

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 547 593**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **83 09900**

⑤1 Int Cl³ : C 12 N 9/12; C 12 P 19/00 // C 12 R 1/145,
1/38.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 15 juin 1983.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 51 du 21 décembre 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BEGHIN-SAY SA.* — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Alain Guibert, Patrice Perlot et Pierre
Monsan.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : J. P. Quere.

⑤4 Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase, saccharose phosphorylase obtenue par le procédé et application
à la synthèse de l'acide glucose-1-phosphorique et de ses sels.

⑤7 Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase, sac-
charose phosphorylase obtenu par le procédé et application à
la synthèse de l'acide glucose-1-phosphorique et de ses sels.

Selon un mode préféré de l'invention, le procédé consiste à
inoculer avec une souche de micro-organisme *Leuconostoc*
mesenteroides répertoriée ATCC 12291 un milieu de culture
comportant du saccharose, de la tryptone, un extrait de levure,
du phosphate de sodium ou de potassium, des oligoéléments
en solution, un antimousse comprenant au moins un ester d'un
polyétherpolyol et d'un acide gras insaturé ou polyinsaturé.

Ce procédé permet une production industrielle de l'enzyme.

L'invention a également pour objet la fabrication de l'acide
glucose-1-phosphorique et de ses sels par mise en contact de
l'enzyme obtenue avec du saccharose et au moins un sel de
phosphate alcalin.

FR 2 547 593 - A1

PROCEDE D'OBTENTION DE SACCHAROSE PHOSPHORYLASE,
SACCHAROSE PHOSPHORYLASE OBTENUE PAR LE PROCEDE ET
APPLICATION A LA SYNTHESE DE L'ACIDE GLUCOSE-1-PHOS-
PHORIQUE ET DE SES SELS.

5

L'invention a pour objet un procédé perfectionné d'obtention de
saccharose phosphorylase consistant à inoculer, avec un microorga-
nisme susceptible de produire ladite enzyme, un milieu de culture
comportant au moins :

10

- une quantité de mono - ou di - saccharide seul ou en
mélange comprenant du saccharose,
- une source d'azote protéique,
- du phosphate de sodium ou de potassium,
- des oligoéléments en solution,

15

puis à cultiver le mélange à une température comprise entre 25 et
35° C et ensuite à structurer le microorganisme et extraire
l'enzyme.

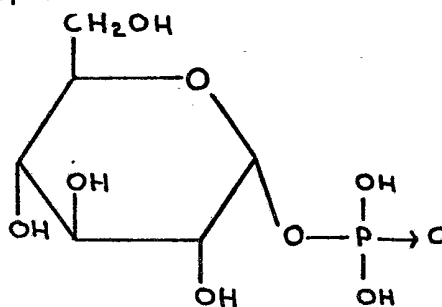
20

L'invention a également pour objet la saccharose phosphorylase
obtenue par le procédé et l'application de celle-ci à la synthèse de
l'acide glucose-1-phosphorique et de ses sels.

25

L'acide glucose-1-phosphorique, encore dénommé ester de Cori, de
formule développée :

30



est un acide fort, stable et non réducteur.

35

Dans la suite de l'exposé, l'acide glucose-1-phosphorique sera
appelé G.1.P., G.1.P.K₂ représentant, par exemple, le sel
dipotassique.

Si les études biochimiques relatives au G.1.P. sont très nombreuses, il n'en est pas de même pour les procédés de préparation industrielle, notamment à partir de l'amidon ou du saccharose.

5 Selon le brevet français 2051242, la fabrication du G.1.P. à partir d'amidon est obtenue par l'action combinée d'une enzyme débranchante-(1-6)-glucosidase et d'une enzyme de phosphorylation (phosphorylase) extraite de la pomme de terre. Bien que cela ne soit pas mentionné dans le texte de ce brevet, il est probable que l'on obtienne également du G.6.P.

10 Selon le brevet français 1379068, la fabrication du G.6.P. est réalisée à partir de l'amidon en utilisant simultanément les deux enzymes nécessaires (phosphorylase et glucomutase) que l'on obtient par extraction de la pomme de terre.

15 Quelques publications traitent de l'obtention de G.1.P. à partir du saccharose par voie enzymatique et en présence de phosphate. L'enzyme nécessaire, la saccharose phosphorylase, est obtenue principalement à partir de microorganismes (essentiellement de
20 Pseudomonas saccharophila et Leuconostoc mesenteroides) selon Doudoroff, J. of Bacteriology 68 381-388 (1954) ou Chassy et coll, Analyst. Biochem. 49 (1972), 232.

