反応は、4mLのねじ蓋ガラス広口瓶で実施した。加熱は、適切なアルミニウムブロックで、所望の温度まで実施した。

【0102】

バッチプロセスでのマイクロ波反応

バッチプロセスでのマイクロ波反応は、反応を順次可能にするために、オートサンブラを取り付けたBiotage Initiator Sixty実験用マイクロ波(laboratory microwave)で実施した。吸収レベルは最大値に設定し、自動的に最大エネルギー入力400Wに制御させた。

40

【0103】

ストップフローマイクロ波反応および連続フロー反応

半連続プロセスを最適化するためのストップフロー反応を、CEM(登録商標)Discover Systemで、CEM(登録商標)Voyager Upgradeと共に、かつ外部圧力センサーによって実施した。連続プロセスでの反応のために、自動的な生成物回収のため、Gilson(登録商標)GX-271オートサンブラを取り付けた、ThalesNano(登録商標)のカートリッジ系反応器システムX-Cubeを使

50

用した。ここで、2つのケイ砂カートリッジ (Cat Cart (登録商標)、70 × 4 mm) を反応ゾーンに導入した。

【0104】

あるいは、ペルフルオロアルコキシアルカンキャピラリ (PFAキャピラリ、内径0.8 mm、外径1.6 mm) を使用し、加熱可能なアルミニウムシリンダに巻き付けた。Shimadzu LC-10AD HPLCポンプによって、所望の流速で基質を添加した。正確な容積 (カラム16.0 mL; カラムの前および後のデッドボリュームそれぞれ1.0 mL) は、純粋な溶媒の規定された流速を、デジタルストップウォッチにより監視することにより決定した。

【0105】

D - フルクトースからフラン誘導体への変換の反応の分析

定量HPLC分析のため、反応試料 (特に記述しない場合、22 μL) を脱イオン水で希釈して1 mLとした。異なる濃度を有する反応試料では、最高濃度が2 mg/mLを超えないように希釈した。この溶液に、100 μLの3 - ヒドロキシベンジルアルコールを内部標準として添加した後、試料を完全に混合した。固体残留物を遠心分離 (5分、20000 G)、または濾過 (Phenex PTFE、4 mm、0.2 μm) により分離した。定量は、内部標準と比較したRIスペクトルのピークの面積に基づいた。

【0106】

試料をHPLCにより、それぞれPDA PlusおよびRI検出器を取り付けたThermo Scientific (登録商標) Surveyor Plus SystemまたはShimadzu (登録商標) Nexera Systemで分析した。分離のため、固定相はPhenomenex (登録商標) からのイオン交換カラム (Rezex RHM - Monosaccharide H+ (8%)、150 × 7.8 mm、スルホン化スチレンおよびジビニルベンゼンの架橋マトリックスから構成される、H⁺体) であり、溶離液は水 (HPLCグレード) および0.1%のTFA (HPLCグレード) から構成した。カラム温度を85 °Cで一定に保ち、実行時間を25分で最適化した。生成物の定量は、内部標準により、RI信号の積分によって実施した。加えて、更なる反応分析のために、波長200 nm、254 nmおよび280 nmをPDAにより記録した。

【0107】

GP1 - バッチプロセスでのD - フルクトースの脱水

標準反応では、反応の最適化のため、100 mgのD - フルクトース (0.56 mmol) および所望の量のそれぞれの触媒をガラスバイアル瓶に入れ、1 mLの新しく蒸留したNMPで処理した。得られた溶液 / 懸濁液を選択した温度まで加熱し、所望の時間反応させた。

【0108】

GP2 - マイクロ波バッチプロセスでのD - フルクトースの脱水

標準反応では、反応の最適化のため、100 mgのD - フルクトース (0.56 mmol) および所望の量のそれぞれの触媒をマイクロ波容器に加えた (0.5 ~ 2.0 mL) 。容器に磁気攪拌子を設け、1 mLのNMPを添加した。マイクロ波の放射強度は、所望の温度を達成するために、企業内の調整アルゴリズムにより自動的に設定した。反応容器の急速冷却は、少なくとも6 barの加圧空気を吹きつけることにより達成した。

【0109】

GP3 - マイクロ波ストップフロープロセスでのD - フルクトースの脱水

標準反応では、反応の最適化のため、D - フルクトース標準溶液 (1 mL; c = 100 mg/mL (NMP中)) および塩酸 (100 μL; c = 1 mol/L) を、磁気攪拌子を備えたマイクロ波容器に添加した。バイアル瓶をスナップキャップで封止した後、溶液を所望の時間、所望の温度まで加熱した。可能な最速加熱を達成するために、加えるエネルギーは下記の表1により設定した。

