

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 035**

21 Número de solicitud: 201730805

51 Int. Cl.:

C12P 17/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2018

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (70.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid ES;

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (10.0%) y

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN (20.0%)

72 Inventor/es:

CARRO ARAMBURU, Juan Rogelio;

FERNÁNDEZ FUEYO, Elena;

ALCALDE GALEOTE, Miguel;

MARTÍNEZ FERRER, Ángel Tomás;

FERREIRA, Patricia;

ULLRICH, René y

HOFRICHTER, Martin

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Composición enzimática y proceso enzimático para la producción de ácido 2,5-Furanodicarboxílico a partir de 5-Metoximetilfurfural usando dicha composición enzimática**

57 Resumen:

Composición enzimática y proceso enzimático para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico a partir de 5-metoximetilfurfural usando dicha composición enzimática.

En la presente invención, se hace referencia a una composición enzimática y al desarrollo de una cascada enzimática para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) a partir de 5-metoximetilfurfural (MMF). La cascada se desencadena mediante la oxidación de MMF por arilalcohol oxidasa, que produce H₂O₂ para que la peroxigenasa inespecífica lleve a cabo la escisión de un enlace éter liberando metanol, y la posterior oxigenación que conduce a la producción de FDCA. Otra enzima, metanol oxidasa, fue seleccionada para la producción in situ del H₂O₂ adicional requerido por la peroxigenasa inespecífica mediante la oxidación de un subproducto de la reacción.

ES 2 694 035 A1

DESCRIPCIÓN

Composición enzimática y proceso enzimático para la producción de ácido 2,5-Furanodicarboxílico a partir de 5-Metoximetilfurfural usando dicha composición enzimática

5

La invención se refiere a una composición enzimática y a un proceso para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico (en lo sucesivo en el presente documento, FDCA), a partir de 5-metoximetilfurfural (en lo sucesivo en el presente documento, MMF) renovable, obtenido de plantas, en presencia de dicha composición enzimática y por medio de una reacción de cascada enzimática autosostenida con el único consumo neto de oxígeno atmosférico y el propio MMF.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

En los últimos años, la necesidad de la sustitución de los materiales basados en el petróleo con otros renovables ha experimentado un aumento (Bozell, J. J. *et al.* (2010) *Green Chem.* 12:539-554.). De este modo, el ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) se considera hoy en día un precursor prometedor para la producción de bioplásticos renovables y biodegradables. Se espera que los poliésteres formados mediante la condensación de este elemento constitutivo con etilenglicol, conocidos como poli(furanodicarboxilatos de etileno) (PEF), sustituyan a otros poliésteres producidos a partir de combustibles fósiles, gracias a su origen renovable y sus propiedades mecánicas, que parecen ser incluso mejores que las de los poli(tereftalatos de etileno) (PET) (Papageorgiou, G. Z. *et al.* (2014) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16:7946-7958). Además, se espera que los PEF sean capaces de competir con el PET en términos económicos y medioambientales, dado que su producción disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero (De Jong, E. *et al.* (2012) *Furandicarboxylic acid (FDCA), A versatile building block for a very interesting class of polyesters*, pág. 1-13. *En P. Smith* (ed.), *Biobased monomers, polymers and materials*. ACS, Washington DC.). De hecho, el primer informe de la hidrólisis enzimática del PEF, que permite el reciclado de sus monómeros, ha salido a la luz recientemente (Pellis, A. *et al.* (2016) *J. Biotechnol.* 235:47-53).

20

25

30

El FDCA se puede obtener a partir de precursores que se forman por la deshidratación

ácida de la fructosa, obtenida directamente de plantas (como monosacárido o en el disacárido sacarosa) o mediante la isomerización de glucosa a partir de la hidrólisis de materiales celulósicos. Tales precursores son principalmente 5-hidroximetilfurfural (HMF) y 5-metoximetilfurfural (MMF). Este último se obtiene cuando la fructosa se
5 deshidrata en presencia de metanol o cuando se trata HMF con éste (Douša, M. *et al.* (2012) *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101:1811-1820; Balakrishnan, M. *et al.* (2012) *Green Chem.* 14:1626-1634.; Chen, P. X. *et al.* (2014) *J. Agric. Food Chem.* 62:4754-4761.) y se supone que es más estable al almacenamiento que el HMF. Se han realizado algunos intentos exitosos de obtener poliésteres a partir de MMF y sus
10 derivados (Pacheco, J. J. *et al.* (2014) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:8363-8367), y se ha creado una empresa conjunta entre BASF y Avantium —Synvina— para producir PEF a partir de MMF renovable.

El uso de enzimas para la producción de FDCA ha ganado impulso y se encuentran
15 disponibles varios informes de la oxidación de HMF a FDCA (Dijkman, W. P. *et al.* (2014) *Angewandte Chemie* 126:6633-6636; Carro, J. *et al.* (2015) *FEBS J.* 282:3218-3229). Sin embargo, no se puede encontrar ningún informe de la conversión enzimática de MMF en FDCA en la bibliografía. Además, el uso de oxidasas, enzimas que llevan a cabo oxidaciones selectivas sobre diferentes moléculas usando O₂ como
20 aceptor de electrones, es interesante para la industria debido a que pueden actuar sobre el sustrato con la única aportación de O₂ atmosférico, que se convierte en H₂O₂. De este modo, se pueden combinar con otras enzimas oxidativas que reducen este H₂O₂ para superar su incapacidad de llevar a cabo algunas reacciones, como se ha publicado para la conversión de HMF en FDCA en una cascada enzimática (Carro, J.
25 *et al.* (2015) *FEBS J.* 282:3218-3229).

