

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. November 2017 (30.11.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/202686 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 19/02 (2006.01) *C12P 7/18* (2006.01)
C12P 7/58 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/061978

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Mai 2017 (18.05.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
16170892.0 23. Mai 2016 (23.05.2016) EP

(71) Anmelder: ANNIKKI GMBH [AT/AT]; Rankengasse
28a, 8020 Graz (AT).

(72) Erfinder: ERTL, Ortwin; Weidenstrasse 3, 8076 Vasolds-
berg (AT). MAYER, Bernd; Jauerburggasse 19/18, 8010
Graz (AT). STAUNIG, Nicole; Weidenstrasse 3, 8076 Va-
soldsberg (AT).

(74) Anwalt: SCHWARZ & PARTNER PATENTANWÄL-
TE OG et al.; Wipplingerstrasse 30, 1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,

DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

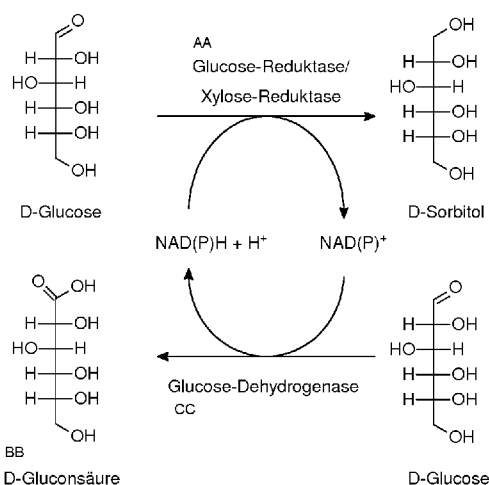
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD FOR ENZYMATIC CONVERSION OF D-GLUCOSE INTO D-FRUCTOSE VIA D-SORBITOL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN UMWANDLUNG VON D-GLUCOSE IN D-FRUCTOSE VIA D-SORBITOL

Fig. 5



AA Glucose reductase/Xylose reductase
BB D-Gluconic acid
CC Glucose dehydrogenase

(57) Abstract: The present invention relates to a method for conversion of D-glucose. The method according to the invention comprises a step a), in which a portion of the D-glucose is enzymatically oxidized to D-gluconic acid (lactone) and a portion of the D-glucose substantially equimolar thereto is reduced to D-sorbitol. Present in the reaction mixture of step a) is not only D-glucose but also D-fructose. The method comprises a further step b), in which D-sorbitol formed from the D-glucose in step a) is enzymatically oxidized to D-fructose.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Umwandlung von D-Glucose. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst einen Schritt a), in dem ein Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Gluconsäure(-lacton) oxidiert wird und ein dazu im Wesentlichen äquimolarer Teil der D-Glucose zu D-Sorbitol reduziert wird. In der Reaktionsmischung des Schrittes a) ist neben D-Glucose auch D-Fructose vorhanden. Das Verfahren umfasst einen weiteren Schritt b), in dem im Schritt a) aus der D-Glucose entstandenes D-Sorbitol enzymatisch zu D-Fructose oxidiert wird.



WO 2017/202686 A1

VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN UMWANDLUNG VON D-GLUCOSE IN D-FRUCTOSE VIA D-SORBITOL

Einleitung

Aufgrund langfristig steigender Preise für fossile Rohstoffe und einem zu erwartenden Rückgang des Angebots solcher Rohstoffe besteht großes Interesse an der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen. Dabei sind die Bereiche Energieerzeugung sowie Herstellung von Nahrungsmitteln und Grundchemikalien zu unterscheiden. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die letzteren beiden Bereiche und betrifft ein Verfahren zur Umwandlung von D-Glucose.

D-Glucose kann in der Natur als monomerer Zucker vorkommen oder als Teil von Disacchariden wie z. B. Saccharose, Maltose oder Laktose. Daneben liegt D-Glucose in großer Häufigkeit in verschiedensten Biopolymeren vor, welche Bestandteile von nachwachsenden Rohstoffen sind. Geeignete Quellen für D-Glucose in einem Verfahren nach vorliegender Erfindung schließen zum Beispiel enzymatische oder nicht-enzymatische Hydrolysate von Stärke, insbesondere Maisstärke, enzymatische oder nicht-enzymatische Hydrolysate von Saccharose oder enzymatische oder nicht-enzymatische Hydrolysate von Cellulose ein. Cellulose, die in einem Verfahren nach vorliegender Erfindung verwendet wird kann zum Beispiel gewonnen werden aus Biomasse, vorzugsweise aus lignocellulosischer Biomasse, wie zum Beispiel Holz, Stroh, wie Weizenstroh, Maisstroh, Bagasse, Sisal, Energiegräser. Zur enzymatischen Hydrolyse von Maisstärke können z. B. Amylasen eingesetzt werden. Für die enzymatische Spaltung von Saccharose eignen sich z. B. Invertasen. Zur enzymatischen Spaltung von Cellulose können z. B. Cellulasen eingesetzt werden. Für die nicht-enzymatische Spaltung genannter Mehrfachzucker eignet sich zum Beispiel eine säurekatalysierte Spaltung.

Stand der Technik

Eine gängige Möglichkeit zur Umwandlung von D-Glucose zu D-Fructose erfolgt unter Verwendung einer geeigneten D-Glucoseisomerase, z. B. D-Xylose-Isomerase, die D-Glucose als Substrat akzeptiert. Solche Verfahren sind schon lange bekannt, z. B. aus US 2,950,228 und auch für den industriellen Einsatz geeignet, wie etwa in US 3,616,221 oder US 3,868,304 beschrieben.

Ein Problem dabei ist, dass üblicherweise maximal ca. 42 % der D-Glucose zu D-Fructose umgewandelt werden können (Glucose-Fructose-Sirup). Eine weitere Anreicherung von D-Fructose gegenüber D-Glucose kann durch Trennverfahren erreicht werden. Eine Möglichkeit dazu ist die Verwendung von chromatographischen Methoden, wie z. B. in US 5,221,478 beschrieben. Für den Nahrungsmittelsektor wird dabei oft lediglich eine teilweise Anreicherung von D-Fructose angestrebt. Vor allem zur Produktion relativ reiner bis hoch reiner D-Fructose sind chromatographische Verfahren aber sehr aufwändig.

Eine weitere Verbindung, die D-Glucose enthält, ist Saccharose. Diese kann in die Bestandteile D-Glucose und D-Fructose gespalten werden, z. B. durch Säurehydrolyse oder enzymatisch (Invertase). Dabei wird eine Mischung von gleichen Teilen Glucose und Fructose erhalten. Wird dabei einer der Zucker in reiner Form benötigt, müssen weitere Schritte durchgeführt werden. Dabei ist z. B. eine ähnliche (aufwändige) Vorgehensweise wie bei Glucose-Fructose-Sirup denkbar.

Neben der Verwendung von Isomerasen wurden in der Literatur auch enzymatische Redoxreaktionen an Kohlenhydraten beschrieben.

So wird beispielsweise in DE 698 39 381 eine Sorbitoldehydrogenase beschrieben, die zur Umwandlung von D-Sorbitol zu L-Sorbose eingesetzt werden und bei der Herstellung von L-Ascorbinsäure Anwendung finden kann.

In DE 10 247 147 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem unter Verwendung von D-Mannitol-2-Dehydrogenase D-Fructose zu D-Mannitol reduziert wird.

In US 4,467,033 ist die enzymatische Oxidation von L-Sorbitol zu L-Fructose beschrieben.

Beispiele für die Reduktion von D-Xylose zu Xylitol sind etwa in US 2006/0035353 oder in Woodyer R. et al., FEBS J., 2005, Volume 272, p 3816- 3827 offengelegt.

Bei diesen Verfahren handelt es sich um einzelne Redoxreaktionen, bei denen zur Regenerierung von Redoxcofaktoren eine zusätzliche Reaktion mit Zugabe eines weiteren Substrats gekoppelt werden muss.

