



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20772

DP/ID/SER.B/729
7 novembre 1994
Original : FRANCAIS

Distr. RESTREINTE

MISE EN OEUVRE DE CINQ PROGRAMMES DE RECHERCHE
ORIENTEE AU SEIN DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE
(INRST, SFAX, TUNISIE)

DP/TUN/86/010
TUNISIE

Rapport final*

Etabli pour le Gouvernement de la République tunisienne
par l'Organisation des Nations Unies pour le développement industriel
Organisation chargée de l'exécution pour le compte
du Programme des Nations Unies pour le développement

D'après l'étude de M. P. Bouchez,
Conseiller technique principal

Fonctionnaire chargé du soutien organique : M. Z. Csizer,
Service des industries chimiques

Organisation des Nations Unies pour le développement industriel
Vienne

* Document n'ayant fait l'objet d'aucune mise au point rédactionnelle.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
I - Introduction	2
II - Principaux résultats acquis	4
II-1 Projet sucre	5
II-2 Projet cellulose	6
II-3 Projet margine	9
II-4 Projet acides aminés	12
II-5 Projet multiplication végétative	14
III - Potentiel humain	18
IV - Equipements scientifiques	19
V - Visites d'experts	19
VI - Formation	19
VII - Fonctionnement et évolution du C.B.S.	19
VIII - Améliorations à apporter	21
IX - Transferts industriels	21
X - Commentaires de l'ONUDI	23

INTRODUCTION

Le Centre de Biotechnologie de Sfax (C.B.S.) a été créé par le décret 83-1037 réorganisant l'I.N.R.S.T., et structuré en six unités de recherche.

Projet DP/TUN/86/010 d'un montant de 1,200,000 \$ US.

Titre: Mise en oeuvre de cinq programmes de recherche orientée.

Objectif: Améliorer la production industrielle et agroalimentaire par le moyen de la technologie

Objectifs immédiats:

- ./ mettre en place cinq programmes de recherche dans le domaine de la biotechnologie en regard:
 - de la disponibilité des matières premières,
 - des priorités agro-industrielles, et
 - du renforcement du potentiel scientifique et technique.
- ./ mettre les résultats des programmes à la disposition des utilisateurs.

Objectif No. 1: Production de sucre alimentaire

Activité No. 1: 90% des besoins en sucres alimentaires sont importés. Priorité à la substitution des importations par une production locale à partir de figues de barbarie, d'orge ou de dattes communes.

Résultat No. 1: Développement d'un procédé de production de sirop de glucose.

Objectif No. 2: Utilisation des matières ligno-cellulosiques

Activité No. 2.: Il existe un déficit d'aliments pour le bétail ainsi qu'en engrais organiques. Il serait souhaitable de disposer de procédés efficaces d'hydrolyse de matières ligno-cellulosiques disponibles.

Résultat No. 2: Développement d'une ou plusieurs souches capables d'hydrolyser les matières ligno-cellulosiques et étude du procédé.

Objectif No. 3: Dépollution des margines

Activité No. 3: Les eaux de lavage provenant de la production d'huile d'olive posent un problème aigu de rejet dans l'environnement. Ce problème est commun à tout le milieu méditerranéen producteur d'olives.

Résultat No. 3: Etude de plusieurs procédés capables de solutionner le problème de manière économiquement raisonnable.

Objectif No. 4: Production d'acides aminés

Activité No. 4: Juguler le déficit en aliments du bétail et en particulier d'acides aminés de complément comme la lysine.

Résultat No. 4: Développement d'une souche productrice de lysine et développement du procédé de production à partir de substrats locaux.

Objectif No. 5: Multiplication végétative des plantes

Activité No. 5: Il existe des maladies infectieuses et transmissibles aux plantes et qui risquent d'affecter à terme les productions tunisiennes, en particulier en ce qui concerne le palmier-dattier.

Résultat No. 5: Solution du problème par le développement des techniques de micropropagation in vitro de cette espèce. Acclimatation et développement en champs.

II - PRINCIPAUX RESULTATS ACQUIS

Les résultats scientifiques acquis dans le cadre de ce projet sont consignés dans les différents rapports annuels du C.B.S. (ANNEXE IV : rapports Avril 1988 - Avril 1989 - Avril 1990 - Avril 1991 - Avril 1992).

Plusieurs résultats très importants ont été obtenus dans les cinq programmes de recherche inscrits dans le cadre de ce projet.

Les objectifs définis dans le protocole d'accord pour les cinq programmes de recherche sont:

1 - PROJET SUCRE

- De produire du sucre par conversion enzymatique de l'amidon d'orge.
- Par extraction de sucre à partir de dattes communes et de figes de barbarie.

2 - PROJET CELLULOSE

- De produire des sucres fermentescibles par bioconversion de la matière lignocellulosique.
- D'appliquer ces résultats dans des processus industriels comme l'utilisation des tourteaux d'olives.

3 - PROJET MARGINE

- D'assurer la biodégradation de la matière organique contenue dans ce substrat, en vue de sa dépollution.
- De produire éventuellement de l'énergie sous forme de biogaz.

4 - PROJET ACIDES AMINES

- D'optimiser les rendements de la production de lysine en utilisant une matière première locale (sucres fermentescibles).

5 - PROJET MULTIPLICATION VEGETATIVE

- De maîtriser les techniques de propagation rapide et efficace donnant des lignées végétales sélectionnées et résistantes de palmier dattier.

II-1 Résultat No 1 - PROJET SUCRE

Résultats des recherches

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes proposés de mettre au point un procédé de production d'un sirop de glucose à partir d'un hydrolysats partiel de l'amidon d'orge ou de toute autre substance amylacée.

En effet, les sirops de glucose possèdent une importance considérable dans l'industrie agro-alimentaire. La TUNISIE importe actuellement 4 500 tonnes de sirop par an. Cette quantité ne cesse d'augmenter au cours du temps.

Afin de répondre à la demande du marché tunisien, le C.B.S. a développé un procédé de production de sirop de glucose à partir de la farine d'orge ou du gruau, sous-produit de la mouture de blé. Le gruau et l'orge décortiqué contiennent 50 à 60 % d'amidon. Le procédé mis au point est basé sur 4 étapes :

- Hydrolyse,
- Séparation,
- Purification,
- Concentration.

a - Hydrolyse

Cette étape est réalisée en deux parties :

1°) Etape de liquéfaction: au cours de cette étape l'amidon est transformé en maltodextrines sous l'action de l'alpha amylase,

2°) Etape de saccharification: les maltodextrines obtenues précédemment sont hydrolysées en glucose sous l'action de l'amyloglucosidase (AMG). Nous obtenons un mélange de glucose, maltose, maltotriose et autres maltodextrines. Les conditions d'hydrolyse sont décrites dans les rapports d'activité du C.B.S.

b - Séparation

La phase liquide, riche en sucres solubles, est séparée de la partie solide contenant différents polymères végétaux, soit sur un filtre à bande, soit en utilisant une centrifugeuse horizontale continue suivie d'une microfiltration tangentielle sur membrane minérale.

c - Purification

La purification du produit se fait sur des résines de décoloration et de désionisation.

d - Concentration

Le produit purifié précédemment est concentré à 80% de matière sèche.

Toutes ces étapes ont été réalisées à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote de 300 litres.

Etude de faisabilité industrielle

Une étude de faisabilité du procédé a été effectuée par la Société SIDRA de COMPIEGNE, dans le cadre du projet. Cette étude, présentée en six documents (ANNEXE V), montre qu'une unité industrielle produisant annuellement 10.000 tonnes de sirop de glucose peut être rentable. Cependant, la Société SIDRA préconise, pour la crédibilité du projet, de passer à une phase de production pilote de 50 à 150 tonnes par an. L'installation de ce pilote a pour objet :

- d'optimiser le processus de production de ce sirop de glucose,
- de produire de grandes quantités de sirop afin de le tester dans les processus de fabrication de certains produits alimentaires en remplacement du produit importé,
- de produire de grandes quantités de sous-produit (culot) riche en protéine afin de le tester dans différentes formulations d'alimentation animale ou humaine,
- de rassurer et convaincre les industriels potentiels qui souhaiteraient investir dans ce procédé.

Développement potentiel

Le Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et à la Technologie a organisé deux réunions: une à SFAX au C.B.S., et l'autre à TUNIS pour discuter des suites à donner au projet sucre.

Les différents participants (différents Ministères, Banques de Développement, des Sociétés Régionales de Développement, les Sociétés Nationales de Sucre BEJA et JENDOUBA) ont montré un intérêt pour la mise en place d'une telle unité de production et ont souhaité la mise en place rapide d'une unité pilote conformément à la proposition de la Société SIDRA.

Un programme de valorisation des résultats de la recherche a été déposé au Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et à la Technologie qui a accepté son financement pour une somme de 300000 dinars sur deux ans. Ce pilote sera mis en place au C.B.S. et nous servira une fois mis au point le procédé de production de sirop de glucose à produire le sirop de fructose.

II-2 Résultat No. 2 - PROJET CELLULOSE

Le sujet principal du groupe "Cellulose", "Bioconversion de la matière lignocellulosique en sucres fermentescibles", visait à faire usage des enzymes cellulolytiques pour dégrader les déchets agricoles afin de produire du glucose.

Ce sucre, métabolisé par tous les organismes vivants, s'affiche comme le carburant le plus utilisé dans les fermentations pour

produire aussi bien des micro-organismes que leurs métabolites à haute valeur ajoutée.

Il est donc très intéressant de produire le glucose à partir de l'hydrolyse totale du bio-polymère le plus abondant du globe, la cellulose.

Etude des paramètres de production des souches

Le groupe s'est donc, dans une première phase, attelé à maîtriser et à optimiser tous les paramètres de la production de cellulases par deux champignons surproducteurs de cellulases, *Trichoderma* et *Penicillium*.

La production en fed-batch s'est avérée la plus efficace, et les résultats obtenus dans ce domaine sont tout à fait comparables à ceux obtenus par les laboratoires de renommée internationale.

Par ailleurs, et sous l'instigation de certains experts, le groupe a aussi isolé un non nombre de souches de *Streptomyces* cellulolytiques à partir du sol tunisien. Bien que productrices, ces souches ne doivent l'intérêt qu'on leur porte que par les qualités extrêmes et non par la quantité des cellulases qu'elles produisent. Une souche produisant une cellulase basique constitue une bonne illustration.

Hydrolyse de la cellulose

Le groupe a, par la suite, cherché à appliquer les cellulases dans le but initialement fixé, à savoir, la conversion de la matière cellulosique, ou dans d'autres voies nouvelles.

L'hydrolyse de la pâte à papier, fournie par l'usine de KASSERINE, était réalisée, mais l'hydrolyse n'est jamais totale, et pourtant ce tissu végétal a déjà subi plusieurs traitements dégradatifs, que dire donc de l'hydrolyse de polymères végétaux bruts ?

En fait, très vite, et en même temps que dans les quatre coins du globe, on s'est rendu compte que cette entreprise (la bioconversion par hydrolyse totale de la cellulose) demeure, pour l'instant du moins, très difficile à réaliser pour une raison évidente: la cellulose n'est jamais seule (sauf quelques exceptions: le coton, certaines algues, ...) dans la structure végétale. Elle est toujours intimement associée à la lignine, les hémicelluloses et, occasionnellement, la pectine.

Il faudrait donc mettre en oeuvre les différents enzymes capables de dégrader ces polymères récalcitrants pour arriver à convertir la cellulose en glucose final. Il suffit de dire que des enzymes telles que les ligninases comptent parmi les plus difficiles à produire (pour preuve, elles ne sont pas encore commercialisées) pour comprendre la difficulté de la tâche.

Souches comme sources d'enzymes

Pour ces raisons, et sous l'instigation d'autres experts, le groupe a réalisé qu'il était préférable de réajuster légèrement sa direction, en visant tout d'abord à maîtriser et à améliorer (par toutes les techniques microbiologiques, génétiques, biochimiques,...) la production d'enzymes "polymère-hydrolase" et ensuite à appliquer les cellulases, en premier lieu, dans des procédés nécessitant une hydrolyse seulement partielle de la matière cellulosique.

Bien entendu, et comme c'est l'une des vocations du centre, l'aspect fondamental de la recherche sur les cellulases importe beaucoup et intéresse énormément le groupe. Par la connaissance de la biochimie fine des enzymes et par la connaissance moléculaire des gènes, nous pouvons agir en conséquence, d'une part, sur le besoin réel en tel ou tel enzyme (et la manière de l'utiliser) dans telle application et, d'autre part, sur l'amélioration génétique de la performance des souches productrices.

Aussi, avons-nous investi dans la purification des enzymes cellulolytiques d'un mutant de champignon (du genre *Penicillium*), surproducteur de cellulase, et dans le clonage de gènes. Nous pouvons dire que la partie biochimique a été très bien développée avec la purification à homogénéité de cinq enzymes: deux β -glucosidases, deux exoglucanases et une endoglucanase.

Nous avons produit les anticorps polyclonaux contre les deux β -glu et une des deux exoglucanases. De plus, la taille, les paramètres cinétiques, l'action des inhibiteurs, ainsi que la composition en acide aminé ont été déterminés pour chaque enzyme.