Los métodos actuales para la reducción de FDCA emplean catalizadores químicos y disolventes que contienen ácidos tales como diluciones de ácido acético. El
30 documento de Patente WO 01/72732 reivindica la producción de FDCA a partir de otro compuesto químico, HMF, también obtenido a partir de la fructosa presente en la biomasa de las plantas. Sin embargo, HMF es inestable en las condiciones que se usan para su producción, dando lugar a productos secundarios y disminuyendo el rendimiento de HMF. Los éteres de HMF, tales como MMF, que se producen en las mismas condiciones que el HMF, pero en presencia de alcoholes alquílicos en lugar de
35 agua, han demostrado poseer mayores estabilidades en las condiciones que se emplean para su producción.

De este modo, varios documentos de patente describen procesos para la producción de FDCA a partir de MMF. Los documentos de Patente WO 2011/043660, WO 2012/161967 y WO 2014/163500 presentan diferentes métodos para la producción de
5 FDCA a partir de MMF, pero todos ellos usan catalizadores de oxidación tales como bromuro, cobalto o manganeso, junto con otros metales. Además, todos ellos describen procesos que tienen lugar a altas temperaturas (en el intervalo de 100-220 °C), y altas presiones (3-15 bar) usando reactores.

10 La ventaja del método que se describe en la presente invención es que no hace uso de catalizadores inorgánicos, sino de enzimas que cumplen con sus cometidos de forma sinérgica a temperatura ambiente y a presión atmosférica. Por lo tanto, este es el primer informe de la bioconversión de MMF en FDCA usando catalizadores enzimáticos con el único consumo neto de oxígeno atmosférico. La presente invención
15 se puede aplicar a la etapa de conversión de MMF en FDCA en la producción industrial de PEF, cambiando de los catalizadores inorgánicos empleados en la actualidad al uso de enzimas para la producción de FDCA. De esta forma, se ahorraría la energía requerida por las técnicas actuales -que dependen de altas temperaturas- y se usarían métodos más ecológicos.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención revela una nueva composición enzimática y un proceso para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA) a partir de 5-metoximetilfurfural
25 (MMF), que se obtiene a partir de plantas y, por lo tanto, es renovable, en presencia de dicha composición enzimática y por medio de una cascada enzimática con el único consumo neto de oxígeno atmosférico y el propio MMF. El MMF se obtiene mediante la deshidratación ácida de fructosa obtenida a partir de lignocelulosa en presencia de metanol y se supone que muestra mejor estabilidad de almacenamiento que el HMF.

30

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición enzimática que comprende: una aril-alcohol oxidasa, una peroxigenasa inespecífica y una metanol oxidasa.

35 En la presente invención, la expresión "aril-alcohol oxidasa" designa una enzima con una actividad de acuerdo con EC 1.1.3.7, que cataliza la deshidrogenación oxidativa

de una diversidad de alcoholes primarios alifáticos y aromáticos conjugados así como sus *gem*-diol homólogos con la reducción concomitante de O₂ a H₂O₂. Para los fines de la presente invención, la actividad de aril-alcohol oxidasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en Ruiz-Dueñas, F.J. *et al.* (2006) *Protein Express. Purif.* 5 45(1):191-199.

Preferentemente, la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*; sin embargo la aril-alcohol oxidasa podría ser de *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* o *Bjerkandera adusta*; o incluso de una especie fúngica diferente.

Preferentemente, la aril-alcohol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 99 % e incluso más preferentemente un 100 % de 10 identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 (número de registro GenBank AAC72747, que corresponde a una aril-alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii*).

SEQ ID NO. 1:

DFDYVVVGAGNAGNVVAARLTEDPDVSVLVLEAGVSDENVLGAEAPLLAPGLVPNSIF
 20 DWNYTTTAQAGYNGRSIAYPRGRMLGGSSSVHYMVMMRGSTEDFDRYAAVTGDEG
 WNWDNIQQFVGKNEMVPPADNHNTSGEFIPAVHGTNGSVSISLPGFPTPLDDRVL
 TTQEQSEEFFFNPDMTGHPLGISWSIASVGNQGRSSSSTAYLRPAQSRPNLSVLINA
 QVTKLVNSGITNGLPAFRCVEYAEQEGAPTTTCAKKEVVLSAGSVGTPILLQLSGIGD
 ENDLSSVGIDTIVNNPSVGRNLSHLLLPAAFFVNSNQTFDNIFRNSSEFNADLDQWT
 25 NTRTGPLTALIANHLAWLRLPSNSSIFQTFPDPAAGPNSAHWETIFSNQWFHPAIPRP
 DTGSFMSVTNALISPVARGDIKLATSNPFDKPLINPQYLSTEFDIFTMIQAVKSNLRFSL
 GQAWADFVIRPFDPRLRDPTNDAAIESYIRDNANTIFHPVGTASMSPRGASWGVVDP
 DLKVKGVDGLRIVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGERGADLIKADQ

30 En la presente invención, la expresión "peroxigenasa inespecífica" designa una enzima con una actividad de acuerdo con EC 1.11.2.1, que cataliza la inserción de un átomo de oxígeno de H₂O₂ en una diversidad de sustratos aromáticos y alifáticos (lineales, ramificados y cíclicos), dando como resultado la peroxigenación o desalquilación de dichos sustratos. Para los fines de la presente invención, la actividad 35 de peroxigenasa se determina de acuerdo con el procedimiento que se describe en Ullrich, R. *et al.* (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8):4575-4581.

