



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 28456 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 1/14**
(43) Date de publication : **01.03.2007**

-
- (21) N° Dépôt : **29306**
(22) Date de Dépôt : **08.09.2006**
(30) Données de Priorité : **11.02.2004 EP 04003036.3**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2005/001262 08.02.2005**
(71) Demandeur(s) : **UREA CASALE S.A., VIA GIULIO POCOBELLI, 6 CH-6900 LUGANO-BESSO (CH)**
(72) Inventeur(s) : **PANCHAUD-MIRABEL, Elisabeth**
(74) Mandataire : **SABA & CO**

-
- (54) Titre : **MILIEU DE CULTURE DESTINE A LA PRODUCTION DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX**
(57) Abrégé : L'INVENTION CONCERNE UN MILIEU DE CULTURE DESTINÉ À DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX COMPRENANT AU MOINS UNE SOURCE DE CARBONE CHOISIE DANS LE GROUPE COMPRENANT DES MOLASSES, UN EXTRAIT DE MALT ET DU SUCROSE ET AU MOINS UNE SOURCE D'AZOTE ORGANIQUE CHOISIE PARMIS UN EXTRAIT DE LEVURE ET UN EXTRAIT SOLUBLE DE MAÏS; ET UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX, NOTAMMENT DES CHAMPIGNONS NÉMATOPHAGES À UNE ÉCHELLE INDUSTRIELLE, COMPRENANT L'ÉTAPE CONSISTANT À SEMER DE LA CONIDIE DE TELS CHAMPIGNONS DANS LE MILIEU DE CULTURE SUSMENTIONNÉ ET À MAINTENIR CELUI-CI À UNE TEMPÉRATURE COMPRISE ENTRE 23 ET 30 °C, PENDANT UNE DURÉE COMPRISE ENTRE 5 ET 10 JOURS, AUX FINS DE DÉTERMINATION DE LA REPRODUCTION ET DE LA CROISSANCE DES CHAMPIGNONS.

RESUME

L'invention concerne un milieu de culture destiné à des champignons filamenteux comprenant au moins une source de carbone choisie dans le groupe comprenant des molasses, un extrait de malt et du sucrose et au moins une source d'azote organique choisie parmi un extrait de levure et un extrait soluble de maïs; et un procédé de production des champignons filamenteux, notamment des champignons nématophages à une échelle industrielle, comprenant l'étape consistant à semer de la conidie de tels champignons dans le milieu de culture susmentionné et à maintenir celui-ci à une température comprise entre 23 et 30 °C, pendant une durée comprise entre 5 et 10 jours, aux fins de détermination de la reproduction et de la croissance des champignons.

WO2005/078067

PCT/EP2005/001262

Titre : Milieu de culture destiné à la production de champignons filamenteux

DESCRIPTION

Domaine de l'application

5 La présente invention se rapporte au domaine technique des agents phytosanitaires.

En particulier, l'invention se rapporte à un milieu de culture des champignons filamenteux, plus spécifiquement des champignons nématophages.

Art antérieur

10 L'utilisation de micro-organismes et, en particulier, de champignons à titre d'agents phytosanitaires constitue une pratique de plus en plus courante.

Les produits à base de champignons sont déjà commercialisés pour la lutte contre les insectes, les champignons phytopathogènes et d'autres parasites typiques des cultures agricoles.

15 Par exemple, le brevet américain 5 811 092 décrit des agents nématophages pour la lutte contre les nématodes des espèces *Meloidogyne*, *Heterodera* et *Ditylenchus*, constitués de souches particulières de *Arthrobotrys conoides* *Dreschler*, un champignon filamenteux.

20 Les nématodes susmentionnés sont responsables de graves maladies végétales et fongiques (mycoses) et causent d'énormes pertes économiques, puisqu'ils peuvent compromettre 50 à 70% de la récolte.