【0110】

10

20

30

40

【数1】

表1
マイクロ波の電力設定および関連する温度

温度	電力設定	温度	電力設定
100℃	50W	180℃	125W
125℃	65W	200℃	140W
150℃	100W	220℃	160W

【0111】

反応容器の急速冷却は、少なくとも6 barの加圧空気を吹きつけることにより達成した。

【0112】

GP4 - カートリッジ系反応器システムでのD - フルクトースの脱水

標準反応では、反応の最適化のため、D - フルクトース標準溶液 (1 mL ; c = 100 mg / mL (NMP中)) を塩酸 (c = 1 mol / L) と混合し、試薬ポンプにより反応システム内へと注入した。加熱プロセス中、安定な温度および安定な流速を監視するために、いくつかの予備試料を取った。選択した反応温度は150、180 および200であり、反応圧力は40 barに調整した。流速は0.2 ~ 0.6 mL / 分の間を選択した。反応試料は2.5 mLの量で取り、分析した。

【実施例3】

【0113】

D - フルクトースの脱水のための触媒としての硫酸の使用

異なる温度、反応時間、および酸濃度を比較した。反応は「GP1」により実施した (実施例4)。使用した触媒は、100 μLの1N硫酸または10 μLの濃縮硫酸のいずれかであった。結果を表1に要約する。

【0114】

【数2】

表1
D-フルクトースの脱水のための触媒としての硫酸

触媒	温度	反応時間	フルクトース消費量	HMF収率	HMF選択率	LS収率
1N H ₂ SO ₄	100℃	3時間	69%	45%	65%	<1%
1N H ₂ SO ₄	120℃	4時間	95%	77%	81%	<1%
1N H ₂ SO ₄	150℃	15分	98%	88%	90%	<1%
1N H ₂ SO ₄	180℃	10分	100%	85%	85%	<1%
濃縮H ₂ SO ₄	120℃	45分	98%	85%	90%	<1%
濃縮H ₂ SO ₄	150℃	10分	100%	90%	90%	<1%
濃縮H ₂ SO ₄	180℃	5分	100%	82%	82%	<1%

【0115】

黒い不溶性ポリマーおよびフミンの形成は、使用された最適条件下で観測されなかった。

【実施例4】

【0116】

D - フルクトースからフラン誘導体への変換を触媒するための硫酸の使用 (連続プロセス)

10

20

30

40

50

D - フルクトース (1 0 % w / v) および濃縮硫酸 (1 % v / v) を N - メチル - 2 - ピロリドンに溶解させた。P F A キャピラリーにより、連続フローで、混合物を反応器にポンプで通した (反応温度 1 5 0)。最初の 1 8 m L を廃棄した後、更に 1 0 m L を分析のために回収した。様々な流速で、反応器内での異なる滞留時間の効果をテストした (表 1 0)。

【 0 1 1 7 】

【 数 3 】

表10
D-フルクトースからフラン誘導体への変換を触媒するための硫酸
(連続プロセス)

流速(mL/分)	滞留時間	フルクトース消費量	HMF収率	HMF選択率	LS収率
0.8mL/分	20分	100%	74%	74%	<1%
1.6mL/分	10分	100%	75%	75%	<1%
3.2mL/分	5分	100%	76%	76%	<1%

【 0 1 1 8 】

黒い不溶性ポリマーおよびフミンの形成は、分析された条件下で観測されなかった。

【 実施例 5 】

【 0 1 1 9 】

D - フルクトースの脱水のための触媒としてのアンバーライト 1 5 (登録商標) の使用
この実施例は、マクロ架橋樹脂に基づくスルホン酸残基を有する強いイオン交換体の使用を示す。1 0 0 m g の D - フルクトースを、1 m L の N - メチル - 2 - ピロリドンの存在下で 3 時間、1 0 0 で攪拌しながらインキュベートした (プロトコル G P 1、実施例 2)。アンバーライト 1 5 (登録商標) を触媒として添加した。表 2 は、この実験の結果を示す。比較的低温で、高い収率が達成された。タール状化合物の形成は回避された。

【 0 1 2 0 】

【 数 4 】

表2
D-フルクトースの脱水のための触媒としてのアンバーライト15(登録商標)

触媒の量	温度	反応時間	フルクトース消費量	HMF収率	HMF選択率	LS収率
10mg	100°C	3時間	70%	50%	71%	<1%

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 H 1/00	(2006.01)	C 0 7 H	1/00
C 0 7 H 3/02	(2006.01)	C 0 7 H	3/02
C 0 7 D 307/50	(2006.01)	C 0 7 D	307/50
C 0 7 D 307/48	(2006.01)	C 0 7 D	307/48
C 0 7 B 61/00	(2006.01)	C 0 7 B	61/00 3 0 0
C 1 2 N 9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02

(74)代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(74)代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(74)代理人 100133042

弁理士 佃 誠玄

(72)発明者 エートル, オートウィン

オーストリア共和国 アー - 8 0 7 6 ヴァソルツベルク, ヴァイデンシュトラーセ 3

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特開2003-159093(JP,A)

国際公開第2006/002021(WO,A1)

国際公開第2012/015616(WO,A1)

国際公開第2011/124639(WO,A1)

特開2001-061472(JP,A)

Current Opinion in Chemical Biology, 2011年, Vol.15, p.249-256

The Journal of Biological Chemistry, 1992年, Vol.267, No.35, p.24989-24994

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed