ביה"ס ללימודי הסביבה ע"ש פורטר - המעבדה לביו-הנדסה סביבתית

בשיתוף:

החוג לגאוגרפיה וסביבת האדם - המעבדה לחישה מרחוק

המכון לחקר ימים ואגמים לישראל – המחלקה לביולוגיה ימית

פיתוח שיטה אופטית מתקדמת לאיתור אצות ים רב-תאיות בעלות ריכוז סוכרים גבוהה לטובת השבחה פרטנית של האצה *Ulva Fasciata*

חיבור זה הוגש כעבודת גמר לקראת התואר

"מוסמך אוניברסיטה" M.Sc בלימודי סביבה

באוניברסיטת תל-אביב

על ידי:

שי שפר

העבודה הוכנה בהנחיית:

ד"ר אלכס גולברג, המעבדה לביו-הנדסה סביבתית, ביה"ס ללימודי הסביבה ע"ש פורטר באוניברסיטת תל-אביב

ד"ר אלכסנדרה צ'ודנובסקי, המעבדה לחישה מרחוק, החוג לגאוגרפיה וסביבת האדם באוניברסיטת תל-אביב

ד"ר ד"ר אלוארו ישראל, המחלקה לביולוגיה ימית, המכון לחקר ימים ואגמים לישראל חיפה

ספטמבר 2016

תקציר

הגידול המתמיד באוכלוסיית העולם בשנים האחרונות עם צפי להמשכו גם בשנים הבאות, גורם לעומסים הולכים וגדלים על מקורות הצריכה הטבעיים של בני האדם. העומסים מרוכזים בעיקר באזורים המיושבים יותר וגורמים לחסרים במקורות בסיסיים כגון: מים מתוקים, מזון חקלאי, דלקים - מקורות אנרגיה מתכלים וחומרים כימיים טבעיים הנדרשים לתעשיות השונות.
בשנים האחרונות נעשים מאמצים רבים הן ע"י המדינות והממשלות באופן פרטני או בצורה גלובלית, תוך שילוב גופי מחקר אקדמאיים ושילוב התעשייה, בחיפוש, פיתוח ומימוש פתרונות אלטרנטיביים שיביאו מצד אחד לצמצום השימוש באותם מקורות טבע מתכלים ומצד שני יאתרו מקורות טבעיים חלופיים לאותם צרכים. כאשר במקביל מתפתחת תעשייה שלמה של פתרונות חליפיים שאינם טבעיים.
מחקר זה מתייחס לפוטנציאל בשימוש אלטרנטיבי באצות מאקרו מקומיות כאשר המטרה היא למצות את הפוטנציאל האנרגטי הגלום בתוכן מתהליך הפוטוסינתזה (סוכרים, שומנים) כמו גם תרכובות כימיות ייחודיות שונות הקיימות בהן כגון חלבונים שונים. בתהליך משולב, המבוסס על התפיסה של הביוריפאיינרי, ניתן לממש את הפוטנציאל האופטימלי הגלום באצות לתעשיות השונות כגון : דלקים ביולוגיים, מזון לאדם ולחי, תוספי מזון, תרכובות לתעשיות כימיות (רפואה, קוסמטיקה ועוד).
היתרונות הגדולים באצות: קצב גידול גבוהה ביחס לצמחי יבשה, תכולה גבוהה של מולקולות אנרגיה וחומרים כימיים יעילים, אין תחרות בשטחי הגידול החקלאיים כאשר ניתן לגדלה בתוך הים או בחוף הצמוד לו, צורכת מי ים ולכן לא מתחרה על מקורות מים מתוקים, במקרים רבים אין צורך בהוספת מקורות מזון מעבר לקיים בים, בייחוד אם משלבים את הגידול בחקלאות ימית של דגים או באזור בהם יש הספקת חומרים אורגנים ובצורה זו האצות גם מהוות גורם מנקה בים.
אחת הבעיות הקיימות בבניית תהליך ביוריפאיינרי יעיל הינו שלב הגידול של האצות ובחירת הזנים והפרטים שייתנו את הפוטנציאל הגבוהה ביותר לתוצרים הכימיים בהתאם לצרכים. תהליך זה מכונה השבחה פרטנית (סלקטיבית) אשר הגדרתו הפשטנית הינה זיהוי ובחירת אותם פרטים באוכלוסיית הגידול אשר מכילים את האחוז הגבוהה ביותר של המולקולות הנדרשות (סוכרים, חלבונים...) על מנת לבצע רבייה סלקטיבית מתוכם לקבלת אוכלוסייה חדשה בעלת ריכוז חומרי גלם נדרשים גבוהה יותר. כיום פעולות כאלו מתבצעות בחוות לגידול אצות, בעיקר במזרח הרחוק, תוך שימוש בשיטות מסורתיות המתבססות על בחירה ידנית – איכותית בהסתמך על מראה, גודל, משקל וכו' . במידה ומעוניינים לבצע תהליך השבחה מדויק יותר יש לשלב שיטות אנליטיות כימיות, הבעיות העיקריות בשיטות אלו הן הזמן הארוך יחסית לביצוען (ע"י דגימות במעבדה) והעלות הגבוהה של אותן שיטות.
בעקבות בעיות אלו הבחירה נעשית בצורה סטטיסטית על מספר פרטים מצומצם תוך הנחות להתנהגות דומה לגבי יתר האוכלוסייה, דבר המקטין את רמת הדיוק בבחירה הסופית.

במחקר הנוכחי המטרה למצוא פתרון יעיל וחסכוני לתהליך ההשבחה הסלקטיבי, שיאפשר בחירת פרטים בהתבסס על הרכבם הכימי תוך שמירה על קצב מיון מהיר ואמין. במידה והמחקר יוכיח את נכונות ההנחות ,אזי תהיה אפשרות לבצע השבחה מדויקת יותר של אצות, שתתבסס על בחירת פרטים מתוך כלל האוכלוסייה (ולא רק מספר סטטיסטי מצומצם של פרטים) בקבועי זמן קצרים מאוד ובעלות נמוכה יחסית כאשר כלל פעילות הבחירה יבוצע בשטח הגידול ללא צורך בלקיחת דגימות למעבדה.

בשיטת ההשבחה אותה המחקר בה לבחון נעשה שימוש בטכנולוגיה של ספקרוסקופיה באורכי גל בתחום הנראה וה- NIR, טכנולוגיה זו קיימת בשימוש נרחב כבר שנים רבות בתעשיות רבות כולל בחקלאות גד"ש לשימושים שונים כגון זיהוי תכולות ותכונות כימיות בצמחים היכולים להצביע על עקות שונות בצמח.

המחקר בא להוכיח שניתן לבנות מודל מבוסס רגרסיה, המסתמך על החזר קרינה בתחום הנראה וה- NIR, שיאפשר זיהוי ריכוזי סוכרים, לטובת ייצור דלקים ביולוגיים, כגון גלוקוז, בפרטים ספציפיים מתוך אוכלוסייה שגדלה בתנאים סביבתיים דומים.

המחקר חולק לשני שלבים כאשר בחלקו הראשון בוצע ניסוי באוכלוסייה קטנה של 16 פרטים ומטרתו הייתה לבחון את בחירת המשתנה התלוי האופטימלי לקבלת פרטים עם ריכוזי סוכרים שונים. ניסוי זה הוכיח שהזנת הפרטים בריכוזי נוטריינטים שונים לאורך תקופה של 3 שבועות, תוך שמירה על יתר הגורמים הסביבתיים דומים בכל בריכות הניסוי, מביא לשוני בכלל ריכוזי הסוכרים באצה כאשר העיקרי הוא סוכר הגלוקוז, הריכוזים שונים בצורה מהותית, ולכן ניתן לבחון בניית מודל המבוסס על ההחזרים של הקרינה לכימות אותם ריכוזי סוכר.

בשלב השני נעשה שימוש באוכלוסייה גדולה של 100 פרטים שחולקו ל 10 בריכות ב 5 טיפולי נוטריינטים שונים, בסוף ניסוי זה נבנה מודל המבוסס על נתוני ריכוזי הסוכר מתוך הבדיקה האנליטית ב- HPLC למול הספקטרומים שנלקחו מהאצות במצב רטוב ובמצב יבש.

תוצאות הניסוי הראו שבשני המקרים (הרטוב והיבש) התקבלו מודלים המאפשרים להעריך את ריכוזי הגלוקוז באצות השונות, כאשר בספקטרום שהתקבל מהאצות הרטובות התקבלה יכולת ניבוי לריכוז גלוקוז באצה של כ- 60% ובאצות היבשות התקבל מודל ניבוי המאפשר הערכת ריכוזי גלוקוז בהסתמך על ההחזר הספקטרלי בדיוק של כ- 80%.

<u>תודות</u>

ראשית ברצוני להודות למנחי המחקר:
בראש ובראשונה לד"ר אלכס גולברג שקיבל אותי למעבדתו עוד בשלבי הקמתה, עזר לי בגיבוש רעיון המחקר ומציאת המנחים הנוספים. אלכס תמך בי לאורך כל הדרך ביחס אישי ובסבלנות רבה ותרם רבות להבנתי את התחום באספקטים השונים שלו תוך ראייה מדעית ויישומית.
לד"ר אלכסנדרה צ'ודנובסקי שתרמה לי רבות בהבנה של תחום הספקטרוסקופיה ובעיקר בשיטות הניתוח של הספקטרומים בכלים הסטטיסטיים וניתוח התוצאות. תמיד עם חיוך ורצון טוב.
לד"ר אלוארו ישראל שחיזק את הבנתי בכל הקשור לגידול האצות בתנאים הדומים לסביבה האמתית. אלוארו העמיד לראשותי את סביבת הניסוי המורכבת במכון לימים ואגמים שאפשרה את הקמת הניסוי וניטורו לאורך תקופות שונות ותרם בעיקר את הידע הרב שלו בתחום אצות המאקרו.
בנוסף ברצוני להודות לכל מי שעזר לי ותרם מזמנו בשלבי הניסוי השונים במעבדות הרבות בהם עבדתי ובעיקר לרות גוטליב מהמעבדה במרכז הרב-תחומי.

תקציר 2
תודות 4
רשימת איורים 7
רשימת טבלאות 8
ראשי תיבות 10
מבוא 10
1. הצורך בחלופה למזון ומקורות אנרגיה 10
2. רקע מדעי 12
2.1. אצות מאקרו 12
2.2. ביוריפאינרי (Biorefinery) 13
2.3. אצת Ulva (חסנית) לביורפאינרי 14
2.4. ניתוח תכולה כימית של אצות בעזרת ספקטרוסקופיה (Visible, NIR, SWIR) 15
2.5. הרעיון המרכזי בבניית המחקר 17
הגדרת מערך המחקר 18
1. מבוא לבניית מערך המחקר 18
2. שלב ראשון בחינת מערך הניסוי האופטימלי 20
3. הגדרת תהליך הגידול בתוך המכלים 21
שיטות וחומרים 23
1. ניסוי ראשון – 16 אצות עם טיפול בודד וביקורת 24
1.1 מטרת הניסוי 24
1.2 מערך הניסוי 24
2. ניסוי שני – ניסוי 100 אצות עם 5 טיפולים שונים 25
2.1 מטרת הניסוי 25
2.2 מערך הניסוי 25
3. פרוצדורת טיפול באצות משותפות לשני הניסויים 26
4. ציוד בניסויים 26
4.1 מכלי הגידול 26
4.2 תמיסת דישון 27
4.3 מייבש חסות 27
4.4 שקילה 27
4.5 ניטור פרמטרים סביבתיים (Hobo) 27
4.6 מדידה ספקטרופוטומטרית רטובה / יבשה 27
4.7 ייבוש 28
4.8 תהליך הידרוליזה 28
4.9 כימות בעזרת HPLC 29
4.10 בניית מודל חיזוי - מבוסס רגרסיה רבת משתנים 31
4.11 הטיפול בנתונים לטובת בניית המודל 32

תוצאות 34
1. ניסוי ראשון 16 אצות 34
1.1 ניתוח תוצאות משקל האצות בגרם 34
1.2 ריכוז סוכרים - כפי שנמדד ב HPLC 37
1.3 מסקנות מתוך תוצאות הניסוי 37
2. תוצאות ניסוי שני: 100 אצות 38
2.1 קצב הגידול – מערך הניסוי השני 39
2.2 הבדלים ספקטראליים 41
2.3 מדידת ריכוזי סוכרים באצות תוך שימוש ב- HPLC 43
2.4 הגדרת הקבוצות לבניית המודל 45
2.5 עקרונות בניית המודלים לחיזוי ריכוזי גלוקוז באצות 47
2.6 מידול הספקטרום הרטוב 49
2.7 מידול הספקטרום היבש 52
דיון 55
מסקנות 58
סיכום 59
כיווני מחקר עתידיים 60
רשימת ספרות 62
ABSTRACT 66
CONCLUSION 69

רשימת איורים

איור 1 ספקטרום ההחזרה הטיפוסי של גידולי שדה בתחום שלושת התדרים. נלקח מתוך: (Li, Zhang, and Huang 2014) 17
איור 2: מטריצה לגידול אצות, חיבור הסלסלות למוטות הפלסטיק מאפשר את איזון המטריצה ביחס לפני המים כך שמצד אחד כל האצות יקבלו תנאי גידול דומים ומצד שני תהיה הפרדה ביניהן לטובת מעקב פשוט. 22
איור 3 – תרשים זרימה של ניסויי האצות 23
איור 4 - פרוטוקול הידרוליזה לדוגמאות האצות לפני כימות תכולת הסוכרים 28
איור 5 - תצוגת משקלי האצות לאורך תקופת הגידול – ההפרש בממוצעי הגידול השבועי בכל אחד מהטיפולים יצא מובהק. 36
איור 6 - קצב גידול האצות בטיפולים השונים. 37
איור 7 - ריכוזי הסוכרים גלוקוז וראמנוז בכל אצה. 38
איור 8 - ריכוז הסוכרים גלוקוז וראמנוז הממוצע לפי טיפול. 38
איור 9 - ממוצע משקלי אצות שבועי לפי טיפול. 40
איור 10 – ממוצע הפרשי משקלי האצות בגרם לכל טיפול כפי שנמדד אחת לשבוע במשך שלושת שבועות הגידול. 41
איור 11 – קריאה ספקטרוסקופית של האצות הרטובות – המדידות התבצעו על האצות מיד בהגיען למעבדה במצבן הרטוב. הספקטרום חושב כממוצע משתי קריאות. 42
איור 12 – קריאה ספקטרוסקופית של האצות היבשות – המדידות התבצעו על האצות מיד לאחר ייבושן בתנור. הספקטרום חושב כממוצע משתי קריאות. 42
איור 13 - קריאה ספקטרוסקופית של האצות היבשות לאחר נגזרת ראשונה. 43
איור 14 - בגרף מוצגים הריכוז המשקלי היחסי של שלושת החד סוכרים העיקריים הנמצאים באצת Ulva: גלוקוז, ראמנוז וקסילוז. המודל חושב ונבנה על הסוכר העיקרי, עם הריכוז הגבוהה ביותר באצות – הגלוקוז. 44
איור 15 – בגרף מוצגים הממוצעים של הריכוז המשקלי היחסי לגבי כל אחד משלושת החד סוכרים העיקריים באצת Ulva. לגבי כל סוכר ניתן לראות את הממוצע שחושב בהפרדה לחמשת טיפולי הדישון (נוטריינטים) השבועיים. החל מ – 0 (ללא תוספת נוטריינטים) ועד 90 מ"ל דישון פעם בשבוע. כפי שמתואר בפרק השיטות. 45
איור 16 – גרף זה מציג את ההתפלגות הנורמלית של ריכוזי הגלוקוז, כפי שהתקבל במדידות ה HPLC. בעזרת הפיזור הנורמלי הוגדרו הקבוצות לבניית המודל. 46
איור 17 – בגרף מוצג המודל שהתקבל לגבי בסיס הנתונים של קבוצה 3 אשר בשילוב עם קבוצת הניבוי נתן את התוצאה הטובה ביותר לניבוי כמות גלוקוז בספקטרום הרטוב. הנקודות והקו הכחולים מייצגים את הכיול (Calibration) של המודל ביחס לתוצאות בפועל ואילו הנקודות והקו האדומים מתייחסים לאימות (Validation) של המודל – הערכה עד כמה המודל יהיה מדויק לגבי הרצות עתידיות של דוגמאות באותה אוכלוסייה סטטיסטית. 50
איור 18 – בגרף הנתון מוצגות תוצאות הניבוי (Prediction) של קבוצת הניבוי של מודל 3 בספקטרום הרטוב. 51
איור 19 – הגרף מציג את טווחי הספקטרום אשר בעזרתם נבנה המודל של קבוצה 3 בספקטרום הרטוב. הטווחים הללו מייצגים את ההחזרים המשפיעים ביותר על בניית המודל. הטווחים הרלוונטיים התקבלו לאחר הרצת המודל מספר פעמים כאשר בכל הרצה ביקשנו להשאיר רק את אורכי הגל המשפיעים ביותר. ההרצות נמשכו לכל מודל בין 3-1 פעמים עד שהתקבלו הפרמטרים הטובים ביותר במודל. 51

איור 20 - בגרף מוצג המודל שהתקבל לגבי בסיס הנתונים של קבוצה 3 אשר בשילוב עם קבוצת הניבוי נתן את התוצאה הטובה ביותר לניבוי כמות גלוקוז בספקטרום היבש. הנקודות והקו הכחולים מייצגים את הכיול (Calibration) של המודל ביחס לתוצאות בפועל ואילו הנקודות והקו האדומים מתייחסים לאימות (Validation) של המודל – הערכה עד כמה המודל יהיה מדויק לגבי הרצות עתידיות של דוגמאות באותה אוכלוסייה סטטיסטית. 53
איור 21 - בגרף הנתון מוצגות תוצאות הניבוי (Prediction) של קבוצת הניבוי של מודל 3 בספקטרום היבש. 54
איור 22 - הגרף מציג את טווחי הספקטרום אשר בעזרתם נבנה המודל של קבוצה 3 בספקטרום היבש. הטווחים הללו מייצגים את ההחזרים המשפיעים ביותר על בניית המודל. הטווחים הרלוונטיים התקבלו לאחר הרצת המודל מספר פעמים כאשר בכל הרצה ביקשנו להשאיר רק את אורכי הגל המשפיעים ביותר. ההרצות נמשכו לכל מודל בין 3-1 פעמים עד שהתקבלו הפרמטרים הטובים ביותר במודל. 54

רשימת טבלאות

טבלה 1 - טבלת קריטריונים להגדרת תהליך הניסוי והשיקולים שהובילו להגדרה זו..... 19
טבלה 2 - חלוקת המכלים בניסוי הראשון (16 אצות), ריכוזים במכלים של 40 ליטר לפי כמות מוספת ב- mM 25
גם בניסוי זה בדומה לניסוי הראשון נבחרו פרטים איכותיים ויזואלית (צבע, שלמות וגודל) ומתוכם נחתכו טלוסים בודדים בגודל של כ 5 סמ"ר ובמשקל שנע בין 0.4-0.6 ג"ר – משקל לאחר ייבוש עדין בעזרת מייבש חסות. כל 10 אצות הוכנסו למטריצת סלסלות פלסטיק ובסה"כ 10 מטריצות. כפי שמוצג בטבלה 3 בניסוי זה הוגדרו 5 טיפולים שונים של הוספת ריכוזי נוטריינטים משתנים, כאשר לכל טיפול עם 10 אצות היו שתי חזרות בשתי ברכות נפרדות שאינן צמודות. המכלים ממוקמים בשורה במרחק אחיד מהים ולכולם אותו מפנה. נפח המכל הוא 40 ליטר ומעליו יש כיסוי ע"י רשת הצללה מפוליפרופילן שחוסמת כ- 50% מהקרינה. 25
טבלה 3 - חלוקת המכלים בניסוי השני (100 אצות), ריכוזים במכלים של 40 ליטר לפי כמות מוספת ב- mM 26
טבלה 4 – פרוטוקול שימוש במערכת ה – HPLC. 29
טבלה 5 – טבלת תמיסות סטנדרטים. 30
טבלה 6 – מיהול תמיסות הסטנדרט לריכוזים שונים על מנת לבנות עקומת כיול..... 30
טבלה 7 - ריכוז מדידת משקלי אצות ללא תוספת נוטריינטים לאורך תקופת הגידול. 35
טבלה 8 - ריכוז מדידת משקלי אצות עם תוספת נוטריינטים לאורך תקופת הגידול..... 35
טבלה 9 - טבלת הפרשי משקלים (גרם) שבועיים, אצות ללא תוספת נוטריינטים. 36
טבלה 10 - טבלת הפרשי משקלים (גרם) שבועיים, אצות עם תוספת נוטריינטים..... 36
טבלה 11 – טבלת ממוצע משקלי אצות בגרם לפי טיפול. המספרים של כל טיפול מייצגים את כמות התמיסה במ"ל שהוספה אחת לשבוע בכל טיפול (ריכוזי הנוטריינטים לכל טיפול מוצגים בשיטות וחומרים טבלה 4). כאשר טיפול 0 הינו גידול ללא תוספת נוטריינטים. 40
טבלה 12 – ממוצע הפרשי משקלי האצות בגרם כפי שנמדד אחת לשבוע במשך שלושת שבועות הגידול. 41
טבלה 13 – בטבלה הוגדרו חמש החלוקות השונות של כל 100 האצות בהסתמך על הפיזור הנורמלי של ריכוזי הגלוקוז שהתקבלו ב HPLC. בטבלה מוצגת קבוצת הביקורת (20%) של כל חלוקה כאשר לגבי כל קבוצה מוגדרת ההפרש (ייתרת ה 80%) מהווה את בסיס הנתונים (Dataset) לבניית המודל עליו נבצע ניבוי (Prediction) בעזרת קבוצת ה 20%. המספור של הדוגמאות בנוי

ממספר המטריצה (של הסלסלות) ומספר הסלסלה בתוך המטריצה. (בכל מטריצה ישנן 10 סלסלות)..... 47
טבלה 14 – בטבלה מוצגות התוצאות הטובות ביותר שהתקבלו לגבי הספקטרום הרטוב. ניתן לראות את התוצאות בבניית המודלים לכל אחת מ 5 הקבוצות שהוגדרו ותוצאות הניבוי לגבי קבוצת הביקורת הרלוונטית. מודגש בצהוב המודל שנתן את התוצאות הטובות ביותר בבנייתו ובניבוי ולכן הוגדר כמודל הנבחר..... 50
טבלה 15 - בטבלה מוצגות התוצאות הטובות ביותר שהתקבלו לגבי הספקטרום היבש. ניתן לראות את התוצאות בבניית המודלים לכל אחת מ 5 הקבוצות שהוגדרו ותוצאות הניבוי לגבי קבוצת הביקורת הרלוונטית. מודגש בצהוב המודל שנתן את התוצאות הטובות ביותר בבנייתו ובניבוי ולכן הוגדר כמודל הנבחר..... 53

ראשי תיבות

ASD - Analytical Spectral Devices

CAS - Chemical Abstracts Service (US registry num)

DDW - Deuterium-depleted water

FR - Full-Range

Glu - Glucose

HPLC - High Pressure/Performance Liquid Chromatography

NIR – Near Infrared

NIRS – Near Infrared Spectroscopy

Nm – Nano Meter

NREL -National Renewable Energy Lab

PLS - Partial least squares

Rha - Rhamnose

RMSE - Root Mean Square Error

RMSEP - Root Mean Square Error of prediction

SWIR - short-wave infrared

VIS - visible spectrum

מבוא

1. הצורך בחלופה למזון ומקורות אנרגיה

בשנים האחרונות אנו עדים לגידול משמעותי באוכלוסיית העולם, מבחינת מספרים: מכמות של כ 6 ביליון בשנת 2000 ועד כמות מוערכת של 7.5 ביליון בשנת 2030 עם צפי לגידול שיגיע לכ 10 ביליון בשנת 2100 [1]. בנוסף נצפה שיפור מתמיד באיכות החיים כמו גם באורך חיי האדם על פני כדו"א. כל הגורמים הללו מיצרים לחץ מתעצם על כל ענפי התעשייה השותפים בייצור המזון העולמי, מוצרים כימיים ודלקים.

השימוש המשותף, שנוצר בשנים האחרונות, באותם שטחים חקלאים לגידולי מזון ולגידולים לטובת דלקים ביולוגיים, כפי שניתן למצוא לדוגמא בארה"ב עם שדות התירס ובברזיל עם קני הסוכר [1] הינו אחד הגורמים המשפיעים על חוסר נוסף בזמינות מזון בעולם. לכל אלו יש לצרף את הדלדול באדמה חקלאית וכמות מוגבלת של מים מתוקים המתאימים לשתייה וחקלאות [2].

הלחץ הנוצר בעקבות הנושאים הללו צפוי ליצר עומס יתר על אותם גורמים הכוללים: אדמות חקלאיות, מי שתייה, דלקים פוסיליים (מאובנים) ומקורות טבעיים. מעבר לכך מתקיים קשר ישיר בין שני המקורות הקריטיים של מזון ודלקים בגלל יחסי הגומלין החזקים ביניהם – ייצור של מזון נוסף דורש יותר אנרגיה כאשר כיום עיקר האנרגיה מיוצרת ע"י מקורות אנרגיה פוסיליים - מתכלים.[2]

בבואנו לבחון את השוק הזמין לדלקים ביולוגיים, אנו מוצאים שני מקורות המוגדרים כרלוונטיים לייצור בקנה מידה גדול: הראשון הוא האתנול המיוצר כיום בעיקר מתירס או מקני סוכר והשני הינו הביודיזל המיוצר מגידולים עתירי שומן כגון סויה או שמן דקלים.

הסיבה שגידולים אלו מוגדרים כמקורות העיקריים לשוק הדלקים הביולוגיים היא זמינותם הגבוהה יחסית והידע הרב שנצבר בשיטות טיפוח הזנים השונים וגידולם. אלמנטים אלו מובילים לייצור יחסית פשוט וזול של מקורות אלו. הבעיה כמובן שלאור הצרכים הצפויים, התלות רק בגידולים אלו כמקור לדלקים ביולוגיים לא יספק לאורך זמן ולא יכול לעמוד בדרישות השוק המתפתח בשנים הקרובות.[3]

מעבר לכך בהערכת האפקט הסביבתי שיש בשימוש במקורות חקלאיים אלו, ניתן להצביע על מספר גורמים בעייתיים משפיעים:

1. הגדלת ריכוז הפחמן הדו חמצני (CO_2) שהינו אחד הגורמים לגידול באפקט החממה – כיום בעקבות השימוש הגדל בדלקים ביולוגיים נמדדה עליה של ppm 2 לשנה.
2. הנזק הנוסף הנגרם כתוצאה משימוש אינטנסיבי באותן קרקעות חקלאיות ,הכולל דישון וריסוס, הינו נזק משמעותי לקרקע והמערכת האקולוגית סביבה כולל מי התהום והאטמוספירה.
3. אפקט נוסף של נזקים נגרם מהשימוש במי שתייה, הנמצאים בחוסר, להשקיית הגידולים. בחישוב השוואתי שנעשה לגבי דריסת הרגל האקולוגית בעקבות השימוש במים מתוקים לטובת הדלקים הביולוגיים לעומת שימוש במים למקורות אנרגיה אחרים, נמצא שלדלקים הביולוגיים יש השפעה שלילית גבוהה יותר. [1,4]

בהסתמך על נתונים אלו ניתן לומר שהגידול בשימוש במקורות מבוססי חקלאות קרקע, עלול לגרום להשפעות משמעותיות בלתי צפויות על האקלים ואובדן של המגוון הביולוגי בעקבות חוסר יכולת האדם לשימור מערכת אקולוגית ברת-קיימא. בהבנה של האפקטים השליליים המשמעותיים הצפויים לאדם ולסביבה, ניתן להבין את האינטרס הבינלאומי הגובר במציאת פתרונות חלופיים טובים יותר.[2].

הנושא הכללי של מחקר זה מתמקד בין היתר, בחיפוש פתרונות שייתנו מענה על הבעיות שהוצגו כך שנקבל מקור לדלק ביולוגי עם פוטנציאל אנרגטי גבוהה, הקטנת השימוש והפגיעה בשטחים חקלאים המשמשים לייצור מזון, והפחתת הצריכה הגבוהה של מים מתוקים.

נראה שאצות המאקרו שנבחרו במחקר, נותנות מענה טוב על כל הדרישות שהוצגו כאן.

2. רקע מדעי

2.1. אצות מאקרו

המודעות לפוטנציאל הגבוהה הקיים בשימוש באצות- מאקרו כחומר גלם לייצור אנרגיה נרשמה כבר באמצע המאה ה- 19 אך הפכה לרלוונטית בשנות השבעים של המאה ה-20 בזמן שהעולם חווה את משבר הנפט.

ניתן להגדיר תקופה זו כנקודת הפתיחה לאותם מאמצים הנראים בימינו במערכות רבות כולל באקדמיה, בתעשייה ובחקלאות הימית. המאמצים כוללים מחקרים רבים ומימוש של מערכות שונות לייצור דלקים ביולוגיים בעזרת אצות ים, המהווים גם פילטר אוויר ביולוגי לצמצום פליטות CO_2. מקור משמעותי למוטיבציה של פעילות זו מגיע ממקורות מימון ממשלתיים לאותם מחקרים כדוגמת זו של התוכנית הלאומית האמריקאית US project of the National Renewable Energy Lab (NREL).[5]

מאקרו אצות הינן אצות רב תאיות , ניתן למצוא מגוון גדול ביותר של מאקרו-אצות בקרבת החופים, באזורים בהם יש להן משטחי אחיזה נוחים להתפתחות. במקרים אחרים ניתן למצוא אצות שאינן נאחזות במשטחים אלו וצפות במים הפתוחים. הסביבה העשירה של הים והאוקיינוס מספקת לאצות את כל צרכיה: מזון (נוטריינטים), קרינת שמש לטובת הפוטוסינתזה ומקור זמין ל CO_2.

האצות אם כן הן בתי חרושת לייצור חומרים אורגניים - בתהליך הפוטוסינתזה הן מקבעות את הפחמן הדו חמצני מהאוויר ומשמרות אותו כאנרגיה בצורת מולקולות מזון כגון סוכרים. בנוסף לסוכרים האצה מייצרת מהחומרים בסביבתה שומנים וחלבונים תוך יכולת לשלב תהליכים אורגניים ואי-אורגניים (mixotrophy).

בהינתן כלל היכולות הללו האצות הופכות להיות גורם ייצור מאוד יעיל ליצירת חומר אורגני בקצב גבוה מאוד. עד 2 ק"ג למטר רבוע בשנה. קצב מהיר בהרבה מיבול צמחייה בקרקע כגון קנה סוכר.[5,6]

באופן מסורתי ניתן למצוא חקלאות ימית של מאקרו-אצות לטובת מזון, תרופות או דישון באזורים שונים בעולם. עיבוד אצות מאוד אטרקטיבי בגלל יכולתן להשתמש במקורות טבעיים בצורה מאוד יעילה כמעט ללא השארת דריסת רגל פחמנית ובתמורה מקבלים חומרי גלם בעלי ערך רב. אי התחרות בגידולי השדה ותכולת האנרגיה הגבוהה שלהן הופכת את האצות לבעלות פוטנציאל איכותי לייצור דלקים ביולוגיים.[6–8] .

בעוד שבאסיה ישנן חוות גדולות לגידול אצות באירופה המחקר והפיתוח לביו-אנרגיה המבוססת אצות נמצאת רק בתחילת הדרך.

מספר מחקרים מצביעים על ריכוזים גבוהים של סוכרים וחומצות שומן. הממצאים הללו מחזקים את ההבנה בפוטנציאל הגלום בחומר האורגני של האצה לייצור חומרים כימיים ייחודיים וביודלקים כגון ביו-אתנול, ביו-בותאנול ואחרים. בנוסף לאצות הים השונות יש מגוון רחב של תרכובות כימיות

היכולות לשמש לתעשיות נוספות. מבין אצות המאקרו הירוקות, לאצת האולווה (Ulva) הפוטנציאל הגבוהה ביותר כמקור ביולוגי לייצור דלקים מבחינה אנרגטית, בין היתר מכיוון שהיא אצה חזקה עם זמינות גבוהה וניתן לגדלה במערכות בתוך הים ומערכות על החוף, קצב הגידול הטבעי של האצה גבוהה, הקציר שלה פשוט יחסית והאולווה מכילה עמילן בדומה לצמחי יבשה אשר הפיכתו לביו-אתנול הינו תהליך סטנדרטי.
[6,9–12]

לדוגמא, בדופן אצת הUlva נמצא את הרב סוכר הגופרתי אולוואן (Ulvan), המבנה הייחודי שלו יכול להוות מקור מעניין לשימושים מגוונים תוך שימוש בגישת הביוריפיינרי (Biorefinery), המפורטת בפרק הבא, לייצור אתנול ומתאן וכימיקלים בעלי ערך גבוהה

2.2. ביוריפאינרי (Biorefinery)

הרעיון האינטגרטיבי – משולב של ה biorefinery הינו מושג חדש יחסית, התפיסה הרעיונית והמימוש שלה, שניהם נמצאים בשלבים ראשוניים של פיתוח. לכן נמצא מגוון רחב של תיאורים ופרשנויות למושג הנ"ל.

לפי ההגדרה שנתנה ע"י Kamm et al. המושג "green biorefinery " הוגדר בשנת 1997 בצורה הזו: ביורפאינרי ירוק מייצג מערכת מורכבת בעלת יכולת שילוב מלאה של קיימות, סביבה ומקורות טכנולוגיה ידידותיים עבור שימוש מקיף (הוליסטי) ונצילות מקסימלית של חומרי גלם ביולוגיים הכוללים את הביומסה הירוקה והשאריות מתוך אזורי גידול ברי-קיימא.

הביטוי שהיה בשימוש בתחילה בגרמניה: תשתיות ומערכות מורכבות (“complex construction (and systems” הוחלף במערכות משולבות באופן מלא (.”fully integrated systems“). כאשר הרעיון הבסיסי הוא להשתמש בציוד מכני ושיטות פיזיות וכימיות שונות על ביומסה לקבלת מגוון תוצרים.
אחד מהיתרונות המשמעותיים בשיטה זו בהשוואה לשיטות המסורתיות הינה היכולת לייצר מגוון רחב של מוצרים ללקוח הסופי עם צמצום הפחת – פסולת למינימום. המוצרים יכולים לכלול בין היתר דלקים ביולוגיים, חומרים כימיים ומזון. התהליכים ניתנים לשליטה ובקרה כך שיש אפשרות לתכנן באיזה תהליך להשתמש על מנת לקבל מוצרי קצה שונים. בניית התהליך מתבססת על זמינות, הרכב ואיכות הביומסה מצד אחד והעלות שלה כחומר גלם ודרישות השווקים השונים מצד שני בנקודת הזמן הנבחנת. בדרך זו ניתן למקסם את התפוקה של הביומסה.
Kamm et al. מציג את התהליך כנוסחה:

(biomass) feedstock-mix + process-mix → product-mix.[13,14]

דוגמה לשימוש ברעיון של הביוריפאינרי ניתן למצוא במחקר של Balboa et al.

במחקר מוצג תהליך יעיל לטיפול בביומסה של מאקרו-אצות חומות "Sargassum muticum". הם הסתמכו על התפיסה הבסיסית של שימוש במגוון שיטות לייצור מוצרי משנה בעלי ערך שוק. הם שילבו תהליכים של כימיה ירוקה ועל ידי כך הצליחו לייצר 6 מוצרים שונים בעלי ערך למגוון תעשיות: מזון לאדם ולבע"ח, מוצרי חקלאות, מוצרים לתעשייה הרפואית, תוספי מזון ומוצרים ליישומים קוסמטיים.[15] .

2.3. אצת *Ulva (חסנית)* לביורפאינרי

לטובת המחקר שלנו בחרנו להשתמש באצה ירוקה מקומית מסוג *אולווה - Ulva Fasciata* הגדלה באזורים הצפוניים של הים התיכון בישראל. .[16] האצה מכונה בעברית *חסנית פסית* השייכת למשפחת *הירוקיות* (*Chlorophyta*), סדרת *החסניתאים* (*Ulvales*) בגלל דמיון הטלוסים לעלי החסה. *הUlva* גדלה בעיקר בעומקים של מטרים בודדים ובאזורי הגאות והשפל.[17]

אצות-מאקרו ירוקות יוצרות עניין רב בייחוד בעקבות קצב הגידול הגבוהה שלהן והתכולה הגבוהה של פחמימות. [18] .

למאקרו אצות ממשפחת *הUlva* יש פריסה עולמית נרחבת והן בעלות פוטנציאל ערך כלכלי גבוהה כמקור פוטנציאלי למזון וביו-אנרגיה.

18–20

כמקור מזון, חשיבותם של זני *הUlva* ידועים כבר שנים רבות, הן מהוות מקור זמין וזול לדיאטות מזון עשירות בנוטריינטים לאדם ולבע"ח, הכוללים ערכים תזונתיים של ויטמינים, חלבונים ומינרלים.[21].

מבחינת שימוש לדלקים ביולוגיים, מחקר שנערך לאחרונה מציג את הפוטנציאל הגבוהה הקיים ב*Ulva* מסוג Ulva lactuca כאשר תמיסת ההידרוליזה שהכילה 75%-93% מהסוכרים השונים שבאצה שימשה כבסיס לתהליך תסיסה להפקת אצטון, בותאנול ואתאנול. כמו כן יש שימוש בסוכר הראמנוז שהינו השני בכמותו באצת הUlva כחומר גלם לייצור 1,2-propanediol – פרופלין גליקול הנדרש לדוגמא בתעשיית התרופות כחומר ממס וכנשא לתרופות לא יציבות או כאלו הלא מסיסות במים ולשימושים נוספים. [22] .

במחקרים קודמים נמצא שיכולה להיות שונות גבוהה בהרכב הכימי של קבוצות אצות *Ulva* שונות אפילו כאלו הגדלות בסביבה דומה מבחינת הים והאקלים. בדומה לגידולים חקלאיים גם האצות בחקלאות הימית מושפעות בשלבי הגידול השונים ממספר רב של גורמים סביבתיים (כגון: מים, נוטריינטים, אור, אקלים וכו') ומשונות גנטית. לכן על מנת לקבל ריכוז גבוהה של חומר מסוים, למשל סוכר ספציפי שקיים באצה, יש צורך להבין כיצד כל אחד מהגורמים יכול להשפיע על הריכוז של אותו חומר, ולהגדיר שיטה לבקרה ושליטה באותם גורמים משפיעים (הסביבתיים והגנטיים) לקבלת השיפור הנדרש. שיטת ההשבחה הסלקטיבית המתוארת כאן, על אף שיש דרישת שוק ברורה למימושה, אינה מפותחת עדיין בצורה איכותית.

התחום של הנדסה גנטית באצות מאקרו נמצא עדיין בחיתוליו בייחוד בהשוואה לגידולי שדה מבחינת הידע הקיים והטכניקות המיושמות. שיטות הדומות לאלו המיושמות בחקלאות קרקע ניתן למצוא בצורה מוגבלת במעט מאוד חוות של חקלאות ימית.
[23–25].

לכן אנו מחפשים שיטה חדשה ולא הרסנית, שתאפשר לנו לבחור את האצות המתאימות ביותר לצרכים המוגדרים כאלו שיעמדו בדרישות ההרכב הכימי בהתאם לפרמטרים שיוגדרו מראש. שיטה שתשתלב בתהליכי עיבוד יבול בקנה מידה גדול עם פוטנציאל למימוש השיטה בקצב גבוהה. בהינתן שיטה מוכחת נוכל לסרוק כמות גדולה של אצות בשלבי הגידול השונים ולקבל אינדיקציה על תכולה כימית שתאפשר לנו לבצע סלקציה איכותית ופרטנית לטובת השבחת הדורות הבאים של האצות.
השיטה לזיהוי הרכב כימי, אותה בחרנו לבחון במחקר הנוכחי מבוססת על ספקטרוסקופיה.

2.4. ניתוח תכולה כימית של אצות בעזרת ספקטרוסקופיה (Visible, NIR, SWIR)

ההשבחה המסורתית בחקלאות של גידולי שדה, עברה שינוי משמעותי בשנים האחרונות עם כניסתן של שיטות מבוססות הדמיה, לזיהוי מהיר ואיכותי של הרכבים כימיים בצמחים.
בשיטות הדמיה שונות כגון: הדמיה מבוססת ספקטרוסקופיה, הדמית אינפרא אדום תרמית (תרמוגרפית), הדמיה פלורסנטית, הדמית תלת מימד והדמיה טומוגרפית נעשה שימוש לקביעת מאפיינים שונים בהרכב הצמחים. [26–29] .
אף על פי כן לא מצאנו מידע בספרות לשימוש באותן שיטות בהשבחה אינטנסיבית של אצות מאקרו.
NIRS - Near Infrared Spectroscopy הינה אחת משיטות האנליזה המתקדמות הנמצאות בשימוש נרחב כיישום משמעותי כמעט בכל שדות המחקר המדעי. ההתקדמות המהירה והמשמעותית בשימוש בשיטה זו וקבלת התוצאות האיכותיות מסתמכת בין היתר על התקדמות מקבילה בתחום ה- chemometric analysis המשלים את יכולת הניתוח של מבנה החומרים. השילוב בין התחומים מאפשר ניתוח של ההרכב הכימי של חומרים בהסתמך על הספקטרום המתקבל בקרינה החוזרת. [30–33] .
תחום ה NIR התגלה לראשונה בשנת 1800 ע"י סר ויליאם הרשל Sir William Herschel שהיה אסטרונום, את הספקטרום הוא גילה בזמן שניסה למדוד את החום של עוצמת אנרגיית השמש באזור הקצה האדום של הספקטרום הנראה, לכבוד חשיבות הגילוי אורכי הגל בטווחים של 780nm – 1100nm מכונים גם 'Herschel infrared'. [34]
נראה שהגדרת טווח אורכי הגל המתייחסים ל NIR משתנים במעט בין גופים שונים, לדוגמא ה IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) מגדירים אותו בטווח של 780nm – 2500nm ואילו בספרות המתייחסת לחישה מרחוק החלוקה המקובלת שנמצא:

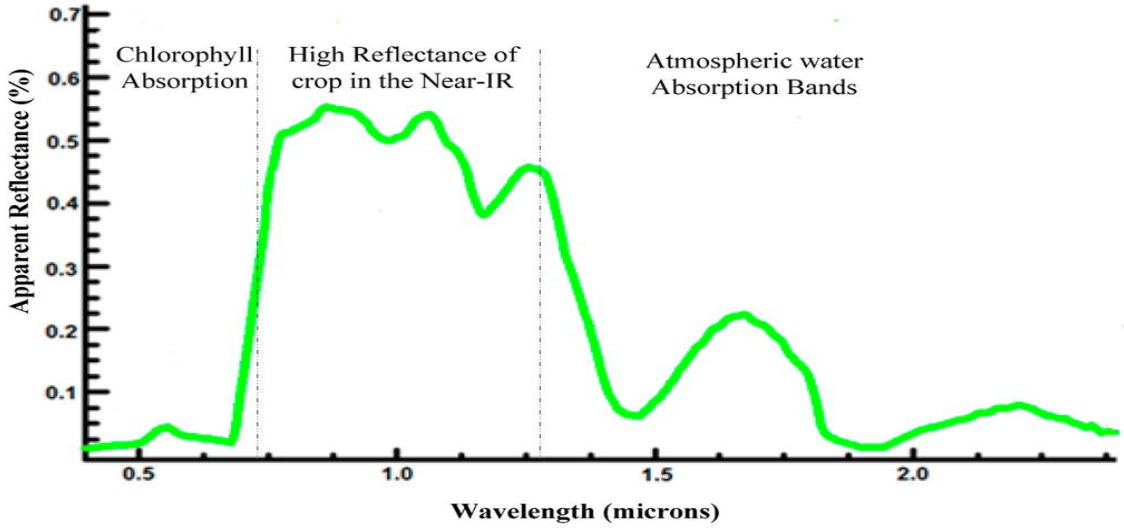
400nm – 700nm מתייחסים ל VIS (visible), 700nm – 1100nm מוגדרים כ NIR (near-infrared), 1000nm – 2500nm מוגדרים כ SWIR (short-wave infrared).

חתימה ספקטרלית המבוססת קליטה סלקטיבית של גלים חוזרים, יכולה לתת אינדיקציה ייחודית של מבנה החומר ותכונותיו, לכן יש שימוש רחב ביכולות אלו בתחומים רבים כגון בתעשיית חומרים שונים ברפואה ומזון ובהגדרת מבנים ותכונות של צמחים ורקמות חיות בחקלאות [35] .

הרעיון הבסיסי של זיהוי חומרים בצורה חד ערכית ע"י הספקטרום המוחזר, מבוסס על הרעיון בו לכל מולקולה וחומר יש יכולת בליעת קרינה אלקטרומגנטית במנות מדויקות של פוטון עפ"י רמות האנרגיה של האלקטרונים באטומים המרכיבים את אותו חומר. למעשה מכיוון שלכל חומר הרכב אטומי שונה כך שגם רמות האנרגיה בו משתנות וכתוצאה מכך יכולת בליעת הפוטונים שלו שונה. לאחר בליעת הפוטון האלקטרון חוזר לרמת האנרגיה הנמוכה יותר ופולט חזרה חלק מהאנרגיה (חלק נצרך ע"י פעילויות צורכות אנרגיה אחרות כגון חימום), החזר האנרגיה נקלט בסנסורים ולמעשה מהווה חתימה ייחודית לאותו חומר. ראה [36] לגבי הרחבה בנושא.

לגבי צמחים, מחקרים מראים ששימוש במדידות ספקטרליות בתחום הנראה וה NIR, מאפשרים ניתוח של המבנה הכימי שלהם בייחוד בתכולת המים והכלורופיל אשר מהווים אינדיקציה לגבי מצבם הפיזיולוגי. כאשר לשיטות המדידה הכימיות המקובלות כגון ה- HPLC ישנן בעיות, מעבר להיותן יקרות ולכך שאורכות זמן רב, הן מצריכות הרס של הצמח או העלה עליו מתבצעת המדידה ולכן לא מתאימות לניטור שוטף של שינויים כימיים ופיזיולוגיים. [37]

השיטה הספקטרלית זולה יותר, מידית ואינה הרסנית אך על מנת לקבל תוצאות איכותיות יש צורך בביצוע כיול יציב וחסין מהפרעות פנימיות וסביבתיות. מכיוון שישנו מרחב גדול של הפרעות פוטנציאליות כגון זנים ותתי זנים של הצמח, תנאי גידול משתנים אשר ברובם בעלי השפעות לא ליניאריות, ישנה חשיבות רבה לבניית ניסוי המבוסס על מספר דגימות רב בתנאים שונים ושימוש במודל רגרסיה רב משתנים מתאים כגון PLS (Partial least squares). נהוג לקחת את רב הדגימות, שני שליש ומעלה ולבנות בעזרתם את המודל למציאת הקשר בין ההרכב הכימי לספקטרום שהתקבל ואילו ביתרת הדגימות להשתמש לטובת אימות המודל [37,38]. השימוש במרחב אורכי גל בספקטרום הכוללים את האור הנראה, NIR ו SWIR, נותן אינדיקציה כימית/ פיזיולוגית רחבה, כאשר לאור הנראה יש אינטרקציה עם photoactive pigments כגון הכלורפיל, ב NIR יש אינטרקציה עם תאי האוויר הפנימי בתא ועם קשרים כימיים בחומר האורגני, בעוד ב SWIR יש אינטרקציה עם מולקולות המים, חלבונים ותרכובות פחמניות שונות. [27]



איור 1 ספקטרום ההחזרה הטיפוסי של גידולי שדה בתחום שלושת התדרים. נלקח מתוך: [27]

בגלל תכולת המים הגבוהה בצמחים (ובאצות) והחפיפה בבליעה של קשרי המימן חמצן עם מולקולות אורגניות נוצר מיסוך ולכן במידת הניתן מתבצע ייבוש חלקי של המים.

מעט מאוד מחקרים שהתבצעו על אצות מאקרו מסוג Ulva, עשו שימוש בבדיקות מבוססות מדידות ספקטרליות גם באורכי גל בתחום הנראה VIS (400-700 nm) ואורכי גל של NIR (700-2500 nm). נמצא ששימוש בהחזר המשלב את שני טווחי אורכי הגל יכול להצביע על מספר פרמטרים שיכולים לעזור בתיאור היחס בין שני חומרים באצה. למשל בין fulvic acids (FA) ל humic acids (HA) בדוגמה ספציפית במקביל נמצא שניתן להצביע על יכולת הערכה של תכולת חלבונים באצות. השימוש בשילוב שני טווחי הגל הללו מאפשר לעקוף חלק מההפרעות הנובעות מהמצאות מים בדוגמא הנבדקת. (מולקולות המים יוצרות מיסוך של חלק מאורכי הגל הרלוונטים). [39]

ממצא מעניין נוסף שהצביעו עליו במחקר, הציג ששילוב של טכניקת ה NIR עם שיטות ניתוח כימיות (chemometric evaluation routines), מגבירות את היכולת לקבל מידע איכותי לגבי הרכב חומרים שונים גם בתעשייה הכימית וגם בצמחים. [40–42]

2.5. הרעיון המרכזי בבניית המחקר

בהתייחס לכתוב במבוא לגבי הצורך במציאת אלטרנטיבה למקורות אנרגיה, מזון וחומרים כימיים חליפיים תוך שימוש באצות מאקרו מקומיות מסוג *Ulva*. והחוסר בשיטה יעילה לזיהוי תכולת הסוכרים באצות לטובת השבחת האצות בצורה סלקטיבית. כאשר השיטה תהיה פשוטה, מהירה ולא הרסנית.

הוגדרה **מטרת המחקר כ**:

פיתוח שיטה ובניית מודל סטטיסטי איכותי, לזיהוי ריכוזי סוכרים באצת Ulva Fasciata תוך שימוש בטכנולוגיה מבוססת ספקטרוסקופיה בתחום אורכי הגל VIS & NIR.

<u>הגדרת מערך המחקר</u>

על מנת להשיג את מטרותיו חולק המחקר לשני שלבים:

1. ניסוי מקדים - מטרתו לאושש את ההנחה לגבי השפעת ריכוז נוטריינטים משתנה על ריכוז סוכרים סופי באצות הUlva.
2. ניסוי עיקרי – מטרתו הוכחת היתכנות לבניית מודל מבוסס ספקטרום מוחזר בתחומי ה VIS,NIR,SWIR לכימות ריכוז סוכר הגלוקוז באצת הUlva.

1. מבוא לבניית מערך המחקר

מטרת המחקר מגדירה את הצורך בקבלת קבוצת אצות אשר נבדלות זו מזו בתכולת הסוכר אותו אנו מתכוונים למדוד, כאשר השוני בריכוז הסוכר נדרש להיות מהותי בטווחים שיאפשרו בניית מודל חיזוי איכותי.

בשלב הראשון בוצעו ניסויים בסדרי גודל קטנים שמטרתם לבחון ולהגדיר את השיטות המתאימות ביותר לטובת הניסוי העיקרי שהתבצע בשלב השני.
קיימות אופציות רבות ומגוונות לגידול אצות, לכן על מנת לקבל את הדרך שתביא להערכתנו לתוצאות האמינות ביותר, נבחנו שיטות גידול שונות למול מטרת הניסוי עד למציאת השיטה האופטימלית לצרכי הניסוי.

חשוב להדגיש כי בניסוי הנ"ל אין מטרה לבחון את ההשפעה של הגורמים הסביבתיים על תכולת הסוכרים, כי אם בחירת גורם ספציפי, עליו קל לשלוט, וידוע כי יש לו השפעה ישירה על ריכוזי הסוכר באצה. גורם זה יוגדר כמשתנה הבלתי תלוי בניסוי.

טיפולים שונים ע"י הגורם שנבחר, יביאו בסופו של דבר את התוצאה הנדרשת של אצות בוגרות בעלות תכולת סוכרים שונה. בטבלה 1 מוצגים הפרמטרים המרכזיים בעזרתם נבנו מערכי הניסויים:

טבלה 1 - טבלת קריטריונים להגדרת תהליך הניסוי והשיקולים שהובילו להגדרה זו.

אבן בוחן	**שיקולים לבחירה**
ניסוי בתנאים מדמי מציאות	ישנן דרכים רבות ומגוונות לגידול אצות מאקרו, לדוגמא ניתן לגדלן במעבדה סגורה בה אנו שולטים על רב או כל הפרמטרים הסביבתיים ומדמים סביבה כלשהי. כמו כן ניתן לגדל את האצות בים הפתוח או בבריכות פתוחות על החוף. בניסוי הנ"ל מטרתנו להגדיר שיטה אשר בעתיד תוכל לשמש במערכות מורכבות המשלבות גידול אצות מאקרו. על מנת שניתן יהיה לבצע את הניסוי בקבועי זמן ועלויות ריאליות, ניתנה עדיפות, בתכנון הראשוני, לניסוי שיבוצע בתנאים אשר ידמו בצורה טובה את תנאי הגידול האמתיים, תוך שימוש במערכת ניסוי בעלת מורכבות פשוטה וזמינה,.
שימוש באצה מקומית	השיטה אותה אנו מעוניינים להגדיר הינה גנרית לגבי אצות מאקרו אך במקביל באה לבחון אצות בסביבתן הטבעית. לכן הגדרנו שימוש באצה מקומית שכיחה לאזור הניסוי אשר תהיה זמינה בכל תקופת הניסוי שנמשך בעונות ותנאים סביבתיים משתנים.
עמידות גבוהה של האצה	חשוב למצוא אצה בעלת תכונות עמידות גבוהה לסביבת הניסוי, כדי שתגדל היטב לכל אורך הניסוי גם בתנאים סביבתיים משתנים, אשר מתרחשים במהלך הניסוי.
יכולת ניטור	סביבת הניסוי חייבת לאפשר ניטור מתמשך ופרטני של האצות בניסוי בצורה כזו שניתן יהיה לבצע מדידות שונות שיוגדרו גם במהלך הניסוי בצורה פשוטה ללא פגיע בהמשכיותו.
הגדרת משתנה בלתי תלוי	על מנת להשפיע על המשתנה התלוי המוגדר כריכוזי הסוכר הסופיים באצות בסיום הניסוי, אנו מעוניינים להשתמש בסביבת הניסוי במשתנה בלתי תלוי אשר אנו מעריכים כי הינו בעל השפעה על הריכוזים והינו אלמנט בו פשוט לנו לשלוט בצורה מדויקת ועקבית לאורך זמן הניסוי. אנו מניחים ומתייחסים ליתר הגורמים המשפיעים (גנטיים וסביבתיים) כזהים לכל הפרטים בניסוי ולכן השפעתם מתקזזת.
בניית מודל לחד סוכר העיקרי	מטרת המחקר היא להוכיח היתכנות לבניית מודל להערכת ריכוז סוכרים מתוך

בלבד	ספקטרום חוזר בתחומי ה- VIS \NIR. לכן הוגדר שלטובת מטרה זו מספיק יהיה לבחון את בניית המודל על חד סוכר בודד , כאשר נבחר את החד סוכר העיקרי שקיים באצת הUlva – הגלוקוז.

2. שלב ראשון בחינת מערך הניסוי האופטימלי

בהסתמך על מערך הקריטריונים והשיקולים הנתון הוגדר מבנה הניסוי ונבחנו האופציות השונות.

על מנת לבצע את הניסוי בסביבה הקרובה ביותר לסביבה הטבעית, נעשה שימוש במכלים פתוחים של 40 ליטר הממוקמים על חוף הים התיכון במכון לימים ואגמים בחיפה. המכלים מקבלים הספקת מים קבועה ממשאבה הממוקמת בתוך הים בעומק של כ- 3 מטר ובמרחק של כ- 150 מטר מקו החוף ולכן מדמים היטב את סביבת הגידול הטבעית של האצות. אנו מניחים שריכוז הנוטריינטים באזור השאיבה עומד על ה- baseline באזור באותה עונה[43], בנוסף קיימת הספקת אוויר קבועה ע"י משאבה המחוברת לצינור עם חרירים הממוקם בתחתית כל מכל. האוויר המוזרם יוצר סירקולציה המשכית של גזים לתוך הבריכה וערבוב של המים.

האצה שנבחרה לניסוי היא מזן *Ulva. fasciata* [16], הUlva היא אצה מקומית לים תיכון ולאזור הניסוי (ראה פירוט בפרק הדיון). היתרון של הUlva היא בעמידותה הגבוהה והתאמתה לתנאים הסביבתיים המשתנים בארץ. הUlva מושפעת מחילופי העונות כאשר בעונות החמות (אביב, קיץ) היא גדלה בקצב גבוהה יותר ובעונות הקרות (סתיו, חורף) פעילותה קטנה, אך היא עונה על הקריטריון של יכולת גידול לאורך כל תקופת הניסוי.

בנוסף בשטח המכון יש מלאי של אצות Ulva במכלים גדולים המכונים "דולבים" (מכלים אטומים מפלסטיק של חברת דולב). האוכלוסייה בדולבים גדלה ועוברת רבייה טבעית כבר שנים רבות במכון ולכן מותאמת מאוד למים ולתנאים באזור. ניתן להניח שהאוכלוסייה באותו דולב הומוגנית מבחינה גנטית.

מבנה האצה ותכולת המולקולות הפנימית שלו כגון ריכוזי החומרים, מושפעים ממספר רב של גורמים, חלקם תכונות גנטיות של האצה וחלקם מושפעים מגורמים סביבתיים חיצוניים כגון: תאורה, טמפרטורה, PH ותכולת נוטריינטים זמינים (חומרי מזון).

מתוך סה"כ הגורמים היכולים להשפיע על תהליך גידול האצה ועל תכולת החומרים בה כגון: קרינה, טמפרטורה, וזמינות נוטריינטים, בחרנו להשתמש בגרדיינט של נוטריינטים כמשתנה הבלתי תלוי על מנת לבנות את האוכלוסייה המגוונת של האצות. הסיבה לשימוש בשיטה זו נובעת מהפשטות היחסית, בהשוואה לפרמטרים הסביבתיים האחרים, בשליטה בכמות הנוטריינטים המוספים למכלי הגידול שנפחם קבוע. תוך הגדרת הוספת הדישון בזמנים קבועים ובכמויות מדודות.

ידוע כי בעזרת חומרי ההזנה העיקריים של האצות (חנקן, זרחן) ניתן להביא את האצות למצב של הזנה אופטימלית או לחילופין למצב של חוסר או עודף בחומרי מזון אשר משפיעים על קצבי הגידול

ויכולים ליצור גם עקה אצל האצות, כאשר תנאי עקה באצות משפיעים בין היתר על ריכוזי מחסני הסוכר באצה. [17]

ההנחה לגבי יתר התנאים הסביבתיים כגון קרינת השמש, הטמ"פ החיצונית והטמ"פ במים הינה שהם בקירוב גבוהה זהים בכל בריכות הניסוי הממוקמות בצמידות אחת לשנייה (הפרמטרים הנ"ל נוטרו במהלך הניסוי וההנחה אוששה).

3. הגדרת תהליך הגידול בתוך המכלים

על מנת לתת מענה לבעיות שהתגלו בשלבים הראשונים של בחינת מערך הניסוי ומפורטות בהמשך, תוכננו מטריצות גידול אשר מאפשרות גידול פרטני של כל אצה בשטח קטן אשר לא חוסם את גודלה (במשך שלושת שבועות הגידול) ומאפשר מעבר מים בתהליך הסירקולציה הקבוע.

נבחרו סלסלות בגודל 15 ס"מ X 15 ס"מ ובעומק של כ 10 ס"מ, הסלסלות חוברו בעזרת חוטי ניילון למטריצה קבועה ובשני הקצוות חוברו מוטות פלסטיק שאפשרו השענות של המטריצה על גבי דופן המכל. בעזרת החוטים בהיקף המטריצה ניתן לקבוע את גובה המטריצה ביחס למכל המים, כך שחלקה העליון ימוקם מספר מ"מ מעל פני המים ויימנע מצד אחד מעבר אצות בין התאים, ומצד שני ישמור על כל האצות כך שיהיו ממוקמות כל העת באותו עומק של כ 10 ס"מ בתוך המים ויקבלו תנאי סביבה דומים (ראה איור 2).

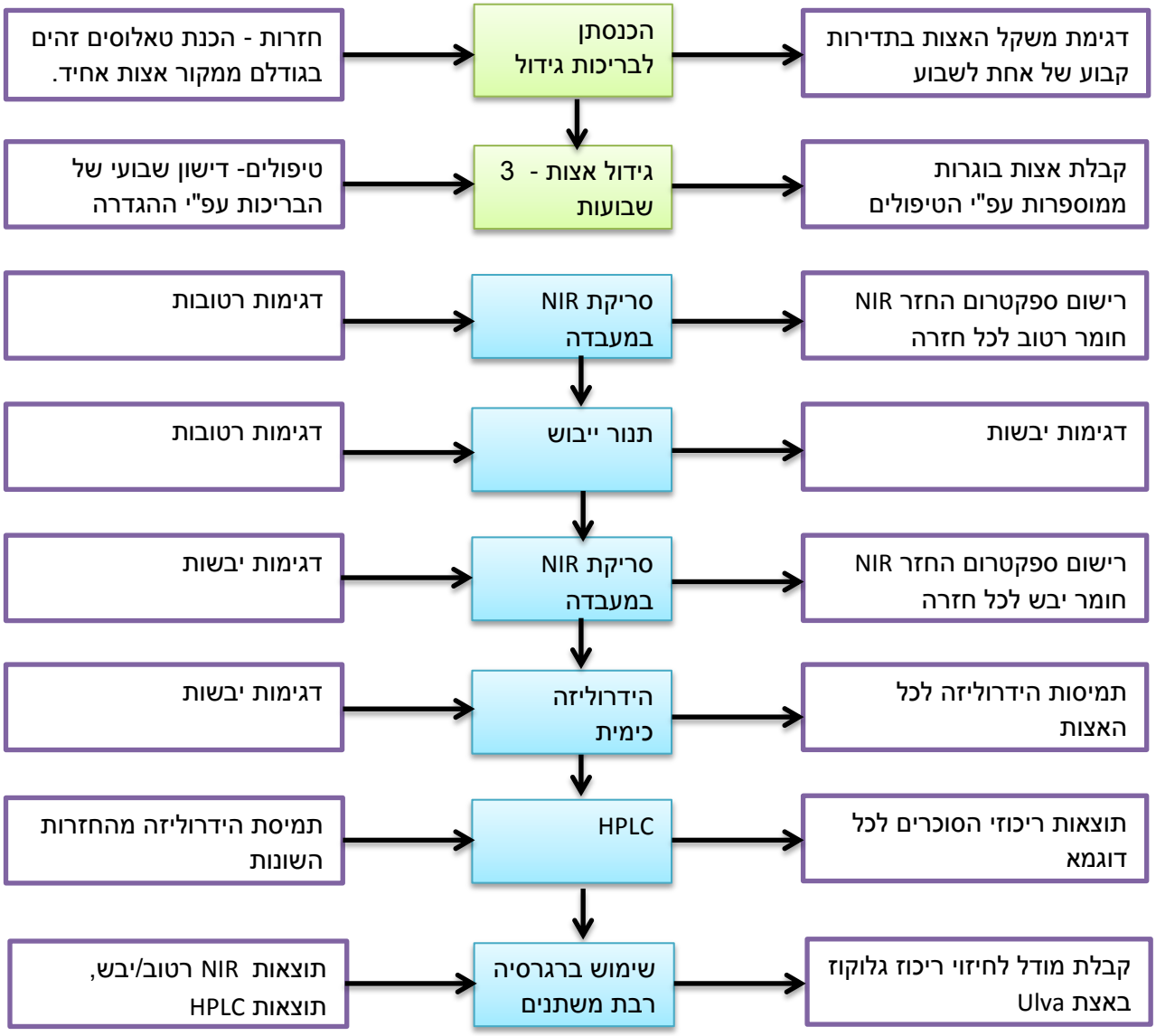
איור 2: מטריצה לגידול אצות, חיבור הסלסלות למוטות הפלסטיק מאפשר את איזון המטריצה ביחס לפני המים כך שמצד אחד כל האצות יקבלו תנאי גידול דומים ומצד שני תהיה הפרדה ביניהן לטובת מעקב פשוט.

הסיבות שהובילו להגדרת מערך הניסוי במטריצות: בתחילה נבחנה אופציה לגידול האצות בתפזורת במכלי ה 40 ליטר כך שהפרטים בתוך המכל הוכנסו בצורה חופשית כדי שיתערבבו כל העת במכל בעזרת האוויר שנכנס מהתחתית ע"י המשאבה. במהלך הבדיקה התעוררו מספר בעיות:

1. הבעיה העיקרית היא שלא הייתה כל דרך לזהות את היחידות השונות ולמעשה בצורה זו אין אפשרות לעקוב לאורך תקופת הגידול אחר ההתקדמות בגידול של כל אצה בנפרד מבחינת משקל, צבע או כל פרמטר אחר.
2. בזמן הגידול נצפתה תופעה שאצות בודדות לעיתים נחתכו, ייתכן שנפגעו פיזית במהלך הערבוב במכל, במקרים אלו היה קושי לזהות מאיזו אצה נחתך החלק ולעדכן בהתאם.
3. בעיה נוספת נובעת מהעובדה שלא ניתן לדעת האם כל האצות מעורבבות כל העת בצורה שווה ורטיקלית במיכל, ולכן יש בעיה להניח שאין השפעה על הגידול הנובעת ממיקום האצה במכל לאורך היום. מיקום האצה עלול להשפיע על אותם גורמים סביבתיים אותם אנו מניחים כקבועים לכל האצות כגון תאורה, וטמפרטורה.

שיטות וחומרים

תכנון מערכי המחקר מתואר באיור 3.



איור 3 – תרשים זרימה של ניסויי האצות

1. ניסוי ראשון – 16 אצות עם טיפול בודד וביקורת

1.1 מטרת הניסוי

לבחון את נכונות ההנחה לגבי השפעת ריכוז הנוטריינטים על תכולת הסוכרים באצות.

1.2 מערך הניסוי

נבחרו שני מכלי 40 ליטר צמודים, המכלים כוסו ברשת הצללה מפוליפרופילן שחוסמת 50% מהקרינה, בכל מכל הונחה מטריצה ובה 8 טלוסים (Thallus) של אצות Ulva.

המשתנה הבלתי תלוי בניסוי זה היה הוספת ריכוז נוטריינטים והמשתנה התלוי הוגדר כריכוז הסוכרים: גלוקוז, ראמנוז וקסילוז בכל אצה בסיום הניסוי. מכיוון שהמכלים צמודים ומקבלים מים ואויר מאותו מקור והצללה זהה אזי ההנחה שיתר הגורמים הסביבתיים נשמרים זהים לשני הטיפולים.

בניסוי זה מקור הטלוסים היה מאצה בודדת, החשיבות בפרמטר הנ"ל הינו ניטרול השפעות גנטיות (במידה וקיימות) של אצת המקור על התוצאות ובכך לחזק את היכולת לקשור בין תוצאות ריכוזי הסוכרים לטיפול שנבחר. נראה שבניסוי השני (לאחר קבלת התוצאות מניסוי זה) הפרמטר הנ"ל, שאינו מהותי למטרת הניסוי המרכזי, לא נשמר, בעיקר בעקבות בעיה טכנית למימושו. (נידון בהמשך).

נבחרה האצה שנראתה החזקה ביותר מבחינה ויזואלית – צבע ירוק חזק, אצה ללא קרעים או חורים ובנוסף שטח האצה הספיק ל 16 יחידות טלוס (שקלה מעל 80 גרם). האצה נחתכה ל 16 יחידות בגודל של כ 5 סמ"ר ובמשקל שנע בין 0.4-0.6 ג"ר – משקל לאחר ייבוש עדין בעזרת מייבש חסות. כל 8 פרטים הוכנסו למטריצה נפרדת כאשר הסלסלות מוספרו מראש על מנת שניתן יהיה לבצע מעקב אחר האצות המופרדות.

כפי שמוצג בטבלה 2 מכל אחד שימש כביקורת ובמכל זה לא הוסף דישון כל תקופת הניסוי ולמעשה הנוטריינטים הזמינים לאצות באותו מכל היו הנוטריינטים הקיימים במי הים שנשאבו כל העת והוכנסו אל הברכות. למכל השני הוספנו פעם בשבוע 90 מ"ל תמיסת דישון שהכילה 2 ליטר מים מזוקקים בתוספת 64 גרם NH_4Cl ו 16 גרם NaH_2PO_4 כפי שמופיע בטבלה 2.

מספר מכל	ריכוז תמיסה שהוסף (מ"ל)	NH4Cl (mM)	NaH2PO4 (mM)
1	0	0	0
2	90	1.34	0.15

טבלה 2 - חלוקת המכלים בניסוי הראשון (16 אצות), ריכוזים במכלים של 40 ליטר לפי כמות מוספת ב- mM .

2. ניסוי שני – ניסוי 100 אצות עם 5 טיפולים שונים

2.1 מטרת הניסוי

הוכחת התכנות לבניית מודל שיאפשר הערכת ריכוז סוכר מסוג גלוקוז,באמינות גבוהה, ובקצב גבוהה (High Throughput) בעזרת טכנולוגיה של ספקטרוסקופיה . שימוש בהחזר קרינה בתחום הנראה ובתחום ה- NIR (Near Infra Red).

2.2 מערך הניסוי

בניסוי 100 האצות, בשונה מניסוי 16 האצות הטלוסים נלקחו ממספר אצות שגודלו באותו דולב במכון (מבחינה טכנית לא ניתן ליצר 100 טלוסים מאצה בודדת) . האצות גדלות ומתרבות בדולב שנים רבות כך שניתן להעריך שהתאמתן לסביבת הניסוי גבוהה ומקור האצות באותו דולב הינו זהה. על אף שאין מדובר באותה אצת מקור.

גם בניסוי זה בדומה לניסוי הראשון נבחרו פרטים איכותיים ויזואלית (צבע, שלמות וגודל) ומתוכם נחתכו טלוסים בודדים בגודל של כ 5 סמ"ר ובמשקל שנע בין 0.4-0.6 ג"ר – משקל לאחר ייבוש עדין בעזרת מייבש חסות. כל 10 אצות הוכנסו למטריצת סלסלות פלסטיק ובסה"כ 10 מטריצות. כפי שמוצג בטבלה 3 בניסוי זה הוגדרו 5 טיפולים שונים של הוספת ריכוזי נוטריינטים משתנים, כאשר לכל טיפול עם 10 אצות היו שתי חזרות בשתי ברכות נפרדות שאינן צמודות. המכלים ממוקמים בשורה במרחק אחיד מהים ולכולם אותו מפנה. נפח המכל הוא 40 ליטר ומעליו יש כיסוי ע"י רשת הצללה מפוליפרופילן שחוסמת כ- 50% מהקרינה.

המכלים דושנו פעם בשבוע בעזרת תמיסה שהכילה 2 ליטר מים מזוקקים בתוספת 64 גרם NH_4Cl ו 16 גרם NaH2PO4 , כאשר לכל מכל הוספו ריכוזי תמיסה שונים כפי שמוצג בטבלה 4.

לחלק מהמכלים הוכנס רכיב ניטור (Hobo של חברת Onset) למעקב אחר עוצמת קרינת אור וטמפרטורה. כאשר הרכיב דגם את הפרמטרים כל שעה למשך כל תקופת הניסוי. בנוסף הותקן רכיב ניטור נוסף באוויר הפתוח מעל הברכות. מטרת הרכיבים הייתה לוודא שהתנאים הסביבתיים הינם בקירוב זהים לכל המכלים כפי שהנחנו.

מספר מכל	ריכוז תמיסה שהוסף (מ"ל)	NH4Cl(mM)	NaH2PO4(mM)
1	0	0	0
2	5	0.075	0.0083
3	15	0.224	0.025
4	30	0.45	0.05
5	90	1.34	0.15
6	0	0	0
7	5	0.075	0.0083
8	15	0.224	0.025
9	30	0.45	0.05
10	90	1.34	0.15

טבלה 4 - חלוקת המכלים בניסוי השני (100 אצות), ריכוזים במכלים של 40 ליטר לפי כמות מוספת ב- mM .

3. פרוצדורת טיפול באצות משותפות לשני הניסויים

בשני הניסויים המכלים דושנו אחת לשבוע כאשר לפני הדישון האצות הוצאו מהמכלים, כל מטריצה הוצאה בנפרד כדי לצמצם את זמן שהות האצות מחוץ למערכת הניסוי. לאחר הוצאתן, המכל נוקה מכל זיהום שנצפה: חול שנכנס עם המשאבה (בייחוד אם היו סופות במהלך השבוע) , זיהום אורגני כגון אצות אחרות (בעיקר חוטיות שנכנסות עם מי הים) או חלקים שנפרדו מהאצות של הניסוי ויצרו פסולת אורגנית.

בהמשך כל אצה יובשה בעדינות מהמים העיליים בעזרת מיבש חסות, נשקלה ונערך רישום עפ"י מספורה.

המטריצות הוחזרו לברכות בדיוק כפי שמוקמו קודם לכן והדישון הוסף לברכה.

בסיום 4 שבועות הניסוי האצות נאספו ונשקלו, כל אצה הוכנסה למבחנת פוליפרופילן 50 מ"ל ממוספרת שהכילה מי ים. כל המבחנות הוכנסו לקופסא ונשמרו באזור מוצל ומאוורר עד הגעתן למעבדה.

4. ציוד בניסויים

4.1 מכלי הגידול

מכלי הגידול החיצוניים הינם מכלי פיברגלס בנפח 40 ליטר, בתחתית המכל מקובע צינור מחורר דרכו מוזרם אוויר בצורה קבועה ע"י מדחס חיצוני, החדרת האוויר בצורה זו מייצרת סירקולציה של המים עם חומרי המזון והכנסת חמצן לתוך המים.

בנוסף, לכל מכל יש בחלקו העליון ברז מים המחובר למשאבת מי ים הממוקמת בקרבת החוף, המשאבה מספקת את המים לכל המכלים בצורה אחידה, הברז היה פתוח לזרימה איטית תמידית. מספר ס"מ מתחת לראש המכל יש יציאת ניקוז המוגנת ברשת, בדרך זו דואגים שהמים לא יעלו מעל

דופן המכל ובמקביל מתבצעת תחלופת מים איטית לכל אורך תקופת הגידול הנשלטת ע"י ספיקת המים הנכנסת למכל.
לכל מכל יש כיסוי של רשת הצללה 50% שמטרתה העיקרית למנוע קרינת יתר בייחוד בתקופת הקיץ כמו כן הרשת מונעת חדירת גורמים מהאוויר. השתמשנו ברשת לכל אורך הניסויים.

4.2 תמיסת דישון

ריכוז תמיסת הנוטריינטים הוכנה עפ"י פרוטוקול שמוגדר במכון ימים ואגמים תוך שימוש ב 16 ג"ר אבקת NaH_2PO_4 98% שמסופקת ע"י חברת חן שמואל כימיקלים בחיפה (CAS no 7558-80-7) וב 64 ג"ר אבקת NH_4Cl 99.5% המסופקת ע"י חברת אינטרטרייד בת"א (LOT No. GZC 2014). את האבקות הכנסנו לתוך 2 ליטר מים מזוקקים. התמיסה המוכנה נשמרה בבקבוק סגור במקום מוצל לתקופת הניסוי. את התמיסה הוספנו אחת לשבוע עפ"י הריכוזים שהוגדרו בניסוי בהתאם לפרוטוקול הגידול הנהוג במכון ימים ואגמים.

4.3 מייבש חסות

על מנת לשקול את האצות בצורה אחידה, לפני השקילה בוצע ייבוש של המים בצורה עדינה תוך שימוש במייבש חסות ביתי.

4.4 שקילה

האצות נשקלו בחדר סגור (למניעת רוח) בקרבת המכלים על מנת לקצר את זמן שהות האצות מחוץ למכל. תוך שימוש במשקל דיגיטלי של חברת mrc BBA-1200 1200/0.02 גרם, דיוק 0.01 גרם .

4.5 ניטור פרמטרים סביבתיים (Hobo)

על מנת לנטר את הפרמטרים הסביבתיים הקבועים טמפרטורה וקרינת שמש בניסוי 100 האצות, הוכנס לכל בריכה שניה רכיב מסוג HOBO pendant temperature / light logger של חברת Onset. הניטור מתבצע כל שעה ונרשם ללוג פנימי. בסיום הניסוי אוששנו בעזרת הנתונים שתנאי הסביבה בכל הבריכות היו דומים.

4.6 מדידה ספקטרופוטומטרית רטובה / יבשה

לצורך המדידה השתמשנו במערכת Analytical Spectral Devices (ASD) Full-Range (FR) spectrometer (Analytical Spectral Devices, Boulder, CO, USA).
טווח דגימות אורכי הגל של המערכת הוא 350-2500nm. הרכיב משתמש בשלושה גלאים הסורקים את הטווח הנראה וה NIR (VNIR) תוך שימוש ב- Si photodiode array ואת טווח ה - shortwave infrared (SWIR1 and SWIR2) תוך שימוש בשני InGaAs photodiodes נפרדים.

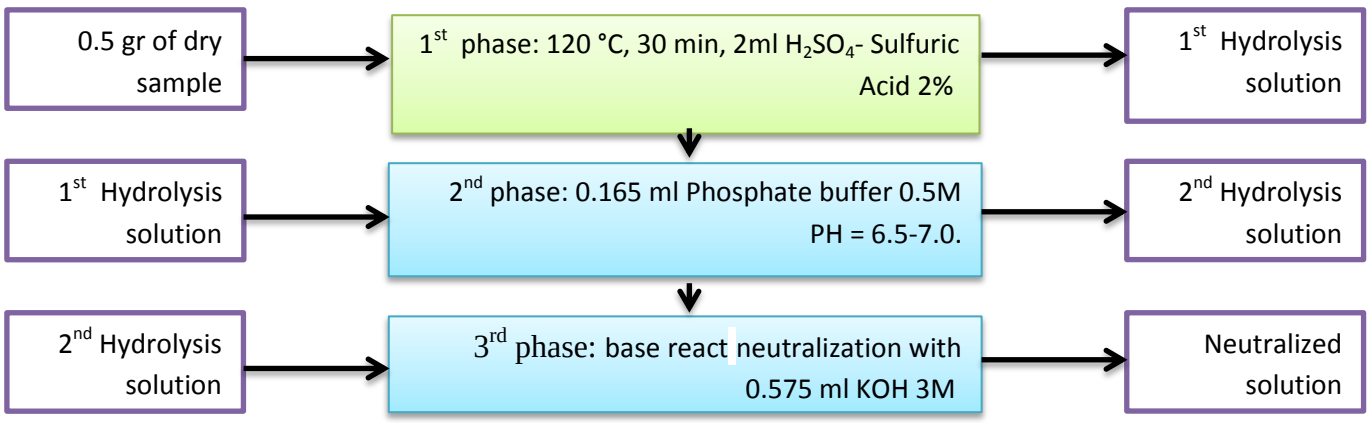
לפני תחילת המדידה התבצעה כיול של מערכת המדידה על משטח לבן (White Reference) לקבלת ערכי החזרה ספקטרלית, בכל 10 מדידות בצענו כיול מול המשטח הלבן.
כל הדוגמאות נמדדו במעבדה בחדר חשוך ובתנאים זהים עד כמה שניתן. המדידה בוצעה על רקע שחור על מנת למנוע מדידת מאפיינים ספקטראליים אשר אינם קשורים לחומר הנמדד. כמו כן המדידה התבצע במגע ישיר של יחידת המדידה ('potato') high intensity contact probe אל האצה. היחידה מבצעת בכל דגימה כ 40 קריאות כאשר מכל דוגמת אצה לקחנו שלוש דגימות באזורים שונים באצה. בין מדידה למדידה ייבשנו וניקינו את שטח המגע בעזרת נייר ייבוש על מנת לשמר אחידות מקסימלית בין הקריאות. יחידת המדידה "potato" יוצבה ע"ג חצובה שאפשרה העלאה והורדת היחידה מבלי לשנות את הזווית בין המדידות שהייתה זווית צפייה אנכית (nadir). בסיום תהליך מדידת כל האצות התקבל קובץ בינארי של הספקטרום המוחזר לכל דוגמא בכל אורכי הגל 350-2500. הקובץ יוצא לקובץ אקסאל להמשך ניתוח הנתונים.

4.7 ייבוש

לטובת ייבוש הדוגמאות לאחר המדידה הרטובה האצות הועברו לצלחות פטרי ממוספרות והוכנסו כשהן פתוחות לתנור של חברת Bluewave Model BW-FCF135, ב 60^{o} C למשך 12 שעות עד להגעה למשקל קבוע. מיד לאחר הייבוש האצות הועברו שוב למדידה בספקטרופוטומטר עפ"י הפרוטוקול המתואר בסעיף הקודם. בסיום המדידה הדוגמאות נכנסו למקפיא ב -20°C עד לתהליך הבא.

4.8 תהליך הידרוליזה

לטובת תהליך ההידרוליזה כל דוגמה יובשה עם חנקן נוזלי ונטחנה לאבקה בעזרת מכתש ועלי בצורה ידנית. נמדדה כמות של כ 0.5 ג"ר מכל דוגמת אצה והוכנסה למבחנה לטובת תהליך ההידרוליזה עפ"י הפרוטוקול המופיע באיור 4.



איור 4 - פרוטוקול הידרוליזה לדוגמאות האצות לפני כימות תכולת הסוכרים

לאחר ניטרול תמיסת ההידרוליזה ל PH 6-7 כל תמיסה סוננה במסנן 0.22 מיקרו. לתוך בקבוקון. כל הבקבוקונים מוספרו והועברו למקרר.

4.9 כימות בעזרת HPLC

על מנת לכמת את הסוכרים מתוך תמיסת ההידרוליזה השתמשנו במערכת HPLC Dionex ICS-5000 platform

נעשה שימוש בקולונה אנליטית מסוג AminoPack 10 והגנה ע"י קולונה מסוג Guard Column.

השתמשנו בגלאי אלקטרוכימי עם AgCl כאלקטרודת ייחוס. להפרדה השתמשנו במנגנון של שלושה ממסים (כפי שמתואר בטבלה 5).

טמפרטורת הקולונה נשמרה על 30^0C והדוגמאות הונחו בדוגם אוטומטי ששמר על טמפרטורה של 4^0C. קצב הזרמת הנוזלים לקולונה נשמר על 0.3 mL min-1.

Time (min)	A (water)%	B (20 mM NaOH)%	B (480 mM NaOH)%
-9	0	0	100
-7	0	100	0
0- inject	0	100	0
10	100	0	0

טבלה 5 – פרוטוקול שימוש במערכת ה – HPLC.

כפי שמוצג בטבלה 6, על מנת לאפשר את כימות הסוכרים בתנאים הנתונים, הוכנו סטנדרטים לשלושת הסוכרים אותם רצינו למדוד, גלוקוז, ראמנוז וקסילוז ובניסוי השני הוספנו בנוסף סטנדרט של ארבינוז, שהינו סוכר שלא קיים באצות, בכמות קבועה לכל דוגמה נמדדת. הארבינוז שימש אותנו כביקורת נוספת למדידות (לוודא שאין הטיה נקודתית במכשיר). את הסטנדרטים מהלנו לקבלת מספר נקודות מדידה בטווח הסוכרים הצפוי, כפי שמוצג כדוגמא בטבלה 7, על מנת שנוכל לבנות עקומת כיול למדידת הדוגמאות. לאחר הכנת הסטנדרטים הם נשמרו במקרר לאורך תקופת המדידות כדי למנוע התפתחות אורגניזמים. במהלך המדידות הסטנדרטים חודשו מספר פעמים וכל פעם הוכנה עקומת כיול מעודכנת.

	mg	mg/ml	ug/ml
glucose	15	0.283	**283.019**
rhamnose	9.5	0.179	**179.245**
xylose	3.1	0.058	**158.49**
arabynose	9.5	0.179	**179.245**

טבלה 6 – טבלת תמיסות סטנדרטים.

	st7	st6	st5	st4	st3	st2	st1	st0
Glucose (ug/ml)	141.51	70.75	35.38	17.69	8.84	4.42	2.21	**1.11**
rhamnose (ug/ml)	89.62	44.81	22.41	11.20	5.60	2.80	1.40	**0.70**
xylose (ug/ml)	29.25	14.62	7.31	3.66	1.83	0.91	0.46	**0.23**
Arab (ug/ml)	89.62	44.81	22.41	11.20	5.60	2.80	1.40	**0.70**

טבלה 7 – מיהול תמיסות הסטנדרט לריכוזים שונים על מנת לבנות עקומת כיול.

הכנת הדוגמאות למדידה התבצעה בתהליך הבא:

1. את תמיסת ההידרוליזה מהלנו פי 50 על מנת להיות בטווח המדידה האופטימלי של מכשיר ה – HPLC. כאשר נלקחה כמות של 30 מיקרו-ליטר מתמיסת ההידרוליזה של הדוגמא, הוספו 75 מיקרו-ליטר מתמיסת הארבינוז לביקורת והנפח הושלם ל 1.5 מ"ל ע"י הוספת 1.395 של DDW water.
2. כל התמיסות עורבבו היטב לפני לקיחת הנפח ובסיום הכנת תמיסת המדידה.
3. כל הנוזלים הועברו דרך מסננת של 0.22 מיקרו-מטר והוכנסו לתוך מבחנת ה HPLC.
4. המבחנות הוכנסו לדוגם האוטומטי ששמר על 4^0C בכל מחזור המדידה.

על מנת לנטרל את העיוותים היכולים לנבוע מהמכשיר עצמו, פרוטוקול המדידה היה במחזורים של כ-20 שעות כאשר בין מחזור למחזור הקולונה והאלקטורדה נוקו בעזרת הזרמת בסיס NaOH ושטיפה במים. כל מחזור החל בהרצת סטנדרטים לכיול לאחר מכן הוזרמו 10 מדידות של דוגמאות ואז נמדדו שוב סטנדרטים וכך בצורה סדרתית עד סיום מדידת הדוגמאות כאשר כל מחזור הסתיים במדידת סטנדרטים.

בסיום המחזור נאספו הנתונים שהתקבלו כאשר כל קבוצת דוגמאות חושבה עפ"י גרף הכיול של מדידות הסטנדרטים הצמודים אליה ובנוסף וידאנו שאין סחיפה בתוצאות מדידת הארבינוז (הבקרה).

לכל דוגמא בצענו שלוש חזרות מדידה בזמנים שונים כאשר התוצאה הסופית של ריכוז כל סוכר חושב מתוך עקומת הכיול של הסטנדרטים שנמדדו באותו מחזור ובוצע מיצוע לריכוזים שהתקבלו בשלוש המדידות.

4.10 בניית מודל חיזוי - מבוסס רגרסיה רבת משתנים

הכיול של הנתונים הוא למעשה אחד הנושאים החשובים ביותר בתחום מציאת הקשר בין הספקטרום לתכונות הכימיות. בבואנו לבחון את הקשר של המשתנה הספקטרלי X כפונקציה של המשתנה הכימי Y אנחנו משתמשים במידול מבוסס רגרסיה לנארית. המודל הנ"ל שימושי כאשר יש צורך לאשש תאוריה התנהגותית מסוימת בין שני המשתנים או לחילופין על מנת לבנות פונקציה שתאפשר חיזוי עתידי של התנהגות המשתנים תוך התבססות על מספר דגימות מצומצם.
הבחירה במודל לינארי נסמכת על תוצאות שהתקבלו במחקרים אחרים בשימוש NIRS שנעשו על צמחים ומכיוון שהשימוש במודל לינארי הינו פשוט יותר.[39]
במידה והמודל הלינארי לא מביא תוצאות איכותיות מספיק באופן עקבי אזי ייתכן שמתקיימת התנהגות לא לינארית של אחד או יותר מהמשתנים. במקרה זה יש לבחון בנוסף רגרסיות לא לינאריות ולהשוות בין התוצאות באיכותן ובעקביות שלהן.
על מנת לבצע פעילות זו בצורה איכותית נהוג לבחור כמות מסוימת של זוגות נתונים המייצגת את רוב המדידות (במקרה שלנו 80%) ומכונה בסיס הנתונים או קבוצת כיול (calibration set) ובעזרתה לבנות את המודל, כאשר שארית המדידות עליהן לא ביססו את המודל (בניסוי הנוכחי 20%) אותה אנו מכנים קבוצת הביקורת או קבוצת הניבוי (test set) אנו מיעדים לבחינת איכות המודל שהתקבל. בהתאם לאיכות תוצאות המודל שמתקבל ולרמת האיכות הנדרשת / צפויה ניתן לחזור על התהליך מספר פעמים, תוך שינוי בתהליך המידול, לדוגמא ע"י פעולות כגון הוצאת דוגמאות קיצוניות מהמודל או בחירת אותם אזורים בספקטרום להן יש השפעה מהותית יותר על איכות המודל, תוך התעלמות מהאזורים הפחות משפיעים ואז בניה חוזרת של המודל. פעולות אלו יחזרו על עצמם עד קבלת המודל האיכותי ביותר.
יש להתחשב בשלושה דגשים חשובים בבחירת קבוצת הכיול:

1. על הקבוצה להיות כזו המייצגת היטב את האוכלוסייה עליה יבוצעו את המדידות העתידיות.
2. על הקבוצה לייצג את מירב הוריאציות של התנאים השונים היכולים להשפיע על המדידות בתנאי מדידה דומים בעתיד.
3. על הקבוצה לכלול עד כמה שניתן דוגמאות המייצגות את טווח הספקטרום וטווח הפרמטר הכימי בצורה הרחבה ביותר האפשרית.

בנוסף רצוי שהפיזור של בסיס הנתונים יהיה דומה לפיזור בקבוצת הניבוי.

האנליזה הכמותית בעזרת השיטה הספקטרוסקופית של ה NIR מבוסס על חוק בר-למברט -Beer Lambert Law, החוק מתאר את הקשר הלינארי בין הריכוז המולרי של חומר מומס בנוזל לבין הבליעה שלו בכל אורך גל. אך בשיטת - NIRS כפי שמשתמשים בה כיום, כאשר ממדלים דוגמאות בעלת מורכבות כימית גבוהה בדומה לדוגמאות של ההידרוליזה מהאצות, המכילות מרכיבים, קשרים ומבנים כימיים רבים, אזי המרחק מהחוק הקלאסי בו מדובר בתמיסה עם מרכיב בודד הינו רב, אף על פי כן הרעיון שבו לכל מרכיב אינדיבידואלי יש השפעה על הספקטרום עדיין מתקיים, אך מציאת המודל הנה מורכבת יותר ולכן יש צורך בתהליך הכיול כפי שתואר קודם לכן.

כדי להתמודד עם כיול רב משתנים נהוג להשתמש במודל של רגרסיה רבת משתנים כדוגמת ה PLS - Partial Least Squares Regression, בשימוש במודל מזהים קשרים בנקודות מסוימות בין הספקטרום למרכיב הכימי ובונים בלוקים של מטריצות תוך מקסום השונות המשותפת (covariance – מדד לקשר בין משתנים מקריים) ביניהם, כאשר לכל מטריצה יש ציון ומשקל המשקפים את חוזק הקשר בין שני הפרמטרים. בסיום התהליך נבנה מודל המתאר את הקשר האיכותי ביותר שנמצא בין אותם משתנים ובעזרתו ניתן לנבא את ההתנהגות העתידית של המשתנים בצורה טובה יותר, כל זאת בהנחה שיילקחו מאותה אוכלוסייה בתנאים דומים.

במקרה שלנו על מנת לבנות את קבוצת הכיול וקבוצת הניבוי בהתאם לשלושת החוקים שהוצגו למעלה בצענו את הפעולות הבאות: בסיום תהליכי המדידה כל הנתונים שכללו את הספקטרום ואת ריכוזי הסוכר הועברו לקובץ אקסאל מאוחד, הספקטרום הרטוב בנפרד מהספקטרום היבש.

שורטט גרף התפלגות נורמלית לכל הדוגמאות עפ"י ריכוזי הסוכרים שהתקבלו בפועל. בהמשך הדוגמאות חולקו ל – 6 קבוצות בהתאם לעקומה הנורמלית של ריכוזי הסוכרים בפועל כך שיהיה ייצוג לכל טווח הריכוזים.

מתוך 6 קבוצות הסוכר שהתקבלו נבנו 5 קומבינציות של קבוצות לטובת בניית המודל בצורה הבאה: כל קבוצה חולקה ל- 80% מהדוגמאות שיהוו את בסיס הנתונים לבניית המודל ויתרת ה- 20% של אותה קבוצה נשמרו כקבוצת הניבוי על המודל שיתקבל.

כל אחת משתי תתי הקבוצות (80% ו 20%) הכילו דוגמאות מכל אחת מקבוצות הריכוזים בהתאם לאחוז היחסי שלהם כפי שהתקבל בהתפלגות הנורמלית.

4.11 הטיפול בנתונים לטובת בניית המודל

לפני הפעלת המודל על הנתונים נהוג לבצע טיפול מקדים לספקטרום, הרעיון בטיפול מקדים לספקטרום הינו הפחתת הפרעות חיצוניות העלולות לפגוע באיכות המודל שנקבל. הפרעות בספקטרום יכולות לנבוע ממגוון רחב של גורמים, בין היתר: טעויות בהכנת הדוגמה, החזר לא מדויק הנובע מקריאה שגויה של הדוגמה, אינטראקציה עם קשרי מולקולות אשר לא מעניינים אותנו, החזר אור לא איכותי ממכשיר המדידה, עיוותים ספקטרלים הנובעים מהמכשיר עצמו או הגלאים, רעשים סביבתיים בזמן המדידה. הפעולות שבוצעו:

1. כל ספקטרום עבר תהליך של יישור בעזרת תוכנת Envi 4.4, היישור מתבצע על מנת להחליק את נקודות המפגש בין שלושת הגלאים של הספקטרופוטומטר ולמנוע עיוותים בנקודות החיבור.
2. הספקטרום המיושר הועבר לתוכנת ה Unscrambler 9.7 להמשך טיפול ולבניית המודל.
3. על מנת להקטין את השפעת עוצמת ההחזר של הספקטרופוטומטר ולחזק את המאפיינים הקשורים למבנים המולקולריים בספקטרום בוצעה נגזרת ראשונה על כל הספקטרום. שימוש בנגזרת על ספקטרום NIR הינה אחת השיטות המקובלות כטיפול מקדים (לעיתים מבצעים גם נגזרת שניה) - בהפעלת הנגזרת מתקיים נטרול של גובה המשרעת (אמפליטודה) והדגשה של התכונות המצביעות על קשרי המולקולות כמו גם הקטנת אפקט פיזור האור המוחזר (scatter effect). הנגזרת הראשונה למעשה מחשבת את השיפועים של גרף הספקטרום בין כל שתי נקודות. אחת מהבעיות שיכולות להיווצר בעקבות גזירת הספקטרום הינה הדגשת רעשים הבאים לידי ביטוי בשיפוע. על מנת להפחית את אותם רעשים נעשה שימוש בשיטה של Savitzky and Golay אשר מבצעת את הנגזרת בהסתמך על ניתוח מקטע באזור ספקטרום מסוים ולא בצורה פשטנית כשיפוע בין שתי נקודות סמוכות.
4. על כל אחד מחמשת בסיסי הנתונים הופעל מודל רגרסיה לינארי:

Regression (Partial Least Squares) **PLS**, לקבלת המודל הראשוני כפי שהוסבר למעלה. מטרת המודל היא למצוא את הקשר בין ריכוזי הסוכר להחזר האמפירי עפ"י הנוסחה הבאה:

$$Y = A + A_1X_1 + A_2X_2 + \ldots + A_nX_n \quad (1)$$

כאשר Y מייצג את ריכוז הסוכר הממודל שהתקבל מה – HPLC, A הוא המקדם האמפירי ו X_{1-n} מייצג את אורך הגל

5. מתוך המודל שהתקבל נבחרו בעזרת התוכנה אותם אורכי גל בספקטרום אשר היו בעלי ההשפעה החזקה ביותר ביחס לריכוז הסוכר והמודל הורץ שוב תוך צמצום הספקטרום הרלוונטי בהתאם. תהליך זה חזר על עצמו בין 3-1 פעמים עד לקבלת הפרמטרים האיכותיים ביותר לגבי אותו מודל.
6. במקביל הופעל על המודל אימות צולב - Cross Validation מסוג Leave one Out. בדרך זו קיבלנו שתי עקומות אשר אחת מתארת את המודל עם הפרמטרים שלו והשנייה מתבססת על האימות ולמעשה חוזה את התוצאות שיתקבלו בעתיד בהרצת המודל על דוגמאות אחרות מתוך האוכלוסייה הנבחנת.
7. הפרמטרים שאימצנו להערכת דיוק המודל הינם:

א. **Slope** – שיפוע הקו שיוצרות הנקודות מייצג את חוזק הקורלציה בין הגלוקוז בפועל לגלוקוז במודל כאשר מופיע בכחול ואת הגלוקוז בפועל לחיזוי עתידי של דוגמאות מאותה אוכלוסייה כאשר מופיע באדום.

ב. **R^2** – הפרמטר של R בריבוע במודל רגרסיה הינו מדד לאיכות המודל, מחושב כריבוע מקדמי המתאם בין הסוכר בפועל לחזוי. הוא נע בין 0-1 וככל שהוא קרוב ל 1 כך איכות המודל גבוהה יותר.

ג. **RMSE (Root Mean Square Error)** – שורש השגיאה הממוצעת של תוצאות המודל. מייצג את השוני בין התוצאות שהתקבלו במודל לבין התוצאות בפועל. מוצג באותן יחידות של האלמנט הנבחן – ריכוז הגלוקוז באצה. ככל שהפרמטר קטן יותר כך השגיאה קטנה יותר והתוצאה יותר מדויקת.

8. לאחר קבלת המודל האופטימלי בכל אחת מחמש הקבוצות, בוצע תהליך ניבוי (Prediction) לכל מודל שהתקבל, תוך שימוש בקבוצת הניבוי של 20 הדוגמאות שלא השתתפו במודל. לגבי תוצאות החיזוי נבחנו הפרמטרים בדומה לאלו של המודל.
9. המודל עם קבוצת החיזוי שנתנו את הניבוי החזק ביותר לגבי הסוכר שנבחן הוגדר כמודל החיזוי האופטימלי.

תוצאות

1. ניסוי ראשון 16 אצות

מטרת הניסוי

לבחון את נכונות ההנחה לגבי השפעת ריכוז הנוטריינטים על תכולת הסוכרים באצות.

1.1 ניתוח תוצאות משקל האצות בגרם

טבלה 8 וטבלה 9 מציגות את תוצאות ניטור משקלי האצות שנמדדו אחת לשבוע, לאחר שיובשו בעזרת מייבש החסות.

באיור 5 מוצגות תוצאות המשקלים הממוצעים בגרמים לכל אחד מהטיפולים.

בטבלה 10 וטבלה 11 בהמשך מוצגים ההפרשים במשקלים לכל אחד משלושת השבועות ולכל טיפול. איור 6 מציג את ממוצע קצב הגידול השבועי לכל אחד מהטיפולים.

ניתן לראות בבירור את ההפרש בגידול בין האצות בטיפול ללא תוספת נוטריינטים בהם קצב הגידול היה איטי מאשר של האצות בטיפול עם תוספת הנוטריינטים. נראה שקצב הגידול הממוצע עלה בכל שבוע ביחס לשבוע הקודם, הקפיצה המשמעותית ביותר הייתה בשבוע השלישי.

בנוסף ניתן לראות בהסתכלות פרטנית שקצב הגידול והגידול האבסולוטי אינם עקביים בכל האצות וישנן כאלו שגדלו פחות מהאחרות ואף ישנן אצות בשני הטיפולים שהציגו קיטון במשקל בין שבוע אחד למשנהו – אצות 4,6,7,15,16.

אף על פי כן הגרף באיור 6 מציג בבירור שההפרש הממוצע בקצב הגידול בין שני הטיפולים היה מובהק לאורך כל תקופת הניסוי והאצות בטיפול 90 גדלו בצורה משמעותית יותר מהאצות בטיפול 0.

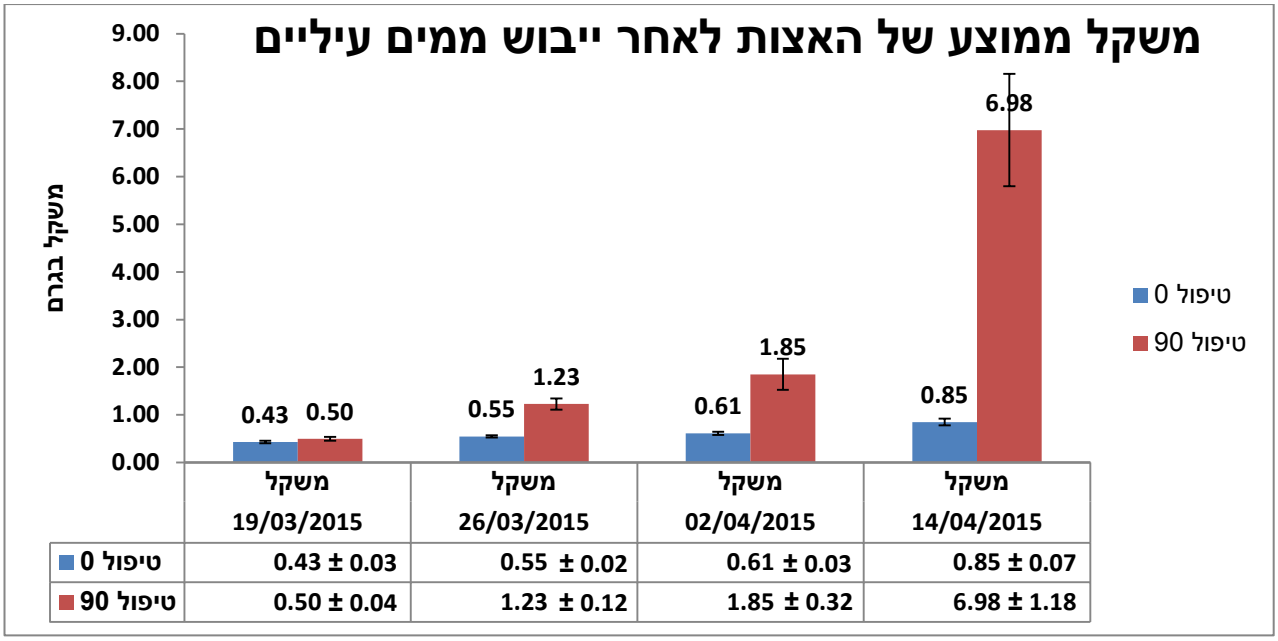
בשבוע הראשון בטיפול ללא הדישון המשקל הממוצע עלה פי 1.3 ואילו בטיפול עם הדישון העלייה במשקל הממוצע הייתה פי 2.46, בשבוע השני העלייה הממוצעת בהתאמה הייתה פי 1.1 ו 1.5 ובשבוע השלישי התקבלה העלייה המשמעותית ביותר 1.4 ו 3.77 בטיפול עם הדישון.

תאריך שקילה	אצה 1	אצה 2	אצה 3	אצה 4	אצה 5	אצה 6	אצה 7	אצה 8
19/03/2015	0.52	0.46	0.3	0.42	0.34	0.44	0.54	0.42
26/03/2015	0.52	0.5	0.42	0.56	0.58	0.64	0.6	0.56
02/04/2015	0.56	0.52	0.58	0.53	0.7	0.72	0.53	0.74
14/04/2015	0.8	0.7	0.9	0.7	1.3	0.7	0.9	0.8

טבלה 8 - ריכוז מדידת משקלי אצות ללא תוספת נוטריינטים לאורך תקופת הגידול.

תאריך שקילה	אצה 9	אצה 10	אצה 11	אצה 12	אצה 13	אצה 14	אצה 15	אצה 16
19/03/2015	0.54	0.62	0.58	0.52	0.4	0.44	0.58	0.3
26/03/2015	1.36	1.3	1.28	1.38	1.52	0.86	1.52	0.6
02/04/2015	1.42	2.4	3.3	2.57	1.98	1.7	1.02	0.42
14/04/2015	6.6	7.1	13	9.4	7.6	5.6	4.9	1.6

טבלה 9 - ריכוז מדידת משקלי אצות עם תוספת נוטריינטים לאורך תקופת הגידול.



איור 5 - תצוגת משקלי האצות לאורך תקופת הגידול – ההפרש בממוצעי הגידול השבועי בכל אחד מהטיפולים יצא מובהק.

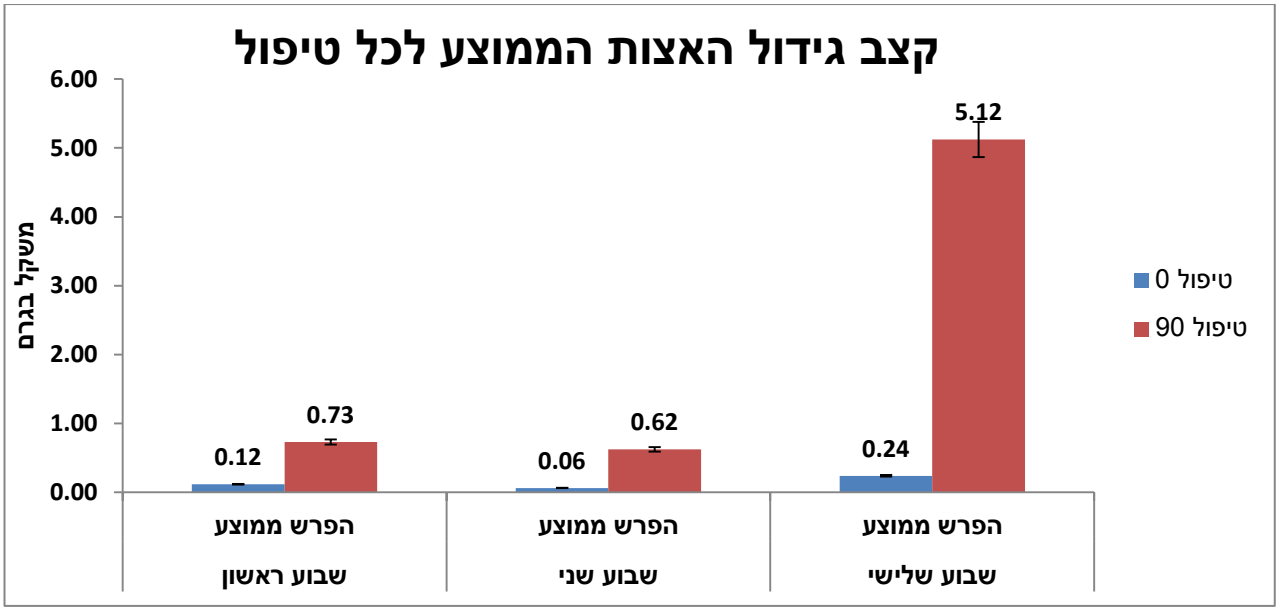
±SE_ N=16 ניתן לראות בצורה מובהקת שהאוכלוסייה שקיבלה טיפול נוטריינטים גדלה משמעותית יותר מזו ללא התוספת.

שבוע	אצה 1	אצה 2	אצה 3	אצה 4	אצה 5	אצה 6	אצה 7	אצה 8
ראשון	0	0.04	0.12	0.14	0.24	0.2	0.06	0.14
שני	0.04	0.02	0.16	-0.03	0.12	0.08	-0.07	0.18
שלישי	0.24	0.18	0.32	0.17	0.6	-0.02	0.37	0.06

טבלה 10 - טבלת הפרשי משקלים (גרם) שבועיים, אצות ללא תוספת נוטריינטים.

שבוע	אצה 9	אצה 10	אצה 11	אצה 12	אצה 13	אצה 14	אצה 15	אצה 16
ראשון	0.82	0.68	0.7	0.86	1.12	0.42	0.94	0.3
שני	0.2	1.1	2.02	1.43	0.46	0.84	-0.5	-0.18
שלישי	5.18	4.8	9.7	6.83	5.92	3.9	3.88	1.28

טבלה 11 - טבלת הפרשי משקלים (גרם) שבועיים, אצות עם תוספת נוטריינטים.



איור 6 - קצב גידול האצות בטיפולים השונים N=16 ±SE בגרף מציג במובהקות שקצב גידול האצות בקבוצה עם התוספת היה גבוהה משמעותית.

.

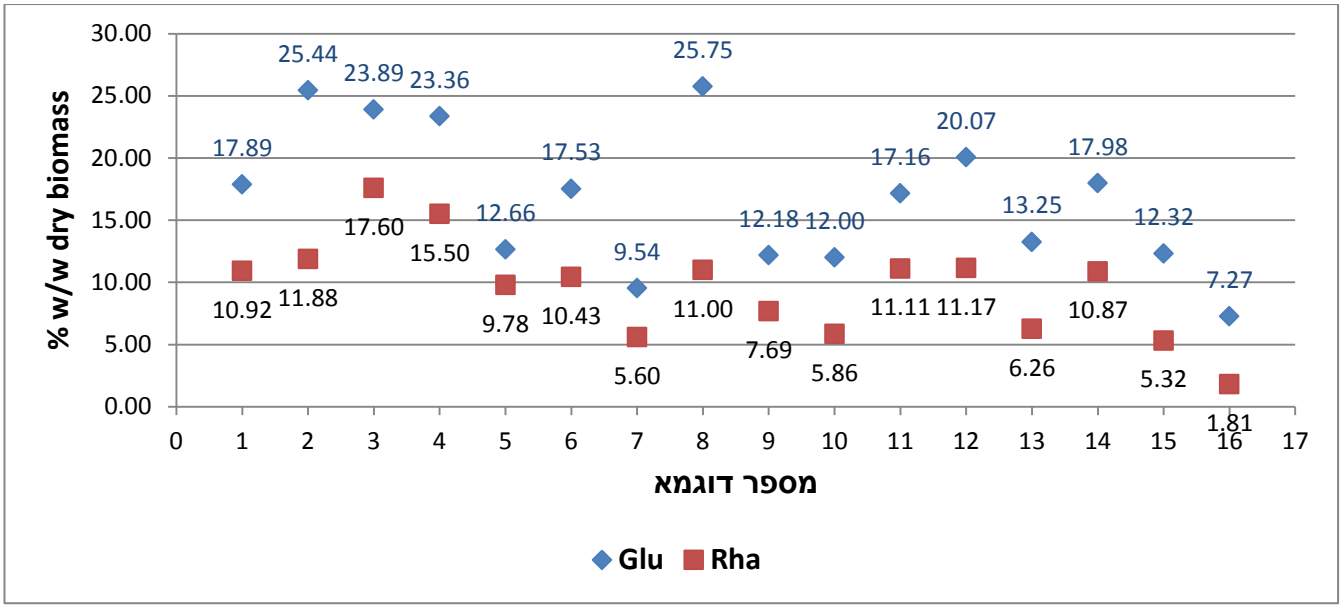
1.2 ריכוז סוכרים - כפי שנמדד ב HPLC

ריכוז הסוכרים נמדד בכל האצות בעזרת מכשיר ה – HPLC. המדידות התבצעו לאחר שהדוגמאות יובשו בתנור למשך 12 שעות ב 60 מעלות צלזיוס ולאחר מכן נטחנו ועברו תהליך הידרוליזה עם חומצה, חימום באוטוקלב למשך 30 דק' ב 120 מעלות וסתירה בבסיס. (כל התהליכים מפורטים בפרק שיטות וחומרים).

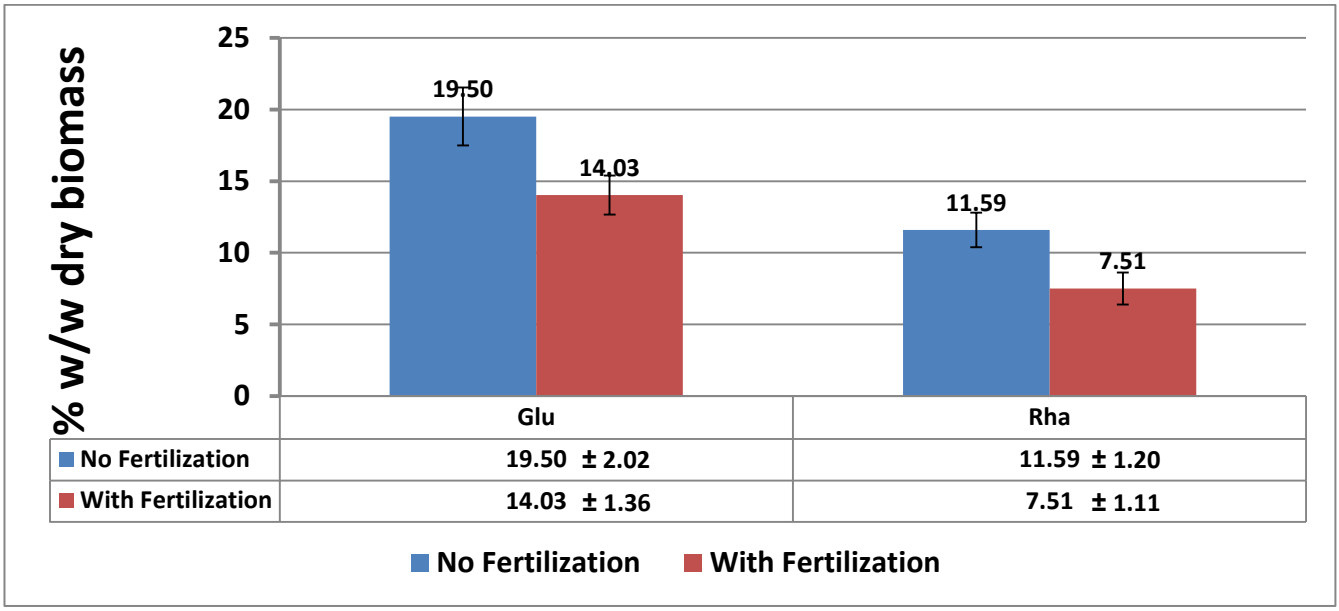
באיור 7 מוצגים ריכוזי הסוכרים גלוקוז וראמנוז שהתקבלו בכל אחת מהאצות, הריכוזים מופיעים כאחוז משקלי בכל מ"ג אצה. ניתן לראות בגרף שריכוז החד-סוכר המשמעותי ביותר שקיבלנו באצת Ulva הינו הגלוקוז (נמדד גם ריכוז הקסילוז שאינו מופיע כאן וריכוזו היה נמוך בסדר גודל מהגלוקוז). טווח ריכוזי הגלוקוז שהתקבלו (אחוז משקלי) נע בין 7.3% ל 25.8%. כאשר אם נבחן את הממוצע בין הריכוזים שהתקבלו בטיפול ללא תוספת נוטריינטים לטיפול עם תוספת הנוטריינטים, נראה כפי שמופיע באיור 8, שהריכוז הממוצע (אחוז משקלי) ב 8 הטיפולים ללא תוספת נוטריינטים הינו 19.5% ואילו האחוז הממוצע ב 8 הטיפולים עם התוספת הינו 14.03%, ההבדל שהתקבל הינו מובהק.

1.3 מסקנות מתוך תוצאות הניסוי

התוצאות שהתקבלו לגבי ריכוז הסוכרים של הדוגמאות מאששות את ההנחה שטיפולים השונים בריכוזי הנוטריינטים בהן מזינים את האצות משפיעים על ריכוז הסוכרים באצות.



איור 7 - ריכוזי הסוכרים גלוקוז וראמנוז בכל אצה.



	Glu	Rha
No Fertilization	19.50 ± 2.02	11.59 ± 1.20
With Fertilization	14.03 ± 1.36	7.51 ± 1.11

איור 8 - ריכוז הסוכרים גלוקוז וראמנוז הממוצע לפי טיפול. N=16 ±SE בגרף נראה הפרש מובהק בריכוז הסוכרים באצה ללא טיפול שהינו ריכוז גבוהה יותר בהשוואה לאצות שקיבלו טיפול נוטריינטים.

2. <u>תוצאות ניסוי שני: 100 אצות</u>

<u>מטרת הניסוי:</u> הוכחת התכנות לבניית מודל שיאפשר הערכת ריכוז סוכר מסוג גלוקוז בקצב גבוהה (High Throughput) בעזרת טכנולוגיה של ספקטרוסקופיה - תוך שימוש בהחזר קרינה בתחום הנראה VIS ובתחום ה- NIR (Near Infra Red).

2.1 קצב הגידול – מערך הניסוי השני

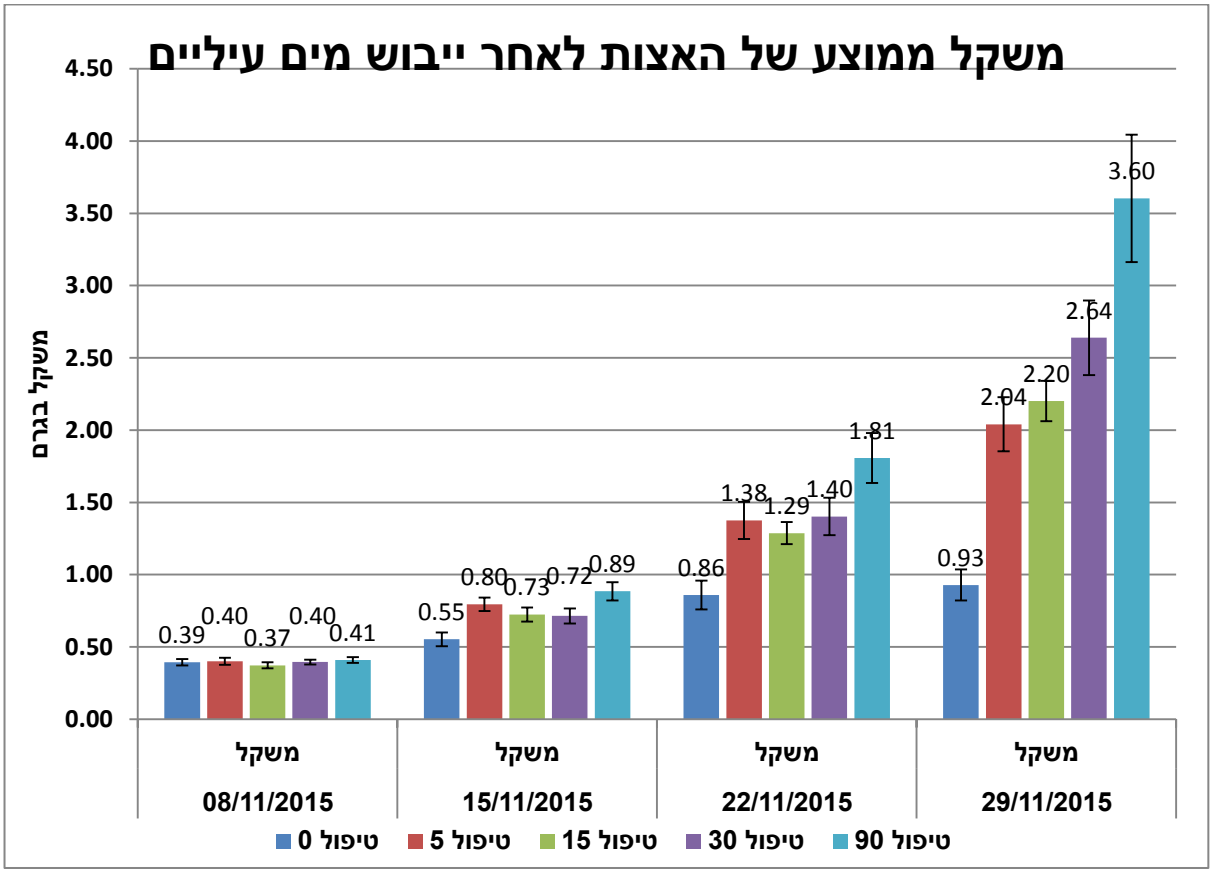
בטבלה 12 ובאיור 9 מוצגים ממוצעי המשקלים בגרמים כפי שנמדדו אחת לשבוע החל מזמן 0 (הכנסת הטלוסים של האצות לברכות), הממוצע חושב לפי טיפול כאשר לכל טיפול היו שתי ברכות נפרדות שכל ברכה הכילה 10 טלוסים של אצות. כך שהממוצע המוצג הינו של 20 האצות מאותו טיפול. נראה שבתחילת הניסוי הממוצע המשקלי של הטלוסים היה סביב ה 0.37 גרם. ניתן לראות שהמשקל הממוצע המבטא את תוספת החומר הביולוגי בכל אצה, גדל בכל שבוע בכל הטיפולים.

ניתן לראות שבמהלך השבוע הראשון והשני המשקל הממוצע של האצות בטיפולים האמצעיים (5,15,30) היה דומה כאשר ההפרשים שנראים אינם מובהקים. לעומתם בשני הטיפולים הקיצוניים 0 ו 90 נראה הבדל מובהק כבר מהשבוע הראשון בגידול במשקל הממוצע כאשר בטיפול ה 90 מ"ל יש גידול משמעותי יותר במסה האורגנית בהשוואה לכל יתר הטיפולים ובטיפול ללא הוספת נוטריינטים נראה הגידול הקטן ביותר.

בטבלה 13 ובאיור 10 מוצגים קצבי הגידול הממוצעים בגרמים לגבי כל אחד מהטיפולים, גם במקרה זה נראה בטיפולים האמצעיים (5,15,30) שקצב הגידול בשבוע הראשון דומה בשלושתם וההפרשים אינם מובהקים, ואילו בטיפולים 0 ו 90 נראים הבדלים מובהקים כאשר בראשון קצב הגידול איטי יותר ואילו בשני קצב הגידול גבוהה יותר בצורה מובהקת מכל יתר הטיפולים. בבחינת קצב הגידול בשבוע השני רואים תחילתו של מדרג בקצבי הגידול כאשר טיפולים 5 ו 15 עדיין דומים בקצב הגידול ואילו בטיפול 0 הקצב עדיין נשמר להיות הנמוך ביותר מבין החמישה ומהצד השני טיפול 30 גבוהה יותר באופן מובהק מהקצבים של 5 ו 15 וטיפול 90 מראה את קצב הגידול הגבוהה ביותר. בשבוע השלישי נוצר כבר מדרג משמעותי יותר בקצב המראה גידול מובהק בין כל הטיפולים כאשר בטיפול 0 נראה הקצב הממוצע הנמוך ביותר באותו שבוע 0.07 ג"ר לאחריו טיפול ה- 5 מ"ל עם 0.67 ג"ר, טיפול ה 15 מ"ל עם קצב גידול ממוצע של 0.92 ג"ר, טיפול ה 30 עם 1.24 ג"ר והגבוהה ביותר טיפול ה 90 עם קצב ממוצע של 1.8 ג"ר. בנוסף ניתן לראות שבטיפול ה- 0 בשבוע השלישי קצב הגידול ירד לעומת הקצב שנמדד בשבוע השני, דבר היכל להצביע על השפעת חוסר הדישון שגורם להאטה בגידול.

תאריך שקילה	טיפול 0		טיפול 5		טיפול 15		טיפול 30		טיפול 90	
08/11/2015	±0.02	0.39	±0.02	0.40	±0.02	0.37	±0.02	0.40	±0.02	0.41
15/11/2015	±0.05	0.55	±0.05	0.80	±0.05	0.73	±0.05	0.72	±0.06	0.89
22/11/2015	±0.10	0.86	±0.13	1.38	±0.08	1.29	±0.13	1.40	±0.17	1.81
29/11/2015	±0.11	0.93	±0.19	2.04	±0.14	2.20	±0.26	2.64	±0.44	3.60

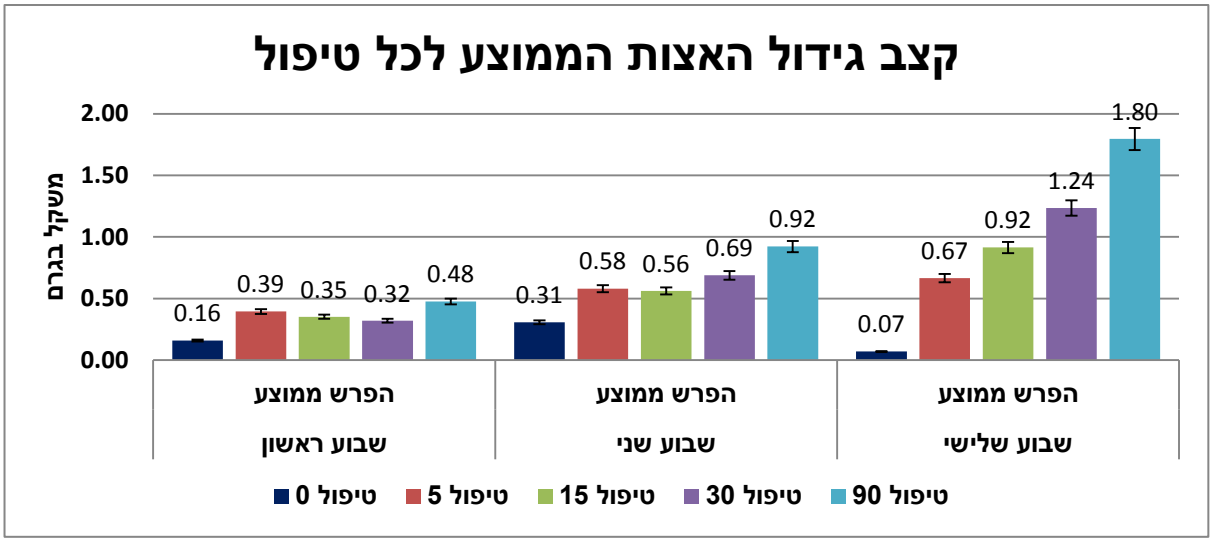
טבלה 12 – טבלת ממוצע משקלי אצות בגרם לפי טיפול. ±SE N=100 . המספרים של כל טיפול מייצגים את כמות התמיסה במ"ל שהוספה אחת לשבוע בכל טיפול (ריכוזי הנוטריינטים לכל טיפול מוצגים בשיטות וחומרים טבלה 4). כאשר טיפול 0 הינו גידול ללא תוספת נוטריינטים.



איור 9 - ממוצע משקלי אצות שבועי לפי טיפול ±SE N=100. הגרף מציג את הפרשי המשקלים במסה הביולוגית של האצות בטיפולים השונים, בטיפולים הקיצוניים 0 ו 90 ניתן לראות כבר בשבועות הראשונים את ההבדל המובהק. בשבוע האחרון ההבדלים נראים במדרג בין כל הטיפולים. ככל שניתנו יותר נוטריינטים כך המסה הביולוגית גדלה.

שבוע	טיפול 0	טיפול 5	טיפול 15	טיפול 30	טיפול 90
ראשון	0.16	0.39	0.35	0.32	0.48
שני	0.31	0.58	0.56	0.69	0.92
שלישי	0.07	0.67	0.92	1.24	1.80

טבלה 13 – ממוצע הפרשי משקלי האצות בגרם כפי שנמדד אחת לשבוע במשך שלושת שבועות הגידול.



איור 10 – ממוצע הפרשי משקלי האצות בגרם לכל טיפול כפי שנמדד אחת לשבוע במשך שלושת שבועות הגידול N=100 ±SE בגרף זה נראה קצב הגידול של האצות המייצר מדרג עפ"י כמות הנוטריינטים שהוספה. יוצא מן הכלל הינו טיפול 0 בו יש ירידה בקצב בשבוע השלישי הנובעת כנראה ממצוקה בחומרי הזנה.

הבדלים ספקטראליים

כל האצות עברו סריקה ספקטרלית בתחום הנראה וה NIR, הספקטרום שהתקבל יושר בנקודות החיבור בין שלושת החיישנים לקבלת גרף מאוחד נקי.

איור 11 מציג את הספקטרום שהתקבל מהאצות בהגיען למעבדה לפני הייבוש ואיור 12 מציג את הספקטרום שהתקבל לאחר תהליך הייבוש.

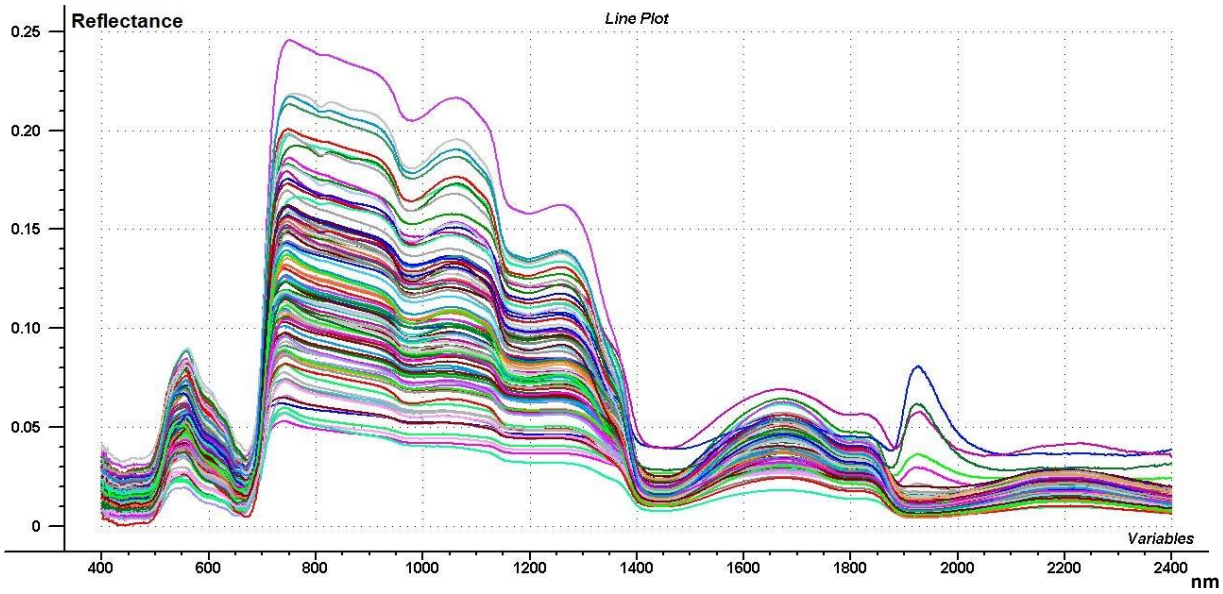
ניתן לראות את הדמיון הרב בין הספקטרום שהתקבל לבין ספקטרום ההחזרה הטיפוסי של גידולי שדה בתחום שלושת התדרים, כפי שמוצג במבוא בסעיף 2.4 (ניתוח תכולה כימית של אצות בעזרת ספקטרוסקופיה).

בהשוואה בין ספקטרום ההחזר הרטוב ליבש, ניתן לראות בברור כיצד המים, אשר להם בליעה בטווחי הספקטרום הנראה וה NIR , יוצרים הנחתה של עוצמת ההחזר לגבי כל הספקטרום.

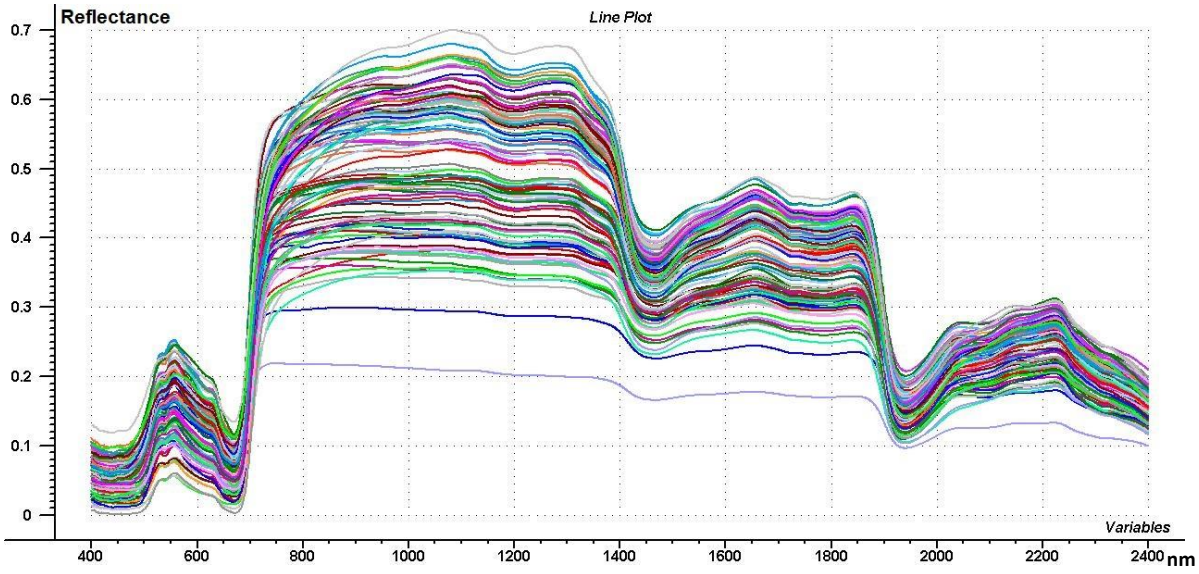
ההנחתה המשמעותית ביותר היא באותם אזורים בספקטרום בהם מולקולות המים, הקשר O-H, בולעות באופן משמעותי יותר קרינה, 760 nm, 970 nm, 1200 nm, 1450 nm, 1950 nm [37], מכיוון שגם למולקולות הרב-סוכרים באצה יש בליעה באותם אזורים אזי ככל שהאצה רטובה יותר כך המיסוך של המים גדול יותר ומקשה על מציאת מודל איכותי כפי שנראה בהמשך.

כמו כן ייתכנו הבדלים בין עוצמת ההחזר הנובעים מתנאי סביבה של המדידה עצמה ומיקום המדידה בשטח פני האצה המשפיע לדוגמא על עובי האצה בנקודות שונות ובכך משפיע על החזר. לכן המדידות בוצעו בתנאים דומים עד כמה שאפשר והנתונים מייצגים ממוצע שהתבצע על שתי מדידות נפרדות.

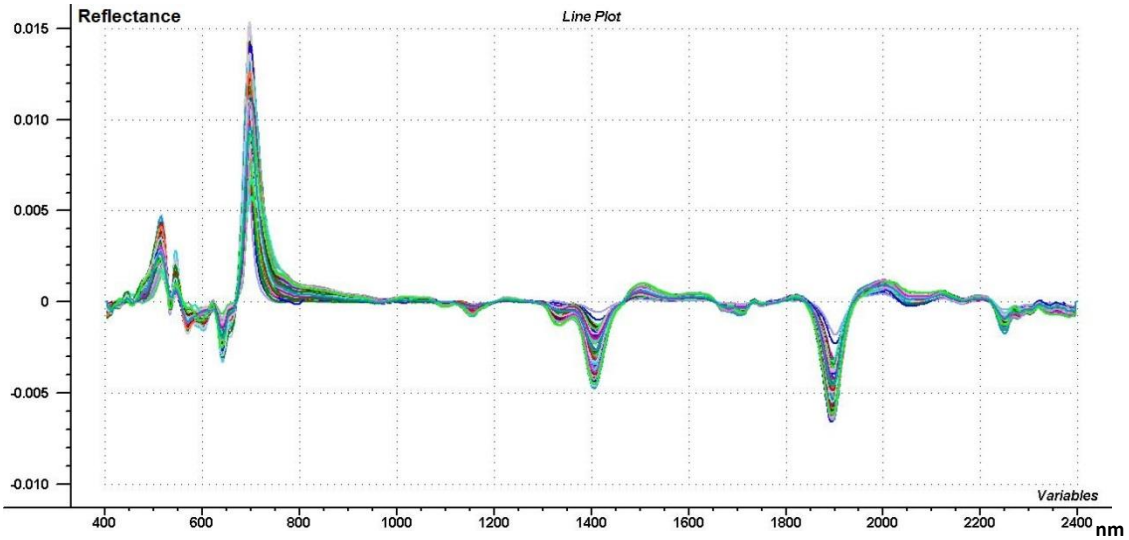
בנוסף על מנת לנטרל עד כמה שניתן את השפעות עוצמת ההחזר ולהתמקד באותן תכונות של הספקטרום המוחזר המושפע מתכולת מולקולות הרב-סוכרים, הבנייה של המודל התבצעה לאחר הפעלת נגזרת ראשונה על הספקטרום כפי שמוצג באיור 13. בהפעלת הנגזרת יש נטרול של גובה המשרעת (אמפליטודה) והדגשה של תכונות המצביעות על קשרי המולקולות.



איור 11 – קריאה ספקטרוסקופית של האצות הרטובות – המדידות התבצעו על האצות מיד בהגיען למעבדה במצבן הרטוב. הספקטרום חושב כממוצע משתי קריאות.



איור 12 – קריאה ספקטרוסקופית של האצות היבשות – המדידות התבצעו על האצות מיד לאחר ייבושן בתנור. הספקטרום חושב כממוצע משתי קריאות.



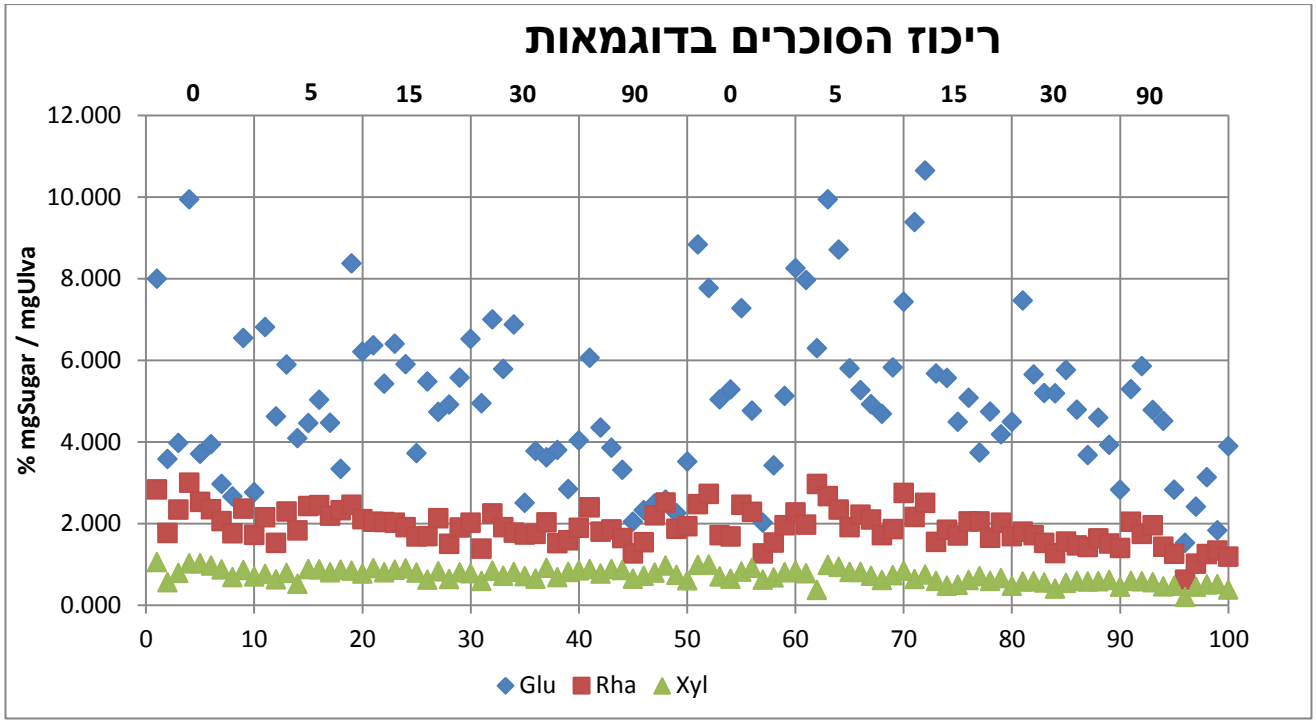
איור 13 - קריאה ספקטרוסקופית של האצות היבשות לאחר נגזרת ראשונה. בגרף זה ניתן לראות כיצד הנגזרת מנטרלת את השפעות עוצמת ההחזר ומתמקדת בשיפועים המבטאים את אותן תכונות של הספקטרום המוחזר המושפע מתכולת מולקולות הרב-סוכרים

2.2 מדידת ריכוזי סוכרים באצות תוך שימוש ב- HPLC

באיור 14 ואיור 15 מוצגות תוצאות ריכוזי הסוכרים במשקל יחסי (אחוזים) למשקל אצה. את המדידות בצענו על כל 100 האצות לאחר תהליך ההידרוליזה (כפי שמתואר בפרק השיטות), המדידות בוצעו לגבי שלושת החד- סוכרים המשמעותיים באצת הUlva (גלוקוז, ראמנוז וקסילוז) כאשר בהמשך בניית המודל התבצע רק לגבי הגלוקוז המהווה את החד סוכר העיקרי מבין כל הסוכרים באצה.

באיור 14 ניתן לראות גרף המתאר בציר ה – Y את הריכוז המשקלי היחסי של הסוכרים כאחוז (מ"ג) סוכר למשקל (מ"ג) אצה וציר ה – X התחתון מייצג את כל 100 האצות המוצגות בצורה סדרתית. בחלקו העליון של הגרף ניתן לראות בציר ה – X את החלוקה של הקבוצות עפ"י חמשת הטיפולים החל מ – 0 (ללא תוספת נוטריינטים) ועד הוספת 90 מ"ל דישון בשבוע. נראה שהחלוקה מייצגת את פיזור האצות במכלים השונים כאשר לכל טיפול היו בסה"כ 20 חזרות שחולקו לשני מכלים נפרדים (לא צמודים) כאשר בכל מכל היו 10 חזרות. בהסתכלות ראשונית נראה שניתן לזהות מגמה כללית בריכוזים במעבר בין הטיפולים אך בצורה פרטנית ניתן לראות שקיים פיזור גדול בתוך הטפולים הזהים. כמו כן ניתן להבחין בהתנהגות דומה במגמת הריכוזים בשלושת הסוכרים ברוב האצות, כך שהיכן שקיימת עלייה או ירידה יחסית בריכוז אחד הסוכרים מתקיימת אותה התנהגות גם ביתר שני הסוכרים.

בעזרת איור 14 ניתן לראות שברוב האצות הריכוז היחסי של הגלוקוז גבוהה בפי 2-4 מריכוז הראמנוז ובסדר גודל מריכוז הקסילוז.

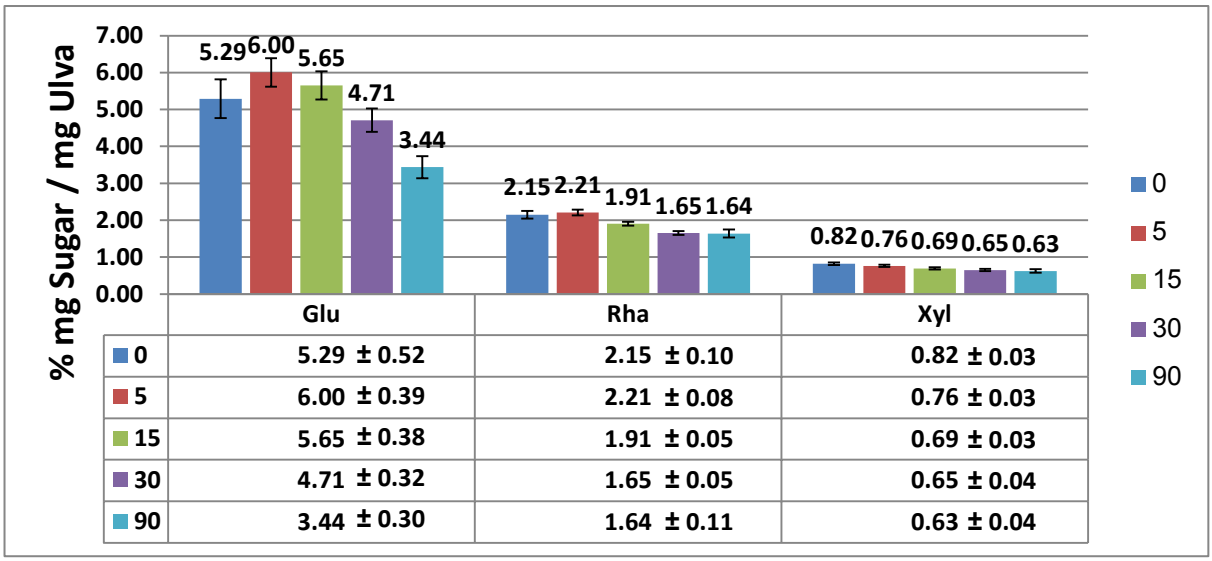


איור 14 - בגרף מוצגים הריכוז המשקלי היחסי של שלושת החד סוכרים העיקריים הנמצאים באצת הUlva: גלוקוז, ראמנוז וקסילוז. המודל חושב ונבנה על הסוכר העיקרי, עם הריכוז הגבוהה ביותר באצות – הגלוקוז.

באיור 15 מוצגים ממוצעי הריכוזים של כל אחד מהסוכרים בחלוקה עפ"י 5 קבוצות הטיפול. כאשר ציר Y מייצג את ממוצע הריכוז המשקלי היחסי של הסוכרים כאחוז (מ"ג) סוכר למשקל (מ"ג) אצה ובציר X ישנה חלוקה ראשית לפי כל אחד משלושת החד סוכרים (גלוקוז, ראמנוז וקסילוז) וחלוקה משנית (עפ"י צבעים) של כל אחד מחמשת טיפולי הנוטריינטים.

בתצוגה זו ניתן להבחין בקלות בהפרשים המשמעותיים המתקיימים בין שלושת החד סוכרים באצה. בנוסף ניתן לראות את המגמה הכללית של שינוי בריכוז כל סוכר בין הטיפולים השונים כאשר באופן כללי ניתן לומר שבטיפולים הנמוכים יש ריכוז סוכרים גבוהה יותר מהטיפולים הגבוהים או לחילופין ככל שהוספו יותר נוטריינטים למכל בטיפול השבועי כך התקבלו ריכוזי סוכרים נמוכים יותר.

מעניין לראות יוצא מן הכלל בולט במגמות הריכוזים, בממוצע שהתקבל בטיפול 0 (ללא תוספת נוטריינטים) לעומת טיפול 5 (הוספת 5 מ"ל תמיסת דישון) בסוכר הגלוקוז. אנו רואים שהתקבל בממוצע ריכוז נמוך יותר (לא מובהק) של סוכרים דווקא בטיפול הנמוך יותר בשונה מהמגמה הכללית, ההנחה שהסיבה נובעת כנראה מעקת יתר בטיפול 0 שהשפיע על יכולת האצה לייצר גלוקוז.



	Glu	Rha	Xyl
0	5.29 ± 0.52	2.15 ± 0.10	0.82 ± 0.03
5	6.00 ± 0.39	2.21 ± 0.08	0.76 ± 0.03
15	5.65 ± 0.38	1.91 ± 0.05	0.69 ± 0.03
30	4.71 ± 0.32	1.65 ± 0.05	0.65 ± 0.04
90	3.44 ± 0.30	1.64 ± 0.11	0.63 ± 0.04

איור 15 – בגרף מוצגים הממוצעים של הריכוז המשקלי היחסי לגבי כל אחד משלושת החד סוכרים העיקריים באצת הUlva. N=100 ±SE . לגבי כל סוכר ניתן לראות את הממוצע שחושב בהפרדה לחמשת טיפולי הדישון (נוטריינטים) השבועיים. החל מ – 0 (ללא תוספת נוטריינטים) ועד 90 מ"ל דישון פעם בשבוע. כפי שמתואר בפרק השיטות.

2.3 הגדרת הקבוצות לבניית המודל

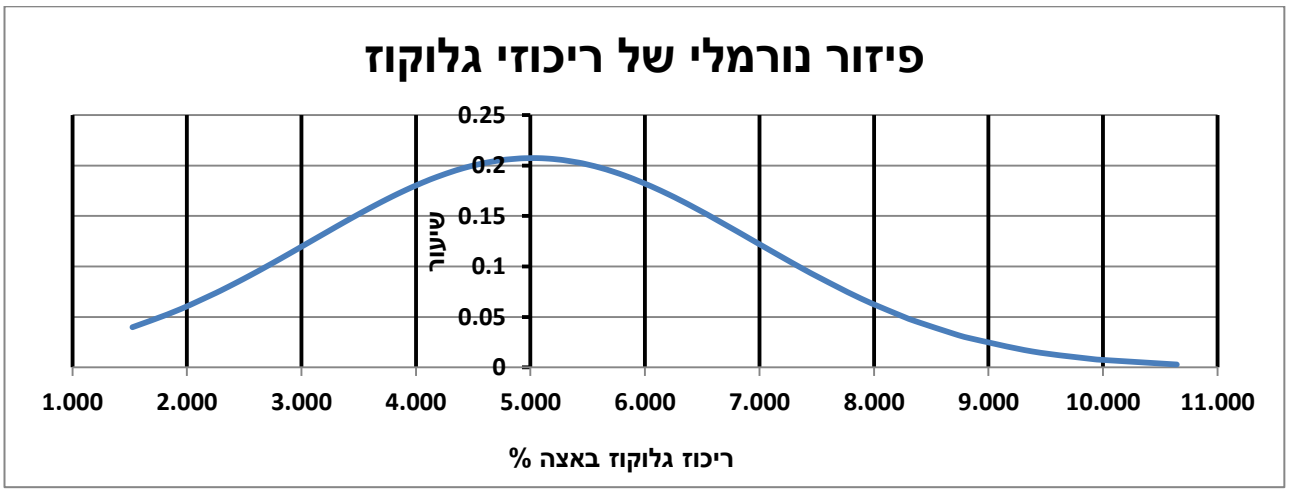
על מנת לבחון בניית מודל לניבוי סוכרים באצות Ulva הוגדרו מספר פרמטרים:

1. בניית המודל תתבצע לגבי החד סוכר בעל הריכוז המשמעותי ביותר באצות – במקרה שלנו הגלוקוז.
2. המודל ייבנה מתוך 80% מהאצות כאשר ייתרת 20% ישמשו כקבוצת הביקורת למודל, עליהן נבצע את הניבוי.
3. החלוקה לקבוצות בסיס הנתונים של המודל (80%) וקבוצת הניבוי (20%) יתבסס על חלוקה של האצות בהתאם להתפלגות הנורמלית של הריכוזים שהתקבלו באותו סוכר. חשוב להדגיש ולציין שהחלוקה היא עפ"י הריכוזים שהתקבלו בפועל במדידות ה – HPLC ולא בהתבסס על הטיפולים. ההסבר לדרך חלוקה זו הינו שבחלק מהטיפולים היה פיזור גדול בריכוזים, כפי שהוצג בסעיף הקודם, ונוצרה חפיפה בייחוד בין טיפולים קרובים. ומכיוון שמטרת המחקר היא להוכיח שניתן לבנות מודל איכותי לזיהוי ריכוז סוכרים באצה אזי, בשלב זה של בניית המודל, הדרך בה הגענו לריכוז הנתון אינה מהותית והנתון המשמעותי לבניית מודל מבוסס ספקטרום וריכוז סוכר הינו תוצאת הריכוז בפועל.
4. מכל 100 האצות נבחרו 5 קבוצות שונות בצורה אקראית, כאשר כל קבוצה שונה אחת מהשנייה בחלוקת הדוגמאות בין קבוצות המודל והניבוי ועומדת בקריטריון של פיזור דוגמאות אחיד בין המודל לקבוצת הניבוי בהסתמך על ההתפלגות הנורמלית.

באיור 16 נראה גרף ההתפלגות הנורמלית של ריכוזי הגלוקוז, כפי שהתקבל במדידות ה HPLC. הפיזור מתייחס לכמות שהתקבלה בפועל בכל אצה ולא בהקשר לחמשת הטיפולים. בציר X ניתן לראות את הריכוז היחסי של הגלוקוז באצות כאשר בציר Y מוצג הפרמטר המייצג את הפיזור הנורמלי של הריכוזים לגבי כל 100 האצות, נראה שהכמות הגבוהה ביותר של אצות התקבלה סביב ריכוז של 5% מ"ג גלוקוז/מ"ג אצה והפיזור מתחלק בין מינימום של 1.5 למקסימום של כ – 10.5.

בהינתן הפיזור הנ"ל הוגדרו 6 קטגוריות של קבוצות אצות עפ"י ריכוזי גלוקוז, ראה טבלה 14, כאשר לכל קטגוריה מופיע האחוז היחסי של כמות האצות המשויכות לה (מכיוון שבידינו 100 אצות אזי האחוז זהה לכמות). בשלב הבא הוגדרו 5 קבוצות שונות עליהן הופעל תהליך בניית המודל בעזרת תוכנת ה - Unscrambler.

בשלב ראשון, כפי שמוצג בטבלה, נבחרו קבוצות הניבוי שמהוות בקירוב 20% מכל קטגוריה. כך שלדוגמא בקטגוריה של 1%-2% גלוקוז התקבלה בהתפלגות הנורמאלית 16 אצות לכן חלקה היחסי בקבוצת הניבוי יהיה 3 שהינו בקירוב 20%, בקטגוריה של 4% גלוקוז בה נמצאות 20 אצות עפ"י ההתפלגות הנורמאלית החלק היחסי בקבוצת הביקורת הינו 4 אצות וכן הלאה לגבי יתרת הקטגוריות כפי שמופיע בטבלה 14. בסיומו של התהליך התקבלו 5 קבוצות ניבוי שונות כשבכל אחת יש 20 אצות בפיזור דומה. יתרת 80% האצות בכל קבוצה יהוו את קבוצת בסיס הנתונים למודל. נציין שהקבוצות נבחרו באופן אקראי וישנן קומבינציות נוספות שניתן לבנות עפ"י אותו עיקרון, אך לטובת הוכחת ההיתכנות של בניית המודל הסתפקנו בחלוקה זו.



איור 16 – גרף זה מציג את ההתפלגות הנורמלית של ריכוזי הגלוקוז, כפי שהתקבל במדידות ה HPLC. בעזרת הפיזור הנורמלי הוגדרו הקבוצות לבניית המודל. כאשר נבנו 5 קבוצות שלכל אחת יש תת קבוצה של 80% מהדוגמאות לבניית המודל ותת קבוצה של 20% מהדוגמאות להרצת מודל הניבוי.

טווח ריכוזי גלוקוז אחוז משקלי	כמות %	כמות בקבוצת הביקורת 20	קבוצה 1	קבוצה 2	קבוצה 3	קבוצה 4	קבוצה 5
1-2	16	3	10-6,5-7,1-8	10-9,4-5,1-10	5-5,10-7,10-5	5-9,1-8,4-9	5-6,5-8,1-7
3	18	4	10-8,5-10,3-5,10-10	5-4,1-2,8-7,9-9	2-8,4-7,4-6,1-6	6-8,9-7,4-8,1-3	5-10,1-5,5-3,1-6
4	20	4	4-10,2-7,7-8,10-3	2-4,8-10,2-2,9-6	8-9,8-5,3-7,7-7	5-2,10-4,8-8,3-8	2-5,9-8,6-6,4-1
5-6	22	4	2-6,9-3,8-4,4-3	6-3,7-6,3-9,7-9	8-6,6-4,9-2,10-2	6-9,10-1,8-3,2-3	9-4,3-2,9-5,3-4
6-7	16	3	5-1,1-9,7-10	2-10,2-1,9-1	7-2,4-4,6-2	3-1,4-2,7-1	3-3,6-5,1-1
8-10	8	2	6-10,8-1	2-9,1-4	7-4,8-2	6-1,7-3	2-9,1-4

טבלה 14 – בטבלה הוגדרו חמש החלוקות השונות של כל 100 האצות בהסתמך על הפיזור הנורמלי של ריכוזי הגלוקוז שהתקבלו ב HPLC. בטבלה מוצגת קבוצת הביקורת (20%) של כל חלוקה כאשר לגבי כל קבוצה מוגדרת ההפרש (ייתרת ה 80%) מהווה את בסיס הנתונים (Dataset) לבניית המודל עליו נבצע ניבוי (Prediction) בעזרת קבוצת ה 20%. המספור של הדוגמאות בנוי ממספר המטריצה (של הסלסלות) 1-10 ומספר הסלסלה בתוך המטריצה. (בכל מטריצה ישנן 10 סלסלות). לדוגמא טיפול 0 בוצע במטריצה 1 ו 6; טיפול 5 בוצע במטריצות 2 ו 7 וכן הלאה. בכל מטריצה הסלסלות מוספרו בין 1-10 לטובת מעקב פרטני. כך שלדוגמא הסלסלה השלישית במטריצה 7 של טיפול 5 רשומה כ 7-2 וכן הלאה.

2.4 עקרונות בניית המודלים לחיזוי ריכוזי גלוקוז באצות

בשלב הבא נתוני 5 הקבוצות שנבחרו מוספרו 1-5 והוכנס לתוכנת ה Unscrambler, לגבי כל אחת מהקבוצות הוגדרה תת קבוצה של בסיס הנתונים (Dataset) לבניית המודל - קבוצת ה 80%, ותת קבוצה לניבוי (Prediction) שנבנתה על בסיס ה -20% הנותרים.

תהליך בניית המודל ובחינתו התבצעו בשני שלבים פעם אחת עם הספקטרום הרטוב לאחר שעבר יישור בשטח חפיפת החיישנים ונגזרת ראשונה ופעם נוספת עם אותה חלוקת קבוצות התבצע ניתוח לגבי הספקטרום היבש לאחר החלקתו (Smoothing) וגזירה ראשונה.

המודל רץ תוך שימוש בטכניקה של Partial Least Squares (PLS) Regression שנמצא כמתאים ביותר למציאת קורלציה בין ספקטרום לתכונות כימיות בצמחים [39].

המודל כפי שניתן לראות באיור 17 לגבי הספקטרום הרטוב ואיור 20 לגבי הספקטרום היבש מציג בניתוח שתי קורלציות: הראשונה קורלציה בין הגלוקוז שנמדד בפועל לתוצאות החזויות לכל 80 הדוגמאות, התוצאות הללו מוצגות בצבע כחול ובמקביל מתבצע ניבוי המבוסס על אותן 80 דוגמאות, אשר מנסה לחזות מה יהיו התוצאות בחישובים עתידיים של דוגמאות מאותה אוכלוסייה לגבי ריכוז סוכר בהסתמך על המודל שהתקבל, תוצאות הניבוי מופיעות בצבע אדום. באופן כללי ניתן לומר לגבי כל הפרמטרים שנבחנו שככל שתוצאות הניבוי (הנקודות האדומות) קרובות למודל (הנקודות הכחולות) כך המודל חזק יותר ובמקביל ככל שהנקודות הכחולות והאדומות קרובות לקו כך המודל יותר מדויק.

במהלך בניית המודל בוצעו מספר הרצות כאשר בכל הרצה צומצמו טווחי אורכי הגל שנמצאו כפחות משפיעים, בחירת אורכי הגל המשמעותיים יותר מתבצע בצורה אוטומטית ע"י התוכנה כאשר ניתן להריץ שוב את המודל תוך שימוש רק באותם אורכי גל משמעותיים וכך המודל נעשה ספציפי ומדויק יותר. אורכי הגל על בסיסם נבנו המודלים מופיעים באיור 19 לגבי הספקטרום הרטוב ובאיור 22 לגבי הספקטרום היבש. כאשר לכל טווח אורכי גל המופיע בציר X יש מקדם המייצג את עוצמתו וכיוונו אשר מופיע בציר Y. בהמשך ניתן לתאר את המודל תוך שימוש בפרמטרים אלו.

הפרמטרים שנבחנו לגבי כל מודל ומוצגות בעמודה השמאלית של טבלה 15 לגבי הספקטרום הרטוב וטבלה 16 לגבי הספקטרום היבש. הינם כפי שהוגדרו בסעיף 4.11 בשיטות וחומרים.

לאחר כיול כל אחד מהמודלים וקבלת התוצאות הטובות ביותר לגבי אותה קבוצה, המודל נשמר בצד. ובשלב הבא בוצע תהליך ניבוי תוך שימוש בקבוצת ה – 20% של אותו מודל המכילה דוגמאות מאותה אוכלוסייה שלא השתתפו בבניית המודל.

באיור 18 לגבי הספקטרום הרטוב ואיור 21 לגבי הספקטרום היבש, מוצגים גרף הניבוי של הקבוצה שנבחרה כמודל האיכותי ביותר, כאשר הנקודות הכחולות מייצגות את כל אחת מ 20 הדוגמאות כשבציר X יש את ריכוז הסוכר שנמדד בפועל ובציר Y יש את תוצאות החיזוי.

לבחינת המודל הטוב ביותר מתוך הקבוצות נעשה שימוש בתוצאות החיזוי העתידי שמופיעים באדום ,תוצאותיו נמוכות יותר מהמודל עצמו אך הוא אמור לתת אינדקציה חזקה יותר לגבי חיזוי עתידי. ובמקביל למודל נבחנו תוצאות הניבוי בפועל שהורץ על קבוצת הביקורת של ה – 20%. כאשר המודל הטוב ביותר הוגדר כמודל שייתן את שילוב התוצאות האיכותי ביותר בפרמטרים של מודל החיזוי (80 הדוגמאות) ובניבוי בפועל (20 הדוגמאות) עם דגש מיוחד על איכות המודלים R^2 שהתקבל בשניהם, שמשמעותו הוא עד כמה המודל מבוסס הספקטרום מסביר את כמות הגלוקוז בפועל כאשר התוצאות נעו בין 60% ברטוב ל 80% ביבש.

2.5 מידול הספקטרום הרטוב

בטבלה 15 מוצגות תוצאות ניתוח לגבי הספקטרום הרטוב לגבי כל חמש הקבוצות, נראה שבאופן כללי תוצאות המודל בהשוואה לספקטרום היבש הינן חלשות יותר. כאשר מודל 3 נבחר להיות האיכותי ביותר מבין החמישה על אף שהפרמטרים של המידול שהתקבלו היו הנמוכים ביותר מבחינת השיפוע, איכות המודל והשגיאה.

אך הניבוי שהתקבל לגביו עם קבוצת ה 20% נתן תוצאות טובות בהרבה משל יתר המודלים בייחוד באיכות המידול R^2 שהיה גבוהה מ 0.6 כאשר ביתר ארבעת המודלים התקבלו תוצאות איכות חלשות מאוד שנעו בין 0.18 ל 0.32. כמו כן טווח השגיאה שהתקבל RMSEP היה נמוך משל יתר הקבוצות.

טווחי הספקטרום העיקריים עליהן התבסס המודל לחיזוי גלוקוז כפי שמוצג באיור 19 ואיור 22, התקבלו סביב אורכי הגל הבאים: 460,490,540,590,640,1230-1280,1390-1395,1840,2350-2390

Model dataset 1 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.792	**Slope**	0.207
R^2	0.766	**R^2**	0.198
RMSE(%)	0.938	**RMSEP(%)**	2.1

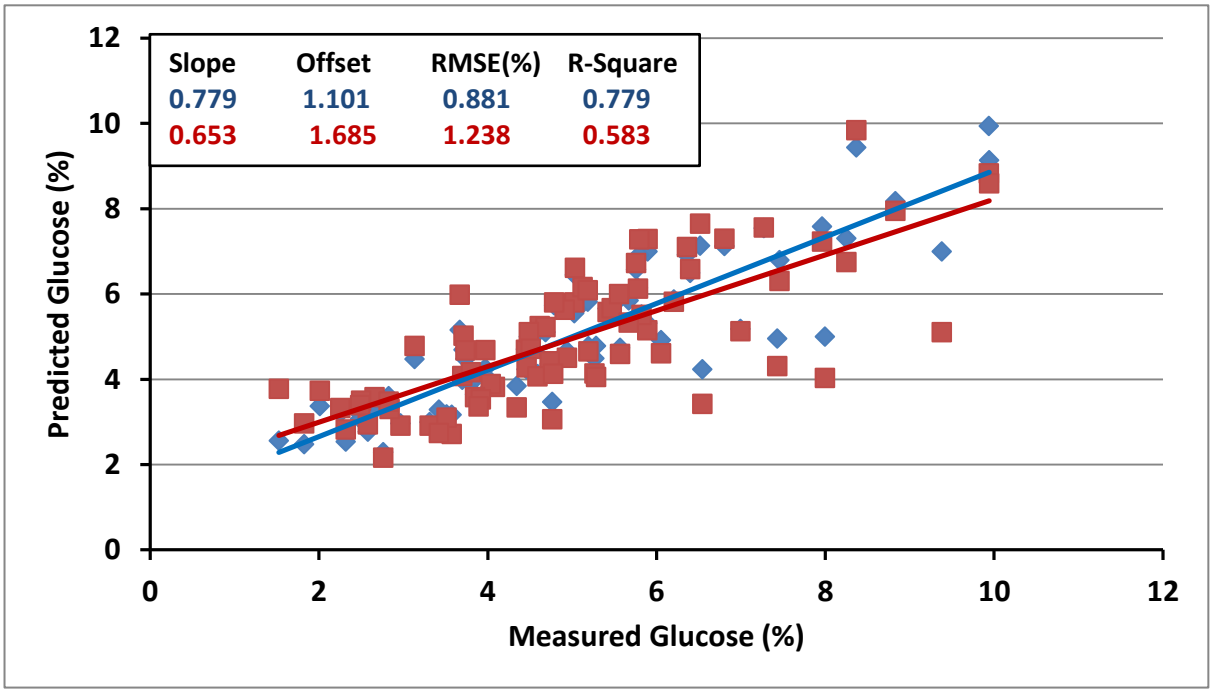
Model dataset 2 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.767	**Slope**	0.943
R^2	0.678	**R^2**	0.321
RMSE(%)	1.08	**RMSEP(%)**	1.625

Model dataset 3 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.653	**Slope**	0.583
R^2	0.583	**R^2**	0.607
RMSE(%)	1.238	**RMSEP(%)**	1.315

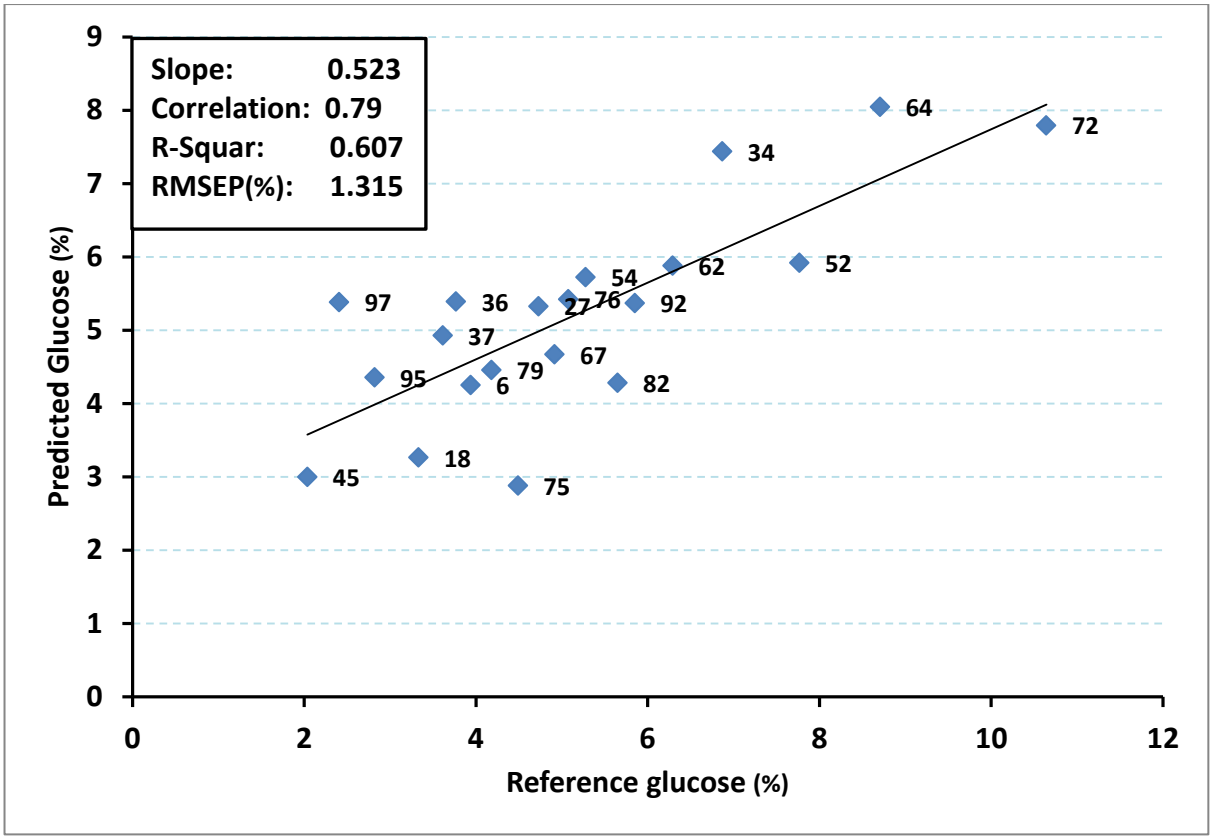
Model dataset 4 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.7	Slope	0.336
R^2	0.64	R^2	0.178
RMSE	1.16	RMSEP	2.167

Model dataset 5 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.617	Slope	0.789
R^2	0.689	R^2	0.241
RMSE(%)	1.2	RMSEP(%)	1.706

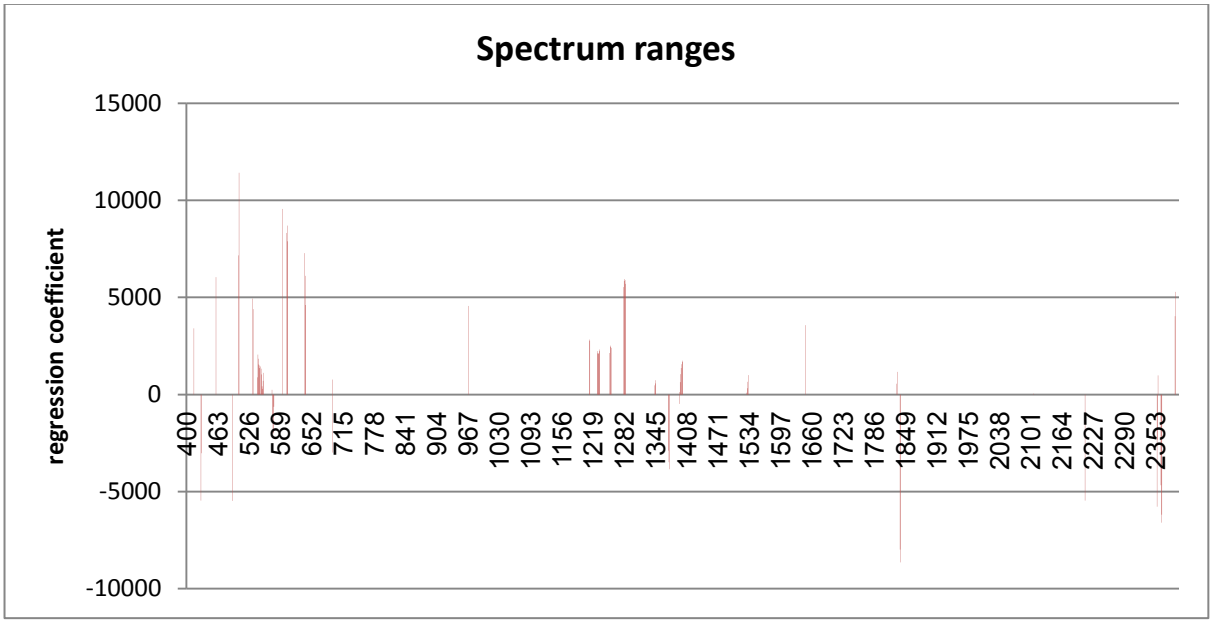
טבלה 15 – בטבלה מוצגות התוצאות הטובות ביותר שהתקבלו לגבי הספקטרום הרטוב. ניתן לראות את התוצאות בבניית המודלים לכל אחת מ 5 הקבוצות שהוגדרו ותוצאות הניבוי לגבי קבוצת הביקורת הרלוונטית. מודגש בצהוב המודל שנתן את התוצאות הטובות ביותר בבנייתו ובניבוי ולכן הוגדר כמודל הנבחר.



איור 17 – בגרף מוצג המודל שהתקבל לגבי בסיס הנתונים של קבוצה 3 אשר בשילוב עם קבוצת הניבוי נתן את התוצאה הטובה ביותר לניבוי כמות גלוקוז בספקטרום הרטוב. הנקודות והקו הכחולים מייצגים את הכיול (Calibration) של המודל ביחס לתוצאות בפועל ואילו הנקודות והקו האדומים מתייחסים לאימות (Validation) של המודל – הערכה עד כמה המודל יהיה מדויק לגבי הרצות עתידיות של דוגמאות באותה אוכלוסייה סטטיסטית.



איור 18 – בגרף הנתון מוצגות תוצאות הניבוי (Prediction) של קבוצת הניבוי של מודל 3 בספקטרום הרטוב.



איור 19 – הגרף מציג את טווחי הספקטרום אשר בעזרתם נבנה המודל של קבוצה 3 בספקטרום הרטוב. הטווחים הללו מייצגים את ההחזרים המשפיעים ביותר על בניית המודל. הטווחים הרלוונטיים התקבלו לאחר הרצת המודל מספר פעמים כאשר בכל הרצה ביקשנו להשאיר רק את אורכי הגל המשפיעים ביותר. ההרצות נמשכו לכל מודל בין 1-3 פעמים עד שהתקבלו הפרמטרים הטובים ביותר במודל.

2.6 מידול הספקטרום היבש

בטבלה 16 נתן לראות את התוצאות שהתקבלו לגבי הספקטרום היבש, במקרה זה התקבל מידול חזק בהרבה מזה שהתקבל בספקטרום הרטוב, נראה שבבניית המודל התקבלו פרמטרים איכותיים בקבוצות 3,4,5 גם בשיפוע וגם במדד האיכות R^2. כאשר קבוצה 5 קיבלה את התוצאות הטובות ביותר אך שלושתן היו קרובות. בהרצה של קבוצות הביקורת של 20 הדוגמאות, התוצאות הטובות ביותר התקבלו בקבוצה 3 בהפרש ניכר מאשר קבוצות 4 ו 5 כאשר בראשונה התקבל R^2 0.8 ואילו בקבוצות 4 ו 5 התקבלו R^2 0.3 ו 0.6 בהתאמה. לכן גם במקרה זה נבחר מודל 3 להיות האיכותי ביותר.

טווחי הספקטרום העיקריים עליהן התבסס המודל לחיזוי גלוקוז כפי שמוצג באיור 22, התקבלו סביב אורכי הגל הבאים: 470,510,670,1650-1750,2125,2300-2315

Model dataset 1 (80 samples)		**Prediction (20 samples)**	
Slope	0.7	**Slope**	0.468
R^2	0.685	**R^2**	0.338
RMSE(%)	1.089	**RMSEP(%)**	1.563

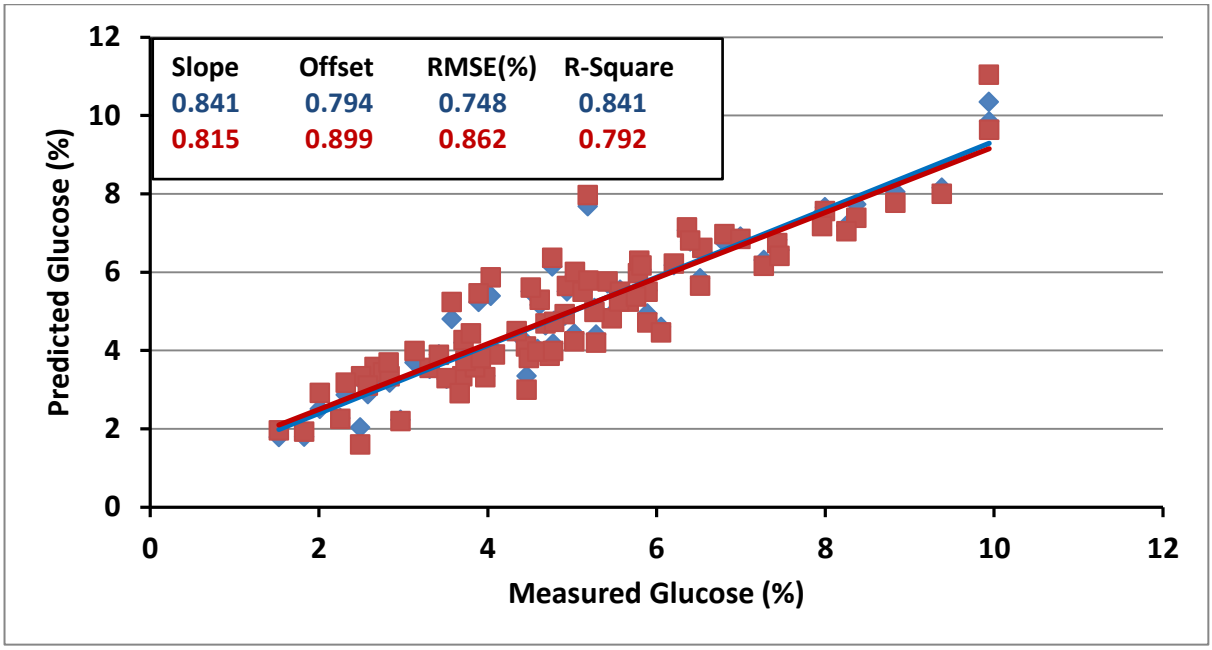
Model dataset 2 (80 samples)		**Prediction (20 samples)**	
Slope	0.596	**Slope**	0.619
R^2	0.574	**R^2**	0.684
RMSE(%)	1.26	**RMSEP(%)**	1.108
		Correlation	0.841

Model dataset 3 (80 samples)		**Prediction (20 samples)**	
Slope	0.815	**Slope**	0.772
R^2	0.792	**R^2**	0.813
RMSE(%)	0.862	**RMSEP(%)**	0.908

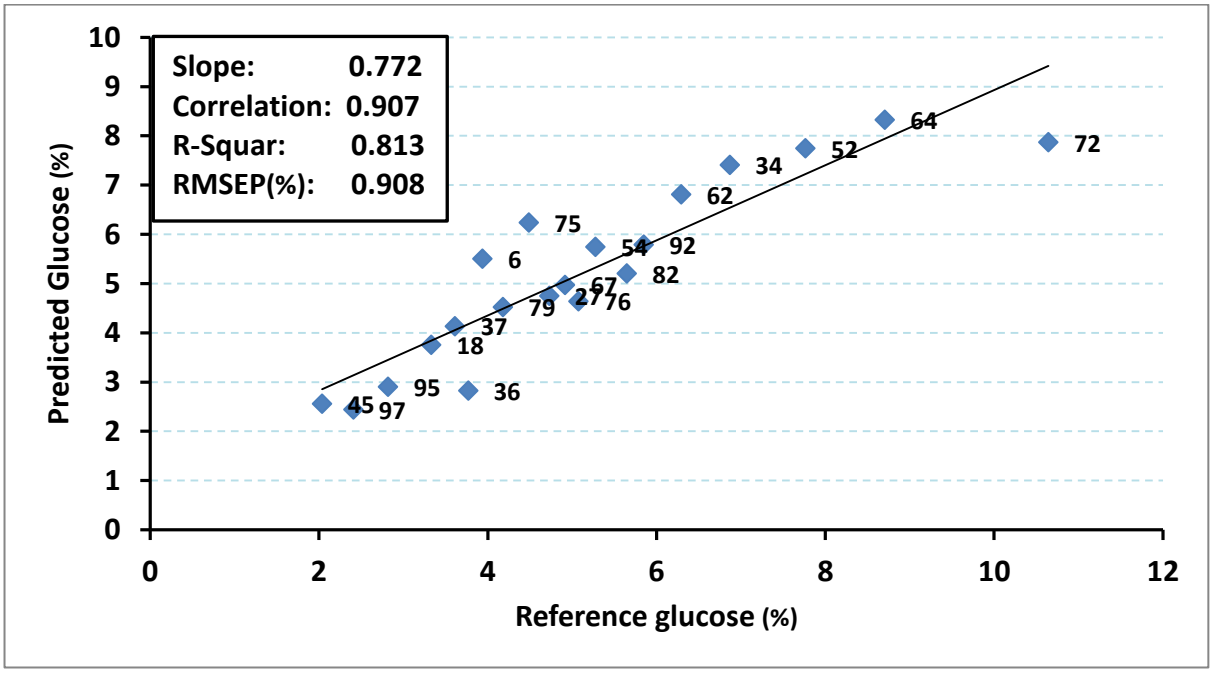
Model dataset 4 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.785	Slope	0.657
R^2	0.892	R^2	0.357
RMSE(%)	0.815	RMSEP(%)	1.359

Model dataset 5 (80 samples)		Prediction (20 samples)	
Slope	0.843	Slope	0.814
R^2	0.814	R^2	0.599
RMSE(%)	0.843	RMSEP(%)	1.24

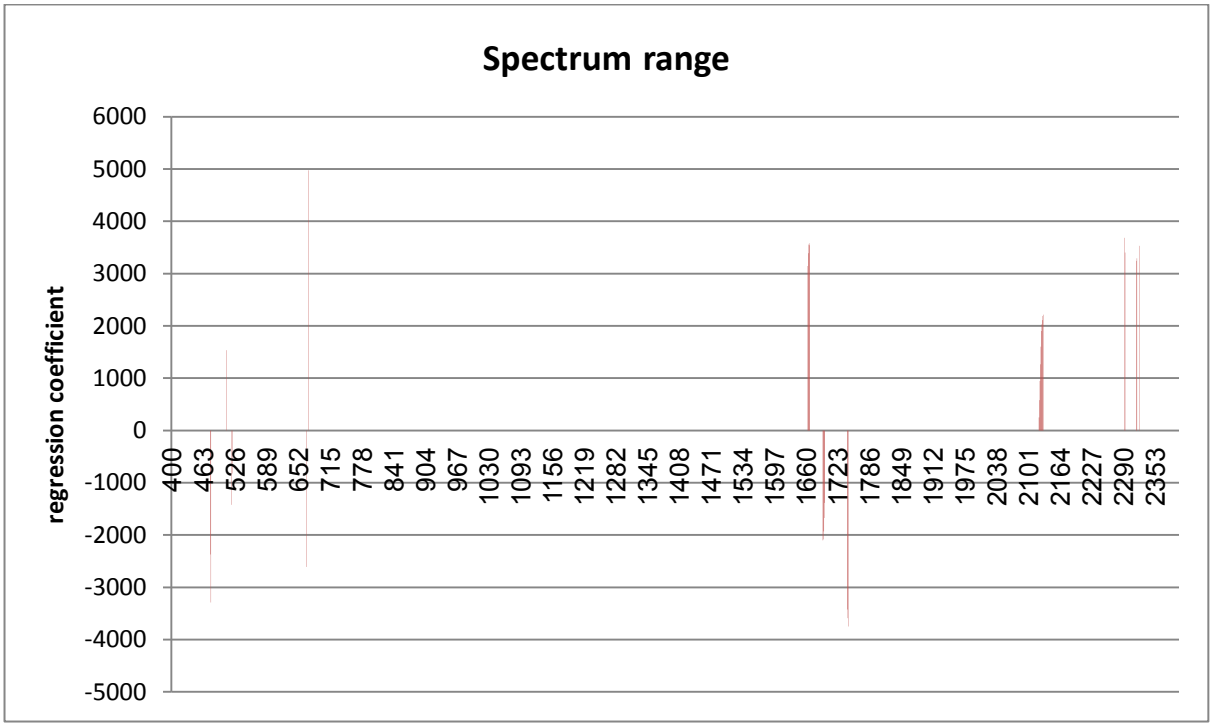
טבלה 16 - בטבלה מוצגות התוצאות הטובות ביותר שהתקבלו לגבי הספקטרום היבש. ניתן לראות את התוצאות בבניית המודלים לכל אחת מ 5 הקבוצות שהוגדרו ותוצאות הניבוי לגבי קבוצת הביקורת הרלוונטית. מודגש בצהוב המודל שנתן את התוצאות הטובות ביותר בבנייתו ובניבוי ולכן הוגדר כמודל הנבחר.



איור 20 - בגרף מוצג המודל שהתקבל לגבי בסיס הנתונים של קבוצה 3 אשר בשילוב עם קבוצת הניבוי נתן את התוצאה הטובה ביותר לניבוי כמות גלוקוז בספקטרום היבש. הנקודות והקו הכחולים מייצגים את הכיול (Calibration) של המודל ביחס לתוצאות בפועל ואילו הנקודות והקו האדומים מתייחסים לאימות (Validation) של המודל – הערכה עד כמה המודל יהיה מדויק לגבי הרצות עתידיות של דוגמאות באותה אוכלוסייה סטטיסטית.



איור 21 - בגרף הנתון מוצגות תוצאות הניבוי (Prediction) של קבוצת הניבוי של מודל 3 בספקטרום היבש. הניבוי נעשה בעזרת תת הקבוצה של 20% האצות הנותרות שלא השתתפו בבניית המודל.



איור 22 - הגרף מציג את טווחי הספקטרום אשר בעזרתם נבנה המודל של קבוצה 3 בספקטרום היבש. הטווחים הללו מייצגים את ההחזרים המשפיעים ביותר על בניית המודל. הטווחים הרלוונטיים התקבלו לאחר הרצת המודל מספר פעמים כאשר בכל הרצה ביקשנו להשאיר רק את אורכי הגל המשפיעים ביותר. ההרצות נמשכו לכל מודל בין 1-3 פעמים עד שהתקבלו הפרמטרים הטובים ביותר במודל.

דיון

העומס הגדל על מקורות האנרגיה המתכלים, יחד עם הדרישה הגוברת להספקת מזון לאוכלוסיות הגדלות בעולם וחיפוש אחר מקורות לחומרים כימיים שונים מהטבע, כל אלו דחפו את המדינות המפותחות ומכוני המחקר בעולם לחפש מקורות מתחדשים שיענו לצרכים אלו. אחד הפתרונות המסתמנים כבעלי פוטנציאל גדול הן אצות הים הרב תאיות, אשר כבר כיום נמצאות בשימוש רחב במזרח הרחוק בעיקר כמקור מזון לבני אדם ובע"ח. המחקר הכללי לגבי גידול אצות אלו בצורה מסחרית והרכב הכימי שלהם עם שימושיו השונים נמצא עדיין בתחילת הדרך.

אחת הדרכים לנצל בצורה אופטימלית את מקור זה מבוססת על הרעיון ההוליסטי של הביוריפאינרי, שהגדרתו היא שיטה יעלה למיצוי הפוטנציאל המקסימלי מתוך המסה האורגנית (במקרה זה אצות) תוך שימוש במגוון שיטות ליצירת תוצרים שונים הנדרשים בתעשיות השונות: ביו-דלקים, הזנה של בני אדם ובע"ח ומקור לחומרים ייחודיים בתעשיות שונות בתחום הכימיה (רפואה, קוסמטיקה ואחרים)

על מנת ליעל את התהליך היצרני המטרה היא למקסם את ריכוזם של אותם חומרים נדרשים בכל יחידת מסה אורגנית. וזאת ע"י תהליך השבחה.

כיום יש חוסר של ידע וניסיון בתחום היכולת לביצוע השבחה פרטנית של אצות מאקרו בהתאם לחומרים הנדרשים לכל אחת מהתעשיות, ההשבחות המתבצעות בחוות חקלאות ימית קטנות במזרח הרחוק מתבססות בעיקרן על בחירה ידנית לפי איכות הנבחנת ע"י החקלאי הימי לפרמטרים איכותיים כגון צבע אצה, משקל, שלמות וכו'.

על מנת לבצע את ההשבחה הסלקטיבית לתחום הדלקים הביולוגיים, בחוות גידול תעשייתיות יש צורך לפתח שיטה יעילה, מהירה ומדויקת לזיהוי ההרכב הכימי של האצות, בדגש על הסוכרים הרלוונטיים.

במחקר הנוכחי הצלחנו להוכיח התכנות לפיתוח שיטה לזיהוי סוכרים ספציפיים באצות תוך שימוש בטכנולוגיה קיימת של ספקטרוסקופיה בטווחים של התחום הנראה וה- NIR (400-2400 ננומטר). בבניית המודל הלינארי להערכת כמות הסוכרים התייחסנו לסוכר הגלוקוז שמוצה בעזרת תהליך הידרוליזה כימי מכלל מולקולות הרב סוכרים הקיימים באצה.

באופן כללי השימוש בשיטה ספקטרוסקופית, המתבסס על ניסיון רחב מתחומים אחרים כולל בחקלאות קרקע, מאפשר זיהוי וכימות מולקולות חשובות כדוגמת הסוכרים במהירות ואמינות גבוהים. פעולה כזו מאפשרת בחירה של אותם פרטים שנותנים ריכוזי חומר רצוי גבוהים יותר, בסביבה ותנאים נתונים, ורבייה שלהם בצורה סלקטיבית. בדרך זו ניתן לקבל אוכלוסייה עם ריכוז

גבוהה יותר של אותן מולקולות נדרשות. כמובן שאת ההשפעה המעשית של פעולה זו והתוצאות שיתקבלו יש לבחון בפועל במחקרי המשך.

לצורך הוכחת ההיתכנות, גדלנו אצות בתנאי חוץ, בברכות על חוף הים התיכון באזור חיפה, כאשר האצות היו מאותו מקור גנטי (לא בצענו בדיקה אך נלקחו מאותו מיכל גידול) וקיבלו תנאים סביבתיים דומים, הטיפולים השונים היו ע"י הספקת הזנת נוטריינטים שונה. הבחירה בריכוז נוטריינטים משתנה כטיפול לקבלת הפרשי ריכוזים של סוכר משתנים נבע מפשטות יחסית בשליטה בפרמטר זה ומתוך ידיעה שעקה בעקבות חוסר או עודף נוטריינטים משפיע באופן ישיר על קצב גידול האצה ועל ההרכב הכימי שלה.

ההנחות לגבי השפעת הנוטריינטים על קצב גידול האצות וריכוז הסוכרים היחסי נבדקו ובוססו בניסוי הראשון, בו גדלנו 2 קבוצות של אצות עם שני טיפולים שונים הראשון ללא הוספת חומרי הזנה מעבר לקיים במי הים והשני ע"י הוספת כמות משמעותית של נוטריינטים כפי שמופיע בטבלה 2, במהלך מדידת המשקלים השבועית מצאנו גידול משמעותי במסת האצות בטיפול עם תוספת הנוטריינטים אשר הגיע בשבוע השלישי לקצב של כפי שני סדרי גודל ביחס לקצב הגידול באצות ללא התוספת (איור 6). לגבי ריכוז הסוכרים נמדדו הפרשים משמעותיים בין שני הטיפולים כאשר באצות ללא תוספת הנוטריינטים שהמסה האורגנית שלה הייתה נמוכה יותר נמצאו ריכוזי גלוקוז גבוהים בכ-40% מהאצות שטופלו בדישון (איור 8).

הגידול הנ"ל בטיפול עם תוספת הנוטריינטים מצביע על כך שהאצות נמצאות בסביבה עם כמות דישון מספקת המאפשרת לאצה להשקיע את האנרגיה בגידול המסה האורגנית ואילו באצות ללא תוספת הנוטריינטים בהן מצאנו תוספת מסה נמוכה יותר וריכוז סוכרים גבוהה ניתן להניח שהאצות נמצאות בעקה של מחסור בחומרי הזנה ולכן משקיעות את האנרגיה באגירת ואחסון הסוכרים כבטחון לעתיד על חשבון גידול במסה האורגנית. בדרך זו ניתן היה לגרום לגידול אצות ממקור זהה כך שיתקבל גרדיינט של ריכוזי סוכר.

על בסיס תוצאות הניסוי הראשון הוקם הניסוי השני בו נבנו 5 טיפולים של ריכוזי נוטריינטים שונים, בניסוי זה נמצאו הפרשים קטנים יותר בין הטיפולים, בהשוואה לאלו שהתקבלו בניסוי הראשון, גם במשקלים וגם בריכוזי הגלוקוז אשר נבעו כנראה מהעונתיות. הניסוי הראשון נעשה בתקופת האביב (אמצע מרץ – אמצע אפריל) ואילו הניסוי השני נערך בתקופת החורף (נובמבר). הניסוי בתקופת האביב התאפיין במזג אוויר יציב לכל אורכו עם תנאים אידיאלים לגידול אצות הUlva בבריכות (טמ"פ חוץ ומים, קרינה) ולכן ראינו צימוח משמעותי גבוהה בטיפול עם תוספת הנוטריינטים לעומת הניסוי השני. בניסוי האביב בטיפול 0 קיבלנו צימוח ממוצע שהתחיל ב 0.43 ג"ר והגיע ל 0.85 ג"ר ובטיפול 90 קיבלנו בממוצע משקל התחלתי של 0.5 ג"ר והגענו לתוספת מסה אורגנית שנתנה בממוצע 6.98 ג"ר (איור 5). בניסוי החורף בטיפול 0 התקבלו תוצאות דומות לאביב של 0.39 ג"ר בתחילה ועד ממוצע 0.93 ג"ר בסוף הניסוי. לעומת זאת בטיפול ה 90 התקבלה מסה ממוצעת של 0.41 ג"ר

בתחילה והגיע ל 3.6 ג"ר בסיום הניסוי, כמחצית מהגידול באביב (איור 9). בהתאמה התקבלו תוצאות ריכוזי הגלוקוז באצות כאשר באביב התקבל בטיפול 0 ריכוז ממוצע של 19.5% ו 14% בטיפול 90 (איור 8) ואילו בניסוי החורף התקבל בטיפול 0 ממוצע של 5.3% (6% בטיפול 5) ו 3.4% בטיפול 90 כרבע מהריכוזים שהתקבלו באביב (איור 15). ההפרשים הגדולים שנצפו מושפעים ככל הנראה מהעונתיות, במאמר של [44] לגבי השפעת העונתיות על ההרכב הכימי באצות Ulva, הממצאים תומכים בהבדלים בריכוזי סוכרים בין העונות, אך לא גבוהים כמו אלו שקיבלנו בניסוי. ההנחה שההבדלים הגדולים שהתקבלו בניסוי הנוכחי נובעים בין היתר מכך שבתקופת גידול האצות בחורף היו שינויי מזג אוויר קיצוניים בטווח קצר שכללו ימים של שמש וימים של סופות רוח וגשם. אף על פי כן קיבלנו בניסוי השני הפרשים גדולים מספיק כפי שמוצג באיור 15 שאפשרו בניית מודל ספקטרלי.