In WO 2013/117584 ist ein Verfahren beschrieben, mit dem Glucose mit enzymatischen Reduktions- und Oxidationsreaktionen in Fructose überführt werden kann. Es kann damit sehr reine Fructose hergestellt werden. Nachteilig dabei ist aber, dass zur Reduktion der Glucose stöchiometrisch bzw. im Überschuss eine Chemikalie wie z. B. ein Alkohol zugegeben werden muss. Diese Chemikalie wird bei der Reaktion verbraucht.

WO 2013/117585 beschreibt ein Verfahren, in dem Glucose enzymatisch zu Fructose umgesetzt und die erhaltene Fructose zu Furanderivaten umgesetzt wird.

Die WO 2014/154676 beschreibt ein Verfahren, in dem Glucose enzymatisch zu Sorbitol reduziert und das erhaltene Sorbitol anschließend enzymatisch zu Fructose oxidiert wird.

Gemäß WO 2014/122617 wird zur Herstellung von D-Fructose aus D-Glucose zunächst D-Glucose enzymatisch zu D-Glucoson oxidiert und anschließend D-Glucoson enzymatisch zu Fructose reduziert.

Aus WO 2014/076012 ist ein enzymatisches Verfahren bekannt, bei dem parallel Oxidation und Reduktion an Zuckern ablaufen. Dabei werden aber die Äquivalente zur Oxidation eines Zuckers (Arabinose) aus der Reduktion eines anderen Zuckers (Xylose) bezogen.

Aus der Literatur ist eine Methode bekannt, bei der Xylose zu Xylitol reduziert wird, wobei gleichzeitig Glucose zu Gluconsäure oxidiert wird (Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich,

D., and Kulbe, K. (1996). Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 52, 387–396.). Dabei werden aber die Äquivalente zur Oxidation eines Zuckers (Glucose) aus der Reduktion eines anderen Zuckers (Xylose) bezogen. Außerdem wird Xylose der Reaktionsmischung mit Glucose aus einer externen Quelle versetzt. Es handelt es sich hier also nicht um die Verwertung einer bestehenden Mischung. Außerdem ist man hier darauf angewiesen, dass Glucose und Xylose stöchiometrisch zueinander vorliegen, um eine möglichst vollständige Konversion zu erreichen.

Ikemi et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 36 (1990), 149-154 beschreiben die enzymatische Herstellung von Sorbitol aus Glucose unter gleichzeitiger Gewinnung von Gluconsäure in einem Bioreaktor mit geladener Membran.

Es existiert ein industrielles Verfahren zur katalytischen Hydrierung von Glucose zu Sorbitol unter Verwendung von Wasserstoff. In US 3,329,729 A wird aber ein großer Nachteil dieses unselektiven Verfahrens deutlich: andere Zucker (wie z. B. Fructose) in der Mischung, wie z. B. werden ebenfalls zum jeweiligen Zuckeralkohol reduziert. Außerdem kann aus Glucose nur ein Produkt (Sorbitol) hergestellt werden.

Zur Herstellung von Gluconsäure aus Glucose sind z. B. fermentative Verfahren beschrieben worden (Beispiel: Znad H., Markos J., and Báles V. (2004) Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 39(11), 1341-1345.). Damit kann aber aus Glucose nur ein Produkt (Gluconsäure) hergestellt werden.

Auch zur Herstellung von einheitlichen Produkten aus einer Mischung enthaltend D-Glucose und D-Fructose unter Verwendung von Redoxenzymen gibt es bereits Beispiele im Stand der Technik. Eine Möglichkeit ist die vollständige Umwandlung der in der Mischung mit Fructose enthaltenen Glucose zu Gluconsäure. Diese kann anschließend (z. B. mit Ionenaustauscher-Chromatographie) abgetrennt werden. Neben fermentativen Methoden zur D-Gluconsäure-Herstellung (in einer Mischung von D-Glucose und D-Fructose) sind auch solche Methoden bekannt, bei denen mit isolierten Enzymen gearbeitet wird (z. B. US 3,935,071A, GB 916 949A) oder bei denen Mikroorganismen eingesetzt werden, die

geeignete Enzyme sekretieren (z. B. FR 2 588 568 A1). Bei allen Verfahren dieser Art dient die Glucose lediglich zur Erzeugung von Gluconsäure. Es kann aus Glucose kein anderes Produkt wie z. B. Sorbitol und damit auch keine zusätzliche Fructose erzeugt werden. Die Glucose kann bei diesen Verfahren also nicht zur Steigerung der Fructose-Ausbeute verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung eines einheitlichen Produkts aus Glucose-Fructose-Mischungen ist die Verwendung des Enzyms Glucose-Fructose-Oxidoreduktase. Dieses kann entweder in seinem Ausgangsorganismus (oft *Zymomonas mobilis*) oder als isoliertes bzw. rekombinantes Enzym eingesetzt werden (z. B. JPH01107145A; Zachariou M., and Scopes R.K. (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol 167(3), 863-869.). Der Nachteil ist, dass hierbei Fructose verbraucht wird. Die Methode eignet sich also nicht für die Herstellung von Fructose. Außerdem kann nur in einer stöchiometrischen Mischung aus Glucose und Fructose die Glucose vollständig zu einem Produkt umgesetzt werden.

Eine andere Methode zur Anreicherung von Zuckern wurde in US 5,464,514 beschrieben. Darin werden Zucker über ihre unterschiedliche Tendenz an eine schwache Säure zu binden getrennt. Die Trennung erfolgt dann über Elektrodialyse. Als schwache Säure wird z. B. Borsäure gewählt. Unterschiedliche Zucker weisen eine unterschiedliche Tendenz auf, an Borsäure zu binden. Die Verbindung aus Zucker und Borsäure ist negativ geladen und wandert im elektrischen Feld, während die Zucker, die nicht an die Borsäure binden, ungeladen bleiben. Die Elektrodialysezelle besteht aus Kathode und Anode, zwischen die zwei Kationen-Austauscher-Membranen angebracht wurden. Zwischen den beiden Kationen-Austauscher-Membranen befindet sich eine Anionen-Austauscher-Membran, die den Zwischenraum in 2 Kompartimente teilt. Kompartiment I befindet sich auf Seiten der Kathode und Kompartiment II auf Seiten der Anode. Wird nun eine Lösung der zu trennenden Zucker in Kompartiment I eingebracht und eine Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen Ionen, das heißt die Zucker, die an die Borsäure gebunden haben, durch die Anionen-Austauscher-Membran in Kompartiment II. Die ungeladenen Zucker verweilen in Kompartiment I. Das Verfahren wurde für die Trennung von Lactose und Lactulose sowie

für die Trennung von Glucose und Fructose getestet. Diese Methode beruht jedoch darauf, dass zwischen den Zuckern eine unterschiedliche Affinität der Bindung an Borsäure besteht. Aber auch ein Teil der Zucker mit geringerer Affinität für die Borsäure wird die Säure binden und damit ins Kompartiment II übergehen. Somit ist keine Trennung der Zucker möglich, lediglich ändert sich das Verhältnis der Zucker zueinander. Im Falle von Fructose und Glucose ist das Verhältnis der Transferraten mit 1,4 zu 1 angegeben. Die Separation kann durch mehrere Elektrodialyseschritte erhöht werden. Borsäure und Zucker können anschließend in einem weiteren Elektrodialyse-Schritt voneinander getrennt werden. Der Nachteil der Methode ist, dass eine gute Separation nur durch viele Elektrodialyse-Schritte erzeugt werden kann. Außerdem wird bei dieser Methode nicht zwischen monomeren und dimeren bzw. oligomeren Zuckern unterschieden. Eine gute Trennung kann nur erzeugt werden, wenn die zu trennenden Substanzen sich stark in der Bindungsaffinität an Borsäure unterscheiden. Weiterhin von Nachteil ist, dass mit Borsäure eine zusätzliche (toxische) Komponente eingesetzt werden muss.

Die vorliegende Erfindung stellt sich gegenüber dem zuvor beschriebenen Stand der Technik die Aufgabe, ein verbessertes Verfahren zur Umwandlung von Glucose und zur Gewinnung von Wertstoffen aus Glucose zur Verfügung zu stellen.