Elles révélèrent, d'une part, l'identité quasi complète entre les deux β -glu, et d'autre part, la différence totale entre les deux exoglucanases.

En collaboration avec un laboratoire étranger, nous avons réalisé la séquence peptidique de certaines régions de deux de ces enzymes purifiées. A partir de ces séquences, nous avons synthétisé des oligonucléotides qui nous seront très utiles dans le clonage des gènes cellulases de Pol6.

Quant à l'endoglucanase purifiée, elle présente, outre sa petite taille, des propriétés très intéressantes: elle est capable, par exemple, à elle seule, d'hydrolyser de la cellulose cristalline.

Par ailleurs, nous avons cloné deux gènes à partir du même mutant de *Penicillium* ainsi que d'une souche de *Streptomyces*, conférant à *E.coli* une activité β -glucidase. La séquence du début du gène du mutant a été déterminée, sur près de quatre cent bases, la composition en acides aminés semble corrélérer avec celle de la β -glu produite par le champignon, mais aucune homologie de séquence en acides aminés n'a été trouvée avec la banque dont nous disposons.

L'analyse de ces deux gènes est encore en cours. Nous sommes en train de cloner d'autres gènes, notamment ceux codant pour les

endoglucanases et les exoglucanases, par le biais des oligonucléotides de synthèse que vous avons produits.

Applications

Parmi les procédés qui ont été développés, nous pouvons citer:

- le délavage des jeans,
- l'ensilage des aliments pour le bétail ou encore
- l'addition de cellulase dans les lessives...

Le groupe a appliqué, avec plein succès, à l'échelle industrielle, ses cellulases dans le délavage des jeans (ANNEXE VI : Etude de faisabilité du procédé de production de cellulase).

Développement potentiel

Il est envisagé de louer le matériel, déjà disponible au Centre, à une société externe qui se chargera de la production des cellulases et de leur commercialisation.

Nous testons actuellement la stabilité de ces cellulases ainsi que les moyens de les stabiliser sous leur forme commercialisée liquide ou solide.

Le second champ d'application a été aussi abordé en collaboration avec deux institutions tunisiennes "l'Office de l'Elevage et des Pâturages" et "l'Institut National Agronomique de Tunis".

Un long programme a été élaboré suite à de nombreuses discussions, et a été initié dans sa première phase: l'ensilage en bocal de quatre aliments pour bétail (luzerne, paille, avoine et feuilles d'olivier) avec des résultats très prometteurs. Nous allons initier, grâce à nos partenaires, la deuxième phase, à savoir, l'ensilage à une échelle plus grande (1 m³) avec essais sur le bétail.

Par ailleurs, et ainsi que nous l'avions avancé plus haut, le groupe s'intéresse à d'autres enzymes capables d'hydrolyser les autres polymères végétaux: les pectinases, les hémicellulases et les ligninases. Un créneau porteur est constitué par l'usage des pectinases dans l'amélioration de l'extraction de l'huile d'olive.

Des souches productrices de pectinases ont été sélectionnées et améliorées génétiquement par mutagenèse classique. Leur jus va être testé à l'échelle industrielle à la prochaine récolte d'olives.

Une autre voie vient d'être développée. Nous tentons d'exprimer la ligninase (grâce à son cDNA) dans divers hôtes eucaryotes, afin de leur conférer cette activité (ou d'améliorer sa production). Cette activité aurait des retombées très bénéfiques sur les processus de dépollution des margines ou encore de la dégradation de la matière ligno-cellulosique.

II-3 Résultat No. 3 - PROJET MARGINE

Résultats des recherches

L'objectif principal de ce projet était d'essayer de mettre au point un procédé de dépollution des margines. Ces eaux résiduaires de l'industrie oléicole posent de sérieux problèmes d'environnement en TUNISIE. Ces effluents de couleur noire sont toxiques à cause de leur concentration élevée en composés organiques et phénoliques.

Dans le cadre de ce projet P.N..U.D., les premiers travaux ont débuté par l'étude de la digestion anaérobie de ces effluents. En réalisant des cultures en batch, nous avons constaté que ces margines ne sont méthanisables que lorsque la D.C.O. est inférieure à 10 g/l.

Lors des essais d'utilisation du procédé U.A.S.B., malgré que les D.C.O. introduites fussent très faibles (<à 10 g/l) à des charges journalières très faibles, des problèmes de démarrage et d'acclimatation ont été rencontrés. Il a été alors montré que le réacteur type U.A.S.B. n'était pas favorable à la biométhanisation des margines.

D'autres réacteurs ont été utilisés sans succès. Le traitement par digestion anaérobie de ces effluents s'est alors avéré non envisageable à cause de l'inhibition de la méthanisation. Deux hypothèses peuvent être à l'origine de cette inhibition :

- La forte concentration en composés organiques, la nature des molécules (composés phénoliques) contenues dans les margines à des concentrations relativement importantes.

Une étape de prétraitement des margines s'impose par l'utilisation de bactéries ou de champignons capables de diminuer la concentration de la matière organique, mais aussi de dégrader ou de modifier les composés phénoliques, inhibiteurs potentiels de la digestion anaérobie.

Le prétraitement par des consortium microbiens ou bactéries aérobies telle que *Pseudomonas putida*, réputée par sa capacité de dégrader les phénols a été également tenté. Malgré la dégradation efficace des composés aromatiques (monomériques), l'utilisation des bactéries n'est pas possible dans ce cas de figure, puisque les margines sont constituées essentiellement de composés polymériques.

Les travaux réalisés au cours des deux dernières années se sont alors orientés vers le prétraitement des margines par les champignons. L'utilisation d'*A.niger* capable de dégrader des polyphénols de faible poids moléculaire a permis de réduire l'inhibition de la méthanisation sans pour autant attaquer les polyphénols de haut poids moléculaire qui représentent plus de 60% de la matière sèche.

Nous avons alors cherché des micro-organismes capables de dégrader les composés phénoliques de faible et de haut poids moléculaires. L'utilisation de *Phanerochaete Chrysosporium*,

champignon connu pour sa capacité à dégrader la lignine (polyphénol) a permis, non seulement de dégrader les composés phénoliques de faible poids moléculaire, mais aussi de dépolymériser les polyphénols de haut poids moléculaire, et par conséquent, de décolorer les margines.

La décoloration des margines, résultante de la dégradation de ses constituants polyphénoliques dépend de l'expression du système ligninolytique de *P. Chrysosporium*. Nous avons ensuite utilisé l'approche de la régulation par le manganèse pour augmenter le niveau de synthèse de l'une ou de l'autre enzyme (LiP, MnP). La LiP apparaît comme l'enzyme clé de la dépolymérisation (décoloration) des composés phénoliques de haut poids moléculaire.

Puisque les margines contiennent de fortes concentrations en composés phénoliques, nous avons réalisé une étude comparative avec d'autres basidiomycètes pour la dégradation des composés aromatiques des margines et/ou leur décoloration. Les champignons utilisés sont différents par la composition de leur système ligninolytique.

Exemples :

Dichomitus squalens secrète les laccases et MnP, *P. Chrysosporium* secrète des LiP et MnP alors que *Phlebia radiata* ou *Coriolus versicolor* secrètent des LiP, MnP, et laccases.

En se basant sur plusieurs critères tels que les rendements de décoloration des margines et de diminution de la D. C. O. et la sporulation, nous avons sélectionné *P. Chrysosporium* HD dérivée de BKM-F pour la suite de nos travaux.

En utilisant 14 souches différentes de *P. Chrysosporium*, nous avons montré qu'il existe une relation entre le taux de production de LiP et la décoloration des margines.

Cette étude fondamentale du système enzymatique impliqué dans la biodégradation des composés aromatiques des margines nous permettra, d'une part, de comprendre les mécanismes de dégradation de ce substrat particulier, de connaître la nature des composés présents et de la limite d'utilisation du système ligninolytique de *P. Chrysosporium*. Cette étude nous permettra aussi la conception du réacteur adéquat pour le traitement des margines.

Schéma de traitement envisagé

Actuellement, un schéma global pour le traitement des margines est en cours de développement. Ce procédé est constitué de trois étapes :

- Une étape de traitement aérobie des margines brutes par *P. Chrysosporium*. Le réacteur ainsi que les conditions adéquates sont en cours d'étude.

- Une étape de digestion anaérobie des margines prétraitées par *P.Chrysosporium*. Actuellement, le filtre anaérobie semble être le réacteur le plus adéquat.

- Une étape de traitement tertiaire permettre d'éliminer la D.C.O. résiduelle qui reste de l'ordre de 15 g/l, même après ces deux premières étapes.

Développement potentiel

Ce travail rentrera dans le cadre du projet DGXII, en collaboration avec l'O.R.S.T.O.M., intitulé "Development of Biological Process for the Treatment of Olive Mill Waste Water", qui est financé par la C.E.E. (180 000 Ecus) pour une durée de trois ans (Mars 1993 à Mars 1996).

Un financement de la part du Secrétariat d'Etat de la Recherche Scientifique et de la Technologie (60 000 DT pour une durée de 3 ans: Juin 1992 à Juin 1995) a été obtenu pour la réalisation du Pilote de traitement des margines.

Notons que, depuis septembre 1991, une convention entre le C.B.S. et l'O.R.S.T.O.M. a été signée en vue de la mise en place d'un laboratoire commun sur les bactéries anaérobies strictes.

II-4 Résultat No. 4 - PROJET DE PRODUCTION DE LYSINE

La TUNISIE importe pour la fabrication des aliments composés tous les ingrédients nécessaires, à savoir: le maïs, les protéines et les compléments vitaminiques.

Face à l'accroissement des importations de ces matières premières, il est impératif de penser sérieusement à la substitution des produits importés par des produits locaux et bon marché.

Au cours de ce projet, nous nous sommes proposés d'étudier la possibilité de produire, à partir d'un substrat disponible en grande quantité, un aliment qui soit le plus complet possible:

- Complément en lysine puisque les céréales sont pauvres en acide aminé,
- Riche en protéines.

La recherche d'un substrat disponible en grande quantité, facilement biodégradable et bon marché est essentielle pour la rentabilité économique du procédé de production de lysine. Le gruau de blé, sous-produit de la mouture de blé des industries agro-alimentaires, est intéressant puisqu'il contient 56 % d'amidon.

C'est un produit bon marché et disponible. Ainsi, l'aliment obtenu à partir de l'hydrolysate de gruau, qui est riche en protéine et en lysine, devrait alors trouver sa place en alimentation animale et, de ce fait, se substituer aux produits importés (comme les tourteaux de soja,...).

Production de lysine

La première partie du travail a porté sur la production de lysine sur milieu synthétique. Les résultats en batch nous ont permis de définir les facteurs les plus importants pour la croissance et la production de lysine par la souche *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513 et la souche *Brevibacterium flavum* ATCC 21475.

L'optimisation de la production de lysine par la souche *C. glutamicum* ATCC 21513, en batch alimenté, a permis d'obtenir une production de 120 g/l, avec un rendement de l'ordre de 35 %. Bien que les résultats obtenus avec la souche *C. glutamicum* ATCC 21513 soient comparables à ceux obtenus dans les publications disponibles, le coût élevé de la production dû à l'utilisation du glucose comme source de carbone, et d'autre part, à l'ajout d'une quantité importante d'extrait de levure restreint son application industrielle. Pour cela, nous avons entrepris des recherches pour réduire les exigences nutritionnelles, en particulier, en substituant l'extrait de levure par des substances disponibles et bon marché.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposés de tester les potentialités de nos souches pour la production de lysine sur milieu à base d'hydrolysate de gruau, d'en comprendre les limitations, d'améliorer les propriétés et de réduire les exigences nutritionnelles, en particulier l'ajout de l'extrait de levure comme facteur de croissance.

La culture des souches de Corynébactéries sur gruau ne pose aucun problème particulier. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer l'absolue nécessité d'une filtration du gruau hydrolysé.

L'utilisation d'un milieu préalablement filtré conduit à une meilleure croissance des souches et, par conséquent, pour une meilleure productivité de la lysine. La filtration élimine une fraction de protéines et de glucanes de la formation de mousses.

Plusieurs sources d'acides aminés et de facteurs de croissance ont été testés. La combinaison de l'hydrolysate protéique du gruau de blé et de la farine de poisson a été retenue. L'utilisation de l'hydrolysate complet amylolytique et protéolytique du gruau filtré sur filtre rotatif 5 μ m additionné d'une faible quantité de farine de poisson de l'ordre de 10 g/l a permis d'obtenir des rendements comparables à ceux obtenus sur milieu synthétique.

L'hydrolyse protéolytique du gruau facilite la filtration de l'hydrolysate du gruau et empêche la formation de mousse.

La troisième partie a porté sur une amélioration génétique de la souche *B. Flavum* ATCC 21475. Les essais préliminaires de mutagenèse de la souche *B. Flavum* ATCC 21475 ont permis d'isoler une dizaine de souches présentant une bonne activité spécifique avec un rendement amélioré. Le rendement de conversion du glucose en lysine, du mutant NG75201 retenu, est de l'ordre de 40 %.

La quatrième partie a porté sur l'amélioration des souches de corynébactéries par les techniques de l'A.D.N. recombinant. Pour cela, plusieurs vecteurs navettes stables autorisant l'expression de gènes chez les corynébactéries d'intérêt industriel ont été construits.