לטובת ניתוח הספקטרום הדוגמאות חולקו באופן יחסי בהתאם לעקומה הנורמלית של ריכוזי הגלוקוז (איור 16) לשתי קבוצות (בכל קבוצה הדוגמאות שמרו על יחס הפיזור הנורמלי) כפי שמוצג בטבלה 14, הקבוצה הראשונה של 80% מהדוגמאות היוותה את בסיס הנתונים לבניית המודל " Training Set" ועליה הופעלה רגרסיה לינארית ואימות צולב מסוג "Leave-one-out cross-validation ". השארית של 20% שימשה כקבוצת ניבוי לבחינת חוזק המודל שהתקבל "Test Set". הוכנו מראש 5 זוגות של קבוצות 80:20 שונות. הפרמטר העיקרי שנבחן בתוצאות הרגרסיה, באימות הצולב ובהרצת הניבוי היה ה R^2 המשמש כמדד לאיכות המודל.

הבחירה ב 80% מהדוגמאות לבניית המודל הינה על מנת לצמצם סיכון לחוסר איזון או הערכה אופטימית בבנייתו כמו כן הדוגמאות בכל קבוצה נבחרו באופן אקראי עפ"י האחוז היחסי של ריכוזי הסוכר כדי למנוע עיוותים בתוצאות.

בניתוח התוצאות בחמשת הזוגות של הספקטרום הרטוב (טבלה 15) המודל האיכותי ביותר בשילוב תוצאות קבוצת הניבוי לגבי ריכוזי גלוקוז התקבל בקבוצה 3 מתוך 5 הקבוצות שנבחנו. ה- R^2 של המודל הינו 0.583 עם R^2 בקבוצת הניבוי של 0.607 כאשר המשמעות שאיכות המודל מצביעה על כך שדיוק המודל בהערכת ריכוז הסוכר w\w לגבי ספקטרום רטוב יהיה סביב ה 60%. ה- RMSE של המודל 1.238 ושל קבוצת הניבוי 1.315, המשמעות של תוצאה זו היא שהטעות הממוצעת בריכוז הסוכר שמתקבל במודל הנתון מתוך הספקטרום לגבי דוגמאות מהאוכלוסייה אותה מידלנו יהיה סביב 1.3 +/- בספקטרום רטוב.

טווחי הספקטרום העיקריים לפיהם נבנה המודל הרטוב (איור 19) היו 530-600, 1230-1280, 1370-1395, 2350.

לגבי חמשת הזוגות בספקטרום היבש (טבלה 16) המודל האיכותי ביותר בשילוב קבוצת הניבוי לגבי ריכוזי הגלוקוז התקבל לגבי קבוצה 3 בדומה לספקטרום הרטוב. ה- R^2 של המודל הינו 0.792 עם R^2 בקבוצת הניבוי של 0.813 כאשר המשמעות שאיכות המודל מצביעה על כך שדיוק המודל בהערכת ריכוז הסוכר w\w לגבי ספקטרום יבש יהיה סביב ה 80%. ה- RMSE של המודל 0.862

ושל קבוצת הניבוי 0.908, המשמעות של תוצאה זו היא שהטעות הממוצעת בריכוז הסוכר שמתקבל במודל הנתון מתוך הספקטרום לגבי דוגמאות מהאוכלוסייה אותה מידלנו יהיה סביב 0.9 +/- בספקטרום יבש.

טווחי הספקטרום העיקריים לפיהם נבנה המודל היבש (איור 22) היו 670, 1660, 1690, 2120, 2290-2320.

אם כן מודל הערכת ריכוזי הגלוקוז, כפי שהתקבל מהתוצאות, מצביע על איכות מודל גבוהה יותר בכ 20% בספקטרום היבש לעומת הספקטרום הרטוב. ידוע כי מולקולות המים הנמצאות באצות הרטובות גורמות להנחתה כללית של הספקטרום המוחזר באורכי הגל של התחום הנראה וה NIR כפי שניתן לראות באיורים: איור 11 לגבי הספקטרום הרטוב ואיור 12 לגבי הספקטרום היבש. ניתן לראות הנחתה כללית של הספקטרום המוחזר באצות הרטובות בכפי 3 ואף יותר.

ובנוסף ידוע כי מולקולות המים גורמות למיסוך של חלק מהתכונות המתקבלות מהחזר הספקטרום של מולקולות הסוכר בכלל והגלוקוז בפרט בעקבות חפיפה בספקטרום הבליעה ולכן תמיד עדיף עד כמה שניתן להשתמש בדוגמאות עם פחות מים.[45,46]

כל אלו גורמים להבדלי האיכות שהתקבלו בתוצאות המודלים בין הספקטרומים היבש והרטוב. אף על פי כן יש יתרון רב במידול הספקטרום הרטוב שיאפשר הערכת ריכוזי סוכר באצות חיות בזמן אמת ללא צורך בתהליכי ייבוש שאורכים זמן ויכולים גם לפגוע באצה עצמה. להערכתי ייתכן וניתן לשפר את המודל ע"י הגדלת הדוגמאות באותה אוכלוסייה לאורך הזמן. כמו כן רצוי לבדוק אופציה של ייבוש חלקי של האצה טרום המדידה הספקטרלית בצורה שלא יהיה הרסני לאצה ולא ייקח זמן רב תוך שימוש בחם נמוך בשילוב פעולות ייבוש עדינות כדוגמת מייבש החסות, פעילות זו יכולה להוציא חלק משמעותי מכמות המים באצה הרטובה (יש למדוד במדויק), בהבנה שכל ייבוש, גם חלקי, ישפר את מידול ריכוזי הסוכר.

<u>מסקנות</u>

1. המסקנה העיקרית מהמחקר היא שניתן לבנות מודל סטטיסטי מבוסס ספקטרוסקופיה בתחום אורכי גל (VIS, NIR, SWIR), אשר ינבא בצורה איכותית ריכוזי סוכר באצות *Ulva* (רטובות ויבשות).
2. מובהקות הניבוי לגבי אצות יבשות גבוהה בכ- 20% ממובהקות הניבוי שהתקבלה באצות רטובות.

סיכום

הרקע למחקר הינו העומס הגדל על מקורות האנרגיה, המזון והמים בעקבות גידול האוכלוסייה המתמיד לאורך השנים. הבעיות העיקריות נובעות בעיקר מדילול אותם מקורות מתכלים כגון אנרגיה פוסילית, שטחי קרקע הניתנים לעיבוד חקלאי ומקורות מים מתוקים. כלל גורמים אלו מובילים את הממשלות וגופי המדע לחפש מקורות אלטרנטיביים. אחד מהמקורות האורגניים אשר מצד אחד לא מתחרים בקרקע חקלאית ולא דורשים מים מתוקים ובנוסף בעלי קצב גידול גבוהה עם פוטנציאל אנרגטי רב ותכולת חומרי גלם אורגניים לתעשיות שונות (סוכרים שונים, חלבונים ושומנים) הן אצות המאקרו. המחקר התמקד באצת מאקרו מקומית בשם *Ulva* שהינה חסת ים הגדלה לאורך חופי הים התיכון, כאשר המטרה הייתה למצוא שיטה לבצוע השבחה פרטנית (Selective Breeding) של אוכלוסיית האצות על מנת לזהות אצות עם תכולת סוכרים ממוצעת גבוהה מיתר הפרטים באותה אוכלוסייה על מנת להרבות את אותם פרטים ולקבל בהמשך אוכלוסיית אצות כללית עם ריכוזי סוכר גבוהים יותר. על מנת לממש את המטרה נבחרה שיטה אופטית הנמצאת בשימוש נרחב במגוון תעשיות וענפים כגון: רפואה, מזון וחקלאות, אך כמעט ולא מיושמת לגבי מאקרו-אצות. השיטה לזיהוי האצות הנדרשות היא ע"י ספקטרוסקופיה (VIS, NIR, SWIR), הרעיון בבסיס השיטה הינו הקרנה של האצה במצב רטוב ויבש באורכי הגל השונים, קריאת ההחזר של הקרינה ושמירת הספקטרום, בהמשך, בעזרת HPLC שהינו כלי המשמש לכימות חומרים בצורה כימית מדויקת, לקבל את ריכוזי הסוכרים השונים בכל אצה ולבסוף בעזרת כלים סטטיסטיים לבנות מודל סטטיסטי לחיזוי ריכוז הסוכרים באצות מתוך הספקטרום המוחזר ע"ב רגרסיה מרובת משתנים. היתרונות בשיטה זו הינם ראשית מהירות הקריאה, עלות זולה יחסית, קריאה אופטית אינה הרסנית כלפי האצה (בהשוואה לכימות כימי-אנליטי מבוסס HPLC לדוגמא), המודל שנבנה הינו ייחודי לאוכלוסיית האצות הנחקרת וניתן לשפר אותו עם הזמן בצורה פשוטה ע"י המשך קריאות אופטיות לאורך עונות הגידול.

הניסויים נערכו בבריכות בצמוד לחוף הים. בהסתמך על מחקרים ולאחר שהוכח בניסוי הראשון שהזנות שונות של נוטריינטים משפיעות על ריכוזי הסוכר באצות, הוגדרו 10 קבוצות של 10 אצות עם 5 טיפולי הזנה שונים בנוטריינטים (סה"כ 100 אצות), האצות גודלו במשך 3 שבועות כשבסיום נבנו שני מודלים סטטיסטיים, הראשון מבוסס קריאה רטובה והשני מבוסס קריאה יבשה. התוצאות שהתקבלו איששו את ההשערה שלנו והוכיחו כי ניתן לבנות מודל לניבוי ריכוזי סוכר גלוקוז באצות *Ulva*, כאשר באצות הרטובות התקבלה איכות ניבוי של כ- 60% ואילו באצות היבשות איכות הניבוי הייתה גבוהה יותר 80%.

במחקרים עתידיים בנושא רצוי לבצע את פעילות בניית המודל לאורך מספר מחזורי גידול תוך בחינת ההנחה שניתן לשפר את המודל בין מחזור למחזור, ייתכן ויש צורך לבנות מודלים נפרדים לעונות שונות. בנוסף כדאי לבחון את ההנחה שבחירת אצות בהתבסס על המודל אכן מביאות לעלייה

מהותית בריכוז הסוכר באוכלוסיית דור ההמשך ובכך להוכיח את יכולת ההשבחה הסלקטיבית בהתבסס על המודל.

בנוסף בניסויי המשך ניתן לבחון בניית מודלים נוספים לגבי חומרים נוספים שיש באצות ולבחון זנים נוספים של אצות מאקרו.

כיווני מחקר עתידיים

1. בחירת תחום הספקטרום בו נעשה שימוש – בחירת בניית המודל מתוך החזר ספקטרלי בתחום הנראה וה NIR נסמך על מחקרים קודמים שנעשו בעיקר בצמחייה בהנחה שלאצות הירוקות עם מנגנון הפוטוסינתזה יהיו תכונות מבניות דומות לעלווה צמחית. אך נציין שבמחקרים אחרים כגון [10] בו כימתו את הסוכרים מתוך מולקולות ה Ulvan , נעשה שימוש באנליזה בתחום ה Mid-IR (3000-8000 nm), התקבלו תוצאות טובות לראמנוז וקסילוז אך תוצאות פחות טובות לגלוקוז. אם כן במחקרי המשך מומלץ לבחון אנליזה דומה תוך שימוש או שילוב טווחי ה Mid-IR.

2. המחקר הנוכחי התמקד בסוכרים העיקריים באצת הUlva, הוכחת התאוריה לגבי היכולת לבניית מודל בוצעה לגבי סוכר הגלוקוז, אך ההנחה היא שניתן לבצע פעולה דומה לגבי מולקולות וחומרים מעניינים נוספים באצה ואף מעבר לכך לבנות מודלים לגבי אצות מאקרו נוספות (ירוקות, חומות ואדומות).

3. שיטת המדידה הספקטרלית והשימוש בעיפרון המדידה - בניתוח התוצאות שהתקבלו מצאנו בחלק מהאצות הבדלים לא מבוטלים בין חזרות המדידה באותה אצה. ההנחה שההבדלים במדידות יכולים לנבוע בין היתר משילוב בין שוני בסביבת המדידה של החזרות, כדוגמת פרמטרים של עוצמת אור בסביבה וניקיון העדשה בין החזרות (העדשה נוגעת באצה בכל מדידה) לבין פרמטרים של מיקום המדידה באצה. במהלך הניסוי נעשה מאמץ לשמר עד כמה שניתן תנאי מדידה זהים אך למחקרי המשך מומלץ לבחון אופציה לשימוש במיקרו סביבת מדידה דומה כגון קופסא סגורה בה נניח את הדוגמא (למנוע השפעות סביבתיות כגון תאורה) וכמו כן לקבוע אזור מדידה קבוע באצה שיחזור על עצמו בכל המדידות (למשל מיקום בטלוס הנמצא במרחק קבוע ממרכז האצה ויוגדר מראש).

4. בניית המודל - רצוי לבחון בניית מודל המבוסס גם על עונתיות, כאשר ייתכן שבשלב ראשון יהיה צורך לתחזק מספר מודלים המתאימים לתקופות הגידול והתנאים המשתנים. מודלים כאלו רצוי לעדכן ולשפר במהלך השנים על מנת להגיע למודל יציב ואיכותי.

5. ניתוח סטטיסטי - בבניית המודל הנוכחי הייתה התייחסות לכל המדידות שהתבצעו, מבחינה סטטיסטית ניתן היה לשפר את איכות המודל ע"י השמטת תוצאות בעלות סטייה חריגה עפ"י

הגדרה מראש של שונות. במחקר הנ"ל הבחירה הייתה שלא להשמיט מדידות על מנת לבחון את איכות התוצאות גם בתנאים סטטיסטיים "קשים יותר".

בנוסף במחקר הנ"ל בחרנו להשתמש ברגרסיה לינארית מרובת משתנים מבוססת PLS, במחקרי המשך רצוי לבחון גם שימוש ברגרסיה לא לינארית על מנת להשוות בין השיטות ולבדוק האם ישנה התנהגות לא לינארית שתביא תוצאות איכותיות יותר.

רשימת ספרות

1. Lal, R. Managing soils for a warming earth in a food-insecure and energy-starved world. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **173,** 4–15 (2010).

2. Karp, A. & Richter, G. M. Meeting the challenge of food and energy security. *J. Exp. Bot.* **62,** 3263–3271 (2011).

3. Wei, N., Quarterman, J. & Jin, Y.-S. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.* **31,** 70–7 (2013).

4. Gerbens-Leenes, W., Hoekstra, A. Y. & van der Meer, T. H. The water footprint of bioenergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 10219–23 (2009).

5. John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. & Pandey, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **102,** 186–193 (2011).

6. Murphy, F., Devlin, G., Deverell, R. & McDonnell, K. Biofuel production in ireland-an approach to 2020 targets with a focus on algal biomass. *Energies* **6,** 6391–6412 (2013).

7. Skjermo, J., Aasen, I. M., Arff, J., Broch, O. J., Carvajal, A., Forbord, S., Olsen, Y., Reitan, K. I., Rustad, T. & Sandquist, J. *Report A new Norwegian bioeconomy based on cultivation and processing of seaweeds : Opportunities and R&D needs*. (2014).

8. Resurreccion, E. P., White, M. A. & Colosi, L. M. Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks. **44,** 1813–1819 (2010).

9. Kraan, S. Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* **18,** 27–46 (2013).

10. Robic, a., Rondeau-Mouro, C., Sassi, J. F., Lerat, Y. & Lahaye, M. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae Ulva rotundata (Ulvales, Chlorophyceae). *Carbohydr. Polym.* **77,** 206–216 (2009).

11. Gosch, B. J., Magnusson, M., Paul, N. a. & de Nys, R. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy* **4,** 919–930 (2012).

12. Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M. & Rasmussen, M. B. A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland. *Sustain. Energy Irel. Dublin* 88 (2009).

13. Kamm, B. & Kamm, M. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64,** 137–145 (2004).

14. Luo, G., Talebnia, F., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q. & Angelidaki, I. Enhanced bioenergy recovery from rapeseed plant in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* **102,** 1433–1439 (2011).

15. Balboa, E. M., Moure, A. & Domínguez, H. Valorization of Sargassum muticum Biomass According to the Biorefinery Concept. *Mar. Drugs* **13,** 3745–60 (2015).

16. Einav, R. & Israel, A. Checklist of seaweeds from the Israeli Mediterranean : Taxonomical and ecological approaches. **56,** 127–192 (2008).

17. Israel, A. 2015) 216–211 **,3** .היבטים שונים בהפקת ביו-אתנול ממָקרו-אצות בישראל).

18. Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H. B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M. B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C. & Jensen, P. D. Bioenergy potential of Ulva lactuca: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresour. Technol.* **102,** 2595–2604 (2011).

19. Fleurence, J., Le Coeur, C., Mabeau, S., Maurice, M. & Landrein, A. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds Ulva rigida and Ulva rotundata. *J. Appl. Phycol.* **7,** 577–582 (1995).

20. Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z. & Waaland, J. R. Chemical compositions of the marine algae Gracilaria salicornia (Rhodophyta) and Ulva lactuca (Chlorophyta) as a potential food source. *J. Sci. Food Agric.* **92,** 2500–2506 (2012).

21. Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. & Rios, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds Ulva lactuca and Durvillaea antarctica. *Food Chem.* **99,** 98–104 (2006).

22. van der Wal, H., Sperber, B. L. H. M., Houweling-Tan, B., Bakker, R. R. C., Brandenburg, W., López-Contreras, A. M. & L??pez-Contreras, A. M. Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed Ulva lactuca. *Bioresour. Technol.* **128,** 431–437 (2013).

23. Robinson, N., Winberg, P. & Kirkendale, L. Genetic improvement of macroalgae: Status to date and needs for the future. *J. Appl. Phycol.* **25,** 703–716 (2013).

24. Colwell, R. R. The potential of biotechnology for developed and developing countries. 5–17 (1986).

25. Chan, C. X., Ho, C. L. & Phang, S. M. Trends in seaweed research. *Trends Plant Sci.* **11,** 165–166 (2006).

26. Cabrera-Bosquet, L., Crossa, J., von Zitzewitz, J., Serret, M. D. & Luis Araus, J. High-throughput Phenotyping and Genomic Selection: The Frontiers of Crop Breeding Converge. *J. Integr. Plant Biol.* **54,** 312–320 (2012).

27. Li, L., Zhang, Q. & Huang, D. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping. *Sensors* **14,** 20078–20111 (2014).

28. Mutka, A. M. & Bart, R. S. Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Front. Plant Sci.* **5,** 734 (2015).

29. Walter, A., Liebisch, F. & Hund, A. Plant phenotyping: from bean weighing to

image analysis. *Plant Methods* **11,** 14 (2015).

30. Blanco, M. & Villarroya, I. NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **21,** 240–250 (2002).

31. Carney, L. T., Reinsch, S. S., Lane, P. D., Solberg, O. D., Jansen, L. S., Williams, K. P., Trent, J. D. & Lane, T. W. Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor. *Algal Res.* **4,** 52–61 (2014).

32. Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-martinez, C. & Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **44,** 683–700 (2007).

33. Otsuka, M., Mouri, Y. & Matsuda, Y. Chemometric evaluation of pharmaceutical properties of antipyrine granules by near-infrared spectroscopy. *AAPS PharmSciTech* **4,** E47 (2003).

34. Davies, E. *Heat kernels and spectral theory*1990) *1990* .).

35. Malta, E., Rijstenbil, J. W., Brouwer, P. E. M. & Kromkamp, J. C. Vertical heterogeneity in physiological characteristics of Ulva spp. mats. *Mar. Biol.* **143,** 1029–1038 (2003).

36. Hunt, G. Spectral signatures of particulate minerals in the visible and near infrared. *Geophysics* (1977).

37. Zhang, Q., Li, Q. & Zhang, G. Rapid Determination of Leaf Water Content Using VIS/NIR Spectroscopy Analysis with Wavelength Selection. *Spectrosc. An Int. J.* **27,** 93–105 (2012).

38. Suchat, S., Pioch, D., Palu, S., Tardan, E., van Loo, E. N. & Davrieux, F. Fast determination of the resin and rubber content in Parthenium argentatum biomass using near infrared spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **45,** 44–51 (2013).

39. Lugassi, R., Chudnovsky, A., Zaady, E., Dvash, L. & Goldshleger, N. Spectral slope as an indicator of pasture quality. *Remote Sens.* **7,** 256–274 (2015).

40. Ramsey, E., Rangoonwala, A., Solgaard, M., Schwarzschild, T. & Schwarzschild, A. Spectral definition of the macro-algae Ulva curvata in the back-barrier bays of the Eastern Shore of Virginia , USA. *Int. J. Remote Sens.* **33,** 586–603 (2012).

41. Carder, K. L., Steward, R. G., Harvey, G. R. & Ortner, P. B. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. *Limnol. Oceanogr.* **34,** 68–81 (1989).

42. Furukawa, T., Watari, M., Siesler, H. W. & Ozaki, Y. Discrimination of various poly(propylene) copolymers and prediction of their ethylene content by near-infrared and Raman spectroscopy in combination with chemometric methods. *J. Appl. Polym. Sci.* **87,** 616–625 (2003).

43. IOLR. *The National Monitoring Program of Israel's Mediterranean coastal waters – Scientific Report for 2012*. (2012).

44. Robic, A., Sassi, J. F., Dion, P., Lerat, Y. & Lahaye, M. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two ulva species (chlorophyta) from the Brittany coast1. *J. Phycol.* **45,** 962–973 (2009).

45. Chen, S.-F., Danao, M.-G. C., Singh, V. & Brown, P. J. Determining sucrose and glucose levels in dual-purpose sorghum stalks by Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* **94,** 2569–76 (2014).

46. Challagulla, V., Walsh, K. B. & Subedi, P. Biomass and Total Lipid Content Assessment of Microalgal Cultures Using Near and Short Wave Infrared Spectroscopy. *BioEnergy Res.* **7,** 306–318 (2013).

Abstract

Growing population, increasing quality of life and longevity, imposes new pressures on all industrial sectors involved in the production of food, chemicals and fuels. The effect of the pressure is expected to increase the use of land, drinking water, fossil fuels and natural resources. The increased use of natural resources could lead to the unpredictable changes of climate, loss of biodiversity and to inability of humanity to maintain eco-systems sustainably.

In the last years we can see many efforts leaded by governments together with the academic institutions and industry to search, develop and implement alternative solutions that will bring to reduction in using those non-renewable natural resources. In addition, they are focusing in finding alternative renewable natural resources that will have the same function.

The following research focuses on the development of high-throughput tools for breeding of a new renewable feedstock - macroalgae.
The local macro-algae \ seaweeds that has been chosen for the research is the green seaweed – sea lettuce cold *Ulva lactuca*. The main goal is to find the optimum way to extract the photosynthetic energy potential of the *Ulva* (sugar and fats) in addition to proteins and other interesting chemical compounds.

Achieving this goal can be addressed by implementing the biorefinery concept. Biorefinery is a collective term for the complex system that includes biomass production, transportation, conversion into products and products distribution. Biorefinery design depends on a large number of factors, including availability of feedstocks, advances in the biomass production and processing technologies, environmental impacts and socio-economic conditions. It can be implemented in various industries as: biofuels, food, feed, medicine and cosmetic.

There are a few benefits for using macro-algae due to its fast growth rates in compare to land crops, high carbohydrate and other compounds content. Seaweeds can be cultivated offshore and onshore and do requirearable land neither fresh

water, most of its nutrients needs are provided from the environment and the sea water therefore there is very limited or no need for fertilization.

One of the challenges of building an effective biorefienery process is the selection of the most suitable species for the given environment condition at the offshore location, this process define as selective breeding, which is not used today at the macroalgae field

There can be large variance in the chemical content between *Ulva* thalli even in the same environment. Like other cultivated organism the seaweeds in the aquaculture are affected from both the environment it grown (water and nutrients, light, temperature etc…) and from its genetic variability.
Therefore to have a high concentration of a specific sugar, usefull for example for bioethanol production, we need to have understanding of the effect on a specific material and a method to improve genetically specific individuals and control it's environment to get the needed benefit.

Although there is a clear need in the market, this area of selective breeding of Macro-Algae isn't developed enough. Technics being use in the Fareast for long time to increase the seaweeds cultivation quality and efficiency are based on manual methods selecting for different criteria such as color and size. Those methods partially bring some benefit but are limited to very small scale of aquaculture farming. Having a more accurate breeding process, required for modern large scale agriculture, one should use analytic chemical methods, the main problems with this approach is the high cost and time consuming. Therefore, when using those methods, it always done statistically on a partial group of the population, which bring to less accurate results for the breeding process.

The goal of this research is to define an effective and economical method for the selective breeding. Therefore, there is a new method that will enable selection of the best individuals based on predefined parameters with specific material composition. The method should fit for high scale cultivation and with high-throughput potential. Such a method will enable us to explore high volume of seaweeds and get an

indication of the ones with the highest content of needed material content for breeding.

Traditional breeding in agricultural crops was transformed by the introduction of high-throughput phenotyping with imaging methods such as imaging spectroscopy. In this research we are using Near infrared spectroscopy NIRS method, it is one of the widely used technologies with an overwhelming application in virtually all fields of science. Spectral signatures based on selective absorption provide unique indicators of pigment types contained in the thallus [35]and can be used as indicators of the macrophyte type and condition.

NIRS has been extensively used in plants for high-throughput breeding. The goal of this study is develop a statistical model, based on spectral measurements of VIS and NIR wavelength that enable determination of the levels of specific carbohydrates (Rhamnose, Glucose, Xylose) in the green macroalgae *Ulva* fasciata. Having this method it will enable high-throughput phenomics of macroalgae from specific environment, to make them an important feedstock for sustainable biorefineries.

The research was divide to two parts The first part was an experiment on a small population of 16 Ulva thallus divided to 2 groups where each group get different treatment of nutrients, The goal here was to examine the influence of different nutrients concentration on the carbohydrate content in the samples after 3 weeks while the other environment condition kept the same. The results confirmed our assumption that by feeding the macro-algae in different nutrients concentration led to differences in the carbohydrate concentration of the Ulva biomass, which the main sugar is the glucose. Having these results we continued with testing of our hypothesis that a correlation between the spectrum and the glucose concentration exists

.

The second and main experiment contained 100 Ulva thalli that were divided to 5 different groups, each group was fertilized with different concentration of nutrient fertilization, after 3 weeks we get a wet and dry spectrum for each sample. With HPLC we got concentrations of the 3 main carbohydrates in the Ulva biiomass: glucose, rhamnose and xylose. Using multivariate regression we developed models

that predict the glucose concentration in the wet Ulva biomass with 60% predictability and in the dry Ulva biomass with 80% predictability.

Conclusion

1. The main conclusion from this research is that it is possible to build a statistical model based spectroscopy in range of wavelengths VIS, NIR, SWIR, to predict seaweed Ulva carbohydrates concentrations (wet and dry).
2. The module for dry seaweed gives a higher significance result in about 20% than the wet seaweeds significance result.

The Porter School of Environmental studies - Laboratory of Environmental Bioengineering

Department of Geography and the Human Environment - Laboratory of Remote Sensing

Israel Oceanographic and Limnological Research (IOLR) - Dept. of Marine Biology

Developing an optical method of detecting monosaccharides concentration seaweed for selective breeding of *Ulva Fasciata*

This paper was submitted as the thesis for the M.Sc. degree of environmental studies in Tel-Aviv University

by:

Shai Shefer

This study was carried out under the supervision of:

Dr. Alexander Golberg, Porter School of Environmental Studies, Tel Aviv University

Dr. Alexandra Chudnovsky, Department of Geography and Human Environment, Tel Aviv University

Dr. Alvaro Israel, Israel Oceanographic and Limnological Research Haifa

September 2016