

LES INOCULA INDUSTRIELS

Cas particulier des champignons filamenteux , inoculum sporal

Au laboratoire ou en milieu industriel le principe de l'inoculation est toujours le même :

Il fautensemencer largement le milieu afin que la souche se développe suffisamment pour supplanter les contaminations éventuelles

A chaque stade, il faut surveiller les contaminations , les bactériophages et les mutations qui sont des causes de la baisse des rendements

Pour réussir une production microbiologique, le matériel vivant doit répondre aux exigences suivantes :

Qualité :

La culture doit posséder une capacité maximale de production. Des tests de stérilité servent à détecter la présence éventuelle de contaminants à tous les stades de la préparation des inocula (inoculum sporal , précultures ,culture principale).

Des prélèvements sont étalés sur des milieux gélosés ou inoculés en milieux liquide propices au développement des divers groupes de micro-organismes. Cette analyse est complétée par un examen microscopique.

Quantité :

Les cellules ou les spores puis les cultures de propagation doivent être en quantité suffisante pour permettre une inoculation optimale de la culture suivante.

La quantité de matériel d'inoculation des précultures et des cultures principales peut influencer spectaculairement sur les caractères morphologiques des cultures et sur leur productivité. Pour chaque souche et chaque procédé la quantité optimale d'inoculum pour les différents stades doit être déterminée.

Axénie : la souche choisie ne doit pas être contaminée tout au long du procédé de fabrication par d'autres micro-organismes

Culture en Milieu solide

Ces milieux sont répartis dans des tubes à essai ou dans des bouteilles de Roux. C'est le procédé habituel pour la reprise de croissance des souches et l'analyse des populations ainsi que pour la détection des contaminants.

Parmi les milieux gélosés favorables au développement de nombreux champignons, il est possible de citer les milieux suivant : Milieu extrait de malt et de levure ; milieu aux flocons de pomme de terre-glucose : milieu peptone - glucose ,

Les milieux au céréales (riz , avoine , millet ou orge perlé) : présentent une surface totale nettement supérieure à celle des milieux gélosés avec une formation de spores par unité de surface du même ordre de grandeur .

Les grains sont légèrement humidifiés avec une solution nutritive favorisant la sporulation .Après stérilisation (45 minutes à 121 °C), ces grains sont séparés par agitation manuelle puis inoculés avec une suspension des spores préparés dans le milieu de sporulation.

Après incubation les spores sont récupérées par addition d'un milieu de protection et agitation intense .

Culture en Milieux liquides :

C'est la méthode idéale pour obtenir des inocula de grand volume facile à manipuler. Cependant, beaucoup de champignons ne sporulent pas aisément en cultures liquides agitées.

Le milieu sorbose - tryptone se révèle favorable à la sporulation de nombreux champignons . Sa formule est la suivante : sorbose, 50 grs ; tryptone (bacto), 5 grs ; KH_2PO_4 , 0.25 grs ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 grs ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.25 grs ; KCl , 0.125 grs ; traces de Fe , Zn , Mn ; eau , amener à 1000 ml ; pH 6.2 - 6.5.

Les spores sont récupérées par filtration sur laine de verre , puis centrifugées. Elles sont ensuite mises en suspension dans un milieu de protection et conservées à basse température.

Inoculum Végétatif : (pré culture , culture de propagation , pied de cuve)

Avec l'inoculum sporal sont inoculés , en Erlenmeyers , puis en bioréacteurs des milieux de propagation permettant une germination rapide des spores et une croissance intense des hyphes .

Les concentrations en nutriments peuvent être progressivement augmentées. Des milieux de propagation de composition qualitative proche du milieu de production permettant de réduire la phase de latence , et donc de diminuer les temps d'incubation.

Généralement les milieux de propagation contiennent des substrats naturels (extraits de malt, extraits de levure, peptone , caséine ...). Voici un exemple de ce type de milieux :

- Extraits de malt liquide , 20 grs ; extraits de levure , 4 grs ; KH_2PO_4 , 0.5 grs ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 grs ; eau , amener à 1000 ml ; pH , 5.8 .

Le type de milieu de propagation , les conditions d'incubation et sa durée influent sur les taux de production obtenus dans la culture principale. Pour éviter des retards de production dus à des « accidents » , les cultures de propagation de faible volume sont souvent dédoublées.

Voici comment on opère dans le cas de souches de *Streptomyces* produisant des antibiotiques (Fig. 49).

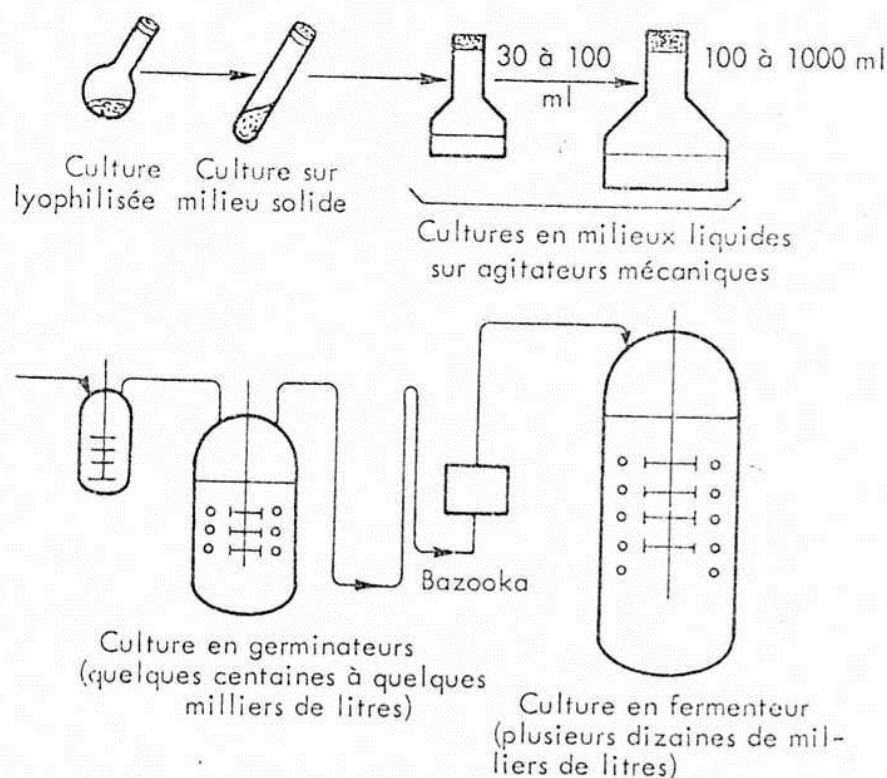


FIG. 49. — Préparation de l'inoculum dans le cas de la fabrication d'antibiotiques.

RECAPITULATIF

On réalise une suspension de spores que l'on dilue et que l'on repique à la surface d'un tube gélosé inclinée .Puis on fait un preinoculum dans un milieu liquide en fioles Erlen meyers ou Fernbach incubés sur de agitateurs rotatifs. Il est indispensable que le milieu choisi donne une grande quantité de spores par fragmentation du mycélium .On passe ensuite à l'atelier dans un petit fermenteur de 300 à 500l puis dans un fermenteur plus grand (germinateur) de 3000 à 5000l qui sert de pied de cuve

Grace à un récipient métallique mobile dénommé bazooka on ensemence aseptiquement le fermenteur à l'aide d'air comprimé stérile dont la pression chasse le contenu du récipient dans le fermenteur

Toute la tuyauterie est stérilisée par la vapeur.