25 L'utilisation des champignons nématophages, comme une alternative aux antiparasitaires conventionnels (par exemple le bromure de méthyle, la chloropicrine, le dichloropropène, etc.), pour l'application au sol avant la culture, ou aux carbamates appliqués directement aux récoltes, permet d'éviter de sérieux problèmes, comme la stérilisation du sol, la destruction de l'équilibre écologique et une toxicité potentielle pour les hommes et les animaux.

30 Par conséquent, les champignons nématophages conviennent en particulier à l'utilisation dans l'agriculture biologique (bio), mais requièrent des dépenses plutôt élevées, en raison des difficultés de leur production à l'échelle industrielle en rendements élevés.

Aussi a-t-on besoin de produire des champignons nématophages moins coûteux pour leur utilisation dans l'agriculture.

35 Le problème à la base de la présente invention était de fournir pour les champignons filamenteux et, en particulier, pour les champignons nématophages, un milieu de culture qui permet la production de tels micro-organismes à l'échelle industrielle en rendements élevés et en un temps court,

avec une réduction conséquente du coût du produit final.

Résumé de l'invention

Un tel problème a été résolu, conformément à l'invention, par un milieu de culture pour les champignons filamenteux qui comporte au moins une source
5 de carbone choisie du groupe comprenant la mélasse, l'extrait de malt et le saccharose et au moins une source d'azote organique choisie parmi l'extrait de levure et l'extrait soluble de maïs.

De préférence, la source de carbone susmentionnée constitue de 70 à 85% du poids sec du milieu de culture et la source d'azote organique susmentionnée
10 constitue de 15 à 30% du poids sec du milieu de culture.

Le milieu de culture selon la présente invention peut également inclure une source d'azote minéral, constituée de nitrates ou de sels d'ammonium. La source d'azote minéral susmentionnée est habituellement ajoutée progressivement au milieu de culture pendant la croissance des champignons,
15 en quantité qui ne dépasse pas 10% du poids sec du milieu de culture et habituellement en quantité de 5 à 8% en poids.

Une composition préférée de milieu de culture de la présente invention comprend 75 à 85% d'extrait de malt et 15 à 25% d'extrait de levure (les pourcentages sont, comme pour le reste de la présente description, des pourcentages en poids sec du milieu de culture).
20

Un autre milieu de culture préféré selon l'invention comporte 60 à 65% de mélasse, 10 à 15% de saccharose, 10 à 15% d'extrait soluble de maïs et 10 à 15% d'extrait de levure. Avantageusement, un tel milieu de culture contient aussi de 5 à 8% d'une source d'azote minéral, en particulier de phosphate diammonique.
25

Un milieu de culture préféré aussi selon l'invention contient deux sources de carbone, c.-à-d. l'extrait de malt en quantité de 25 à 30% et la mélasse en quantité de 40 à 45%, ainsi que l'extrait soluble de maïs en quantité de 25 à 30%.

30 Description détaillée de l'invention

La présente invention sera décrite davantage par référence à quelques modes de réalisation exemplaires présentés à des fins illustratives, non restrictives.

Avant de procéder à l'illustration au moyen d'exemples, on pense qu'il est utile de fournir quelques spécifications relatives aux composants du milieu de culture conformément à l'invention.
35

L'extrait de malt et/ou la mélasse et/ou le saccharose sont utilisés à titre de sources de carbone.

L'extrait de malt est obtenu par la germination de grains de céréales (habituellement l'orge). A la germination, des enzymes spécifiques (les amylases) sont produites, permettant la conversion de l'amidon en sucres. L'extrait de malt contient environ 60% de maltose, des vitamines et de nombreux oligo-éléments.

La mélasse constitue un sous-produit de l'industrie du sucre et vient sous la forme d'un liquide visqueux noir brunâtre, contenant 10% d'eau, 35% de saccharose, 20% d'autres sucres et 15% de cendre.

L'extrait de levure et l'extrait soluble de maïs sont utilisés à titre de sources d'azote organique.