Preferentemente, la peroxigenasa inespecifica es de *Agrocybe aegerita*; sin embargo, la peroxigenasa inespecifica podría ser de *Marasmius rotula*, *Coprinopsis cinerea* o *Chaetomium globosum* o incluso de una especie fúngica diferente.

5

Preferentemente, la peroxigenasa inespecifica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, incluso más preferentemente al menos un 99 % e incluso más preferentemente un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 (que corresponde a una variante evolucionada de la peroxigenasa inespecifica de *Agrocybe aegerita*, denominada PaDa-I, documento de Patente WO2017081355A1).

10

SEQ ID NO. 3:

15

EPGLPPGPLENSSAKLVNDEAHPWKPLRPGDIRGPCGLNTLASHGYLPRNGVATPA
 QIINAVQEGFNFDNQAAIFATYAAHLVDGNLITDLLSIGRKTRLTGPDPPPPASVGG
 LN
 EHGTFEGDASMTRGD AFFGNNHDFNETLFEQLVDYSNRFGGGKYNLTVAGELRFKRI
 QDSIATNP NFSFVDFRFF TAYGETTFPANLFVDGRRDDGQLDMAARSFFQFSRMPD
 DFFRAPSPRSGTGVEVVVQAHPMQPGRNVGKINSYTVDPTSSDFSTPCLMYEKFVNI
 20 TVKSLYPNPTVQLRKALNTNLDFLFQGVAAAGCTQVFPYGRD

20

En la presente invención, la expresión "metanol oxidasa" designa una enzima con actividad de acuerdo con EC 1.1.3.13, que cataliza la deshidrogenación oxidativa de metanol así como otros alcoholes alifáticos cortos con la reducción concomitante de O_2 a H_2O_2 .

25

Preferentemente, la metanol oxidasa es de *Pichia pastoris*; sin embargo, la metanol oxidasa podría ser de una especie fúngica diferente.

30

Preferentemente, la metanol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 99 %, incluso más preferentemente un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 (que corresponde a metanol oxidasa de *Pichia pastoris*, número de registro GenBank AAB57850).

35

SEQ ID NO. 2:

MAIPEEFDILVLGGGSSGSCIAGRANLDHSLKVGLEAGENLNNPWVYLPGIYPRNM
 KLDSKTASFYTSNPSPHLNGRRRAIVPCANILGGGSSINFMMYTRGSASDYDDFEAEG
 WKTKDLLPLMKKTETYQRACNNPEIHGFEGPIKVSFGNYTYPVCQDFLRATESQGIPY
 5 VDDLEDLVTAHGAEHWLKWINRDTGRRSDSAHAFVHSTMRNHDNLYLICNTKVDKIIV
 EDGRAAAVRTVPSKPLNAKKPTHKVYRARTQIVLSCGTISSPLVLQRSGFGDPIKLRAA
 GVKPLVNLPGVGRNFQDHYCFFSPYRIKPQYESFDDFVRGDANIQKKVFDQWYANG
 TGPLATNGIEAGVKIRPTPEELSQMDESFAQEGYREYFEDKPKDKPVMHYSIIAGFFGDH
 TKIPPGKYMTMFHFLEYPFSRGSIHITSPDPYATPDFDPGFMNDERDMAPMVWSYKK
 10 SRETARKMDHFAGEVTSHHPLFPYSSEARAYEMDLETSNAYGGPLNLTAGLAHGSW
 TQPLKKPAGRNEGHTSNQVELHPDIEYDEEDDKAIENYIREHTETTWHCLGTCSIGP
 REGSKIVKWGGVLDHRSNVYGVKGLKVGDLVCPDNVGCNTYTTALLIGEKTATLVG
 EDLGYTGEALDMTVPQFKLGTYEKTGLARF

15 El término "identidad", como se usa en el presente documento, en el contexto de la descripción de dos o más secuencias de aminoácidos, se refiere a un porcentaje especificado de coincidencias de residuos aminoacídicos en las posiciones de un alineamiento de dos secuencias de aminoácidos. Los métodos de alineamiento de secuencia para comparación se conocen bien en el estado de la técnica. El grado de
 20 identidad se puede determinar usando el método de Clustal (Higgins, 1989, *CABIOS* 5: 151-153), el método de Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730), el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.* 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 287 Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, 25 (WI)); BLAST o BLASTN, EMBOSS Needle y
 25 FASTA (Altschul *et al.* 1999, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). Además, también se puede usar el algoritmo de Smith-Waterman con el fin de determinar el grado de identidad entre dos secuencias. Preferentemente, el grado de identidad se determina usando BLAST con los parámetros por defecto. Este software está disponible de forma pública en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for*
 30 *Biotechnology Information* (NCBI)).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para la producción de FDCA a partir de MMF en una reacción de cascada enzimática autosostenida que comprende poner en contacto MMF con la composición enzimática
 35 que comprende una aril-alcohol oxidasa y una peroxigenasa inespecífica en medio acuoso y en presencia de oxígeno.

En una realización preferente de la invención, la composición enzimática que se usa en el proceso también comprende una metanol oxidasa.

5 La aril-alcohol oxidasa, la peroxigenasa inespecífica y la metanol oxidasa son preferentemente como se definen en el primer aspecto de la invención. Es decir, preferentemente, la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*; sin embargo la aril-alcohol oxidasa podría ser de *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* o *Bjerkandera adusta*; o incluso de una especie fúngica diferente. Preferentemente, la
10 aril-alcohol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 99 % e incluso más preferentemente un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1.

15

Preferentemente, la peroxigenasa inespecífica es de *Agrocybe aegerita*; sin embargo, la peroxigenasa inespecífica podría ser de *Marasmius rotula*, *Coprinopsis cinerea* o *Chaetomium globosum* o incluso de una especie fúngica diferente. Preferentemente, la peroxigenasa inespecífica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al
20 menos un 60 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, incluso más preferentemente al menos un 99 % e incluso más preferentemente un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

25 Preferentemente, la metanol oxidasa es de *Pichia pastoris*; sin embargo, la metanol oxidasa podría ser de una especie fúngica diferente. Preferentemente, la metanol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 99 %, incluso más preferentemente un 100 % de
30 identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

En una realización preferente de la presente invención, se añaden tampones al medio de reacción para alcanzar el pH deseado. Preferentemente, los tampones se basan en fosfatos, tales como soluciones acuosas de fosfato sódico.

35

La reacción se lleva a cabo en un intervalo de 12 °C a 30 °C, preferentemente a 28 °C

y con valores de pH de 5 a 8, preferentemente el pH es 7. Los tiempos de reacción están en el intervalo de 1 h-145 h.

5 En una realización preferente de la presente invención, la proporción molar entre el MMF y cada una de las enzimas aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica está entre 1:0,002 y 1:0,03, más preferentemente 1:0,0033. Y la proporción molar entre el MMF y la alcohol oxidasa, si estuviera presente, está entre 1:0,00066.

10 En una realización de la presente invención, se añade metanol a los medios de reacción. Preferentemente, se añade después de 72 h de incubación de la mezcla de reacción. Preferentemente, el metanol se añade con una concentración final de 0,5 mM.

15 En otra realización de la presente invención, se añade H₂O₂ al medio de reacción. Más preferentemente, se añade H₂O₂ con una concentración final de 1,5 mM. Preferentemente, se añade H₂O₂ al medio de reacción cuando la reacción tiene lugar en presencia de la aril-alcohol oxidasa y la peroxigenasa inespecífica, pero en ausencia de metanol oxidasa.

20 El proceso de la presente invención se describe como una reacción en un solo paso en la que las enzimas mencionadas anteriormente se añaden a una solución de MMF preferentemente tamponada a pH 7. La aril-alcohol oxidasa cataliza la oxidación del grupo carbonilo del MMF gracias a su capacidad ya referida para oxidar las formas de diol *geminal* hidratadas de los aldehídos para producir un ácido, ácido 5-
25 metoximetilfuranocarboxílico (MMFA), y peróxido de hidrógeno debido a la reducción del oxígeno molecular atmosférico. Tanto MMFA como peróxido de hidrógeno son sustratos (reductor y oxidante, respectivamente) para la peroxigenasa inespecífica, que cataliza la escisión del enlace éter del MMFA para dar lugar a: i) ácido 5-
30 formilfuranocarboxílico (FFCA), que porta un grupo carbonilo y un grupo carboxílico; ii) metanol (de la oxigenación del grupo saliente metilo); y iii) agua (de la desoxigenación del peróxido de hidrógeno). El FFCA producido también es un sustrato para la peroxigenasa inespecífica, que cataliza la hidroxilación de su grupo carbonilo, convirtiendo de ese modo FFCA en FDCA a costa de peróxido de hidrógeno. La
35 metanol oxidasa desempeña el papel de suministrar peróxido de hidrógeno a la peroxigenasa inespecífica mediante la oxidación del metanol producido como producto secundario en metanal, dado que la reacción de la aril-alcohol oxidasa no produce

suficiente peróxido de hidrógeno para convertir todo el MMF en FDCA.

Usando el enfoque descrito anteriormente, se obtiene una conversión de un 70 % del MMF inicial en FDCA después de 120 horas, según se revela mediante la
5 identificación y cuantificación por GC-MS de los productos de reacción. Por lo tanto, los sustratos iniciales consumidos son MMF y oxígeno atmosférico y los productos de la cascada enzimática son FDCA (70 %), MMFA (30 %) (porcentajes molares de MMFA inicial), dos equivalentes de agua y un equivalente de metanal. El proceso descrito presenta un método para la producción de FDCA a partir de MMF con el uso
10 de catalizadores enzimáticos que no consumen otros recursos más que el compuesto químico que se convierte y oxígeno atmosférico y tiene lugar a temperatura ambiente.