Mais il s'agit de travaux théoriques orientés vers la synthèse du saccharose.

25 Les faibles rendements observés au niveau des cultures cellulaires, de la production, de l'extraction et de la purification de l'enzyme ont amené le déposant à proposer un nouveau procédé de préparation de la saccharose phosphorylase.

30 Grâce à ce procédé, la production industrielle du G.1.P. est réalisable : ceci permet d'envisager l'application de ce dérivé dans des domaines variés de l'industrie chimique.

35 Le procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon l'invention est caractérisé en ce que le milieu de culture inoculé par le microorganisme comporte un antimousse comprenant au moins

- 3 -

un ester d'un acide gras insaturé ou polyinsaturé et d'une substance hydrophile ayant des groupements OH.

5 L'invention a également pour objet la saccharose phosphorylase obtenue par le procédé et l'application de la saccharose phosphorylase obtenue par le procédé à la synthèse de G.1.P. et de sirop de fructose par mise en contact de celle-ci avec du saccharose et au moins un sel de phosphate alcalin.

10 Il est connu que la croissance bactérienne provoque un phénomène de moussage gênant. Aussi, il est habituel pour les biochimistes d'ajouter au milieu de culture une certaine quantité d'antimousse afin de supprimer ou tout au moins de réduire ce phénomène. Toutefois, l'antimousse de la présente invention présente en outre, la faculté d'accroître la productivité enzymatique utile.

15 Les microorganismes susceptibles de produire la saccharose phosphorylase sont bien connus et sont, notamment, choisis parmi les souches suivantes :

- 20
- Leuconostoc mesenteroides,
 - Pseudomonas saccharophila,
 - Pseudomonas putrefaciens,
 - Clostridium pasteurianum,
 - 25 - Pullularia pullulans.

Ces microorganismes sont en particulier cités dans De Laporte et coll, Abstracts, 2ème congrès européen de biotechnologie Eastbourne 1981, p.237 et Imshenetskii microbiologiya 49,98.101.

30 Leuconostoc mesenteroides référencé N° ATCC12291 s'est révélé particulièrement efficace.

35 Dans cet exposé, par "source d'azote protéique", on entend les composés qui sont susceptibles de fournir au microorganisme les acides aminés essentiels. Avantageusement, cette source d'azote protéique sera composée d'un mélange de tryptone et d'extrait de levure.

De même, il est nécessaire d'apporter au microorganisme les oligo-éléments suivants, sous forme de sel : Magnésium, Soufre, Fer, Manganèse.

5 On appelle phase d'extraction la phase qui consiste à libérer l'enzyme et à la faire passer en solution par destructuration de la membrane, puis à éliminer les débris cellulaires par centrifugation. La destructuration du microorganisme peut s'effectuer par des moyens mécaniques ou des moyens chimiques.

10 Parmi les substances hydrophiles on peut citer avantageusement les polyéthers polyols comme les poly(oxyéthylène), poly(oxypropylène-1,2), poly(oxybutylène-1,2) glycols et homologues supérieurs ou leurs adducts sur des polyols comme le glycérol, le triméthylol propane, le sorbitol.

15 On appelle acides gras les acides de C_{12} à C_{18} .

Parmi les acides gras insaturés ou polyinsaturés on choisira, de préférence, l'acide oléique ou linoléique.

20 Le milieu de culture répond avantageusement à la composition suivante :

25	- mono-ou di-saccharide seul ou en mélange	
	comprenant au moins 10 % en poids de saccharose	20 à 60 g/l
	- source d'azote protéique	40 à 120 g/l
30	- phosphate de sodium ou de potassium	5 à 30 g/l
	- oligoéléments en solution	0,3 à 1,2 g/l
35	- antimousse comprenant un ester d'acide gras insaturé et/ou polyinsaturé	
	et d'un polyétherpolyol	0,5 à 3 g/l

- 5 -

De préférence, le milieu de culture répond à la composition suivante :

5	- saccharose	20 à 60 g/l
	- tryptone	20 à 60 g/l
	- extrait de levure	20 à 60 g/l
10	- phosphate de sodium ou de potassium	5 à 30 g/l
	- oligoéléments en solution	0,3 à 1,2 g/l
15	- antimousse comprenant un ester d'acide gras insaturé ou polyinsaturé et d'un polyétherpolyol	0,5 à 3 g/l

20 De préférence, la concentration dans le milieu fermentaire des esters d'acides gras est comprise entre 0,01 et 1,5 g/l.