L'extrait de levure est obtenu par l'autolyse de *Saccharomyces cerevisiae* et vient sous la forme d'une poudre fine jaune pâle, facilement soluble dans l'eau. L'extrait de levure contient des peptides, des acides aminés libres, des bases puriques et pyrimidiques, ainsi que des vitamines hydrosolubles du groupe B. L'extrait de levure a une teneur totale en azote de 10% et une teneur en azote α -aminé de 5%.

L'extrait soluble de maïs est obtenu par le trempage des grains de maïs à 50°C pendant 24 à 48 heures dans l'eau qui contient du dioxyde de soufre. Ce réactif permet la déstructuration du réseau protéique entourant les grains d'amidon et offre l'avantage d'empêcher le développement de micro-organismes indésirables durant le trempage. L'extrait soluble de maïs a une teneur totale en azote de 7% et une teneur en azote α -aminé de 1.7% et contient également 5% de sucres, 4% de potassium, 3% de phosphore et 17% de minéraux différents.

Divers milieux de culture à base des sources de carbone et d'azote susmentionnées ont été testés. Ces milieux peuvent être classifiés dans les trois classes suivantes :

- classe 1 : milieux où l'extrait de malt constitue la source principale de carbone ;
- classe 2 : milieux où la mélasse constitue la source principale de carbone ;
- classe 3 : milieux où la source principale de carbone est constituée de l'extrait de malt et de la mélasse.

La teneur en pourcentage des milieux en source d'azote organique selon l'invention peut être diminuée, en remplaçant une partie d'une telle source d'azote organique par une source d'azote inorganique (des nitrates ou des composés d'ammonium), qui est ajoutée progressivement en petites quantités durant la culture.

Cet ajout d'azote inorganique durant la culture permet une meilleure nutrition du micro-organisme et, dans le cas des champignons filamenteux, la consolidation des filaments mycéliens.

5 Le remplacement d'une partie de la source d'azote organique par une source d'azote inorganique présente également l'avantage de réduire les coûts de production, car les sources d'azote organique (l'extrait de levure et l'extrait soluble de maïs) constituent les composants les plus chers du milieu de culture selon l'invention.

10 Le milieu de culture selon l'invention convient en particulier à l'utilisation dans la production des champignons filamenteux de la famille de Moniliales. En particulier, dans les exemples indiqués ci-dessous, les champignons filamenteux de *Arthrobotrys conoides* Dreschsler sont utilisés.

EXEMPLE 1

Cet exemple concerne un milieu de culture de la classe 1.

15 La culture des champignons filamenteux est entreprise dans une fiole Erlen de 300 ml, contenant 150 ml de milieu de culture.

Le milieu est composé de 20 g/l d'extrait de malt et de 4 g/l d'extrait de levure et est stérilisé avant d'être ensemencé avec des conidies du champignon en question.

20 La culture dure 6 jours à partir de l'ensemencement à une température d'environ 27°C.

A partir du troisième jour, des échantillons sont prélevés du milieu de culture pour déterminer la masse sèche (g/l) et le nombre de propagules (CFU/l).

25 Pour déterminer la masse sèche, 20 ml de milieu de culture sont filtrés puis séchés dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Le nombre de propagules est déterminé sur 1 ml de milieu de culture.

Le tableau 1 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 1

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	6	0	0.00
3	5.26	1.505	$1.92 \cdot 10^8$
4	5.79	3.345	$1.30 \cdot 10^9$
5	6.56	5.05	$3.07 \cdot 10^9$
6	6.11	9.895	$4.43 \cdot 10^9$

EXEMPLE 2

30 Le test effectué dans l'exemple 1 est repris dans un miniréacteur de 2 litres contenant 1.2 litres de milieu de culture comme dans l'exemple 1. Les

conditions expérimentales sont les mêmes que celles de l'exemple 1, à la seule différence que le prélèvement d'échantillons débute le lendemain de l'ensemencement avec les conidies.

5 Le miniréacteur en question est un récipient à fond rond, muni d'un agitateur à pales, d'un moyen de chauffage et de refroidissement, d'un moyen de ventilation, ainsi que de sondes du pH, du O₂ et de la température.