Résultats des recherches

En conclusion, nous avons prouvé la faisabilité du procédé de production de lysine. Des rendements (40, 42 %) comparables à ceux obtenus dans des publications disponibles ont été obtenus. Notre procédé met en oeuvre une technologie simple, applicable à tous les types de produits amylicés pour produire un aliment complet. Les milieux utilisés sont relativement simples. Ils contiennent de l'hydrolysate amylolytique du gruau, comme source de carbone et une source d'acides aminés et de facteurs de croissance constituée par l'hydrolysate protéique du gruau et l'hydrolysate protéique de la farine de poisson.

L'utilisation de l'hydrolysate protéique du gluten de blé et de la farine de poisson permet d'aboutir à un coût des matières premières inférieur à celui de l'extrait de levure et apporte ainsi une solution économiquement prometteuse à la substitution de l'extrait de levure.

Développement potentiel

La concurrence du soja (le tourteau de soja contient une quantité suffisante de lysine) est défavorable à la lysine, et de plus, les prix de vente effectués par les producteurs japonais et coréens ne cessent de baisser. Il est bien évident que, sur la base de ces données, et des résultats satisfaisants obtenus, il sera intéressant d'intensifier les recherches. Elles concernent :

- L'optimisation des paramètres technologiques du procédé de production de lysine,
- L'optimisation des conditions d'hydrolyse protéolytique du gruau additionné de farine de poisson,
- L'amélioration de la souche par les techniques de mutagenèse classique, en vue d'obtenir une souche présentant une bonne productivité, une faible production de métabolites secondaires, une bonne assimilation du substrat, et bien entendu, un rendement très élevé.

L'aboutissement d'une telle recherche en TUNISIE limiterait l'importation accrue des nutriments utilisés pour la préparation d'aliments composés (le maïs, les protéines, les compléments vitaminiques,...), qui pèsent lourd sur la balance des paiements du pays, et contribuera à un meilleur apport de protéines d'organismes unicellulaires et de lysine pour l'alimentation animale.

**II-5 Résultat No. 5 - PROJET DE MULTIPLICATION VEGETATIVE DU
PALMIER-DATTIER VARIETE DEGLET NOUR**

Le projet Palmier Dattier a pour objectif la mise en oeuvre d'une méthode de multiplication rapide des meilleures variétés de dattiers, en particulier "Deglet Nour", par cultures in vitro.

La propagation végétative du Palmier Dattier à l'aide des cultures in vitro peut suivre trois voies différentes :

- La réversion du méristème floral ou d'une portion de celui-ci vers un fonctionnement végétatif,
- La néoformation de bourgeons,
- La différenciation d'embryons somatiques.

Seule la première voie dont les organes sont initiés au sein d'un ensemble parfaitement structuré bien organisé garantit une conformité suffisante des plantes régénérées. Néanmoins, le contrôle de l'agronomie de cette plante ne peut se concevoir sans la maîtrise des deux autres voies, et tout particulièrement, celle relative à l'embryogenèse somatique qui est aujourd'hui en plein développement.

Résultats des recherches

Nous passerons en revue les résultats des essais entrepris en vue de l'amélioration du procédé de multiplication déjà établi et les premières conclusions tirées de l'expérimentation conduite sur l'étude de l'embryogenèse somatique à partir de bourgeons végétatifs de rejets et des feuilles qui en dérivent.

a) - Effet de la gibbérelline GA3 sur la formation et l'élongation de plantes à partir de touffes de feuilles

La contrainte majeure à l'industrialisation du procédé de multiplication précédemment défini demeure le nombre réduit de pousses feuillées dont l'évolution aboutit à la formation de plantules allongées, bien structurées ayant des feuilles normales emboîtées les unes dans les autres.

En effet, le transfert de plantes courtes mal structurées en pot entraîne systématiquement leur perte lors de la phase d'acclimatation.

Afin d'initier le plus grand nombre possible de plantes bien structurées, semblables à celles issues de germinations de graines, nous avons analysé l'effet de quatre doses de GA 3 : 5, 1, 0.5 et 0.1 mg/l en association avec d'autres régulateurs de croissance dans les milieux nutritifs. Les résultats obtenus après quatre mois de culture se résument ainsi :

- Quelle que soit la concentration de GA 3 utilisée, son effet se manifeste après deux mois de culture, donc au terme du deuxième repiquage, par une élongation énorme de quelques feuilles. Celles-ci deviennent très fines et s'enroulent sur elles-mêmes. Elles sont de couleur blanche dont les extrémités sont légèrement verdâtres. Leur taille peut dépasser 12 cm.

- Apparition d'un nombre réduit de plantes bien structurées, très allongées, très fines et très fragiles. Celles-ci sont très délicates à transférer en tubes ou en pot.

- Début de nécrose des explants mis en culture à partir du 3ème repiquage avec émission de grandes quantités de substances phénoliques. Il en résulte la dégénérescence des explants et enfin leur perte. Cet effet est d'autant plus marqué que la dose de GA 3 testée est élevée.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'extrême sensibilité des tissus de dattier à l'action de GA3 sans que son effet sur l'initiation et l'élongation des pousses feuillées soit réellement bénéfique.

b) - Effet des facteurs trophiques et hormonaux sur la multiplication et l'élongation des plantes

Afin d'avoir des taux de multiplication plus élevés, nous avons procédé à un affinement des conditions chimiques de multiplication et d'élongation des plantes, en analysant l'effet d'une série de combinaisons hormonales en association avec la solution minérale de MS et du saccharose additionnés à diverses concentrations.

Cette étude a révélé qu'une meilleure prolifération des tissusest observée en présence de la solution minérale de MS x 2 + ANA + Kin + IPA avec un coefficient mensuel de multiplication de l'ordre de 2.2

Pour que ce taux puisse se maintenir stable au cours des repiquages successifs, il convient de transférer les cultures tous les trois cycles de repiquage sur un milieu dont la composition est nettement différente de celle des milieux utilisés précédemment, sinon on assiste à un ralentissement souvent irrémédiable de la vitesse de multiplication entre le 4ème et le 6ème repiquage.

S'agit-il d'un phénomène d'accoutumance ou plutôt d'un processus d'accumulation toxique d'un élément ou d'une substance donnée ?

En ce qui concerne l'élongation des plantes, celle-ci est nettement stimulée en présence de fortes concentrations de saccharose jusqu'à 80 g/l surtout en présence de la solution minérale de MS x 2 et du couple ANA-BAP. Les plantes doublent alors de taille tous les deux mois.

c) - Embryogenèse somatique

Le processus conduisant à la régénération d'embryons somatiques est aujourd'hui en plein développement. Il rencontre de nombreux succès dont les plus marquants concernent les espèces ligneuses et les monocotylédones. Ceci est lié aux nombreux avantages qui découlent de l'utilisation de ce système.