In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Umwandlung von D-Glucose zur Verfügung, welches einen Schritt a) umfasst, in dem ein Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Gluconsäure(-lacton) oxidiert wird und ein dazu im Wesentlichen äquimolarer Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Sorbitol reduziert wird, wobei neben D-Glucose auch D-Fructose in der Reaktionsmischung des Schrittes a) vorhanden ist und wobei das Verfahren einen weiteren Schritt b) umfasst, in dem im Schritt a) aus der D-Glucose entstandenes D-Sorbitol enzymatisch zu D-Fructose oxidiert wird.

Unter „im Wesentlichen äquimolar“ ist zu verstehen, dass das Verhältnis von Gluconsäure zu Sorbitol zwischen 0,9 und 1,1, vorzugsweise zwischen 0,99 und 1,01, insbesondere bevorzugt zwischen 0,999 und 1,001 beträgt. Diese Verhältnisse beziehen sich ausschließlich auf die durch die Reaktionen des Schrittes a) erhaltenen Produkte. Es können andere Konzentrations-Verhältnisse in der Lösung auftreten, wenn gleichzeitig

(insbesondere simultan) noch andere Reaktionen ablaufen, wie im Folgenden gezeigt werden wird.

Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen angeführt.

Kurze Beschreibung der Figuren

Ein exemplarisches Reaktionsschema des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 1 dargestellt.

Figuren 2 bis 5 zeigen Reaktionsschemata von weiteren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Gluconsäure(-lacton) oxidiert und ein dazu im Wesentlichen äquimolarer Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Sorbitol reduziert. Ein wichtiger Vorteil dabei ist, dass Redox-Äquivalente zur Oxidation der Glucose vollständig durch die ebenfalls erfolgende Reduktion der Glucose geliefert werden können und nicht durch zusätzliche Maßnahmen wie z. B. die Zugabe von zusätzlichen Substraten, bereitgestellt werden müssen.

Erfindungsgemäß ist neben D-Glucose auch D-Fructose in der Reaktionsmischung des Schrittes a) vorhanden. Weiters umfasst das erfindungsgemäße Verfahren einen weiteren Schritt b), in dem im Schritt a) aus der D-Glucose entstandenes D-Sorbitol enzymatisch zu D-Fructose oxidiert wird.

Damit stellt das erfindungsgemäße Verfahren eine elegante Möglichkeit zur Verfügung, in Mischungen von Glucose und Fructose die Fructose weiter anzureichern und andererseits einen weiteren Wertstoff (Gluconsäure) zu gewinnen, der darüber hinaus auch leicht aus der Mischung abtrennbar ist.

Bevorzugt bleibt im erfindungsgemäßen Verfahren die D-Fructose im Schritt a) bei der Umsetzung von D-Glucose zu Gluconsäure(-lacton) bzw. Sorbitol im Wesentlichen unverändert, nimmt also nicht an der Reaktion teil.

In einem besonderen Aspekt ist ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsmischung im Schritt a) mit einer Glucose-Dehydrogenase und einer Xylose-Reduktase mit Glucose-Reduktase-Aktivität oder mit einer sonstigen Glucose-Reduktase in Kontakt gebracht wird.

Der Anteil der D-Fructose in der Mischung enthaltend D-Glucose und D-Fructose kann bezogen auf die Gesamtsumme von Glucose und Fructose bevorzugt zwischen 10 % (w/w) und 95 % (w/w), mehr bevorzugt zwischen 35 % (w/w) und 90 % (w/w), insbesondere bevorzugt zwischen 40 % (w/w) und 60 % (w/w), wie z. B. 42 % (w/w), 50 % (w/w) oder 55 % (w/w) betragen. Solche Mischungen sind z. B. erhältlich als Glucose-Fructose-Sirup hergestellt aus Maisstärke oder als Invertzuckersirup nach Behandlung von Saccharose mit Invertase oder chemischer Hydrolyse wie z. B. Säure-Hydrolyse. Solche Lösungen können aufgrund ihrer natürlichen Herkunft noch andere Stoffe, wie z. B. andere Zucker enthalten.

Eine weitere besondere Ausführungsform des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt b) das D-Sorbitol zur enzymatischen Oxidation mit einer Sorbitol-Dehydrogenase in Kontakt gebracht wird, wobei D-Sorbitol zu D-Fructose oxidiert wird.

Enzyme und Redoxenzyme in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung schließen Oxidoreduktasen ein. Oxidoreduktasen sind Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren. Oxidoreduktasen schließen beispielsweise Dehydrogenasen, Reduktasen, Oxidasen, sowie Katalasen ein.

Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Redoxcofaktor(en) NAD(P)^+ und/oder NAD(P)H in der Reaktionsmischung des Schrittes a) und/oder der Reaktionsmischung des Schrittes b) vorhanden sind. Die Redoxcofaktoren können somit in nur einem der beiden Schritte oder auch in beiden Schritten anwesend sein.

Dabei bezeichnet NAD^+ die oxidierte Form und NADH die reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotid während NADP^+ die oxidierte Form und NADPH die reduzierte Form von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat bezeichnen. Ein Zusatz von Redoxcofaktoren ist unter Umständen nicht notwendig, wenn die Enzym-Präparationen (z.B. Lysate, Lösungen, Lyophilisate, Zellsuspensionen, Ganzzell-Biokatalysatoren) diese bereits in ausreichender Konzentration enthalten. Falls die Redoxcofaktoren NAD(P)^+ und/oder NAD(P)H bei der Umsetzung von D-Glucose gemäß vorliegender Erfindung zugesetzt werden, beträgt die zugesetzte Konzentration in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung üblicherweise von 0,001 mM bis 10 mM, vorzugsweise von 0,05 mM bis 0,5 mM. Dabei beträgt das Verhältnis der molaren Konzentration des Cofaktors zur molaren Konzentration der Zucker maximal 0,1, bevorzugt maximal 0,01, besonders bevorzugt maximal 0,001. Z. B. ist bei einer 50 mM Zuckerlösung die Cofaktor-Konzentration üblicherweise auf 5 mM oder weniger limitiert.

Bei der Umsetzung von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol ist dabei kein zusätzliches Redoxcofaktor-Recycling erforderlich, da die beiden Reaktionen gegenseitig den Redoxcofaktor regenerieren.

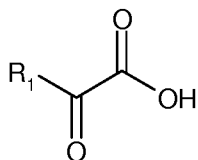
Eine weitere besondere Ausführungsform des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass bei der Umsetzung von D-Sorbitol zu D-Fructose in Schritt b) entstandener reduzierter Redoxcofaktor NADH/NADPH parallel kontinuierlich enzymatisch wieder in seine oxidierte Ausgangsform zurückgeführt wird.

In einem besonderen Aspekt ist ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Redoxcofaktor bei der Umsetzung von D-Sorbitol zu D-Fructose im Schritt b) im selben Reaktionsansatz durch mindestens ein weiteres

Redoxenzym, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholdehydrogenasen, Zuckerdehydrogenasen, NAD(P)H-Oxidasen, Hydrogenasen oder Laktatdehydrogenasen unter Verbrauch von Co-Substraten, insbesondere Ketonen, Aldehyden, Zuckern, Brenztraubensäure und deren Salze und/oder Sauerstoff bzw. unter Erzeugung von Wasserstoff, regeneriert wird.

Im Stand der Technik sind außerdem elektrochemische Verfahren zur Regenerierung von Redoxcofaktoren beschrieben (z. B. in Miyawaki O., and Yano T. (1997) Electrochemical bioreactor with regeneration of NAD^+ by rotating graphite disk electrode with PMS adsorbed. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 474-478 oder Maeda H., and Kajiwarra S. (1985) Malic acid production by an electrochemical reduction system combined with the use of diaphorase and methylviologen. *Biotechnol. Bioeng.* 27(5), 596-602.). Prinzipiell sind solche Verfahren dazu geeignet, den bei der Oxidation von Sorbitol zu Fructose reduzierten Cofaktor zu regenerieren.

In einem besonderen Aspekt ist ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass D-Sorbitol im Schritt b) in einem enzymatischen Verfahren unter Verwendung und Regenerierung der Redoxcofaktoren NAD^+/NADH oder $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in D-Fructose übergeführt wird, wobei bei der Regenerierungsreaktion, die den reduzierten Redoxcofaktor wieder in seine ursprüngliche oxidierte Form überführt, Sauerstoff, ein Aldehyd, ein Keton, ein Zucker oder eine Verbindung der allgemeinen Formel



I

worin R_1 für eine geradkettige oder verzweigt-kettige (C_1 - C_4)-Alkylgruppe oder für eine (C_1 - C_4)-Carboxyalkylgruppe steht, reduziert wird.

Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung ist darüber hinaus dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und b) im selben Reaktionsansatz ohne

Isolierung des Zwischenprodukts D-Sorbitol erfolgen.

Unter der Formulierung „im selben Reaktionsansatz“ werden Reaktionen verstanden, die in einer Reaktionsmischung ablaufen, ohne dass Intermediate isoliert werden müssen. Die Reaktionen können dabei simultan oder konsekutiv ablaufen. Die Formulierung schließt ein, dass während der Reaktion weitere Komponenten hinzugefügt oder entfernt werden, wobei aber Edukt, Intermediat(e) und Produkt des Reaktionswegs D-Glucose > D-Sorbitol > D-Fructose bis zum Abschluss der Reaktion(en) in der Lösung verbleiben.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist daher dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und b) gleichzeitig durchgeführt werden.

In einem weiteren Aspekt ist ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass Gluconsäure(-lacton) während der Reaktion(en), nach einem Reaktionsschritt oder am Ende des Verfahrens abgetrennt wird, wobei das Verfahren zur Abtrennung von Gluconsäure(-lacton) vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ionenaustauscher-Chromatographie, Elektrodialyse, Membranfiltration und Fällung durch Bildung eines schwerlöslichen Salzes. Entsprechende Methoden sind einer fachkundigen Person bekannt bzw. können der einschlägigen Literatur entnommen werden. Eine Vorschrift für Elektrodialyse zur Isolierung von Gluconsäure bietet z. B. US 6,187,570. Dort wird eine Methode beschrieben, durch die Derivate der Gluconsäure mittels Elektrodialyse aus einem Fermentationsansatz oder einem zellfreien, biokatalytischen Ansatz isoliert werden können. Zwischen Kathode und Anode werden abwechselnd mehrere Anionen- und Kationen-Membranen angebracht. Der Block aus Kathode, Anode und den Zwischenmembranen ist mit einem Elektrolyten gefüllt. Es gibt "Feed-Kompartimente", in die die Lösung, Fermentationsansatz oder zellfreier, biokatalytischer Ansatz eingebracht werden. Außerdem gibt es "Konzentrations-Kompartimente" in denen die Säuren aufkonzentriert werden. Beide Kompartimente sind mit einer Anionen- und einer Kationen-Membran voneinander getrennt. Wenn eine Spannung angelegt wird, so wandert die negativ geladene Säure durch die Anionen-Membran in das Konzentrations-Kompartiment, während die ungeladenen Bestandteile der Lösung im Feed-Kompartiment verbleiben. So wird die Gluconsäure bzw. die Derivate dieser Säure von neutralen Bestandteilen abgetrennt und

aufkonzentriert.

Zur Verwendung von Ionenaustauschern für die Entfernung von geladenen Verbindungen aus wässrigen Lösungen gibt es eine Vielzahl von Beispielen im Stand der Technik. Speziell für Zuckersäuren seien hier US3935071 und WO2014076012A1 genannt.

Das Verfahren gemäß vorliegender Erfindung wird in einem wässrigen System, dem gegebenenfalls ein Puffer zugesetzt wird, durchgeführt. Geeignete Puffer schließen zum Beispiel Acetat-, Kaliumphosphat-, Tris-HCl-, Triethanolamin und Glycin-Puffer zum Beispiel mit einem pH-Wert von 5 bis 10,5, vorzugsweise von 6 bis 10 ein. Zusätzlich oder alternativ kann eine Kontrolle des pH-Werts über die Messung des pH-Werts sowie eine rückgekoppelte Zugabe von Säure(n) oder Base(n) erfolgen. Zusätzlich oder alternativ können dem System Ionen zur Stabilisierung der Enzyme, wie zum Beispiel Mg^{2+} oder sonstige Zusätze wie zum Beispiel Glycerin zugesetzt werden.

Abhängig von den verwendeten Enzymen kann das Verfahren nach vorliegender Erfindung bei Temperaturen von 10°C bis 70°C, vorzugsweise von 15°C, bis 55°C durchgeführt werden.

Aufgrund der temperaturabhängigen Löslichkeit von D-Glucose oder ggf. von Mischungen der D-Glucose mit anderen Zuckern ist bei der Durchführung des Verfahrens die Glucose-/Zucker-Konzentration jedenfalls der jeweiligen Reaktionstemperatur anzupassen.

Die vorliegende Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass eine Isomerisierung der D-Glucose durch Reduktion zu D-Sorbitol erfolgt, das zur D-Fructose oxidiert wird, wobei zu Beginn der Reaktion eine Mischung aus D-Glucose und D-Fructose vorliegt. Bestimmte Ausführungsformen dieses Aspekts sind in den Reaktionsschemata in Fig. 2 oder Fig. 4 dargestellt.

Bei einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung werden die enzymatischen Redoxreaktionen zur Umsetzung von D-Glucose zu D-Sorbitol und D-Gluconsäure sowie zur weiteren Umsetzung des entstandenen D-Sorbitols zu D-Fructose bevorzugt durch solche

Dehydrogenasen katalysiert, welche die Redoxcofaktoren NAD^+/NADH und/oder $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ verwenden.

Unter einer Glucose-Dehydrogenase versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Enzym, das die Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) katalysiert und das dabei eine zur umgesetzten Menge an D-Glucose im Wesentlichen äquimolare Menge an Redoxcofaktor NAD(P)^+ zu NAD(P)H reduziert. Dabei muss dieses Enzym nicht zwingend als „Glucose-Dehydrogenase“ annotiert sein. Es kann auch ein Enzym mit einer anderen Bezeichnung eingesetzt werden, vorausgesetzt es besitzt die messbare beschriebene Aktivität. Eine fachkundige Person kann ein fragliches Enzym mit einem einfachen photometrischen Test auf die gesuchte Aktivität hin überprüfen. Die Literatur enthält viele Vorschriften zur Aktivitätsmessung von Zucker-Oxidoreduktasen. Prinzipiell enthalten solche Tests in wässriger Lösung eine Puffersubstanz (z. B. Kaliumphosphat-Puffer oder Triethanolamin-Puffer z. B. mit einem pH-Wert zwischen $\text{pH}=6,0$ und $\text{pH}=10,0$, im Beispiel $\text{pH}=7,0$ - $\text{pH}=8,0$), das zu untersuchende Enzym in passender Verdünnung (hier: Glucosedehydrogenase), das betreffende Substrat (hier D-Glucose) in der gewünschten Konzentration (z. B. 5 % (w/v)), den passenden Redoxcofaktor NAD(P)^+ oder NADPH (am Beispiel Glucosedehydrogenase: NAD^+ oder NADP^+). Durch die Reaktion kommt es zu einem Verbrauch oder der Bildung von NAD(P)H (hier: Bildung). Dadurch kann die Reaktion photometrisch bei 340 nm verfolgt werden ($\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Anhand der Reaktionskinetik kann eine fachkundige Person die Aktivität des Enzyms berechnen. Die Enzym-Einheit 1 U entspricht dabei derjenigen Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 μmol Substrat pro min umzusetzen. Ein Vergleich mit bekannten Enzymen ist möglich, um die Eignung des neuen Enzyms einzuschätzen. Die beschriebene Vorgehensweise kann analog auch auf andere Zuckerdehydrogenasen angewandt werden.