Si no se incluye metanol oxidasa en la composición enzimática (y contuviera solo aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica), el proceso, en las mismas condiciones
15 descritas anteriormente, da como resultado rendimientos de FDCA de un 25 % (en ausencia de peróxido de hidrógeno añadido) y un 40 % (en presencia de peróxido de hidrógeno añadido).

En resumen, la presente invención proporciona un proceso como se ha definido
20 anteriormente para la producción de FDCA a partir de MMF renovable obtenido de plantas. El MMF es el producto de la deshidratación de la fructosa que se origina de la hidrólisis e isomerización de materiales que contienen azúcares (celulósicos) de biomasa de plantas en presencia de metanol a pH ácido. Por lo tanto, es un compuesto renovable que da lugar a FDCA si su grupo carbonilo y su grupo metoxilo
25 se convierten en ácidos carboxílicos.

FDCA da lugar a poli(furanodicarboxilatos de etileno) (en lo sucesivo en el presente documento PEF) si se condensa con etilenglicol. De acuerdo con la bibliografía, los PEF exhiben buenas propiedades mecánicas y de barrera y son, de ese modo,
30 candidatos a sustituir a otros poliésteres tales como PET o PBT. La comparación de la producción de PEF y PET mostró que la cantidad total de energía no renovable disminuyó en un 40-50 %, mientras que la emisión de gases de efecto invernadero disminuyó en un 45-55 %, en la producción de los PEF. Además, ya se han sintetizado PEF obtenidos a partir de MMF y se pueden hidrolizar enzimáticamente para el
35 reciclado de sus componentes.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica de la presente invención. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Otros objetivos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la memoria descriptiva o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1. Gráfico que muestra el porcentaje molar de FDCA producido a partir del MMF inicial. Línea de puntos: cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa del hongo *Pleurotus eryngii* y peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita*; línea de guiones y puntos: cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa del hongo *Pleurotus eryngii* y peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* a la que se añade H₂O₂ (1,5 mM) desde el inicio de la reacción; línea continua: cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa del hongo *Pleurotus eryngii*, peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* y metanol oxidasa; línea de guiones: cascada de aril-alcohol oxidasa del hongo *Pleurotus eryngii*, peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* y metanol oxidasa a la que se añadió metanol (0,5 mM) después de 72 h de reacción.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica para la producción de FDCA a partir de MMF

30

Se incubaba una solución de MMF 1,5 mM en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, con aril-alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii* (SEQ ID NO. 1) (5 μM) y peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* (SEQ ID NO. 3) (5 μM) en condiciones de agitación a 200 rpm y 28 °C en una cámara termostatzada.

35

La AAO del hongo *Pleurotus eryngii* se obtiene de forma heteróloga como una proteína recombinante en *Escherichia coli* W3110 que aloja el vector pFLAG1 con el ADNc de AAO maduro. La enzima se produce como cuerpos de inclusión y además se repliega
5 *in vitro* y se purifica como se ha descrito anteriormente en Ruiz-Dueñas, F.J. *et al.* (2006) *Protein Express. Purif.* 45(1):191-199.

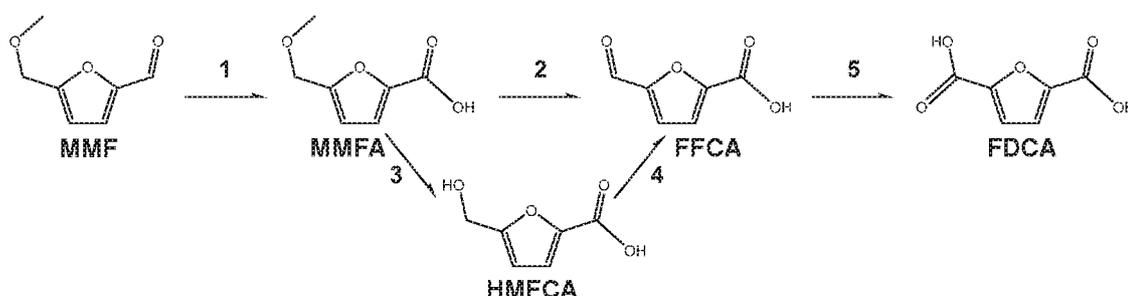
La variante PaDa-I de UPO de *Agrocybe aegerita* se produce en *Pichia pastoris* que aloja el vector Ppicz-B-PaDa-I en un fermentador de vaso de vidrio de 7 l. La expresión
10 se induce mediante la adición de metanol y la enzima se purifica cromatográficamente usando columnas de Sepharose FF y Q-source (GE Healthcare).

Se recogen muestras de 250 μ l después de diferentes tiempos de incubación y las reacciones se detienen por adición de HCl hasta que se alcanza un pH de 2-3. Los
15 valores bajos de pH causan la protonación de los ácidos orgánicos y permiten su posterior extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico. Con el fin de analizar los productos de reacción, los últimos se extraen mezclando minuciosamente las muestras con un exceso de *t*-butil metil éter tres veces, se desecan usando Na_2SO_4 y se evapora el *t*-butil metil éter usando un rotavapor a temperatura ambiente. Las
20 mezclas se derivatizan con 50 μ l de BSTFA durante 15 min a 25 °C (Teixidó, E. *et al.* *Chromatogr. A* 1135:85-90).