D'abord, l'embryogenèse somatique est susceptible de conduire à des populations cellulaires très importantes surtout quand elle

se déroule en milieu liquide. Les taux de multiplication atteints sont très élevés comparativement aux autres méthodes de propagation in vitro.

D'autre part, la maîtrise de ce processus peut conduire à la production de semences artificielles dont les enjeux sont de taille. Enfin, les cellules embryogènes constituent souvent une source de protoplastes idéale car leur aptitude à régénérer des plantes est extrêmement élevée.

Bien que plusieurs facteurs interviennent généralement dans l'induction de l'embryogenèse somatique, nous avons axé notre travail sur l'étude de la composante hormonale sans toutefois négliger l'incidence de l'âge de l'explant, l'effet de la concentration en sucre et la période de prélèvement.

Deux régulateurs de croissance ayant une forte activité auxinique (2.4-D et Picloram) ont été additionnés aux milieux de culture, soit séparément, soit en association entre eux ou avec d'autres régulateurs : ANA, ANOA, AIA, AIB, BAP, IPA.

Le 2.4-D a été testé aux concentrations de 5, 1, 0.5 et 0.1 mg/l, et le Picloran aux concentrations de 5, 1, 0.5, 0.1 et 0.01 mg/l.

Les premiers résultats obtenus montrent une diversité de comportement des explants mis en culture selon la nature et la teneur du milieu en substances de croissance.

Si le 2.4-D à 0.1 mg/l se révèle totalement inactif, son emploi permet d'initier des nodules à partir de 0.5 mg/l, mais avec une faible fréquence (5 à 10 %). Ces nodules sont lisses, plus ou moins compacts et jaunâtres. Ils apparaissent après quatre mois de culture.

Une bonne prolifération cellulaire est obtenue à la concentration de 1 mg/l de 2.4-D. Plus de 50 % de explants viables évoluent en Cals compacts, plus ou moins granuleux, à croissance rapide.

Une concentration de 5 mg/l en 2.4-D entraîne la dégénérescence progressive des tissus à partir du 4ème mois de culture, ce qui traduit un effet net de toxicité. On note toutefois, la néoformation de cals granuleux, ce qui autorise l'application de cette dose pendant la première période de culture.

En ce qui concerne le Picloran, on note sensiblement le même type d'effet qu'avec le 2.4-D pour les concentrations inférieures à 1 mg/l. A 5 mg/l, il se révèle performant par rapport au 2.4-D. On remarque surtout l'émission de polyphénols, ce qui empêcherait toute prolifération cellulaire.

Différents milieux de multiplication et de régénération sont en cours d'être testés sur des cals prélevés sur les explants primaires. Notre objectif est de mettre au point des milieux favorables à la prolifération cellulaire et à la néoformation de plantes.

Développement potentiel

Ce projet a permis de mettre au point des techniques de multiplication végétative du palmier dattier à partir de différents tissus; le passage en champ des plants obtenus a été réalisé. Cependant, ces plants n'ont pas encore donné des fruits pour contrôler la consécration génétique.

III - POTENTIEL HUMAIN

La formation des cadres scientifiques a commencé en 1975 à la Faculté des Sciences et Techniques de SFAX, au niveau du 1er et du 2ème cycle de formation universitaire et s'est poursuivi au niveau du 3ème cycle dans différentes Universités Françaises, et particulièrement dans les Universités de Technologie de COMPIEGNE, Paul SABATIER de TOULOUSE, de PARIS VI et VII, et enfin au C.N.R.S. (C.G.M. et Institut Jacques MONOD).

En 1988, lors du démarrage du projet, le personnel du Centre était composé de

- Un professeur,
- Trois Maîtres-Assistants,
- Six Assistants ou Equivalents,
- Cinq Techniciens,
- Six Administratifs (trois Secrétaires, un Agent Comptable et deux Agents de laboratoires).

En 1992, à la fin du projet, le personnel du Centre a évolué et la pyramide s'est constituée:

- Quatre Maîtres de Conférences et Professeur,
- Onze Maîtres-Assistants ou Equivalents (thèse d'université ou 3ème cycle),
- Un Coopérant O.R.S.T.O.M. (niveau Thèse d'Etat),
- Huit Assistants ou Equivalents,
- Neuf Ingénieurs et Techniciens de Laboratoires,
- Cinq Ingénieurs et Techniciens Stagiaires (S.I.V.P.),
- Une Secrétaire,
- Un Agent Comptable,
- Deux Agents de Laboratoires.

Ces chiffres indiquent que,

- Les effectifs ont doublé en absolu durant la période de fonctionnement du projet,
- Le personnel administratif a diminué alors que le personnel scientifique et technique a augmenté. Il faudra recruter pour la bonne marche de l'institution un personnel adapté comme des secrétaires, des documentalistes, des ingénieurs, etc...
- Le rapport chercheurs sur ingénieurs et techniciens a également évolué ; il est passé de deux à trois indiquant que le nombre de techniciens a diminué par rapport au nombre de

chercheurs. Ces rapports doivent être rectifiés par le recrutement de cadres techniques (ingénieurs, techniciens supérieurs).

- L'encadrement général du Centre s'est nettement amélioré par le recrutement de chercheurs confirmés de niveau Thèse d'Etat, Thèse d'Université et de Troisième Cycle.

Ces chercheurs couvrent une grande partie des disciplines des biotechnologies. Cependant, un certain nombre de spécialités font défaut au C.B.S., et il est urgent de former et recruter trois chercheurs confirmés :

- Un en Microbiologie,
- Un en Génie Industriel,
- Un en Génie de Fermentation.

IV - EQUIPEMENTS SCIENTIFIQUES

Tout le matériel est inventorié au niveau de l'administration du C.B.S. et a été réparti au niveau des différentes équipes du Centre. En plus de cet équipement, le C.B.S. a pu bénéficier d'un budget de fonctionnement de 200 000 \$ environ pour acheter des produits chimiques, des enzymes et de la verrerie.

V - VISITE D'EXPERTS

Plusieurs experts internationaux sont venus évaluer les programmes du C.B.S. durant toute la période du projet. Ces visites nous ont permis également de discuter et mettre ces experts à contribution. Nous devons insister particulièrement sur les apports de Douglas EVELEIGH que nous tenons à remercier. Les copies des rapports des experts sont jointes au présent rapport en ANNEXES I et II.

VI - FORMATION

Un certain nombre de chercheurs ont pu bénéficier d'une formation complémentaire qui s'est répercutée directement sur la conduite des programmes.