Unter einer Glucose-Reduktase wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Enzym verstanden, welches die Reduktion von D-Glucose zu D-Sorbitol katalysiert und dabei eine im zur umgesetzten Menge an D-Glucose im Wesentlichen äquimolare Menge an Redoxcofaktor NAD(P)H zu NAD(P)^+ oxidiert. Dabei muss dieses Enzym nicht zwingend als „Glucose-Reduktase“ annotiert sein, vorausgesetzt es besitzt die messbare beschriebene Aktivität. Dies ist insbesondere der Fall für Enzyme, die als „Xylose-Reduktase“ annotiert

sind, aber auch als Glucose-Reduktase funktionieren. Es wurde bereits gezeigt, dass geeignete Xylose-Reduktasen verwendet werden können, um D-Glucose zu D-Sorbitol zu reduzieren (z. B. Wang X. et al., *Biotechnol. Lett.*, 2007, Volume 29, p 1409-1412). Weiterhin sind einige Enzyme unter der Bezeichnung „Aldehyd-Reduktase“ dazu geeignet, D-Glucose zu D-Sorbitol zu reduzieren (z. B. die Aldehyd-Reduktase aus *Galdieria sulphuraria*, siehe: Gross W., Seipold P., and Schnarrenberger C.(1997) Characterization and Purification of an Aldose Reductase from the Acidophilic and Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol.* 114(1), 231-236.).

Unter einer Sorbitol-Dehydrogenase versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Enzym, das die Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose katalysiert und das bevorzugt dabei eine zur umgesetzten Menge an D-Sorbitol im Wesentlichen äquimolare Menge an Redoxcofaktor NAD(P)^+ zu NAD(P)H reduziert. Dabei muss dieses Enzym nicht zwingend als „Sorbitol-Dehydrogenase“ annotiert sein. Es kann auch ein Enzym mit einer anderen Bezeichnung eingesetzt werden, vorausgesetzt es besitzt die messbare beschriebene Aktivität. Hier kann zum Beispiel eine Xylitol-Dehydrogenase aus *Galactocandida mastotermitis* genannt werden. Diese kann neben der namensgebenden Aktivität auch Sorbitol zu Fructose oxidieren.

Geeignete Enzyme zur Reduktion von D-Glucose zu D-Sorbitol sind bekannt und schließen z. B. Xylosereduktasen ein, die beispielsweise aus *Candida tropicalis* oder aus *Candida parapsilosis* erhältlich sind.

Geeignete Enzyme zur Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconsäure sind bekannt und schließen z. B. Glucosedehydrogenasen ein, die beispielsweise aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* oder *Thermoplasma acidophilum* erhältlich sind.

Geeignete Enzyme zur Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose sind bekannt und schließen z. B. Sorbitoldehydrogenasen ein, die beispielsweise aus *Bacillus subtilis*, *Malus domestica*, *Rhodobacter sphaeroides* oder *Galactocandida mastotermitis* erhältlich sind.

Bei der Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose werden verwendete Redoxcofaktoren vorzugsweise im selben Reaktionsansatz durch mindestens ein weiteres Redoxenzym ggf. unter Verbrauch von Co-Substrat(en) regeneriert.

Als Co-Substrate werden Substanzen bezeichnet, die bei der Regenerierung von NAD^+/NADH und/oder $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (oder anderer Redoxcofaktoren) reduziert oder oxidiert werden. Geeignete Co-Substrate können bei einem Verfahren nach vorliegender Erfindung zur Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose zum Einsatz kommen und schließen beispielsweise Ketone (z. B. Aceton), Aldehyde (z. B. Acetaldehyd), Brenztraubensäure und deren Salze und/oder Sauerstoff ein. Bei der Umwandlung von D-Glucose zu D-Sorbitol und D-Gluconsäure wird kein externes Co-Substrat benötigt, da die Redoxcofaktoren durch die beiden Reaktionen jeweils gegenseitig regeneriert werden.

NAD(P)H-Oxidasen sind einer fachkundigen Person bekannt. Geeignete NAD(P)H-Oxidasen sind zum Beispiel erhältlich aus *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium aminovalericum*. Diese NAD(P)H-Oxidasen teilen die Eigenschaft, dass als Reaktionsprodukt Wasser entsteht. Es können prinzipiell aber auch NAD(P)H-Oxidasen eingesetzt werden, bei denen als Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid H_2O_2 entsteht. Solche Enzyme sind z. B. erhältlich aus *Brevibacterium sp.* oder *Thermotoga maritima*. Es besteht dabei die Gefahr, dass Wasserstoffperoxid akkumuliert und Enzyme schädigt. Deswegen ist allgemein der Zusatz einer Katalase üblich. Diese setzt H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff um.

Enzyme können in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung als solche, gegebenenfalls in der Form von Zell-Lysaten, gegebenenfalls als rekombinant überexprimierte Proteine, beispielsweise als in *E. coli* rekombinant überexprimierte Proteine verwendet werden, wobei weiterhin bevorzugt die entsprechenden Zell-Lysate ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden können. Je nach dem zu produzierenden Enzym können auch andere Mikroorganismen zur Expression eingesetzt werden, z. B. Mikroorganismen, die einer fachkundigen Person bekannt sind. Feste Bestandteile der jeweiligen Mikroorganismen können in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung entweder abgetrennt werden oder in der Reaktion mit eingesetzt werden (z. B. Ganzzell-Biokatalysatoren). Es können auch Kulturüberstände oder Lysate von Mikroorganismen

eingesetzt werden, die ohne rekombinante DNA-Technologie bereits ausreichende Enzym-Aktivitäten aufweisen. In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung können sowohl Enzyme als auch Redoxcofaktoren entweder in löslicher Form oder an Feststoffe immobilisiert zum Einsatz kommen.

Die Begriffe „Gluconsäure“ und „Gluconsäurelacton“ werden synonym verwendet. Die Nennung eines der Begriffe schließt den jeweils anderen mit ein. Das Gleichgewicht zwischen Gluconsäure und Gluconsäurelacton in wässrigen Lösungen ist von pH-Wert der Lösung abhängig. Während einer biokatalytischen Reaktion nach vorliegendem Verfahren kann es von Vorteil sein, den pH-Wert während der Reaktion konstant zu halten. Dies kann z. B. durch eine ausreichende Pufferkonzentration oder durch (rückgekoppelte) Zugabe von Säuren oder Basen, wie z. B. Natronlauge, Natriumhydrogencarbonat, Natriumcarbonat oder Calciumcarbonat erfolgen.

Die Nennung einer Säure oder des Salzes einer Säure schließt hier den jeweils nicht genannten Begriff ein. Ebenfalls schließt die Nennung von Säuren hier alle davon abgeleiteten Ester mit ein. Weiter sind hier (partiell) mit Schutzgruppen versehene Verbindungen bei der Nennung der zugrundeliegenden Substanzen mit eingeschlossen.

In einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung liegt D-Glucose üblicherweise in der wässrigen Reaktionsmischung in einer Konzentration von ≥ 5 % (w/v) D-Glucose vor, bevorzugt ≥ 10 % (w/v) D-Glucose, insbesondere bevorzugt ≥ 15 % (w/v) D-Glucose, wobei eine Konzentration von 50 % (w/v), vorzugsweise 40 % (w/v), insbesondere bevorzugt 35 % (w/v) nicht überschritten werden sollte. Die Konzentrationsbereiche gelten auch für die Mischung von D-Glucose und D-Fructose. Hierbei beziehen sich die genannten Konzentrationen auf die Summe aller gelösten Zucker.

Der beispielsweise nach der Spaltung von Saccharose oder nach der Herstellung von Glucose-Fructose-Sirup (z. B. mittels Glucose-Isomerase) enthaltene D-Glucose-Anteil kann in einem besonderen Aspekt des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung je zur Hälfte zu D-Sorbitol und zu D-Gluconsäure(-lacton) umgewandelt werden. Entstandenes D-Sorbitol

wird weiter zu D-Fructose oxidiert, wodurch es zu einer Erhöhung des Anteils von D-Fructose am Gesamt-Zuckergehalt kommt.