Le tableau 2 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 2

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	6	0	0.00
1	5.51	1.175	2.50•10 ⁶
2	5.5	1.3825	1.80•10 ⁷
3	6.61	1.59	8.50•10 ⁷
4	5.4	4.03	9.60•10 ⁸
5	5.13	4.29	1.27•10 ⁹
6	5.08	5.625	3.10•10 ⁹
7	5.5	7.848	6.08•10 ⁹

10 Au bout de sept jours de culture, 8 grammes presque de champignons par litre de milieu de culture sont ainsi obtenus avec 6.08•10⁹ de propagules.

EXEMPLE 3

Cet exemple concerne un test effectué avec un milieu de culture de la classe 2.

15 La culture du champignon filamenteux est entreprise dans une fiole Erlen de 300 ml, contenant 150 ml de milieu de culture.

Le milieu est composé de 25 g/l de mélasse, de 5 g/l de saccharose, de 5 g/l d'extrait soluble de maïs et de 5 g/l d'extrait de levure et est stérilisé avant d'être ensemencé avec des conidies du champignon en question.

20 La culture est incubée pendant 6 jours à partir de l'ensemencement à une température d'environ 27°C.

25 A partir du troisième jour, des échantillons sont prélevés du milieu de culture pour déterminer la masse sèche (g/l) et le nombre de propagules (CFU/l). Pour déterminer la masse sèche, 20 ml de milieu de culture sont filtrés puis séchés dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Le nombre de propagules est déterminé sur 1 ml de milieu de culture.

Le tableau 3 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 3

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	5.07	0	0.00
3	4.87	1.58	$3.12 \cdot 10^7$
4	4.20	3.82	$1.40 \cdot 10^8$
5	6.46	6.76	$1.30 \cdot 10^9$
6	6.98	9.995	$3.65 \cdot 10^9$

EXEMPLE 4

Le test effectué dans l'exemple 3 est repris dans un miniréacteur de 2 litres comme décrit dans l'exemple 2, contenant 1.2 litres de milieu de culture comme dans l'exemple 3. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles de l'exemple 3, à la seule différence que le prélèvement d'échantillons débute le lendemain de l'ensemencement avec les conidies.

Le tableau 4 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 4

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	5.07	0	0.00
1	5.04	2.675	$9.90 \cdot 10^7$
2	5.01	3.9	$3.00 \cdot 10^8$
3	5.44	5.125	$5.00 \cdot 10^8$
4	6.11	8.295	$8.20 \cdot 10^8$
5	6.69	2.75	$1.07 \cdot 10^9$
6	7.32	3.485	$2.10 \cdot 10^9$
7	7.65	10.164	$3.77 \cdot 10^9$

10 Les résultats présentés pour les jours à partir du cinquième jour pourraient paraître anormaux mais ceci est uniquement dû à une concentration excessive de champignons dans le milieu de culture, ce qui empêche le prélèvement de champignons homogènes.

Le dernier échantillon est prélevé directement du réacteur.

15 Dans ce cas, en l'espace de sept jours, plus de 10 grammes de champignons par litre de milieu de culture sont obtenus avec une teneur en propagule de $3.77 \cdot 10^9$.

EXEMPLE 5

Cet exemple concerne un test réalisé avec un milieu de culture de la classe 3.

20 La culture du champignon filamenteux est entreprise dans une fiole Erlen de 300 ml, contenant 150 ml de milieu de culture.

Le milieu est composé de 15 g/l de mélasse, de 10 g/l d'extrait de malt et de

10 g/l d'extrait soluble de maïs et est stérilisé avant d'êtreensemencé avec les conidies du champignon en question.

La culture est incubée pendant 6 jours à partir de l'ensemencement à une température d'environ 27°C.