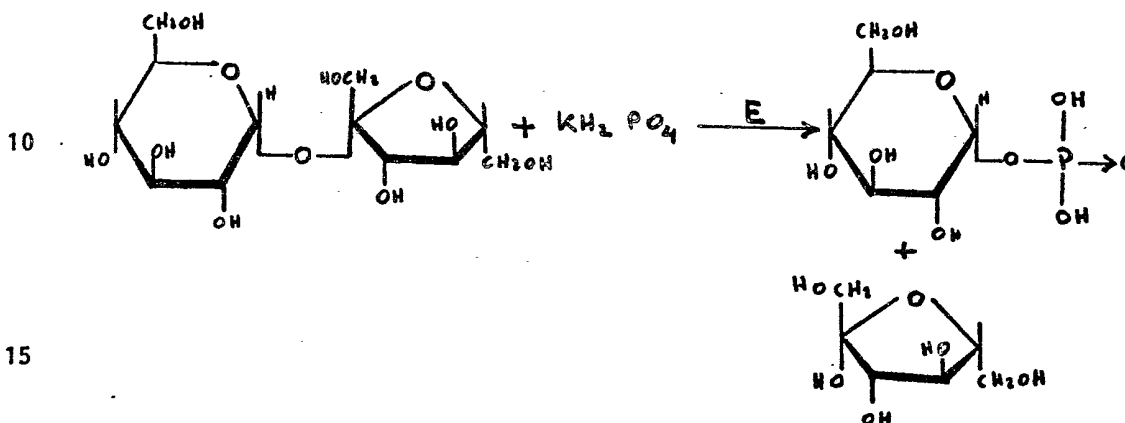
25 Dans la phase d'extraction, un moyen particulièrement intéressant permettant l'extraction de la saccharose phosphorylase des cellules réside dans l'utilisation du polyoxyéthylène p.t. octylphénol. Ce moyen permet, en outre, d'éviter l'ajout de sulfate de protamine ou d'autres polycations, polyéthylène imine en particulier, nécessaires autrement pour éliminer les acides nucléiques.

30 Dans ce cas, l'étape de purification est réduite à l'ultrafiltration afin d'éliminer les protéines sans intérêt.

35 L'enzyme peut être utilisée sous forme soluble ou sous forme immobilisée. La fixation peut être assurée sur un support choisi par une des nombreuses méthodes décrites dans la littérature. On retiendra en particulier comme support, les rafles de maïs et la méthode de fixation décrite dans la demande de brevet français N° 79 31382.

Pour l'emploi de l'enzyme sous forme soluble, il est clair que l'on peut utiliser directement la préparation enzymatique telle qu'on l'obtient après, éventuellement, le traitement au sulfate de protamine et avant ultrafiltration.

- 5 La saccharose phosphorylase en présence de saccharose et d'un sel de phosphate catalyse la réaction suivante :



Ainsi, l'application de cette enzyme obtenue par le procédé est double.

- 20 D'une part, obtenir le G.1.P. par mise en contact de l'enzyme avec du saccharose et au moins un sel de phosphate alcalin, puis élimination éventuelle du fructose.
- D'autre part, obtenir un sirop de fructose par mise en contact de l'enzyme avec du saccharose et au moins un sel de phosphate
- 25 alcalin, puis élimination éventuelle du G.1.P.

- Dans le cas de l'enzyme soluble, la réaction de phosphorylation du saccharose s'effectue par simple mise en contact de l'enzyme, d'une part, et de la solution de saccharose et de phosphate, d'autre
- 30 part. Le titre de la solution de saccharose varie avantageusement entre 10 millimolaire et 1500 millimolaire (soit 4g/l à 510 g/l). Les phosphates sont ajoutés sous forme de solution de molarité allant de 10 millimolaire à 1500 millimolaire d'un tampon phosphate $\text{PO}_4 \text{HK}_2$ et $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$ assurant un système optimum de $\text{pH} = 6,8$. Le
- 35 rapport molaire saccharose/phosphate peut varier dans des proportions considérables sans sortir de l'invention : afin d'obtenir un taux de conversion le plus élevé possible, il est compris de préférence entre 0,5 et 4, et avantageusement voisin de 2.

Lorsque ce rapport est voisin de 2, il est éventuellement possible de supprimer les étapes d'élimination du phosphate lors des opérations ultérieures.