Gluconsäure(-lacton), welche nach einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung hergestellt wird, kann aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden. Dies kann direkt nach oder während des Schrittes erfolgen, bei dem Gluconsäure erzeugt wird oder aber erst nach einer oder mehreren weiteren enzymatischen Umsetzungen in der Mischung. Einer fachkundigen Person sind dazu verschiedene Methoden bekannt, wie z. B. Ionenaustauscher-Chromatographie, Elektrodialyse, Membranfiltration und Fällung durch Bildung eines schwerlöslichen Salzes. Diese sind in der Literatur umfassend beschrieben. In der Folge werden exemplarische Beispiele beschrieben.

In US 6,284,904 wird eine Methode beschrieben, die der Entfernung organischer Säuren, wie zum Beispiel Succinat, aus industriellen Lösungen wie Fermentationsansätzen oder Hydrolysaten dient. Hierbei wird die Lösung über einen Anionen-Austauscher gegeben und dieser unter Bedingungen gewaschen bei denen die organischen Säuren nicht eluiert werden. Im Anschluss werden die organischen Säuren durch Zugabe stärkerer, anorganischer Anionen eluiert. So können organische Anionen aus einer komplexen Lösung, wie z. B. einem Hydrolysat, isoliert und auch aufkonzentriert werden.

In US 6,187,570 wird eine Methode beschrieben, durch die Derivate der Gluconsäure mittels Elektrodialyse aus einem Fermentationsansatz oder einem zellfreien, biokatalytischen Ansatz isoliert werden können. Zwischen Kathode und Anode werden abwechselnd mehrere Anionen- und Kationen-Membranen angebracht. Der Block aus Kathode, Anode und den Zwischenmembranen ist mit einem Elektrolyten gefüllt. Es gibt "Feed-Kompartimente", in die die Lösung, Fermentationsansatz oder zellfreier, biokatalytischer Ansatz eingebracht werden. Außerdem gibt es "Konzentrations-Kompartimente" in denen die Säuren aufkonzentriert werden. Beide Kompartimente sind mit einer Anionen- und einer Kationen-Membran voneinander getrennt. Wenn eine Spannung angelegt wird, so wandert die negativ geladene Säure durch die Anionen-Membran in das Konzentrations-Kompartiment, während die ungeladenen Bestandteile der Lösung im Feed-Kompartiment verbleiben. So wird die Gluconsäure bzw. die Derivate dieser Säure von neutralen Bestandteilen abgetrennt und

aufkonzentriert.

D-Fructose, die nach einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung hergestellt wurde, kann z. B. als wässrige Lösung wie z. B. als Sirup bereitgestellt oder aus der Lösung isoliert werden. Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens nach vorliegender Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass D-Fructose, die gemäß vorliegender Erfindung gewonnen wird, isoliert wird, insbesondere in kristallisierter Form. Vorschriften zu Kristallisation von Fructose können aus dem Stand der Technik entnommen werden (z. B. EP 293 680 B1, EP 613 954B1, US 4,895,601, US 5,047,088).

In einem besonderen Aspekt wird bei einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung die Mischung aus D-Glucose und D-Fructose durch enzymatische oder nicht-enzymatische Spaltung von Saccharose, vorzugsweise durch enzymatische Spaltung von Saccharose, beispielsweise mit einer Invertase gewonnen, wobei die enzymatische Spaltung von Saccharose entweder in einem vorgelagerten separaten Schritt erfolgen kann oder aber im gleichen Reaktionsansatz wie die folgenden Redoxreaktionen. Es ist dabei möglich, zuerst die Saccharose mittels Invertase komplett zu spalten. Ebenfalls ist es möglich, schon während der laufenden Invertase-Reaktion an der freigesetzten Glucose die erfindungsgemäßen Redoxreaktionen durchzuführen.

Da durch das Verfahren gemäß vorliegender Erfindung sehr reine D-Fructose hergestellt werden kann, eignet sich diese Fructose für weitere Umsetzungen zu Grundchemikalien. Diese sind somit aus regenerativen Quellen zugänglich. Eine mögliche solche Umsetzung ist die Herstellung von Hydroxymethylfurfural (HMF). Der Ablauf eines solchen Verfahrens kann z. B. WO 2013/117585 A1 entnommen werden. HMF kann beispielsweise weiter zu Furandicarbonsäure (FDCA) umgesetzt werden. Dazu gibt es im Stand der Technik veröffentlichte Methoden (z. B. siehe WO 2015/193364 A1). FDCA ist ein wichtiger Grundstoff zur Herstellung von Polymeren aus regenerativen Quellen. Beispielsweise kann FDCA zur Herstellung des Kunststoffes Polyethylenfuranoat (PEF) eingesetzt werden. Dieser kann als Ersatz für Polyethylenterephthalat (PET) dienen und ist diesem in manchen Eigenschaften sogar überlegen. Ein Einsatzgebiet für PEF ist z. B. die Herstellung von

Verpackungsmaterial wie zum Beispiel Flaschen, welche beispielsweise zur Verpackung von Getränken, Kosmetika, Reinigungsmitteln etc. verwendet werden können.

Abkürzungen

h	Stunde(n)
HPLC	High-performance liquid chromatography
IPA	Isopropylalkohol (2-Propanol)
MeOH	Methanol
PET	Polyethylenterephthalat
PEF	Polyethylenfuranoat
RID	refractive index detector

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1

Schematische Darstellung der Reaktionen von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol. Als Enzyme können zum Beispiel eine Xylosereduktase mit Glucosereduktase-Aktivität („XR“) und eine Glucosedehydrogenase („GluDH“) verwendet werden.

Fig. 2

Schematische Darstellung der Reaktionen von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol sowie die weitere Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose. Als Enzyme können zum Beispiel eine Xylosereduktase mit Glucosereduktase-Aktivität („XR“) und eine Glucosedehydrogenase („GluDH“) sowie eine Sorbitoldehydrogenase („SDH“) verwendet werden.

Fig. 3

Schematische Darstellung der Reaktionen von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol in Gegenwart von D-Fructose. Beispiel einer Mischung von gleichen Teilen D-Glucose und D-Fructose. Sowohl mit einem geringeren als auch mit einem höheren Anteil von Fructose kann die Reaktion analog durchgeführt werden. Als Enzyme können zum Beispiel eine Xylosereduktase mit Glucosereduktase-Aktivität („XR“) und eine Glucosedehydrogenase („GluDH“) verwendet werden.

Fig. 4

Schematische Darstellung der Reaktionen von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol in Gegenwart von D-Fructose sowie die weitere Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fructose. Beispiel einer Mischung von gleichen Teilen D-Glucose und D-Fructose. Sowohl mit einem geringeren als auch mit einem höheren Anteil von Fructose kann die Reaktion analog durchgeführt werden. Als Enzyme können zum Beispiel eine Xylosereduktase mit Glucosereduktase-Aktivität („XR“) und eine Glucosedehydrogenase („GluDH“) sowie eine Sorbitoldehydrogenase („SDH“) verwendet werden.

Fig. 5

Reaktionsschema der Redoxreaktionen von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol. Es sind die enzymatischen Reaktionen unter Verwendung von Redoxcofaktoren dargestellt, sowie die gegenseitige Regenerierung der Redoxcofaktoren. Eine weitere Umsetzung des entstandenen Sorbitols zu Fructose ist möglich.

Beispiele

Alle Temperaturangaben sind in Grad Celsius (°C).