Los productos de las reacciones se separan y se identifican mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en un cromatógrafo de gases equipado con una
25 columna HP-5MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA; 30 m x 0,25 mm de diámetro interno; 0,25 μ m de espesor de película) acoplado a un detector de masas de cuadrupolo. El programa del horno comienza a 110 °C durante 2 min, aumentando a 20 °C \cdot min⁻¹ hasta 310 °C. Se usa helio como gas portador a un caudal de 1,2 ml \cdot min⁻¹. Los compuestos supuestamente implicados en la ruta oxidativa del MMF (Esquema 1)
30 se identifican por comparación de sus espectros de masas con los de sus estándares derivatizados. Los factores de respuesta se determinan como las pendientes de los ajustes de las respuestas de diversas concentraciones de dichos compuestos estándar (después de su extracción líquido-líquido y derivatización) en función de la concentración a una ecuación lineal. Estos factores de respuesta se usan para estimar
35 el porcentaje molar de cada uno de los compuestos en las reacciones.

Esquema 1. Rutas propuestas para la oxidación de MMF en FDCA. MMF, 5-metoximetilfurfural; MMFA, ácido 5-metoximetilfuranocarboxílico; HMFCA, ácido 5-hidroximetil-2-furanocarboxílico; FFCA, ácido 5-formilfuranocarboxílico; FDCA, ácido 2,5-furanodicarboxílico.

5



La cuantificación de los productos de reacción de la cascada enzimática que implica aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica con MMF mostró que un 25 % del MMF inicial se había convertido en FDCA (línea de puntos de la Figura 1). La reacción demostró haber finalizado después de 24 h de incubación. A la luz de estos resultados, se supone que AAO cataliza la reacción del Esquema 1, mientras que la peroxigenasa inespecífica debe catalizar las reacciones 2 y 5 o 3, 4 y 5 con el fin de producir FDCA.

15

Este bajo rendimiento de FDCA se debe probablemente al agotamiento de H_2O_2 , dado que la aril-alcohol oxidasa produce solo 1 equivalente de H_2O_2 , mientras que UPO requeriría, al menos, 2 equivalentes para convertir todo el MMF en FDCA.

Ejemplo 2. Cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica con la adición de H_2O_2 para la producción de FDCA a partir de MMF

Dados los bajos rendimientos obtenidos en el Ejemplo 1 debidos a la escasez de H_2O_2 , se añadió este último a la realización para obtener un mayor rendimiento de FDCA. Se incubó una solución de MMF 1,5 mM en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, con aril-alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii* (SEQ ID NO. 1) (5 μ M), peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* (SEQ ID NO. 3) (5 μ M) y H_2O_2 en condiciones de agitación a 200 rpm y 28 °C en una cámara termostatizada. Los procedimientos fueron como se describen para el análisis de los productos de reacción en el Ejemplo 1.

30

El análisis y la cuantificación de los productos de la reacción mostraron que el rendimiento de FDCA mejora mediante la adición de H_2O_2 , que actúa como sustrato necesario para la peroxigenasa inespecífica. Los rendimientos de FDCA alcanzaron un 40 % de conversión a partir del MMF inicial (línea de guiones y puntos de la Figura 1).

5 A pesar del hecho de que la concentración de H_2O_2 (añadido de forma exógena y producido por la aril-alcohol oxidasa) sería suficiente para la conversión total de MMF en FDCA, no se logró. Esto se puede deber al hecho de que la peroxigenasa inespecífica es inestable en presencia de H_2O_2 y que posee una actividad catalasa relativamente baja, lo que significa que puede catalizar la desoxigenación de H_2O_2 en

10 H_2O sin donar el O a ningún receptor.

Ejemplo 3. Cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa, peroxigenasa inespecífica y metanol oxidasa para la producción de FDCA a partir de MMF

15 Con el fin de aumentar el rendimiento de FDCA conseguido en el Ejemplo 2, se incubaba una solución de MMF 1,5 mM en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,0, con aril-alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii* (SEQ ID NO. 1) (5 μ M), peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* (SEQ ID NO. 3) (5 μ M) y metanol oxidasa de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO. 2) (adquirida en Sigma-Aldrich) (1 μ M) en condiciones de agitación a 200

20 rpm y 28 °C en una cámara termostatzada. Si la reacción transcurriera a través de las etapas 1, 2 y 5 del Esquema 1, se produciría metanol como producto secundario de la desmetoxilación de la molécula de MMFA por parte de la peroxigenasa inespecífica, dado que esta enzima puede escindir éteres por introducción de un átomo de O formando un grupo hidroxilo y carbonilo en cada uno de los productos. Se supone que

25 el uso de un sistema enzimático para la producción de H_2O_2 ralentiza su liberación de un modo tal que el rendimiento de la peroxigenasa inespecífica podría mejorar. Los procedimientos para la identificación de los productos de reacción son como se describen en el Ejemplo 1.