L'enzyme est ajoutée à la solution saccharose + tampon phosphate dans un rapport de 0,1 à 1 USP par millilitre de solution traitée.

5 Les températures de réaction sont choisies de 25°C à 55°C, de préférence.

L'avancement de la réaction peut être suivi de plusieurs façons : dosage du saccharose par HPLC ou par voie enzymatique, dosage du fructose et glucose libre par HPLC ou voie enzymatique, 10 dosage du G.1.P par HPLC ou voie enzymatique ou encore par polarimétrie.

Dans le cas de l'enzyme immobilisée sur support solide, il est possible de travailler en continu avec la même enzyme.

15 On fait alors passer les réactifs, dans des conditions identiques de pH, de température, de rapport molaire saccharose/phosphate, de concentration.

Une manière commode de suivre l'état d'avancement de la réaction consiste également à suivre les variations de l'angle de polarisation 20 du mélange (mesure de α). Cette mesure automatique et en continu fournit un bon moyen de contrôle pour la régulation d'une unité de fabrication de G.1.P. en continu.

25 Le phosphate minéral restant est précipité, par exemple par addition d'un sel de magnésium. Dans le cas où le taux de conversion en G.1.P. est élevé, le phosphate résiduel ne gêne pas les applications industrielles du G.1.P. et cette étape de précipitation n'est pas nécessaire.

30 On peut donc directement passer à l'étape suivante de séparation du G.1.P. des sucres neutres.

La séparation du G.1.P. des sucres neutres fait appel aux résines échangeuses d'ions. La solution passe sur au moins deux colonnes 35 en série, la première étant une résine cationique forte sous forme H^+ (résine IR 120 de Rohm et Haas par exemple), la deuxième étant une résine anionique faible sous forme OH^- (résine IRA 68 de Rohm et Haas par exemple). Les sels minéraux solubles sont fixés

sur la première colonne, le G.1.P. étant fixé sur la deuxième colonne. Les sucres neutres passent sans rétention à travers les colonnes et sont stockés, éventuellement concentrés, pour faire des sirops à haute teneur en fructose. Le saccharose présent peut être également hydrolysé si sa présence est gênante pour un emploi particulier.

Lorsque la capacité d'absorption des colonnes est atteinte, on procède à leur élution. Le G.1.P. est élué de la 2ème colonne par une solution saline ou basique du groupe alcalin ou alcalino terreux (par exemple KCl ou KOH). Le G.1.P. est élué sous forme d'un sel correspondant au cation utilisé pour l'éluat.

L'acide glucose-1-phosphorique G.1.P. est obtenu par acidification du milieu.

Les exemples ci-dessous illustrent l'invention :

EXEMPLE 1

Production de la saccharose phosphorylase :

Dans un fermenteur de 1,5 l on verse 1000 ml d'une solution, préalablement stérilisée par chauffage, ayant la composition suivante :

25	Saccharose	40 g/l
	Tryptone	40 g/l
	Extrait de levure	40 g/l
	K ₂ HPO ₄	20 g/l
	Struktol J 633 ^(R)	
30	Antimousse constitué d'esters d'acide stéarique, oléique, linoléique et de glycérol polyoxyéthyléné, polyoxypropyléné, polyoxybutyléné.	1 g/l

35

On ajoute ensuite 10 ml d'une solution de vitamines, préalablement stérilisée par filtration stérile sur membrane, ayant la composition suivante :

	Thiamine, HCl	1 g/l
5	MgSO ₄ , 7H ₂ O	40 g/l
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	1 g/l
	MnSO ₄ , H ₂ O	20 g/l
	Acide ascorbique	5 g/l

10 A la température de 30°C, on ajoute un inoculum de Leuconostoc mesenteroïdes référencé N° ATCC 12291 de telle sorte que ce dernier représente de 5 à 10 % du volume fermentaire. La température de culture est maintenue à 30°C sous faible aération et faible agitation. La croissance bactérienne est suivie optiquement et
15 à l'issue de la phase de croissance exponentielle, le milieu est centrifugé. Les cellules de Leuconostoc mesenteroïdes sont recueillies dans le culot.

Après lavage au tampon phosphate de potassium 0,05M pH6,8 des
20 cellules ainsi recueillies et recentrifugation, l'activité enzymatique saccharose phosphorylase est extraite des cellules par traitement des cellules par un agent tensio-actif tel que le polyoxyéthylène p-t-octylphénol (TRITON X 100). L'enzyme ainsi libérée passe en
25 solution, de laquelle on élimine les restes cellulaires par centrifugation.