Beispiel 1

Umwandlung von D-Glucose zu D-Gluconsäure(-lacton) und D-Sorbitol in einer Mischung enthaltend D-Fructose

Es wurde folgende Reaktionsmischung hergestellt: dH₂O: Rest zu 500 µl Gesamtvolumen; 50 mM Triethanolaminpuffer pH 8.0 (eingestellt mit HCl); 5 % (w/v) D-Glucose; 5 % (w/v) D-Fructose; 0.2 mM NADP⁺; 5 U Xylose-Reduktase (aus *Candida parapsilosis*, rekombinant exprimiert in *E. coli*, Zellsuspension); 5 U Glucose-Dehydrogenase (aus *Bacillus subtilis*, rekombinant exprimiert in *E. coli*, Zell-Lysat); 10 mg CaCO₃. Die Reaktion wurde in einem Glasreaktionsgefäß durchgeführt, wobei der Deckel nicht vollständig verschlossen war, um ein Entweichen von evtl. entstehendem CO₂ zu ermöglichen. Es wurde für 24 h unter Schütteln inkubiert (Eppendorf Thermomix; 25°C; 800 rpm). Eine Analyse wurde mittels HPLC durchgeführt (Agilent 1200 Series, Säule: Phenomenex RezexTM RCM-Monosaccharide Calcium 300 x 7.8 mm (80°C), Detektor: RID (50°C), Laufmittel: H₂O HPLC grade 0.5 ml/min). Dabei wurde festgestellt, dass Fructose weiterhin zu ca. 5 % [w/v] in der Lösung vorhanden war. Anhand des entstandenen Sorbitols wurde der Umsatz der Glucose auf >90 % bestimmt (relativ zur ursprünglich vorhandenen Glucose). Zusätzlich wurde die Bildung von Gluconsäure nachgewiesen.

Beispiel 2

Umwandlung von D-Sorbitol zu D-Fructose in einer Mischung enthaltend D-Gluconat und D-Fructose

Es wurde folgende Reaktionsmischung hergestellt: dH₂O: Rest zu 500 µl Gesamtvolumen; 50 mM Triethanolaminpuffer pH 8,0 (eingestellt mit HCl); 2,5 % (w/v) Natrium-D-Gluconat; 2,5 % (w/v) D-Sorbitol; 5 % (w/v) D-Fructose (eine solche Zusammensetzung von Fructose, Sorbitol und Gluconsäure kann z. B. näherungsweise durch eine Reaktion nach Beispiel 1 erhalten werden); 0.2 mM NAD⁺; 10 U NADH-Oxidase (aus *Clostridium aminovalericum*, rekombinant exprimiert in *E. coli*, Zellsuspension); 12,5 U Xylitol-Dehydrogenase (aus *Galactocandida mastotermitis*, hier eingesetzt als Sorbitol-

Dehydrogenase, rekombinant exprimiert in *E. coli*, Zellsuspension). Die Reaktion wurde in einem Glasreaktionsgefäß durchgeführt. Dieses wurde für 24 h unter Schütteln inkubiert (Eppendorf Thermomix; 20°C; 800 rpm). Um die Zufuhr von Luft-Sauerstoff zu ermöglichen wurde das Reaktionsgefäß mit Alufolie verschlossen, in die mehrere Löcher gestochen wurden. Die Analytik erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Der Umsatz von Sorbitol zu Fructose (relativ zum ursprünglich vorhandenen Sorbitol) betrug > 99 % (w/w). Durch die Reaktion erhöhte sich die Fructose-Konzentration auf ca. 7,5 % (w/v). D-Gluconsäure war nach wie vor in der Lösung enthalten.

Beispiel 3 - Umsetzung einer Mischung von Glucose und Fructose zu Fructose – parallele Durchführung der Umsetzung von Glucose sowie der Oxidation des entstandenen Sorbitols in „one pot“

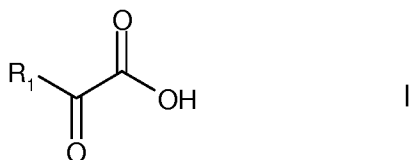
Es wurde folgende Reaktionsmischung hergestellt: ddH₂O (ad 500 µl), Calciumcarbonat (15 mg), 500 mM TEA/NaOH-Puffer 8.0 (50 µl), Glucose (25 mg), Fructose (25 mg), 10 mM NAD⁺ (20 µl), 10 mM NADP⁺ (10 µl), NADPH-abhängige Xylose-Reduktase (ca. 4 U), NADP-abhängige Glucose-Dehydrogenase (ca. 5 U), NADH-abhängige NADH-Oxidase (ca. 10 U), NAD-abhängige Sorbitol-Dehydrogenase (ca. 5 U). Die Reaktionsmischung wurde in einem 1.5 ml Glasgefäß mit Gas-durchlässigem Deckel für 16 h inkubiert (Eppendorf Thermomixer 20°C, 850 rpm). Die Reaktionsprodukte wurden mittels HPLC analysiert (Agilent 1200 Series, Säule Phenomenex Rezex RCM Monosaccharide Ca 300 x 7.8 mm). Die Fructose-Konzentration stieg von anfänglich 5 % (w/v) auf 6,9 % (w/w). Es wurde daneben ein nahezu vollständiger Verbrauch der Glucose nachgewiesen. Das Zwischenprodukt Sorbitol war nur in Spuren nachzuweisen, weshalb davon auszugehen ist, dass es kontinuierlich weiter zum Endprodukt Fructose umgesetzt wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Umwandlung von D-Glucose, umfassend einen Schritt a), in dem ein Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Gluconsäure(-lacton) oxidiert wird und ein dazu im Wesentlichen äquimolarer Teil der D-Glucose enzymatisch zu D-Sorbitol reduziert wird, wobei neben D-Glucose auch D-Fructose in der Reaktionsmischung des Schrittes a) vorhanden ist und wobei das Verfahren einen weiteren Schritt b) umfasst, in dem im Schritt a) aus der D-Glucose entstandenes D-Sorbitol enzymatisch zu D-Fructose oxidiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsmischung im Schritt a) mit einer Glucose-Dehydrogenase und einer Xylose-Reduktase mit Glucose-Reduktase-Aktivität oder mit einer sonstigen Glucose-Reduktase in Kontakt gebracht wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt b) das D-Sorbitol zur enzymatischen Oxidation mit einer Sorbitol-Dehydrogenase in Kontakt gebracht wird, wobei D-Sorbitol zu D-Fructose oxidiert wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Redoxcofaktor(en) NAD(P)^+ und/oder NAD(P)H in der Reaktionsmischung des Schrittes a) und/oder der Reaktionsmischung des Schrittes b) vorhanden sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Umsetzung von D-Sorbitol zu D-Fructose im Schritt b) entstandener reduzierter Redoxcofaktor NAD(P)H parallel kontinuierlich enzymatisch wieder in seine oxidierte Ausgangsform zurückgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Redoxcofaktor bei der Umsetzung von D-Sorbitol zu D-Fructose im Schritt b) im selben Reaktionsansatz durch mindestens ein weiteres Redoxenzym,

insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholdehydrogenasen, Zuckerdehydrogenasen, NAD(P)H-Oxidase, Hydrogenasen oder Laktatdehydrogenasen unter Verbrauch von Co-Substraten, insbesondere Ketonen, Aldehyden, Zuckern, Brenztraubensäure und deren Salze und/oder Sauerstoff bzw. unter Erzeugung von Wasserstoff, regeneriert wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass D-Sorbitol im Schritt b) in einem enzymatischen Verfahren unter Verwendung und Regenerierung der Redoxcofaktoren NAD^+/NADH oder $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in D-Fructose übergeführt wird, wobei bei der Regenerierungsreaktion, die den reduzierten Redoxcofaktor wieder in seine ursprüngliche oxidierte Form überführt, Sauerstoff, ein Aldehyd, ein Keton, ein Zucker oder eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R_1 für eine geradkettige oder verzweigt-kettige (C_1 - C_4)-Alkylgruppe oder für eine (C_1 - C_4)-Carboxyalkylgruppe steht, reduziert wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und b) im selben Reaktionsansatz ohne Isolierung des Zwischenprodukts D-Sorbitol erfolgen.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte a) und b) gleichzeitig durchgeführt werden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Gluconsäure(-lacton) während der Reaktion(en), nach einem Reaktionsschritt oder am Ende des Verfahrens abgetrennt wird, wobei das Verfahren zur Abtrennung von Gluconsäure(-lacton) vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ionenaustauscher-Chromatographie, Elektrodialyse, Membranfiltration und Fällung

durch Bildung eines schwerlöslichen Salzes.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass D-Fructose, die gewonnen wird, isoliert wird, insbesondere in kristallisierter Form.
12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung aus Glucose und Fructose durch enzymatische oder nicht-enzymatische Spaltung von Saccharose, vorzugsweise durch enzymatische Spaltung von Saccharose, beispielsweise mit einer Invertase gewonnen wird, wobei die enzymatische Spaltung von Saccharose entweder in einem vorgelagerten separaten Schritt erfolgen kann oder aber im gleichen Reaktionsansatz wie die folgenden Redoxreaktionen.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die D-Fructose im Schritt a) bei der Umsetzung von D-Glucose zu Gluconsäure(-lacton) bzw. Sorbitol im Wesentlichen unverändert bleibt.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil der D-Fructose in der Mischung enthaltend D-Glucose und D-Fructose bezogen auf die Gesamtsumme von Glucose und Fructose zwischen 10 % (w/w) und 95 % (w/w), bevorzugt zwischen 35 % (w/w) und 90 % (w/w), insbesondere bevorzugt zwischen 40 % (w/w) und 60 % (w/w) beträgt.