- 5 A partir du troisième jour, des échantillons sont prélevés du milieu de culture pour déterminer la masse sèche (g/l) et le nombre de propagules (CFU/l). Pour déterminer la masse sèche, 20 ml de milieu de culture sont filtrés puis séchés dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Le nombre de propagules est déterminé sur 1 ml de milieu de culture.
- 10 Le tableau 5 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 5

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	4.7	0	0.00
3	4.49	1.82	$2.38 \cdot 10^7$
4	4.62	3.815	$1.78 \cdot 10^8$
5	5.25	5.57	$1.23 \cdot 10^9$
6	6.03	8.555	$1.35 \cdot 10^9$

EXEMPLE 6

- 15 Le test effectué dans l'exemple 5 est repris dans un miniréacteur de 2 litres comme décrit dans l'exemple 2, contenant 1.2 litres de milieu de culture comme dans l'exemple 5. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles de l'exemple 5, à la seule différence que le prélèvement d'échantillons débute le lendemain de l'ensemencement avec les conidies.

Le tableau 6 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

Tableau 6

Jour	pH	Masse sèche (g/l)	CFU/l
0	4.7	0	0.00
1	4.61	2.905	$5.60 \cdot 10^6$
2	4.7	3.085	$6.00 \cdot 10^7$
3	4.56	3.265	$1.23 \cdot 10^8$
4	6.11	5.295	$3.20 \cdot 10^8$
5	5.99	5.88	$7.00 \cdot 10^8$
6	6.94	6.305	$9.50 \cdot 10^8$
7	7	10.026	$2.22 \cdot 10^9$

- 20 En l'espace de sept jours, plus de 10 grammes de champignons par litre de milieu de culture sont obtenus avec une teneur en propagule de $2.22 \cdot 10^9$.

EXEMPLE 7

Le milieu de culture de l'exemple 3 est modifié comme suit, dans le but de réduire la teneur des deux sources d'azote organique qui constituent les composants les plus chers :

- 5 25 g/l de mélasse ;
- 5 g/l de saccharose ;
- 2.5 g/l d'extrait soluble de maïs ;
- 2.5 g/l d'extrait de levure.

- 10 Avec un tel milieu de culture, un test de culture (A), utilisant le champignon susmentionné, est effectué à titre comparatif avec deux autres tests de culture (B et C), où le même milieu de culture est utilisé et impliquant des ajouts ultérieurs d'une source d'azote minéral à partir du quatrième jour.

- 15 Dans le test B, 0.21 g de phosphate diammonique sont ajoutés trois fois à partir du quatrième jour (plus précisément au quatrième, sixième et huitième jours), totalisant un ajout de 0.63 g. Dans le test C, 0.28 g sont ajoutés trois fois à partir du quatrième jour aussi (plus précisément au quatrième, sixième et huitième jours), totalisant un ajout de 0.84 g.

Les tests sont effectués dans des fioles Erlen de 500 ml, contenant 300 ml de milieu de culture stérilisé avant l'ensemencement avec les conidies.

- 20 Au neuvième et dernier jour de la culture, la teneur totale en azote du milieu de culture comme dans (A) est égale à 0.85 g/l tandis que, dans les milieux auxquels est ajouté du phosphate diammonique (A et B), elle est égale à 1.05 g/l (A) et 1.26 g/l (B), respectivement.

- 25 A partir du troisième jour, des échantillons sont prélevés du milieu de culture chaque deux jours pour déterminer la masse sèche (g/l) et le nombre de propagules (CFU/l). Pour déterminer la masse sèche, 20 ml de milieu de culture sont filtrés puis séchés dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Le nombre de propagules est déterminé sur 1 ml de milieu de culture.

Le tableau 7 présente un résumé des résultats obtenus, comme suit.

30

Tableau 7

Jour	A			B			C		
	pH	MS	CFU	pH	MS	CFU	pH	MS	CFU
0	5.06	0.00	0.00	5.06	0.00	0.00	5.09	0.00	0.00
3	4.92	3.94	5.50•10 ⁶	4.80	2.84	2.50•10 ⁴	4.80	3.36	2.50•10 ⁴
5	5.12	3.44	1.75•10 ⁸	4.89	4.57	4.73•10 ⁸	5.30	3.48	3.05•10 ⁸
7	6.68	6.45	1.58•10 ⁹	5.47	8.32	3.15•10 ³	6.39	5.48	4.00•10 ⁹
9	7.14	8.63	3.20•10 ⁹	5.44	11.30	7.25•10 ⁹	5.86	7.86	6.78•10 ⁹

MS = Masse sèche (g/l).