L'étape de précipitation des acides nucléiques au sulfate de protamine n'étant pas nécessaire, la solution est directement traitée par ultrafiltration de façon à ne conserver que les protéines de
30 poids moléculaire compris entre 10 000 et 100 000.
On définit une unité d'activité enzymatique "USP" de la saccharose phosphorylase comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la synthèse de 1 micromole de G.1.P. par minute à 30°C, pH = 6,8 et en présence d'une solution de saccharose 200 milli-
35 molaire et de phosphate 100 millimolaire.

Les résultats obtenus, auxquels on a adjoint ceux obtenus lors d'un essai comparatif effectué dans les mêmes conditions mais sans l'antimousse de l'invention, sont résumés dans le tableau ci-après :

5		Procédé de l'invention	Procédé sans antimousse
	durée de la croissance fermentaire (h)	4	7
10	Volume utile du fermenteur (l)	80	3
	Productivité (g de cellules humides) l	15	13
15	Activité enzymatique du surnageant après traitement par le polyoxyéthylène Octylphénol (USP/g de cellules humides)	180	145

A titre indicatif, l'activité enzymatique des cellules entières s'élève à 200 USP/g de cellules humides pour des cellules cultivées en présence de l'antimousse. Le procédé selon l'invention permet donc une très bonne extraction de l'activité enzymatique.

EXEMPLE 2

25 Production de la saccharose phosphorylase

Le mode opératoire de l'exemple 1 est recommencé mis à part le fait que le cassage des cellules est effectué, après centrifugation du milieu, dans un broyeur à billes.

30 La solution d'enzyme obtenue par cassage est débarrassée des acides nucléiques par précipitation au sulfate de protamine. Les étapes suivantes sont identiques à celles de l'exemple 1.

35 Les résultats obtenus auxquels on adjoint ceux obtenus lors d'un essai comparatif dans les mêmes conditions mais sans l'antimousse

de l'invention, sont réunis dans le tableau ci-dessous :

		Procédé de l'invention	Procédé sans antimousse
5	Activité enzymatique du surnageant après cassage des cellules (USP/g de cellules humides)	170	80

10 EXEMPLE 3

Production de G.1.P. en phase homogène :

Dans un réacteur faiblement agité, on fait réagir, à 40°C, 4 litres
d'une solution ainsi constituée :

- 15
- saccharose 0,8 mole/litre (274 g/litre)
 - tampon phosphate 0,42 mole/litre
 - enzyme purifiée 360 USP/litre.

20 Le tableau ci-après donne la composition du mélange réactionnel en
fonction du temps :

25	Durée (h)	Saccharose		Tampon phosphate		G1P (mole/ litre)
		mole/litre	taux de conversion en %	mole/litre	taux de conversion en %	
30	0	0,8	0	0,420	0	0
	18	0,54	32,5	0,160	61,9	0,26
	42	0,446	44,2	0,066	84,3	0,354
	65	0,406	49,2	0,026	93,8	0,394

35 L'équilibre thermodynamique de la réaction s'établit en théorie à
 $K_{eq} = 0,05$. On constate donc qu'après 65 h de réaction, la
constante d'équilibre calculée s'établit à $K_{cal} = 0,07$. La réaction
est donc pratiquement à l'équilibre. Dans ces conditions, la

proportion de phosphate minéral est très faible (inférieure à 3 % en poids / G.1.PK₂) ce qui minimise, voire élimine, les étapes ultérieures de purification.

EXEMPLE 4

5

Séparation et purification de G.1.P.
Précipitation du phosphate minéral résiduel.

10

15

La solution provenant de l'exemple 3 et contenant donc 0,104 mole de tampon phosphate résiduel et 1,576 mole de G.1.P. est additionnée à 20° de 0,104 mole d'acétate de magnésium sous agitation. Après dissolution, le pH de la solution est amené à 8,6 par addition de 210 ml de NH₄OH à 14 %. Le phosphate précipite alors sous forme de complexe et est éliminé par filtration. Le volume du filtrat recueilli est de 4,2 litres et contient 1,523 moles de G.1.P. sous forme de sel dipotassique G1PK₂, soit une purification avec un rendement de 97 %. La solution ne contient plus de phosphate minéral.

EXEMPLE 5

20

Séparation du G.1.P. des sucres neutres.