Fig. 4

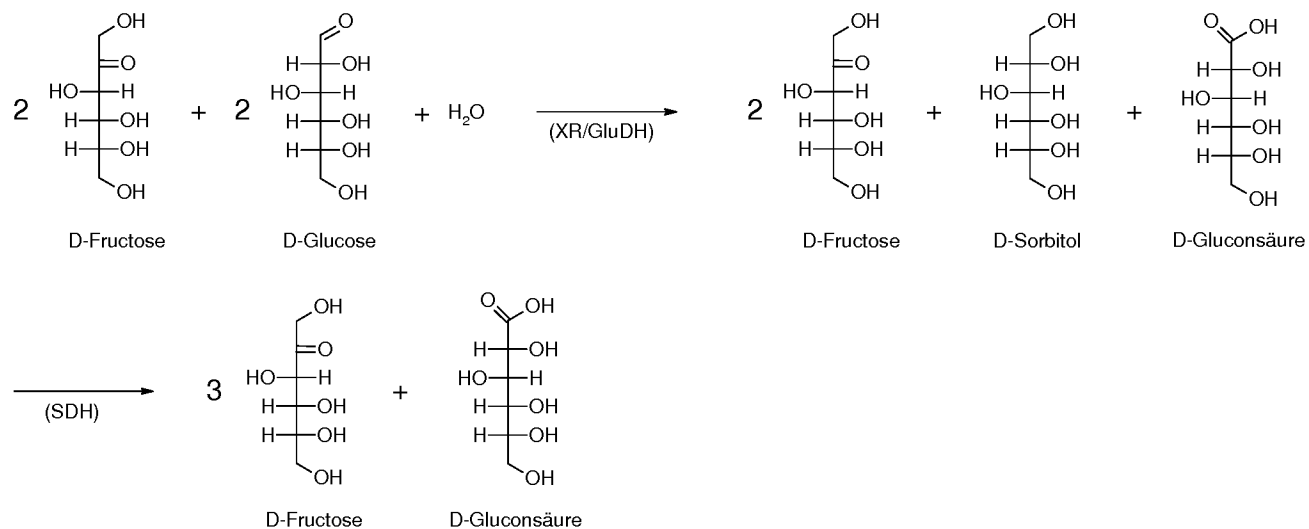
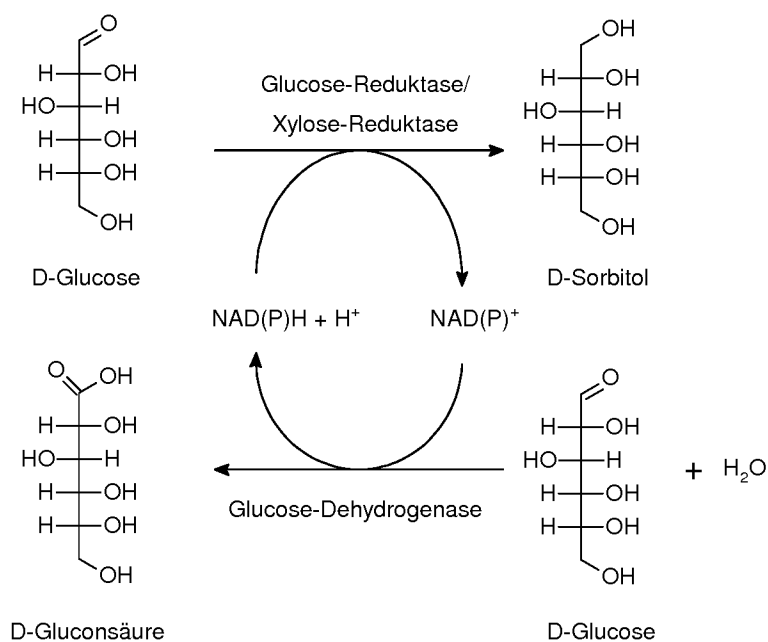


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/061978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P19/02 C12P7/58 C12P7/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, IBM-TDB, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IKEMI, M. ET AL.: "Sorbitol Production in Charged Membrane Bioreactor with Coenzyme Regeneration System: I. Selective Retainment of NADP(H) in a Continuous Reaction", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 36, no. 2, 20 June 1990 (1990-06-20), pages 149-154, XP002360459, abstract page 150, column 1, lines 16-26 page 152, column 2, line 22 - page 153, column 2, line 30; figure 4; table III page 154; table IV ----- -/--	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 2017

Date of mailing of the international search report

01/08/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuchs, Ulrike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/061978

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/117585 A1 (ANNIKKI GMBH) 15 August 2013 (2013-08-15) cited in the application page 6, line 24 - page 17, line 18 pages 24-25; examples 1, 2 pages 37-40; claims 1-13 -----	1-14
A	NIDETZKY, B. ET AL.: "Continuous Enzymatic Production of Xylitol with Simultaneous Coenzyme Regeneration in a Charged Membrane Reactor", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 52, no. 3, 1996, pages 387-396, XP002350972, cited in the application page 391, column 2, lines 4-11 page 392, column 1, lines 48-53 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/061978

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013117585 A1	15-08-2013	CA 2863137 A1	15-08-2013
		EP 2812440 A1	17-12-2014
		HK 1204011 A1	06-11-2015
		JP 2015507919 A	16-03-2015
		US 2015010965 A1	08-01-2015
		WO 2013117585 A1	15-08-2013

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12P19/02 C12P7/58 C12P7/18 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, IBM-TDB, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	IKEMI, M. ET AL.: "Sorbitol Production in Charged Membrane Bioreactor with Coenzyme Regeneration System: I. Selective Retainment of NADP(H) in a Continuous Reaction", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 36, Nr. 2, 20. Juni 1990 (1990-06-20), Seiten 149-154, XP002360459, Zusammenfassung Seite 150, Spalte 1, Zeilen 16-26 Seite 152, Spalte 2, Zeile 22 - Seite 153, Spalte 2, Zeile 30; Abbildung 4; Tabelle III Seite 154; Tabelle IV ----- -/--	1-14
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. Juli 2017		01/08/2017
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Fuchs, Ulrike

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2013/117585 A1 (ANNIKKI GMBH) 15. August 2013 (2013-08-15) in der Anmeldung erwähnt Seite 6, Zeile 24 - Seite 17, Zeile 18 Seiten 24-25; Beispiele 1, 2 Seiten 37-40; Ansprüche 1-13 -----	1-14
A	NIDETZKY, B. ET AL.: "Continuous Enzymatic Production of Xylitol with Simultaneous Coenzyme Regeneration in a Charged Membrane Reactor", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 52, Nr. 3, 1996, Seiten 387-396, XP002350972, in der Anmeldung erwähnt Seite 391, Spalte 2, Zeilen 4-11 Seite 392, Spalte 1, Zeilen 48-53 -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/061978

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
WO 2013117585	A1	15-08-2013	CA	2863137	A1	15-08-2013
			EP	2812440	A1	17-12-2014
			HK	1204011	A1	06-11-2015
			JP	2015507919	A	16-03-2015
			US	2015010965	A1	08-01-2015
			WO	2013117585	A1	15-08-2013
