

Amélioration des souches

Après avoir isolé un micro-organisme produisant la substance désirée, il faut améliorer son rendement.

Améliorer une souche sauvage

→ Détermination des conditions optimales de croissance
→ Modification génétique.

1. Détermination des conditions optimales de croissance

□ Conditions →

Composition du milieu de culture
T°C, pH optimal...

Pour déterminer les conditions optimales de la croissance d'un germe :

- Réaliser la cinétique de croissance.
- Réaliser la cinétique de production.
- déterminer la phase de production des métabolites

Une fois les cinétiques sont réalisées, on procède à l'amélioration du potentiel sécrétoire du micro-organisme en jouant sur la **composition du milieu de culture** :

Tester plusieurs sources de C et leurs [c], sources de N et leurs [c], éléments minéraux, facteurs de croissance..... **pH, Tc°** :

- ❖ Mesurer soit la croissance soit la production (pH de croissance n'est pas forcément le même que celui de la production du métabolite).
- ❖ Exp. Préparer un milieu de culture, le répartir dans des Erlen, varier le pH (pH 2-12).
Stériliser les milieux.
- ❖ Ensemencer (même charge microbienne= même inoculum).
- ❖ Incuber et mesurer la croissance.

2. Modification génétique

La cellule microbienne possède des **mécanismes régulation** qui lui permettent de ne synthétiser que la quantité de métabolites qui lui est strictement nécessaire. Pour augmenter le rendement, il y a plusieurs manières de supprimer ces mécanismes après avoir induit la **formation des mutants** / des méthodes physico- chimiques.

L'une des voies de la modification génétique =

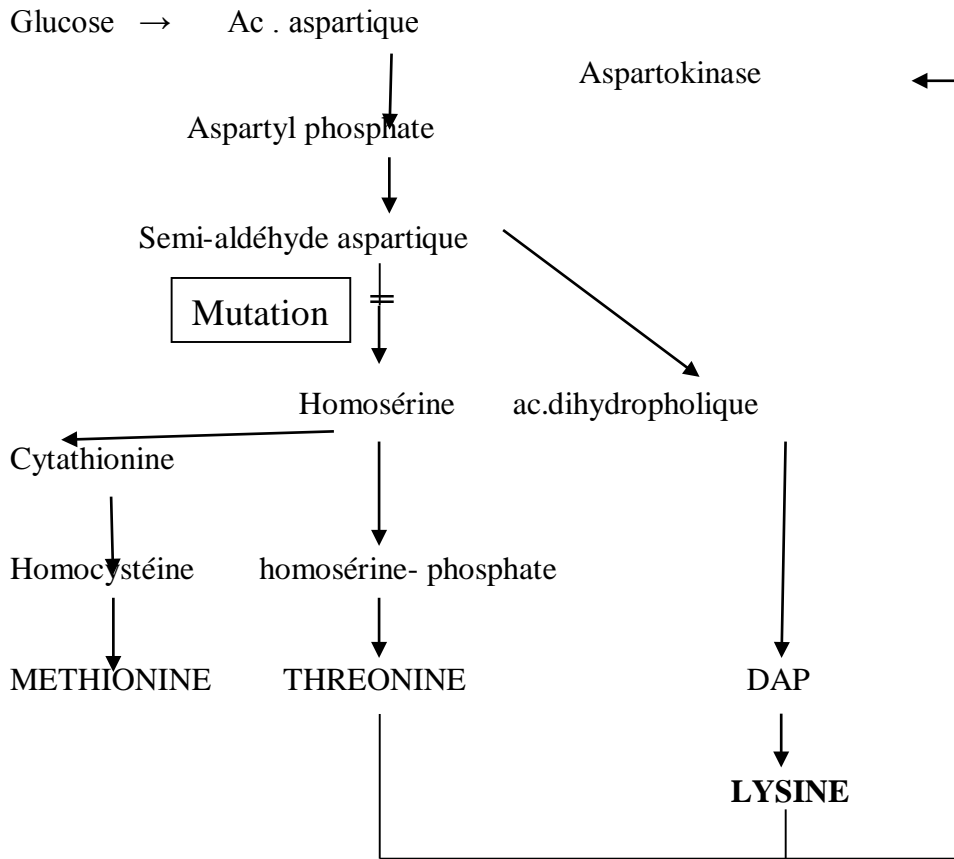
Bloquer les voies de dégradation qui réduisent les rendements de production et ceci en provoquant **une perte d'enzyme**.