25

30

35

500 ml d'une solution contenant 120 millimoles de G.1.P. et 440 millimoles de sucres neutres (Saccharose et fructose avec des traces de glucose) sont percolés sur 2 colonnes en série, de 1,2 litre de IR 120 forme H⁺ et de IRA 68 forme OH⁻. Les sucres neutres sont recueillis au-delà de la 2ème colonne avec un rendement de 100 %. Ces sucres sont de très haute pureté et peuvent être utilisés en l'état ou concentrés comme sirop alimentaire. Le G.1.P. reste fixé sur la résine IRA 68. Il est élué par de la potasse 1N. On recueille ainsi 114 millimoles de G.1.P. - soit un rendement de 95 % . Le précipité alcoolique recueilli après filtration et séchage est constitué de G.1.PK₂ d'une pureté supérieure à 98 %.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase consistant à inoculer, avec un microorganisme susceptible de produire ladite enzyme, un milieu de culture comportant au moins :
- une quantité de mono-ou di-saccharide seul ou en mélange comprenant du saccharose,
 - une source d'azote protéique,
 - du phosphate de sodium ou de potassium,
 - des oligoéléments en solution;
- puis à cultiver le mélange à une température comprise entre 25 et 35°C et ensuite à structurer le microorganisme et extraire l'enzyme, caractérisé en ce que le milieu de culture inoculé par le microorganisme comporte un antimousse comprenant au moins un ester d'un acide gras insaturé ou polyinsaturé et d'une substance hydrophile ayant des groupements OH.
2. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est choisi parmi les souches de :
- Leuconostoc mesenteroides,
 - Pseudomonas saccharophila,
 - Pseudomonas putrefaciens,
 - Clostridium pasteurianum.
 - Pullularia pullulans
- susceptibles de produire la saccharose phosphorylase.
3. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 2, caractérisé en ce que le microorganisme est un Leuconostoc mesenteroides référencé N° ATCC 12291.

4. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'acide gras est choisi parmi l'acide oleique ou linoleique.
- 5 5. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1 caractérisée en ce que la substance hydrophile est un polyéther polyol.
- 10 6. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce que les esters de l'acide gras sont des mono-ou di-linoléates de triols.
- 15 7. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration dans le milieu fermentaire d'esters d'acides gras est comprise entre 0,01 et 1,5 g/l.
- 20 8. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu de culture répond à la composition suivante :
- 25 - mono-ou di-saccharide seul ou en mélange comprenant au moins 10 % en poids de saccharose 20 à 60 g/l
- source d'azote protéique 40 à 120 g/l
- 30 - phosphate de sodium ou de potassium 5 à 30 g/l
- oligoéléments en solution 0,3 à 1,2 g/l
- antimousse 0,5 à 3 g/l
- 35

9. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 8, caractérisé en ce que le milieu de culture répond à la composition suivante :
- | | | |
|----|---------------------------------------|---------------|
| 5 | - saccharose | 20 à 60 g/l |
| | - tryptone | 20 à 60 g/l |
| | - extrait de levure | 20 à 60 g/l |
| 10 | - phosphate de sodium ou de potassium | 5 à 30 g/l |
| | - oligoéléments en solution | 0,3 à 1,2 g/l |
| 15 | - antimousse | 0,5 à 3 g/l |
10. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce que le microorganisme est traité au moyen de l'ajout de polyoxyéthylène p.t.octyl-phénol.
- 20
11. Procédé d'obtention de saccharose phosphorylase selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'après l'extraction, l'enzyme est purifiée par précipitation des acides nucléiques et éventuellement ultrafiltration.
- 25
12. Saccharose phosphorylase obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 11.
- 30
13. Saccharose phosphorylase selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle est fixée sur un support solide, notamment les rafles de maïs.
- 35

14. Application de la saccharose phosphorylase selon l'une des revendications 12 ou 13 à la synthèse de l'acide glucose-1-phosphorique et de ses sels, caractérisée en ce que l'on met en contact la saccharose phosphorylase avec du saccharose et au moins un sel de phosphate alcalin et en ce qu'on élimine éventuellement le fructose formé.
15. Application de la saccharose phosphorylase selon l'une des revendications 12 ou 13 à la synthèse de sirop de fructose, caractérisée en ce que l'on met en contact la saccharose phosphorylase avec du saccharose et au moins un sel de phosphate alcalin et en ce qu'on élimine éventuellement l'acide glucose-1-phosphorique formé.
16. Application selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce que le rapport molaire saccharose/phosphate est compris entre 0,5 et 4.