Ainsi, plusieurs chercheurs du C.B.S. (voir les rapports dans l'ANNEXE III) ont soit effectué des stages au C.B.S., soit à l'étranger, soit encore, participé à des manifestations scientifiques internationales comme des cours de formation de courte durée ou des congrès internationaux.

VII - FONCTIONNEMENT ET EVOLUTION DU CENTRE

Nous pouvons dire que ce projet a eu des répercussions immédiates sur le Centre.

En effet:

- La loi de finances 1989 a doté le Centre de la personnalité civile, de l'autonomie financière, et l'a rattaché à l'Université de SFAX pour le Sud. Le budget national du Centre, par cette opération, a été augmenté substantiellement.

- La loi de finances 1992 a rattaché le Centre au Secrétariat d'Etat à la Recherche Scientifique et à la Technologie. Cette création et ce transfert témoignent de la volonté nationale à développer et structurer le secteur de la Recherche Scientifique et Technologique. Le budget national de fonctionnement (hors salaires) du C.B.S. augmente de manière conséquente; il est passé de 15 000 dinars en 1988 à 260 000 dinars en 1992 (Titre I et II) et 350 000 dinars en 1993.

- Le Comité Scientifique, composé d'experts scientifiques internationaux et nationaux, des représentants de certains ministères et d'industriels, mis en place par le projet a eu un effet très positif sur les chercheurs qui ont pu atteindre rapidement une phase de maturité scientifique.

- Le Centre a pu recruter pratiquement tout le personnel formé depuis 1979 dans les Universités Françaises, et s'est structuré en programmes de recherches avec un certain nombre de services communs comme l'analyse, la maintenance et le laboratoire pilote. Les chercheurs maîtrisent parfaitement plusieurs technologies comme :

- * Les Technologies de l'A. D. N. recombinant,
- * Les Techniques de séparation et purification,
- * Les Techniques de fermentation...

- L'équipement acquis par le laboratoire pilote permet d'offrir au secteur industriel un service pratiquement inexistant en TUNISIE.

- Le Centre a pu lancer d'autres programmes de recherche sur la pomme de terre, sur les bio-pesticides, et sur le traitement des déchets industriels en relation avec l'industrie. La conjugaison de tous les résultats acquis a donné au C.B.S. une crédibilité au niveau international qui lui permet:

* de réaliser des programmes de recherche en collaboration avec plusieurs laboratoires d'excellence internationaux.

* de signer des conventions avec des Centres de Recherches Internationaux. Le C.B.S., après avoir été jumelé avec l'Institut Jacques MONOD, est devenu, depuis 1991, un Centre affilié au C.I.G.G.B., et a signé une convention avec l'O.R.S.T. O.M. pour la mise en place d'un laboratoire commun sur les bactéries anaérobies strictes.

* de recevoir, dans le cadre de ces programmes, un financement international (programmes C.E.E. et C.I.G.G.B.). Nous pouvons dire que tous les programmes du C.B.S. ont obtenu un financement international.

* d'organiser des Cours Internationaux de formation de courtes durées; le Cours International Théorique et Pratique de Génie Enzymatique, organisé par le C.B.S., du 18 au 26 septembre 1992, en est un exemple.

VIII - AMELIORATIONS A APPORTER

Il est clair pour nous que certains buts recherchés ont été atteints et que les conditions actuelles du C.B.S. sont propices à l'épanouissement des chercheurs. Cependant, il faudra dès maintenant réfléchir et apporter les solutions nécessaires aux différents problèmes qui restent en suspend:

- L'implication du secteur économique dans les choix et les orientations du C.B.S. Nous pensons que l'U.T.I.C.A., les banques de développement à titre d'exemple devront participer au Conseil d'Administration du C.B.S.

- Le statut du personnel de recherche :

- * Chercheurs,
- * Ingénieurs et Techniciens.

- Du statut des Centres de Recherches, actuellement le C.B.S. est régi par les textes des Etablissements Publics à caractère administratif. Les Centres de Recherches, sous ce cadre juridique, ne peuvent être compétitifs sur le plan international.

- L'importation rapide des produits et pièces de rechanges.

- La formation au sein de l'Université des cadres scientifiques pour la recherche au niveau de la formation de base et de la formation de 3ème cycle. Ceci implique la mise en place d'une politique de recrutement à long terme.

- La mise en place d'une bibliothèque scientifique et technologique (copies des revues scientifiques et copies des brevets qui sortent dans le domaine des biotechnologies). La mise en place d'une telle structure nécessitera beaucoup de moyens financiers qui dépassent de loin les moyens actuels du C.B.S. La mise en place d'une telle structure est une nécessité si nous voulons être compétitifs sur le plan international. Nous pensons que la coopération internationale devra nous aider à mettre en place une telle structure.

- Faciliter le transfert des résultats de laboratoire à l'industrie par la création de centres de transfert.

IX - TRANSFERT INDUSTRIEL DES RESULTATS DE RECHERCHE

A l'échelle nationale, il manque des structures d'interface entre le monde industriel et le monde de la recherche capables d'identifier les problèmes du secteur industriel, commander des études au niveau des Centres de Recherche-Développement, et transférer ensuite les connaissances acquises à l'échelle économique.

Sur le plan international, ces hommes d'interfaces sont essentiellement regroupés dans les bureaux d'ingénieries. A

défaut de telles structures en Tunisie, il faudra mettre en place des structures de transfert.

Nous pensons qu'une structure de transfert de techniques en Biotechnologie, à côté du C.B.S., aura des répercussions très positives sur les programmes du C.B.S. et d'autres centres de recherches. En effet, ce Centre de transfert aurait pour mission:

- de tester les produits issus des laboratoires de recherches à l'échelle semi-industrielle, pour assurer le transfert du savoir-faire,

- de faire des travaux d'extraction et de purification pour l'industrie,

- d'assurer la production de certains produits pour les laboratoires de recherches nationaux ou pour les besoins de l'industrie comme les enzymes,

- de faire des études d'ingénieries pour le compte des Universités ou le secteur industriel,

- de faire des études technico-économiques et élaborer des accords et conventions entre le secteur industriel et les centres de recherche.

Ce Centre sera conçu autour de certaines technologies déjà mises au point dans les laboratoires comme :

- La production des sirops de glucose et de fructose,

- La production d'enzymes comme les cellulases, la glucose-isomérase ou certaines enzymes de restriction qu'il faudra développer pour les besoins des laboratoires nationaux, les enzymes pour les besoins des laboratoires d'analyses médicales,

- La production par culture in-vitro de plantes,

- La production d'anticorps monoclonaux et poly-clonaux.

L'apport d'une solution à ces problèmes permettra au C.B.S. de mieux rationaliser et gérer le potentiel humain et matériel existant.