CFU = Propagules/litre.

WO2005/078067

PCT/EP2005/001262

Comme on peut le constater d'après le tableau montré ci-dessus, l'ajout d'une source d'azote minéral, particulièrement en petite quantité (test B), donne lieu à une augmentation considérable de la masse sèche à obtenir à partir du septième jour de culture et une augmentation supérieure à 100% du nombre de propagules à obtenir pour le même temps de culture.

10

15

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Un milieu de culture pour les champignons filamenteux comprenant au moins une source de carbone choisie du groupe comprenant la mélasse, l'extrait de malt et le saccharose, et au moins une source d'azote organique
5 choisie parmi l'extrait de levure et l'extrait soluble de maïs ; le milieu de culture comprend également une source d'azote minéral.
2. Un milieu de culture selon la revendication 1, où ladite source de carbone constitue 70 à 85% du poids sec du milieu de culture et ladite source d'azote organique constitue 15 à 30% du poids sec du milieu de culture.
- 10 3. Un milieu de culture selon la revendication 1 ou 2 où ladite source d'azote minéral est contenue en quantité qui ne dépasse pas 10% du poids sec du milieu de culture et, de préférence, de 5 à 8% en poids.
4. Un milieu de culture selon la revendication 3 où ladite source d'azote minéral comprend des nitrates ou des sels d'ammonium.
- 15 5. Un milieu de culture pour les champignons filamenteux comprenant 75 à 85% d'extrait de malt et 15 à 25% d'extrait de levure, où lesdits pourcentages sont des pourcentages du poids sec dudit milieu de culture.
6. Un milieu de culture pour les champignons filamenteux comprenant 60 à 65% de mélasse, 10 à 15% de saccharose, 10 à 15% d'extrait soluble de
20 maïs et 10 à 15% d'extrait de levure.
7. Un milieu de culture selon la revendication 6, comprenant également 5 à 8% d'une source d'azote minéral.
8. Un milieu de culture selon la revendication 7, où ladite source d'azote minéral comprend le phosphate diammonique.
- 25 9. Un milieu de culture pour les champignons filamenteux contenant en pourcentage du poids sec dudit milieu, 25 à 30% d'extrait de malt, 40 à 45% de mélasse et 25 à 30% d'extrait soluble de maïs.
10. Une méthode de production de champignons filamenteux, en particulier de champignons nématophages, à l'échelle industrielle, qui comprend l'étape
30 qui consiste à ensemercer un milieu de culture avec les conidies desdits champignons selon toute revendication parmi les revendications 1 et 2 et à garder ledit milieu de culture à une température de 23-30°C pendant 5 à 10 jours pour déterminer la reproduction et la croissance des champignons, où la source d'azote minéral dudit milieu de culture est progressivement ajoutée en
35 petites quantités, de préférence à partir du quatrième jour après l'ensemencement desdites conidies.
11. Une méthode selon la revendication 11, où ladite source d'azote minéral comprend des nitrates et des sels d'ammonium et est ajoutée en

WO2005/078067

PCT/EP2005/001262

quantité totale qui ne dépasse pas 10% du poids sec dudit milieu de culture et de préférence en quantité de 5 à 8% du poids sec dudit milieu de culture.

12. Une méthode de production de champignons filamenteux, en particulier de champignons nématophages, à l'échelle industrielle, qui comprend l'étape
- 5 qui consiste à ensemercer un milieu de culture avec les conidies desdits champignons selon toute revendication parmi les revendications 5, 6 et 9, et à garder ledit milieu de culture à une température de 23-30°C pendant 5 à 10 jours pour déterminer la reproduction et la croissance des champignons.

Page modifiée.

10

(QUATRE CENT TREIZE LIGNES)
(ONZE PAGES)

11

UREA CASALE
P. P. SABA & CO., Casablanca