Les agents mutagènes les plus utilisés ayant une action sur l'ADN :

- **NTG : N – méthyl nitroguanine**
 - **UV**
 - **Acide nitreux**
-
- **L'acide nitreux** ; remplace les radicaux NH_2 / des cétones.
Cytosine → uracile
Guanine → Hypo xanthine= base azotée issue de la désamination de l'actenosine.
 - **NTG**, fixe le radical méthyle sur un azote de guanine ; la Guanine se lie avec la Thymine au lieu de la Cytosine (G-T).
 - **UV**, le max. d'absorption d'ADN= 260 nm. A cette longueur d'onde, la plus part de bactéries sont tuées et parmi les survivantes un % élevé est constitué par des bactéries mutantes.

Le principe repose sur l'induction des mutants, leur culture, leur purification et leur conservation.

Exp. Amélioration de la production de lysine



Chaîne biosynthèse et régulation de la lysine (*Corynebacterium glutamicum*)

Corynebacterium glutamicum : souche sauvage isolée par Kinoshita en 1956.

Le mutant de cette souche excrète **60 g de lysine /litre**.

➤ Dans le cas de la souche sauvage ; la biosynthèse de la lysine a une partie commune avec celle de la thréonine et c'est le mélange lysine-thréonine qui provoque le **rétrocontrôle**. ➤ Dans le cas de la souche mutante (mutant homosérine dépendant), elle ne synthétise plus de la thréonine, le rétrocontrôle ne joue plus et la lysine s'accumule dans le milieu.

N.B : la méthréonine et la thréonine sont importants pour la croissance il faut les ajouter en [optimale] dans le milieu.

La production optimale de lysine a lieu quand le milieu contient 400 µg/ml d'homosérine.

CONSERVATION DES SOUCHES

Il existe plusieurs techniques qui permettent la conservation des souches avec l'intégralité de leurs propriétés.

Principe : Conserver une souche c'est la maintenir en vie dans des conditions où son activité biologique est réduite au minimum de telle sorte qu'il n'y ait pas de mutation.

1) Culture sur gélose à l'extrait de terre en culot

- + Extrait de terre (gélose molle) : 500g terre (filtration), 3g d'agar, 1L d'eau distillée.
- + Autoclaver pendant 1h à 130°C.
- + Inoculation / piqure centrale.
- + Conservation à + 4°C.

2) Gélose inclinée sous paraffine

- + Inoculation d'une gélose à base de peptones, sans glucides.
- + Dès une croissance visible, recouvrir la surface avec la paraffine.
- + Conserver à plus de 4°C.

3) Congélation

Le pourcentage des cellules vivantes est d'autant plus élevé que la température de congélation est plus basse.

- + - 7°C : 15jours : le pourcentage de cellule vivantes 2.
- + - 30°C : 15jours : le pourcentage de cellule vivantes 41.

Il faut utiliser des agents **cryoprotecteurs** qui protègent les cellules de l'extérieur contre les cristaux de glace (DMSO, Glycérol...).

4) Lyophilisation

Le principe repose sur la combinaison de la congélation et la dessiccation. Le milieu doit contenir un colloïde protecteur (sérum, lait...).

On relie les tubes contenant le milieu de cultureensemencé, incubé, congelé à une pompe à vide. L'eau congelé se sublime ;à la fin, il reste une poudre (mélange de cellule avec le milieu de culture). Cette technique permet une conservation pendant plusieurs années.

5) Stabilisation sur terre

Cette technique concerne les micro- organismes qui sporulent.

- Obtention d'une suspension de spores (milieux spéciaux) .
 - Préparation d'un mélange :
 - Terre 20%
 - Sable 78%
 - CaCO₃ 02%
- répartition de quelques grammes par tubes
- Stérilisation 8 à15 h à 130°C.
 - Après refroidissement, ajouter / tube quelques gouttes de la suspension de spores.
 - Évaporer l'excès d'eau dessiccateur sous vide.
 - Les tubes sont scellés.
 - Conservation des spores environ plusieurs années sans germination.