X - COMMENTAIRES DE L'ONUUDI SUR LE RAPPORT DE FINAL DU PROJET
 DP/TUN/86-010
 CBS Programmes de Recherches avril 1988 - avril 1992

L'introduction du rapport met en lumière l'influence importante qu'a eu le financement de ce projet sur le développement du CBS.

Il a permis:

- d'orienter et de focaliser les décisions budgétaires de l'Etat en faveur de la recherche,
- de former du personnel et de l'encadrer à un niveau scientifique élevé,
- de provoquer un réflexe embryonnaire de transferts de résultats de recherche vers l'industrie,
- aux chercheurs de prendre conscience de leur potentiel de prestataires et d'entrepreneurs, et
- de crédibiliser le C.B.S. au niveau international.

Pour que le système de transfert fonctionne au mieux, les entreprises devront se doter progressivement de personnes de formation scientifique, dont certaines devraient provenir du Centre. Nous pensons que le Centre devrait avoir ce rôle de fournisseur de chercheurs d'entreprises pour deux raisons:

- faciliter ultérieurement la communication recherche-production,
- faire perdurer la créativité du Centre par un renouvellement des chercheurs.

I - POTENTIEL HUMAIN

Le rapport permet de constater que de 1988 à 1992, le budget de fonctionnement par personne rattachée au Centre a été multiplié par dix alors que le personnel n'a fait que doubler. Cependant, sa structure devra évoluer pour lui assurer un équilibre qui permette l'efficacité dans le transfert; on pourrait penser en particulier à des noyaux de base: 1 chercheur- 1 ingénieur- 2 à 3 techniciens, habituellement rencontrés dans les structures de recherche-développement.

III VISITES D'EXPERTS

Les experts ont passé au Centre environ deux mois ouvrables par an, mais ceci représente à peu près 1 heure de conseil pour 100 heures de travail d'un équivalent chercheur, ce qui montre assez bien l'indépendance scientifique du Centre.

IV FORMATION

Ceci est confirmé par le fait que, durant les quatre années du projet, un équivalent chercheur a passé en moyenne moins d'un mois à l'étranger.

V RESULTATS ACQUIS

V-1 Projet sucre

Ce projet, à l'apparence simple, a permis à l'équipe responsable d'apprendre à connaître et à maîtriser les nombreux problèmes de changement d'échelle. Les résultats obtenus et la suite financière donnée par le gouvernement Tunisien sont encourageants. Il est important de noter que le procédé développé par le C.B.S. est techniquement original car il s'applique à l'amidon second (grau de blé) alors que les procédés industriels habituels sont adaptés au traitement de l'amidon premier (maïs). Le brevet déposé à l'INORPI devrait être déposé dans tous les pays de la convention de Madrid, de manière à pouvoir le valoriser à l'étranger. Il est convenu que le gouvernement tunisien finance les 70000 DT nécessaires.

Suivi:

- missions ponctuelles d'experts industriels pour conforter les adéquations procédé/appareillage choisies pour le pilote industriel,
- études de marchés du sirop de glucose sur l'Algérie, le Maroc, la Lybie et l'Egypte,
- caractérisation des rejets du procédé.

V-2 Projet cellulose

Ce projet rassemble toutes les étapes d'un développement: de la recherche fondamentale aux applications en passant par la maîtrise de la production en pilote industriel.

L'objectif principal était de maîtriser les conditions d'hydrolyse de la cellulose.

Les étapes ont été bien maîtrisées, mais pour des raisons de propriété industrielle, le Centre a été obligé de développer la production de sa propre souche à partir d'un clonage des gènes de Pol6. Cette nouvelle souche devrait être opérationnelle avant la fin de l'année 1994.

Pour l'instant quatre applications: les cellulases pour le délavage des jeans (la plus avancée) et les ensilages, les pectinases pour la production d'huile d'olive et production d'hôtes à ligninase destinés à des procédés de dépollution.

Suivi:

- assistance pour le scale-up de la production d'enzymes,
- mission d'expert pour faisabilité de production d'ensilages (paille et luzerne). Il existe un projet de collaboration avec l'INRA pour ce développement.

V-3 Projet margines

La dépollution des margines (400000 T par an, 200 g/l de D.C.O.), résidus de la production d'huile d'olive, est un problème d'environnement très important à résoudre.

Une voie de procédé a été déterminée. Elle est composée de trois étapes. L'épuration commence au contact de *P. Chrysosporium*, suivi d'une méthanisation et d'ultrafiltration. Son approfondissement sera financé sur trois ans par la Communauté Européenne et le gouvernement Tunisien dans un partenariat avec l'ORSTOM.

Suivi:

- mission d'expert pour l'évaluation des coûts totaux de dépollution et de la logistique à envisager en fonction de la répartition des sites à dépolluer
- mission d'expert pour la production de biogaz.

V-4 Production de lysine

Ce projet semble bien avancé. Cependant, de nombreuses incertitudes pèsent sur son avenir, en particulier en raison de la situation du marché international de la lysine. Il serait judicieux, à ce stade, de se poser les questions sur les disponibilités des matières premières, le marché tunisien de la lysine, le coût de fabrication et, en particulier, le coût de traitement et les débouchés pour les effluents (à traiter) du procédé.

Suivi:

- étude de marché de la lysine.

V-5 Multiplication végétative de palmier dattier

Le champignon qui attaque le palmier dattier n'est pas encore présent en Tunisie, ce qui explique la réticence du Ministère concerné à délivrer les autorisations nécessaires pour travailler à résoudre ce problème (nécessité d'un laboratoire classé P2 avec contrôle des effluents). Une collaboration triangulaire, Maroc-Algérie-Tunisie, financée par le P.N.U.D. a été établie et devrait permettre des économies d'échelle sur la résolution de ce problème.

Au C.B.S., les résultats obtenus en quatre années sont maigres et les objectifs économiques n'ont pas été présentés. Les résultats en champs montrent qu'il existe un problème de conformité des plants (rendement de 60%)

Suivi: le projet a été pour l'instant réorienté vers la production de plants de pomme de terre par micropropagation in-vitro.

Commentaire final

Le projet a permis à un centre de recherche de démarrer, d'atteindre et de dépasser la "taille critique" nécessaire à l'obtention de résultats valorisables.

Il est remarquable que, au bout de quatre années, 60% des activités engagées soient sur le point de déboucher sur des projets industriels et/ou aient trouvés d'autres financements pour y parvenir. Cependant, il est nécessaire de procurer un appui au C.B.S pour l'aider à finaliser les projets de transfert (glucose et cellulases) et renforcer ceux dont l'aboutissement demandera encore quelques années de mise au point (marges).