30 El análisis y la cuantificación de los productos de reacción revelaron que, después de 145 h se había convertido un 70 % del MMF inicial en FDCA debido a la cascada enzimática que se describe en el presente documento (línea continua de la Figura 1). La reacción debe transcurrir a través de las etapas 1, 2 y 5 del Esquema 1, produciendo de este modo metanol como producto secundario que se usa por parte de

35 la metanol oxidasa para la producción de H_2O_2 adicional para que la peroxigenasa inespecífica catalice las reacciones deseadas. Las sinergias entre las tres enzimas se

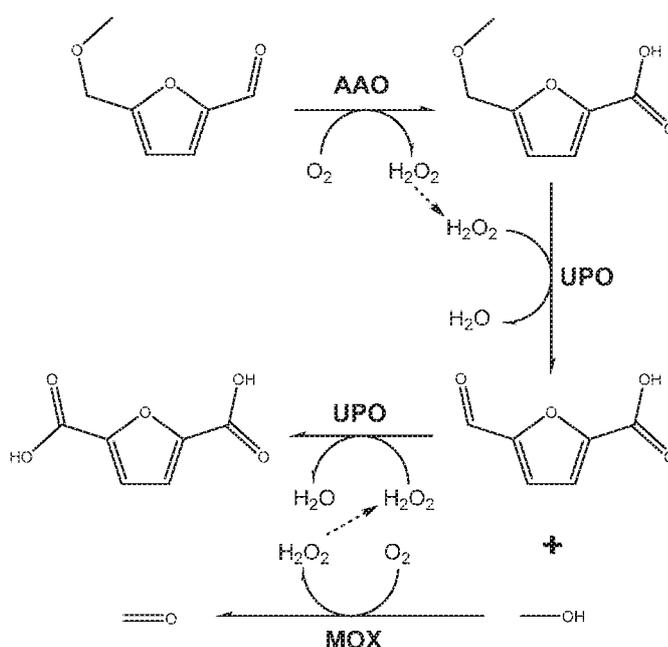
representan en el Esquema 2.

Ejemplo 4. Cascada enzimática de aril-alcohol oxidasa, peroxigenasa inespecífica y metanol oxidasa con la adición de metanol para la producción de FDCA a partir de MMF

Con el objetivo de aumentar el rendimiento de FDCA descrito en el Ejemplo 3 debido a la producción de H_2O_2 de forma dependiente de la enzima (que implica una liberación gradual de dicho oxidante químico), se dispuso una realización tal como la descrita en el Ejemplo 3, a la que se añadió metanol (0,5 mM, concentración final) después de 72 h de incubación. Los procedimientos para el análisis de los productos de reacción son como se describen en el Ejemplo 1.

El análisis y la cuantificación de los productos de reacción revelan que, después de 120 h de incubación de la realización que se describe en este Ejemplo 4, más de un 90 % del MMF inicial se convierte en FDCA (línea de guiones en la Figura 1). Por lo tanto, la adición de metanol aumenta la disponibilidad de H_2O_2 debido a la acción de la metanol oxidasa que alimenta la peroxigenasa inespecífica para producir mayores cantidades de FDCA.

Esquema 2. Cascada enzimática autosuficiente desarrollada para la producción de FDCA a partir de MMF.



CONCLUSIONES

En la presente invención, los presentes inventores han demostrado en primer lugar
5 que AAO y UPO son capaces de catalizar la conversión parcial (25 %) de MMF
renovable en FDCA en una cascada enzimática que implica los dos biocatalizadores,
MMF como sustrato, y O_2 , beneficiándose del H_2O_2 liberado como producto secundario
por la AAO. La adición de MOX a la reacción mejora drásticamente el rendimiento de
10 FDCA (70 %), que está limitado por la cantidad de H_2O_2 producida por AAO, gracias a
la oxidación del metanol liberado previamente por UPO y la liberación concomitante de
 H_2O_2 . Por lo tanto, se alcanza una conversión de un 70 % solo con la participación de
los biocatalizadores, O_2 y los productos secundarios de la reacción. Este rendimiento
se puede mejorar además hasta más de un 90 % mediante la adición de metanol
exógeno, que actúa como sustrato para MOX que produce H_2O_2 adicional para UPO.

15

La producción enzimática de H_2O_2 prueba ser mejor que su adición debido a la
inestabilidad de la peroxigenasa inespecífica en presencia de altas concentraciones de
 H_2O_2 en la mezcla de reacción.

REIVINDICACIONES

1. Composición enzimática que comprende: una aril-alcohol oxidasa, una peroxigenasa inespecífica y una metanol oxidasa.
5
2. Una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación previa en la que la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*, de *Pleurotus ostreatus*, de *Pleurotus pulmonarius* o de *Bjerkandera adusta*.
- 10 3. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*.
4. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la aril-alcohol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos
15 con al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 1.
5. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la aril-alcohol oxidasa consiste en SEQ ID NO. 1.
- 20 6. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la peroxigenasa inespecífica es de *Agrocybe aegerita*, de *Marasmius rotula*, de *Coprinopsis cinerea* o de *Chaetomium globosum*.
7. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
25 previas en la que la peroxigenasa inespecífica es de *Agrocybe aegerita*.
8. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la peroxigenasa inespecífica comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 3.
- 30 9. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la peroxigenasa inespecífica consiste en SEQ ID NO. 3.
10. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la metanol oxidasa es de *Pichia pastoris*.
35
11. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

previas en la que la metanol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 2.

5 12. Una composición enzimática de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la metanol oxidasa consiste en SEQ ID NO. 2.

13. Proceso para la producción de ácido 2,5-furanodicarboxílico a partir de 5-metoximetilfurfural que comprende poner en contacto el 5-metoximetilfurfural simultáneamente con la composición enzimática que comprende una aril-alcohol oxidasa y una peroxigenasa inespecífica, en medio acuoso y en presencia de oxígeno.
10

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la composición enzimática también comprende una metanol oxidasa.

15 15. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en el que se añade metanol a la mezcla de reacción.

16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que se añade metanol a una concentración final de 0,5 mM.
20

17. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que la reacción se lleva a cabo a una temperatura que varía entre 12 °C y 30 °C.

18. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en el que
25 la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 28 °C.

19. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en el que el pH del medio de reacción está entre 5 y 8.

30 20. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en el que el pH del medio de reacción es 7.

21. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20 en el que la proporción molar entre 5-metoximetilfurfural y cada una de las enzimas aril-alcohol oxidasa y peroxigenasa inespecífica está entre 1:0,002 y 1:0,03.
35

22. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-21 en el que la proporción molar entre el 5-metoximetilfurfural y la metanol oxidasa está entre 1:0,00066.
- 5 23. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-22, en el que el tiempo de reacción está entre 1 h y 145 h.
24. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-23, en el que se añade H₂O₂ al medio de reacción.
- 10 25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que se añade H₂O₂ a una concentración final de 1,5 mM.
26. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-25 en el que
15 la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*, de *Pleurotus ostreatus*, de *Pleurotus pulmonarius* o de *Bjerkandera adusta*.
27. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-26 en el que la aril-alcohol oxidasa es de *Pleurotus eryngii*.
- 20 28. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-27 en el que la aril-alcohol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 1.
- 25 29. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-28 en el que la aril-alcohol oxidasa consiste en SEQ ID NO. 1.
- 30 30. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-29 en el que la peroxigenasa inespecífica es de *Agrocybe aegerita*, de *Marasmius rotula*, de *Coprinopsis cinerea* o de *Chaetomium globosum*.
31. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-30 en el que la peroxigenasa inespecífica es de *Agrocybe aegerita*.
- 35 32. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-31 en el que la peroxigenasa inespecífica comprende una secuencia de aminoácidos con al menos

un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 3.

33. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-32 en el que la peroxigenasa inespecífica consiste en SEQ ID NO. 3.

5

34. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-33 en el que la metanol oxidasa es de *Pichia pastoris*.

35. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-34 en el que la metanol oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO. 2.

10

36. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-35 en el que la metanol oxidasa consiste en SEQ ID NO. 2.

15

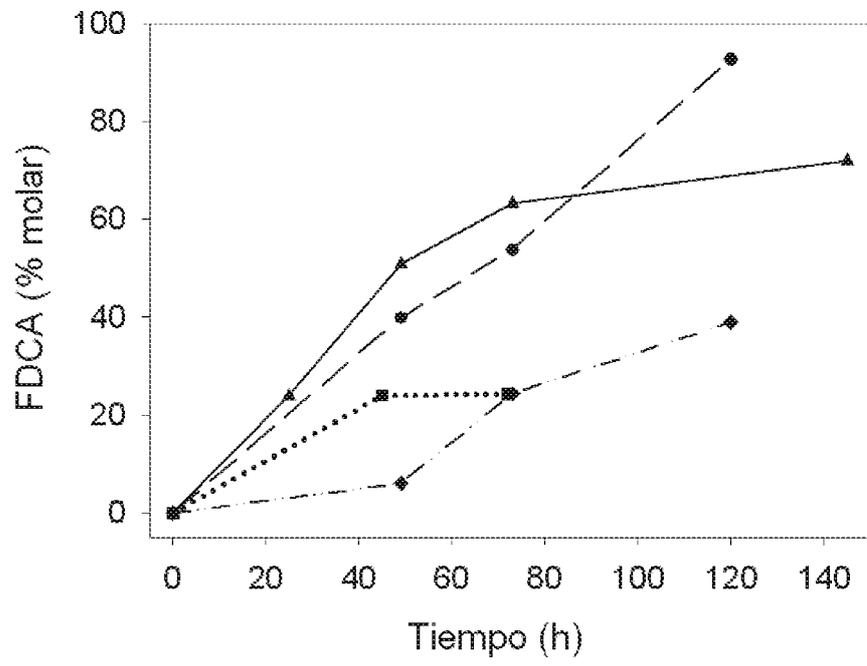


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201730805

②² Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2017

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12P17/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CARRO, J. et al. "5-hydroxymethylfurfural conversion by fungal aryl-alcohol oxidase and unspecific peroxygenase". THE FEBS JOURNAL, 01/08/2015, Vol. 282, N° 16, páginas 3218-3229, <DOI: 10.1111/febs.13177>, todo el documento.	1-36
A	WO 2009023174 A2 (ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY) 19/02/2009, todo el documento especialmente página 11, ejemplo 1A, párrafo [0041].	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.12.2017

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS