



אוניברסיטת תל-אביב

הפקולטה למדעים מדויקים

ע"ש ריימונד ובברלי סאקלר

**השפעות סביבתיות כתוצאה מייעול תהליך הפקת האתנול מאצת
Ulva sp. בתהליך התססה דו שלבית, על ידי
Escherichia coli ו- *Saccharomyces cerevisiae***

חיבור זה הוגש כחלק מהדרישות לקבלת התואר
"מוסמך אוניברסיטה" (M.Sc) באוניברסיטת תל-אביב
בבית הספר לסביבה ומדעי כדור הארץ ע"ש פורטר
בחוג ללימודי הסביבה

על ידי: עמיחי גיליס

העבודה הוכנה בהנחיית:

פרופ' אלכסנדר גולברג, בית הספר לסביבה ומדעי כדור הארץ ע"ש פורטר,
אוניברסיטת תל אביב.

פרופ' מרטין קופייק, בית הספר לביולוגיה מולקולרית של התא וביוטכנולוגיה,
הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת תל אביב.

מרץ 2020

תודות:

ברצוני להודות פרופ' אלכסנדר גולברג על ההזדמנות לבצע מחקר במעבדתו, על ההכוונה האישית והסיוע לכל אורך המחקר.

תודה לפרופ' מרטין קופייק על ליווי המחקר, והיותו זמין לכל שאלה.

מארק פוליקובסקי שממנו למדתי את עבודת המחקר והמעבדה, וכן על הייעוץ והעזרה לאורך כל המחקר.

מנהלת המעבדה רותי גוטליב וחברי המעבדה על התמיכה והחברות.

במהלך עבודת המחקר רכשתי ידע רב וכלים מחקרניים רבים שיעזרו וישמשו אותי בהמשך הדרך.

על כל אלו, תודה גדולה לי אליכם.

עמיחי

תקציר

הגידול באוכלוסיית העולם עם העלייה בתוחלת החיים ואיכותם הביאו לעליה בשימוש בדלק מאובן. שימוש בדלק מאובן גורם לזיהום אוויר, תחלואה והגדלת אפקט החממה, כמו כן זהו משאב מתכלה ולכן ישנה חשיבות רבה במעבר לשימוש באנרגיה מתחדשת וביו-דלקים.

ביו-אתנול הוא הדלק המתחדש הנפוץ בעולם לתחבורה. ביו-אתנול ניתן להפיק ממספר מקורות פחמן כגון תירס, קני סוכר ואצות. שימוש באצה כחומר גלם להפקת אתנול יכול להוות פתרון סביבתי כיוון שאצות גדלות בים ואינן צורכות שטחי חקלאות ומים מתוקים. בעבודה השתמשנו באצה מזן *Ulva sp.* (חסנית) כמקור פחמן להפקה של אתנול. ל-*Ulva sp.* יש כמות גדולה של סוכרים ופוטנציאל הפקת האתנול ממנה הוא גדול.

המחקר בא לענות על שני פערי ידע בהפקת אתנול מאצות. האתגר הראשון הוא הקושי בפרוק דופן התא הבנויה מפחמימות מורכבות, כגון צלולוז והמיצלולוז, לסוכרים שאותם מסוגלים מיקרואורגניזמים לצרוך ולהפיק מהם אתנול. לפיכך חלקו הראשון של המחקר בוחן שיטות שונות לביצוע הידרוליזה של האצה לסוכרים ובוחן מהם הפרמטרים הטובים ביותר לביצוע טיפול מקדים והידרוליזה עם שילובים שונים של אנזימים.

הפער השני הוא היכולת להתסיס מגוון סוכרים כגון רמנוז, קסילוז וחומצה גלוקרנית לאתנול. מטרת המחקר הינה לבדוק היתכנות לתהליך שייתן מענה לפער ביכולת לנצל את מגוון הסוכרים להפקת אתנול. במסגרת תהליך זה יבוצעו טיפול מקדים והידרוליזה ולאחר מכן תבוצע התססה דו שלבית: בשלב הראשון תסיסה על ידי שמר *Saccharomyces cerevisiae* שמוגדר כמתסיס הטוב ביותר ותשואת האתנול שלו מגלוקוז היא גבוהה, אך הוא אינו סוגל לצרוך את יתר הסוכרים. בשלב השני נבצע תסיסה על ידי *Escherichia coli* מתסיס בעל יכולת לצרוך מגוון רחב יותר של סוכרים אך עם תשואת אתנול נמוכה, כך שינוצלו הסוכרים שלא נצרכו בשלב הראשון. בחלק זה נבדק מהי הקומבינציה של *S. cerevisiae* ו-*E. coli* המתאימה ביותר לתהליך. בניסוי שנעשה בנפח של 3 מ"ל בדקנו שש קומבינציות של תסיסה חד ודו שלבית (*S. cerevisiae* בלבד, *E. coli* בלבד, *E. coli* → *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* → *E. coli*, *E. coli* → *S. cerevisiae* ו-*E. coli* → *E. coli*). לאחר שקיבלנו את תוצאות ההידרוליזה והתסיסה הטובות ביותר בדקנו הפקת אתנול בנפח 1L

תוצאות המחקר הראו שטיפול מקדים עם חומצה (H_2SO_4 2%) ואחריה הידרוליזה אנזימתית בשילוב האנזימים Enzyme mix הכוללת את האנזימים: (α -0.52 U amyloglucosidase), 10.7 U amylase ו-6 U cellulase ואינקובציה במשך 24 שעות ב $45^{\circ}C$, 150 RPM) נותנים את אחוז הסוכרים הגבוה ביותר: רמנוז (3.31%) גלקטוז (0.11%) גלוקוז (8.08%) קסילוז (2.23%) פרוקטוז (0.08%) וחומצה גלוקרנית (5.04%) שה"כ כ- $17.42 \pm 1.42\%$ סוכר מאצה יבשה. גלוקוז הוא הסוכר שנמצא באחוז הגדול ביותר באצה והוא גם הדומיננטי ביותר בתהליך התסיסה. הגלוקוז מתקבל בעיקר בשלב ההידרוליזה האנזימתית כמעט בלי קשר לטיפול המקדים.

בניסויי התססה דו-שלבית בנפח מעבדתי נמצא שבהתססה בשלב הראשון על ידי *S. cerevisiae* התקבל כ- 30.72 ± 5.6 mg ethanol/ g Dry Weight ולאחר מכן בשלב השני

בהתססה על ידי *E. coli* התקבל כ- 8.8 ± 1.57 mg ethanol/ g DW. סך האתנול שהתקבל מהתססה דו שלבית זאת הוא כ- 39 mg ethanol /g DW , כמות האתנול הגבוהה ביותר מכל הקומבינציות שנבדקו. בתסיסה דו שלבית התקבל הפרש תשואה של 23% יותר אתנול לעומת התססה חד שלבית על ידי *S. cerevisiae* בלבד. בנוסף אחוז הסוכרים שנצרכו בתהליך הדו שלבי הוא הגבוה ביותר (74%).

בניסוי בנפח 1L בתסיסה בשלב הראשון על ידי *S. cerevisiae* התקבלה כמות אתנול 40.15 mg ethanol / g DW ובשלב השני בתסיסה על ידי *E. coli* התקבל 3.04 mg ethanol/ g DW. סך הכול בתהליך התססה דו שלבי בנפח גדול התקבל 43.19 mg ethanol / g DW , הפרש תשואה של 8% בלבד לעומת תסיסה חד שלבית על ידי *S. cerevisiae*.

בהשוואה בין התססה דו שלבית בנפח מעבדתי לעומת התססה דו שלבית בנפח גדול של 1L, ניתן לראות שבניסוי בנפח גדול של 1L בהתססה בשלב הראשון על ידי *S. cerevisiae* התקבל כמות אתנול גדולה יותר מאשר בניסוי התססה דו שלבית בנפח מעבדתי (40.15 mg ethanol / g DW) לעומת 30.72 mg ethanol / g DW אך בתסיסה בשלב השני על ידי *E. coli* כמות האתנול שהתקבלה קטנה משמעותית מאשר בניסויים בנפח מעבדתי (3 mg ethanol/ g DW אתנול) לעומת 8.8 mg ethanol/ g DW. ולכן הפרש התשואה בהתססה דו שלבית לעומת חד שלבית היא שונה, 23% בניסוי בנפח מעבדתי לעומת 8% בנפח גדול 1L תוצאה זו משפיעה על היעילות והכדאיות בתהליך תסיסה דו שלבית לעומת חד שלבית.

מסקנות המחקר הן ששילוב של טיפול מקדים על ידי חומצה (H_2SO_4 2%) ולאחר מכן הידרוליזה אנזימתית נותנים את אחוז הסוכרים הגבוה ביותר מאצה יבשה (17% סוכר מאצה). בהתססה דו שלבית של אצה *Ulva* sp. בשלב ראשון על ידי *S. cerevisiae* ובשלב השני על ידי *E. coli* מתקבלת תשואת אתנול גבוהה ב-23% לעומת התססה בשלב אחד רק על ידי *S. cerevisiae* (39.59 mg ethanol/ g DW לעומת 30.72 mg ethanol/ g DW).

תוכן עניינים

6.....	1 רקע מדעי.....
6.....	1.1 שימוש בדלק מאובן לתחבורה
7.....	1.2 אנרגיה מתחדשת כמקור אנרגיה לתחבורה.....
7.....	1.3 ביו-אתנול כמקור אנרגיה לתחבורה.....
7.....	1.3.1 התפתחות השימוש בביו-אתנול כמקור אנרגיה לסקטור התחבורה
8.....	1.3.2 חומרי הגלם המשמשים להפקת ביו-אתנול
9.....	1.4 מאקרו אצות כחומר גלם לביו- אתנול, יתרונות ומגבלות.....
10.....	1.4.1 אצה ירוקה <i>Ulva</i> sp.....
11.....	1.5 שלבים בהפקת אתנול מאצת <i>Ulva</i> sp.....
11.....	1.5.1 גידול אצת <i>Ulva</i> sp.....
12.....	1.5.2 יבוש וטחינה של אצת <i>Ulva</i> sp.....
12.....	1.5.3 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת <i>Ulva</i> sp.....
13.....	1.5.4 התססה של אצת <i>Ulva</i> sp להפקת ביו-אתנול
15.....	1.5.5 זיקוק אתנול.....
17.....	2 פערי ידע בתחום ההידרוליזה והתסיסה של אצת <i>Ulva</i> sp.....
18.....	3 מטרות המחקר
18.....	4 השערת המחקר.....
19.....	5 מהלך העבודה, סקירה כללית.....
19.....	5.1 טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית
19.....	5.2 תסיסה דו שלבית.....
20.....	5.3 הפקת אתנול בנפח גדול.....
20.....	6 שיטות וחומרים.....
20.....	6.1 טיפול מקדים והידרוליזה לאצת <i>Ulva</i> sp.....
20.....	6.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית.....
22.....	6.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת <i>Ulva</i> sp בעומס מוצקים משתנה
24.....	6.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת <i>Ulva</i> sp בגודלי חלקיקים שונים
25.....	6.2 הפקת אתנול באמצעות התססה דו שלבית של אצות <i>Ulva</i> sp.....
25.....	6.2.1 גידול וייבוש אצות <i>Ulva</i> sp.....

25.....	6.2.2 גידול המיקרואורגניזמים.....
25.....	6.2.3 התססה דו שלבית של אצת <i>Ulva</i> sp.....
27.....	6.3 הפקת אתנול בנפח 1L.....
30.....	6.4 שיטות אנליטיות לחישוב כמות סוכרים ואתנול.....
30.....	6.4.1 כימות סוכרים בעזרת מכשיר HPLC.....
31.....	6.4.2 חישוב כמות אתנול באמצעות קיט אתנול.....
32.....	6.4.3 ניתוח סטטיסטי של התוצאות.....
32.....	7 תוצאות.....
32.....	7.1 טיפול מקדים והידרוליזה של אצות <i>Ulva</i> sp.....
32.....	7.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה.....
34.....	7.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה בעומס מוצקים משתנה.....
36.....	7.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה.....
37.....	7.2 תוצאות תסיסה דו שלבית של אצת <i>Ulva</i> sp.....
37.....	7.2.1 תסיסה דו שלבית ניסוי מספר 1.....
42.....	7.2.2 תסיסה דו שלבית ניסוי 2.....
46.....	7.3 הפקת אתנול בנפח גדול 1L.....
46.....	7.3.1 תסיסה דו שלבית של אצת.....
48.....	7.3.2 זיקוק אתנול.....
48.....	8 דיון.....
48.....	8.1 ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה של אצות <i>Ulva</i> sp.....
48.....	8.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה.....
49.....	8.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה בעומס מוצקים משתנה.....
49.....	8.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה.....
50.....	8.2 ניסוי תסיסה דו שלבית של אצת <i>Ulva</i> sp.....
52.....	8.3 הפקת אתנול בנפח של 1L.....
52.....	8.3.1 תסיסה דו שלבית.....
52.....	8.3.2 זיקוק אתנול.....
52.....	9 מסקנות.....
53.....	10 מחקרי המשך.....
54.....	11 ביבליוגרפיה.....
59.....	12 נספחים.....

59.....	12.1 פרוטוקול HPLC
59.....	12.1 הידרוליזה, עומס מוצקים וגודל חלקיקים
67.....	12.2 תסיסה דו שלבית ניסויים 2-1
69.....	12.3 הפקת אתנול בקנה מידה מעבדתי

רשימת טבלאות

- טבלה 1 - הפקה של אתנול מאצת *Ulva sp.* על ידי מיקרואורגניזמים שונים 15
- טבלה 2 - טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.* 22
- טבלה 3 - ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.* בעומס מוצקים משתנה 23
- טבלה 4 - גודל חלקיקים של אצות..... 24
- טבלה 5 - סיכום ניסוי 1 ו-2, התססה דו שלבית לאצת *Ulva sp.* 27
- טבלה 6 - ניסוי 1, שינוי באתנול וסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 39
- טבלה 7 - T-test ניסוי 1 תסיסה דו שלבית סה"כ אתנול שהתקבל..... 41
- טבלה 8 - ניסוי 2 שינוי אתנול וסך הסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 44
- טבלה 9 - T-test ניסוי 2 תסיסה דו שלבית סה"כ אתנול שהתקבל..... 46
-
- טבלה 1S - תוצאות סוכרים מטיפול מקדים והידרוליזה..... 60
- טבלה 2S - פלט T-test לתוצאות סה"כ סוכרים לניסוי טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית..... 61
- טבלה 3S - פלט T-test לתוצאות סה"כ תשואת סוכרים בעומס מוצקים שונים 62
- טבלה 4S - פלט T-test כמות סוכרים בעומס מוצקים שונים..... 63
- טבלה 5S - אחוז סוכרים שהתקבל ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה בעומסי מוצקים שונים..... 64
- טבלה 6S - כמות סוכרים שהתקבלה טיפול והידרוליזה בעומסי מוצקים שונים..... 65
- טבלה 7S - פלט T-test סך סוכרים הירוליזה עם גודל חלקיקי שונים..... 66
- טבלה 8S - פלט T-test גלוקוז בהידרוליזה עם גודל חלקיקים שונה..... 66
- טבלה 9S - כמות סוכרים שהתקבלו לאורך תסיסה דו שלבית ניסוי 1..... 67
- טבלה 10S - תוצאות סוכרים מניסוי תסיסה דו שלבי מספר 2..... 68
- טבלה 11S - סוכרים ב scale up..... 69

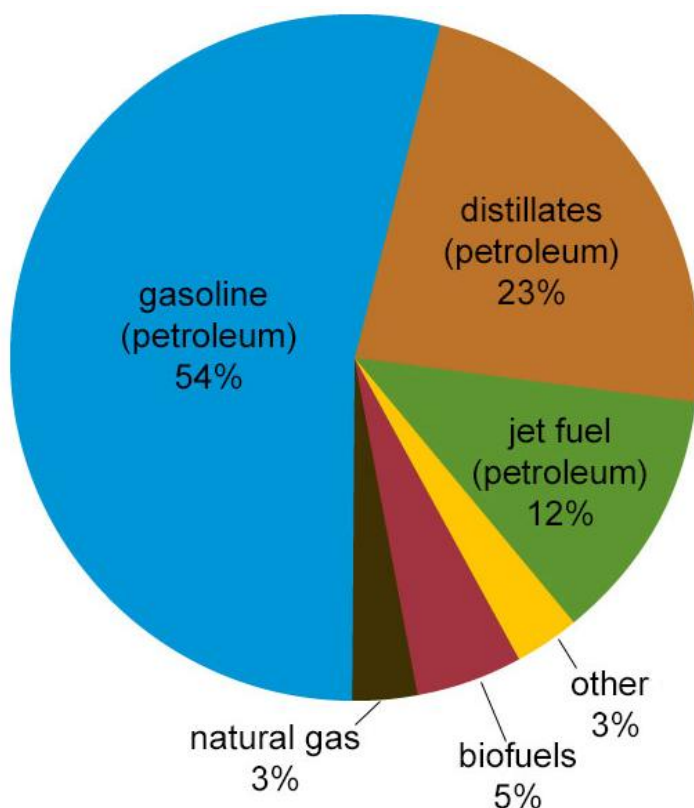
רשימת איורים

- איור 1 - תמהיל מקרות אנרגיה לתחבורה בארה"ב 2018..... 6
- איור 2 - זנים שונים של אצות רב תאיות..... 10
- איור 3 - תרשים הפקת ביו-אתנול מאצת *Ulva* sp..... 11
- איור 4 - מסלול נשימה תאית בשמר..... 14
- איור 5 - תרשים של תסיסה דו שלבית..... 19
- איור 6 - גודל חלקיקים של אצה *Ulva* sp..... 24
- איור 7 - פרמנטור MINIFOR 1L..... 29
- איור 8 - מאדה מסתובב..... 30
- איור 9 - פרוטוקול להרצת לקיט אתנול (מתוך החוברת שהגיע עם הקיט)..... 31
- איור 10 - טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva* sp..... 33
- איור 11 - עומס מוצקים, השוואה בין תשואה לכמות סוכר..... 35
- איור 12 - טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה..... 36
- איור 13 - תסיסה דו שלבית ניסוי 1, שינוי באתנול וסוכר לאורך התסיסה..... 38
- איור 14 - ניסוי 1, שינוי בסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 41
- איור 15 - ניסוי 2, שינוי באתנול וסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 43
- איור 16 - ניסוי 2, שינוי בסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 45
- איור 17 - ניסוי scale up, שינוי באתנול וסך הסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית..... 47

1.1 שימוש בדלק מאובן לתחבורה

עם הגידול המתמיד באוכלוסייה והעלייה באיכות החיים גוברת כל עת הדרישה למקורות אנרגיה נוספים, הן לתעשייה והן לתחבורה. בשנת 2018 צרך סקטור התחבורה בארה"ב כ-30% מסך האנרגיה הנצרכת ומתוכם כ-54% הוא דלק מאובן ו-23% נוספים תזקיני נפט (איור 1)¹ מגמת הגידול בסקטור התחבורה תביא לגידול בשימוש בדלק מאובן.

השימוש הגובר בדלק מאובן לעומת קצב ההתחדשות שאורך מיליוני שנים יגרום בעתיד הקרוב למחסור בדלק מאובן. בנוסף, שימוש גובר בדלק מאובן לעומת קצב ההיווצרות מוציא מאיזון את מעגל הפחמן הפטרו-כימי וגורם לעליה בשיעור הפחמן הדו חמצני באטמוספירה ובאוקיינוסים. עליה בריכוז הפחמן הדו חמצני באוויר גורם לשינויי אקלים ולאפקט החממה². שימוש בדלק מאובן לתחבורה גורם לזיהום אוויר מקומי, במיוחד בנסיעה בעיר כשהכבישים נמצאים בסמוך לבתים ולהולכי רגל, בעיקר של החומרים: NO , NO_2 , SO_2 וחלקיקים נשימתיים ($pm\ 2.5$, $pm\ 10$) הגורמים לבעיות בריאותיות גם בחשיפה לטווח קצר³.



איור 1 - תמהיל מקורות אנרגיה לתחבורה בארה"ב 2018¹

1.2 אנרגיה מתחדשת כמקור אנרגיה לתחבורה

הצריכה המוגברת של דלקים מאובנים ושלל הבעיות שפורטו בסעיף הקודם מדגישים את הצורך בהפקה של אנרגיה מתחדשת לתחבורה. מסך כלל מקורות האנרגיה לסקטור התחבורה נצרכים רק 5% מביו-דלקים, הכוללים ביו-אתנול, ביו-דיזל וביו-מימן ובנוסף 6% ממקורות אנרגיה שאינם מוגדרים כאנרגיה מתחדשת אלא כאנרגיה נקייה, כגון גז טבעי וחשמל. היתרונות הבולטים בשימוש באנרגיה מתחדשת ונקייה כמקורות אנרגיה לתחבורה הן:

אנרגיה בת קיימא: להפקה של אנרגיה מתחדשת יש פוטנציאל להיות ברת קיימא, בתכנון נכון ובייעול מקורות הפקת האנרגיה ניתן יהיה לייצר אנרגיה מתחדשת לתחבורה בצורה תעשייתית באופן מקיים ובאופן שיקטין למינימום את הפגיעה בסביבה.

הפחתה בזיהום אוויר: הפחמן הדו חמצני שמשחרר הוא אותו פחמן דו חמצני שהבימסה (המשמשת מקור לביו דלקים) ספגה מהאוויר בעת שגדלה ולכן אין פגיעה במעגל הפחמן וכמות הפחמן הדו חמצני באוויר לא תעלה כתוצאה משימוש בדלקים אלו².

מכלל האנרגיות המתחדשות העבודה מתמקדת בביו-אתנול.

1.3 ביו-אתנול כמקור אנרגיה מתחדשת לתחבורה

ביו-אתנול מופק ממגוון מקורות פחמניים כגון תאית (צלולוז) ועמילן ולכן ניתן להפיק אותו ממספר רב של צמחים כגון אצות, תירס, קני סוכר וקני אורז וכן מפסולת אורגנית תאית כגון נייר עיתונים וכו'. ניתן לערבב אתנול עם דלקים מאובנים עד 15% בלי שום צורך לבצע שינוי במנוע הרכב ולכן השימוש בביו-אתנול הוא אטרקטיבי ביותר. בשנת 2015 ביו אתנול היווה כ-90% מסך הדלקים הביולוגים לתחבורה⁴.

1.3.1 התפתחות השימוש בביו-אתנול כמקור אנרגיה לסקטור התחבורה

השימוש באתנול כמקור אנרגיה לתחבורה החל במאה ה-19 על ידי שמואל מורי וניקולס אוטו שבנו מנוע שיכול לפעול גם על אתנול. הרכב הראשון שתוכנן ויוצר על ידי הנרי פורד ב-1896 היה יכול לנסוע רק על אתנול כדלק. בדגמים הבאים המנוע עבד על תערובת של אתנול ודלק מאובן. לאחר מלחמת העולם הראשונה הייתה ירידה בצריכת הביו-אתנול מכיוון שהדלק המאובן היה זול מאד. ב-1927 גם ברזיל התחילה להפיק ביו-אתנול אך הפסיקה לאחר שמחירי הדלק ירדו. בשנות ה-70, בזמן משבר הדלק העולמי, ברזיל הקימה תכנית לאומית להפקת ביו-אתנול (Pro-Alcool) מקני סוכר הגדלים בשפע במדינה. בשנות השמונים רוב המכוניות החדשות בברזיל נסעו על ביו-אתנול (96% אתנול 4% מים) ובשנות האלפיים 80% מהמכוניות בברזיל נסעו על תערובת של אתנול ודלק מאובן. בתחילת שנות השמונים מתוך רצון לחזק את המגזר

החקלאי וכן להתחרות בתעשיית הביו-אתנול בברזיל חידשה ארצות הברית את תעשיית הביו-אתנול והפכה למובילה בעולם. בשנת 2014 ביו-אתנול הווה 20% מהדלק לתחבורה בארה"ב. מתוך הרצון לחזק את תעשיית הביו-אתנול הממשל האמריקאי דרש מתעשיות הרכב הגדולות לתכנן ולייצר רכבים שמסוגלים לפעול על סקאלה גדולה של תערובות דלקים החל מדלק מאובן בלבד עד לתערובת של E-85 (85 אחוז אתנול 15 אחוז דלק מאובן)⁵. כיום כאמור רק 5% מהאנרגיה לתחבורה היא אנרגיה מתחדשת⁶.

1.3.2 חומרי הגלם המשמשים להפקת ביו-אתנול

לאורך השנים נעשה שימוש במגוון חומרי גלם מן הצומח להפקת אתנול לתחבורה, ניתן לחלק את חומרי הגלם לשלושה דורות^{7,8}.

דור ראשון- גידולי שדה, כגון תירס וקנה סוכר. כיום רוב הביו-אתנול שמיוצר עדיין מופק מביו-מסה מהדור הראשון⁸. היתרון בשימוש באותם חומרים הוא יכולת ההפקה המהירה של אתנול כמעט ללא צורך בטיפול מקדים. תירס מכיל כמות גדולה של עמילן שניתן לפרק ע"י אנזימים או בטיפול תרמי וקנה סוכר דורש רק טיפול פיזיקאלי (טחינה), על כן אותם גידולים נוחים מאד להפקת אתנול⁹. החיסרון בשימוש באותם גידולים הוא שהם גדלים על האדמה והם מוצרי מזון בסיסיים. הסבה של אותם גידולים לטובת הפקת אנרגיה דורשת אדמה חקלאית רבה (וכן חומרי הדברה רבים, בעיקר בתירס) וגורמת לצמצום בגידול למזון, דבר שגורם לעליה במחירי המזון ולמחסור בשוק¹⁰. כיום יש חוסר הסכמה בין קבוצות שונות של מדענים וכלכלנים האם הפקת אתנול מתירס משתלמת מבחינה כלכלית והאם היא ברת קיימא. ניתוח יחס האנרגיה בין ההשקעה בהפקת האתנול מתירס לבין הרווח האנרגטי, כפי שנעשה בארה"ב, הראה יחס של ~1:1. כלומר, ההשקעה האנרגטית שווה לתשואה שמתקבלת. בנוסף, קיימים היבטים סביבתיים הכוללים שימוש נרחב בריסוס וכמויות גדולות של מים להשקיית התירס¹¹.

דור שני- הפקת אתנול מגידולים שאינם ראויים למאכל אדם ומזבל אורגני כגון נייר ועיתון וכדו'. היתרון בשימוש בחומרים אלו הוא שהם אינם מזון לבני אדם וכן שמדובר בפסולת שלא יעשה בה שימוש אחר. החיסרון הוא שגידולים אלו מכילות ליגנין ודורשים טיפול מקדים מסיבי ותשואת האתנול נמוכה¹².

דור שלישי- הפקת אתנול מביו-מסה ימית הכוללת מיקרו ומאקרו אצות. בחומרי גלם מדור זה עוסקת התזה ויורחב עליהם בהמשך.

1.4 מאקרו אצות כחומר גלם לביו-אתנול, יתרונות ומגבלות

אצה הוא שם למגוון רחב של "צמחים" ימיים, הכולל צורות תאיות ורב-תאיות, שבדרך כלל יש בהן כלורופיל, אך הן ללא גבעולים ושורשים אמיתיים¹³. האצות מחולקות לשתי קבוצות, מיקרו-אצה ומאקרו-אצה. משני סוגי האצות ניתן להפיק אתנול¹⁴.

מאקרו אצות אינן מכילות ליגנין והן בעלות קצב גידול מהיר. ניתן לגדל אותן במי ים כך שאינן נזקקות לאדמה ולמים שפירים. גידולים יבשתיים לעומת זאת, צורכים 75% מהמים השפירים בעולם. יתרה מכך, האצות סופחות חומרים כגון זרחן ופחמן ממי הים ולכן לא רק שלא צריך לדשן אותן, הן מקטינות את האיטופיקציה בימים ובאוקיינוסים¹⁵. כמו כן באצות קיים ריכוז גבוה של פחמימנים. נתונים אלו מאפשרים לגדל אצות באופן בר קיימא וכן מגדילים את הסיכוי שהליך הפקת אתנול באצות יהיה כלכלי¹⁶.

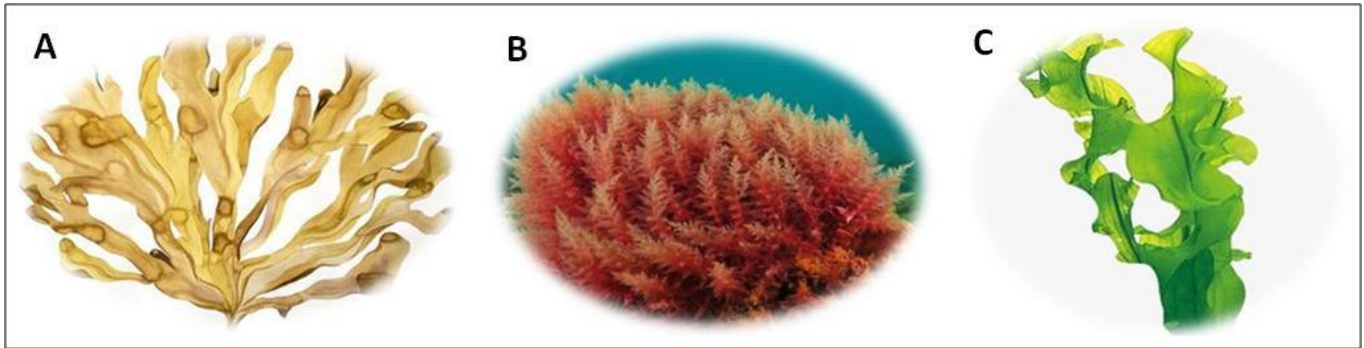
מלבד היכולת להפיק מהן אתנול יש בגידול אצות יתרונות רבים, כגון העובדה שאצות סופחות מהאוויר פחמן דו חמצני בכמות גבוהה מכל צמח אחר ולכן גידול אצות בחוות ענק יתרום להפחתה של פחמן דו חמצני באוויר. בנוסף לאתנול ניתן להפיק מאצות מוצרים רבים כגון שמנים וחלבונים שיכולים לשמש למטרות נוספות כך שכמעט ואין פסולת משימוש באצות¹⁷.

גידול נרחב של מאקרו-אצות מוגבל על ידי מספר גורמים כגון הקצאות שטחים ימיים, מגבלות עונתיות וגיאוגרפיות¹⁸. כמו כן, בניגוד לביו-מסה יבשתית, רק בשנים האחרונות פותחו מודלים וכלים גנומיים מתקדמים על מנת שניתן יהיה לאפיין ולפתח זנים שונים של מאקרו-אצות בעלי תכונות ספציפיות למזון, אנרגיה וכימיקלים¹⁹.

מאקרו-אצה הינה אצה רב תאית, ניתן לחלק את המאקרו-אצה לשלוש קבוצות טקסונומיות עיקריות על פי הפיגמנטציה שלהן (איור 2):

- אצה חומה (Phaeophyta): ישנם כ 1500-2000 מינים של אצה חומה ברחבי העולם. הם יכולים לגדול עד 20 מטר מתחת לפני המים ויש להם תפקיד חשוב במערכת האקולוגית.
- אצה אדומה (Rhodophyta): קבוצה גדולה של אצות רב תאיות הכוללת כ-6000 מינים. אצות אדומות מאופיינות על ידי נוכחות מוגברת של פיגמנט פיקובלינים (phycobilins), אשר אחראי על צבעם האדום. המינים: (Nori) *Porphyratenera* ו- *Palmaria palmata* (Dulse) הם הנפוצים והנצרכים ביותר במדינות אסיה וכן במדינות המערב¹⁸

- אצות ירוקות (Chlorophyta): קבוצה מגוונת של כ 8000 מינים. אצות ירוקות מקבלות את צבען הירוק מכלורופיל a ו- b, כמו גם פיגמנטים נוספים כגון β -carotene ו-xanthophylls. הנפוצה מבין האצות ירוקות היא ה- אולווה (*Ulva*) הכוללת את המינים¹⁸: *U. compressa* ו-*U. intestinalis*, *U. lactuca*. ירוקות מזן *Ulva* sp.



איור 2- זנים שונים של אצות רב תאיות

A-אצה חומה B- אצה אדומה C-אצה ירוקה

1.4.1 אצה ירוקה *Ulva* sp.

אצה מזן *Ulva* sp. נחשבה לגידול פוטנציאלי של אנרגיה ימית^{14,20} ה-*Ulva* sp. גדלה לכל אורך חופי הים התיכון הישראלי. היא עמידה לשינויים סביבתיים, כולל עלייה של 3°C בטמפרטורות פני הים במהלך שני העשורים האחרונים, ושכיחות גוברת של חדירת מינים פולשים^{22,21}. כבר בתחילת שנות ה-70 כשארצות הברית התחילה את התוכנית לפיתוח מינים מימיים לטובת מזון ואנרגיה, נבחרה ה-*Ulva* sp. הודות לשיעורי הצמיחה הגבוהים שלה ובהיותה עשירה מאד בפחמימנים. המסקנה הייתה אז שגידול *Ulva* sp. להפקת אנרגיה אינו כלכלי. עם זאת, שינוי האקלים גרם להתעניינות גוברת באנרגיה מתחדשת כולל דלק ביולוגי, אשר הגבירה את הלחץ על משאבי ביומסה מסורתיים, תהליך שזירז חיפוש חלופה ברת קיימא כמו ביומסה ימית. גורמים אלו החזירו את ההפקה של ביו-דלקים מ-*Ulva* sp. לחזית המחקר²³.

הרכב הפחמימות של ה-*Ulva* sp. (dry matter) משתנה בהתאם לעונות השנה ולתנאי הגידול אך באופן כללי ה-*Ulva* sp. מורכבת מ-27% אחוז חלבון ו-62% פחמימות, בלי שומן כלל²⁴.

הפחמימות נמצאות ב-*Ulva* sp. בכמה אזורים: צלולוז (תאית) והמיצללוז מרכיבים את דופן התא. צלולוז הוא הפולימר הנפוץ ביותר בטבע ומורכב ממולקולות של גלוקוז המחוברים בקשרי בטא, הוא פולימר גבישי מסודר וחזק מאוד אך מגיב בצורה מהירה תחת תנאים שונים²⁵. המיצלולוז הוא פולימר מסועף המורכב מכמה חד סוכרים, גלוקוז, קסילוז וחומצה גלוקרונית.

בתוך התאים יש עמילן, פולימר של גלוקוז המחובר בקשרי 1→4. העמילן והתוצרים המופקים מעמילן חשובים מאד לתעשייה לשימושים רבים הכוללים מזון, תרופות ויישומים ביו טכנולוגים נוספים. גרגירי העמילן נמצאים סביב הכלורופלסט בפירנואידים ובתילאקואיד²⁶. תכולת העמילן ב- *Ulva sp.* משתנה בהתאם לעונה ויכולה להגיע עד ל-32% מהמשקל היבש²⁷. פחמימה נוספת המצויה ב-*Ulva sp.* וייחודית לה היא האולבן (*Ulvon*) - פולימר המורכב בעיקר מרמנוז וכן מחומצות אורניות. המבנה של האולבן אופייני אך מחקר על ההפקה שלו ותכונותיו נמצא עדיין בשלבים ראשוניים²⁸.

1.5 שלבים בהפקת אתנול מאצת *Ulva sp.*

הפקת אתנול מאצות, בניגוד לביו-מסה אחרות, דורשת מספר שלבים (איור 3). בפרק זה אסקור את השלבים להפקת האתנול ואציג מחקרים ושיטות מרכזיות שנעשו על כל שלב.

שלבי הפקת האתנול מתוארים בתרשים הבא:



איור 3 - תרשים הפקת ביו-אתנול מאצת *Ulva sp.*

1.5.1 גידול אצת *Ulva sp.*

מאקרו-אצות ובכללן ה-*Ulva sp.* ניתן לגדל הן על היבשה (onshore) והן בים (offshore). על החיסרון שבגידול על קרקע הרחבנו בפרקים הקודמים ולכן גידול *Ulva sp.* בכמויות מסחריות בצורה ברת קיימא מוטב לבצע בים וגם על היתרונות שבזה הארכנו בפרקים הקודמים. גידול *Ulva sp.* בצורה מסחרית בים התחיל בארה"ב בשנות ה-70 במשבר האנרגיה העולמי בפרויקט שנקרא "Ocean Food and Energy Farm Project". התוכנית בהמשך עברה לצרכי אנרגיה בלבד. תוך כדי הגידול נלמדה המורכבות של המערכת הביולוגית הימית ונמצאו דרכים לשיפור החקלאות הימית²⁹. למרות הצלחות מסוימות עובדי הפרויקט לא הצליחו להתגבר על כל המכשולים ובעיקר על התאמת מערכת הגידול לאצות ובשל כך התוכנית הופסקה. בתחילת שנות האלפיים המשיך המחקר על גידול של ביומסה בים³⁰.

גידול *Ulva sp.* במזרח התיכון, Korzen et al (2016)²⁷ גידלו *Ulva sp.* בים מול חוף מכמורת, ישראל. את ה-*Ulva sp.* הם גידלו בכלובים המכוסים רשת ניילון, 22 מטר במורד הזרם של כלובי דגים שסיפקו לאצות חומר הזנה. שיעור הגידול המקסימאלי של האצות הגיע ל-16.8% ליום לאורך שבועיים.¹⁹ Chemodanov et al (2017) גידלו *Ulva sp.* בסמוך לתחנת הכוח

רידניג תל אביב, ישראל. קצב הגידול היומי הממוצע שנמדד הוא $4.5 \pm 1.1\% \text{ gr DW m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ וממוצע גידול שנתי בכלובים בשיעור של: $5.1 \pm 1.5\% \text{ gr DW m}^{-2} \text{ day}^{-1}$.

1.5.2 יבוש וטחינה של אצת *Ulva sp.*

לאחר קצירת האצה יש צורך ליבש אותה על מנת להגיע לחומר יבש. בניסוי שערכתי האצה התייבשה בחוץ במקום מוצל במשך שלושה ימים ולאחר מכן במשך חצי יממה בתנור בחום של 40 מעלות צלזיוס. יבוש אידיאלי של אצה הוא לרמה של פחות מ-22% לחות¹⁹.

הטחינה של האצה נועדה בעיקר על מנת להגדיל את שטח הפנים שלה להגברת היעילות של השלבים הבאים.³¹ Postma et al (2017) בחנו מה גודל החלקיק האופטימלי של שלושה סוגי אצות על מנת למצות חלבונים ופחמימות בהשריה במים בלבד. תוצאות המחקר הראו שחלקיקים בגודל 0.3-0.4 מ"מ הם היעילים ביותר הן מבחינת כמות החלבונים והפחמימות והן מבחינת מאזן אנרגטי בין ההשקעה בטחינה לאנרגיה שניתן להפיק.

1.5.3 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.*

הידרוליזה היא פירוק של פולימר למונומר באמצעות תגובה עם מולקולת מים. במקרה שלנו אנו מעוניינים לפרק רב סוכר (צלולוז, המיצלולוז, עמילן ואולבן) לחד סוכר (רמנוז, גלקטוז, גלוקוז, פרוקטוז, קסילוז וחומצה גלוקורונית). אנו מחלקים את תהליך פירוק האצה לטיפול מקדים הכולל פירוק על ידי חומר כימי או פעולה הידרותרמית ולאחר מכן הידרוליזה על ידי אנזימים. עם זאת, הטיפול המקדים וההידרוליזה אינם תלויים זה בזה וניתן לעשותם בנפרד.

טיפול כימי- הטיפול המקדים השכיח ביותר נעשה בעזרת חומצה או בסיס חזקים. Jiang et al.³² (2016) ו-³³ Wang et al (2011) בחנו מהו הטיפול המקדים על ידי חומצה היעיל ביותר. הם בדקו מספר פרמטרים הקשורים לטיפול המקדים הכוללים: ריכוז משתנה של חומצה, זמן הרתחה וטמפרטורות וכן עומס מוצקים (solid load). המסקנה שלהם הייתה שבעומס מוצקים של 15% עם 2% של חומצה גופרתית (H_2SO_4) ב- 121°C למשך 30 דקות ניתן להפיק את כמות הסוכרים הגבוהה ביותר. הידרוליזה כימית היא יעילה ונוחה מאוד מבחינת יעילות התהליך עקב הזמן הקצר שנדרש והתשואה הגדולה אך בשימוש בחומרים אלו ישנם סיכונים רבים הן לבני האדם והן לסביבה שיש לקחת בחשבון²⁵.

טיפול הידרותרמי בתת לחץ- טכנולוגיה לפרוק של ביומסה באמצעות שימוש במים בטמפרטורה גבוהה מאד בתנאים של תת לחץ. בשיטה הידרותרמית בטמפרטורה של $100-100^\circ\text{C}$ ניתן לפרק ביומסה למגוון מוצרים. פירוק של אצת *Ulva sp.* נעשתה על ידי Lee et al.³⁴ (2013). הם פירקו *Ulva sp.* בטווח טמפרטורות של $100-200^\circ\text{C}$ למשך 2-12 דקות וקיבלו

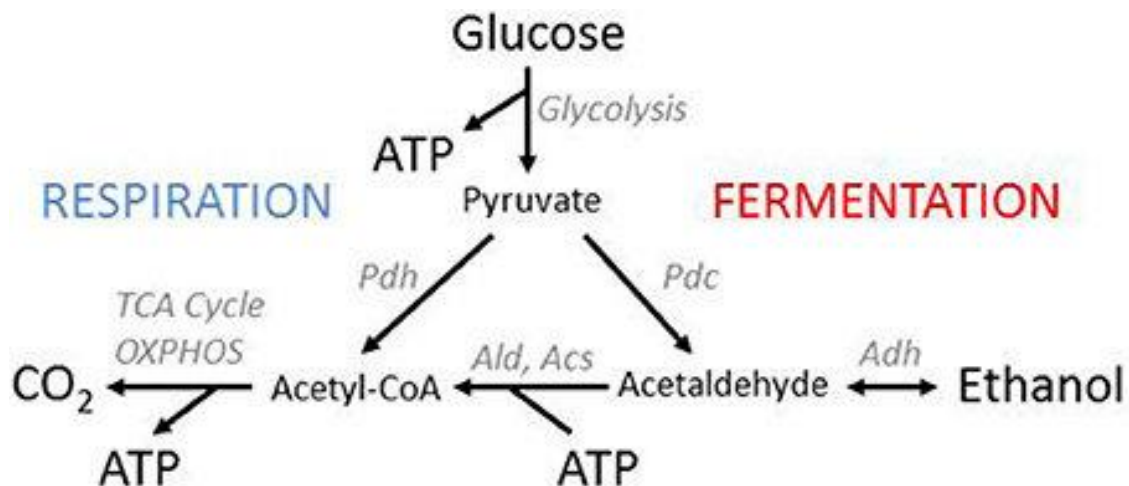
תשואת גלוקוז מקסימאלית של 8.5% מהחומר היבש. הידרוליזה הידרותרמית של אצות ירוקות אינה כרוכה בכימיקלים מסוכנים ולכן יכולה לשמש צעד 'ירוק' ראשוני בתהליך התסיסה. עם זאת, טכנולוגיה זו אינה יעילה מספיק ולכן נעשה בה פחות שימוש.

אנזימים: הידרוליזה אנזימטית של ביומסה כרוכה בתגובה ביוכימית של אנזים לפירוק צלולוז ועמילן לגלוקוז. אנזימים לפירוק עמילן הם נפוצים מאד ואף נמצאים ברוק אנושי ומשמשים לפירוק העמילן במזון שאנו אוכלים.³⁵ אנזימים לפירוק צלולוז נפוצים מאד בקיבות של בע"ח המסוגלים לפרק צלולוז (בקר, סוסים וכו.).¹⁶ Poespowati et al (2013) הראו שהפקה של הכמות הגדולה ביותר של אתנול, 7.7% נפחי, הם הצליחו להפיק על ידי הידרוליזה אנזימטית שבאה אחרי טיפול מקדים בחומצה. בטיפול המקדים הם השתמשו בחומצה גופרתית 2% ואח"כ באנזים ביתא עמילז (beta-amylase).³³ Wang et al (2011) ביצעו גם הם הידרוליזה לאחר טיפול מקדים בחומצה. לאחר הטיפול המקדים (2% חומצה גופרתית למשך 30 דקות ב-120 °C) הם קיבלו 4.8 mg/g גלוקוז מהאצות הטירות ולאחר טיפול אנזימטי הם קיבלו 13.8% גלוקוז מהאצות. לעומתם,³⁶ Trivedi et al (2013) בדקו מגוון הידרוליזות והראו שטיפול ראשוני בחום (ללא חומצה) של 120 °C במשך שעה ולאחר מכן הידרוליזה אנזימטית למשך 36 שעות ב-45°C נתן תשואה מקסימאלית של 206.82±15 mg/g סוכרים.

1.5.4 התססה של אצת *Ulva sp.* להפקת ביו-אתנול

תהליך התסיסה, נשימה בתנאים אנאירוביים (איור 4), הינו תהליך שכיח בטבע שקורה הן ביצורים אאוקריוטיים והן ביצורים פרוקריוטיים.

השלב הראשון בתהליך התסיסה האנאירובי הוא הגליקוליזה, תהליך שבו מולקולת גלוקוז מחולקת לשתי מולקולות פירובט בתהליך שבו משתחררים ATP ו-NADH³⁷. לאחר מכן מתרחש מחזור של מולקולת ה-NADH (כלומר המרה מחדש ל-NAD⁺) כדי לחדש את תהליך הגליקוליזה. ייצור אנרגיה מתבצע במהלך הגליקוליזה.³⁸ מחזור של מולקולת NADH ל-NAD⁺ בתסיסה מתרחש במקביל להפיכה של הפירובט לחומר מוגמר שיוצא מהתהליך, בתסיסה אלכוהולית הוא הופך לאתנול ופחמן דו חמצני. יש עוד עשרות מסלולים מטבולים שבהם מיקרואורגניזמים מבצעים תהליך של תסיסה, מה שגורם להבדל בין התהליכים הוא נוכחות או היעדר אנזימים.³⁹ כדי לבצע תסיסה אלכוהולית למשל, על האורגניזם לייצר אנזים Pyruvate dehydrogenase, אשר למעשה הוא מבצע את תהליך התסיסה האלכוהולית.



איור 4- מסלול נשימה תאית בשמר

תהליך התססה של מדיום יכול להתבצע בשתי דרכים מקובלות: שיטה ראשונה המוכרת כ- Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) [הידרוליזה ותסיסה בנפרד]. היתרון של השיטה הוא שניתן לאפשר לאנזימים תנאים אופטימליים מבחינת טמפרטורה ו-pH (טמפרטורה אידיאלית לרוב האנזימים היא 40-50 °C לעומת מיקרואורגניזמים שפועלים בטווח טמפרטורות של 30-37 °C. כמו כן ה-pH האופטימלי לאנזימים נמוך יותר מאשר ל- *S. cerevisiae* ו-*E. coli*: 4.5 לעומת 5.5 ו-7 בהתאמה). לאחר מכן בשלב התסיסה ניתן לתת לאורגניזם את התנאים האופטימליים להם הוא זקוק. בשיטה זאת ניתן למדוד את כמות הסוכרים המתקבלת לאחר שלב ההידרוליזה, פעולה שרלוונטית בעיקר למחקר. מנגד, החיסרון של השיטה הוא שתהליך התסיסה וההידרוליזה לוקח יותר זמן ויש לכך משמעותיות כלכליות. השיטה השנייה היא: Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) [הידרוליזה ותסיסה במקביל]. היתרון הגדול של השיטה הוא חיסכון בעלות ובזמן. לעומת זאת, כפי שכתבנו, האנזימים לא נמצאים בתנאים אופטימליים וזה משפיע על יעילות ותפוקת ההידרוליזה^{40,41}.

המיקרואורגניזם המתסיס הטוב ביותר הוא ה-*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) המוכר גם כשמר הבית (לאפיית לחם והפקת בירה). ל-*S. cerevisiae* יכולת להתסיס עם תשואת אתנול גבוהה את הסוכרים גלוקוז, פרוקטוז ומנוז². מיקרואורגניזמים נוספים הידועים כמתסיסים יעילים הם מינים של קלוסטרודיום המסוגלים להפיק אצטון, בוטאנול ואתנול (ABE) על ידי תסיסה אנאירובית ממגוון רחב של סוכרים⁴².

Escherichia coli (*E. coli*) הוא מהחיידקים הנחקרים בעולם. אף על פי שהוא לא מתסיס יעיל כמו ה-*S. cerevisiae* היתרון שלו הוא היכולת לסנתז אנזימים המסוגלים לצרוך מגוון רחב של סוכרים. מודל ממוחשב שנעשה על הגנום של ה-*E. coli* WT (*E. coli* k-12 mg1655), בדק את המערכות המטבוליות שלו ואת יכולתו לגדול על מצע של סוכרים שונים. תוצאות המודל הראו שהחיידק מסוגל לצרוך מגוון סוכרים הכוללים את הסוכרים שמתקבלים מההידרוליזה של *Ulva* sp.⁴³ בהתבסס על המודל המוצג במאמר ביססנו את ההנחה ש-*E. coli* מסוגל לצרוך את הסוכרים שבאצה. *E. coli* הוא חיידק נחקר ולכן אפשר לבצע בו שינויים גנטיים רבים. *E. coli* שעבר הנדסה גנטית מסוגל לפרק בצורה טובה יותר מגוון רחב של חד סוכרים ולייצר מהם אתנול.⁴⁴ Kim et al (2011) התסיסו אצת *Ulva* sp. עם *E. coli* אתנוגנטי (*E. coli* k-11) שמשוגל לצרוך את מגוון הסוכרים באצה, בסוף התסיסה התקבל 0.4 g /g sugar אתנול. בשונה מהניסויים שאני ערכתי, אצל קים להידרוליזת האצות הוסף מצע עשיר של LB הכולל גלוקוז yeast extract לפני שלב התסיסה שאפשרו ל-*E. coli* לפעול בתנאים נוחים יותר.

טבלה 1- מציגה תוצאות של מחקרים שהפיקו אתנול מ-*Ulva* sp. בעזרת שימוש במיקרואורגניזמים שונים. שימוש ב-*S. cerevisiae* כמתסיס הראה את התשואה הגבוהה ביותר.

טבלה 1 - הפקה של אתנול מאצת *Ulva* sp. על ידי מיקרואורגניזמים שונים

Species	Hydrolysis method	Total sugar (mg/g DW Algae)	Microorganism	Ethanol yield (g/g sugar)	Reference
<i>U. lactuca</i>	Acid + Enzyme	343	<i>Clostridium beijerinckii</i>	0.4	⁴⁵
<i>Ulva</i> sp.	Enzyme	200	<i>E. coli</i> Ko11 ¹	0.4	⁴⁴
<i>U. fasciata</i>	Hot buffer + Enzyme	± 112	<i>S. cerevisiae</i> MTCC No. 180	0.47	⁴⁶
<i>U. lactuca</i>	Acid	113	<i>S. cerevisiae</i>	0.55	⁴⁷
1. <i>E. coli</i> ko11 was modified to allow more efficient sugars utilization					

1.5.5 זיקוק אתנול

לאחר התסיסה האתנול שמתקבל מעורבב בתוך תמיסה שרובה מים ויש צורך להפריד את האתנול מהמים ולזקק לרמה של 95%⁵ על מנת שיוכל לשמש כדלק לכלי רכב. תהליך הזיקוק

מורכב מכמה שלבים. בשלב הראשון מחממים את הנוזל לטמפרטורה של $75-100^{\circ}\text{C}$ מעלות תחת תנאים של תת לחץ. מכיוון שטמפרטורת האידוי של האתנול היא 75°C אתנול מתאדה לפני מים^{8,48} ומכיוון שהמערכת בתת לחץ הוא נשאב החוצה מהמיכל ועובר דרך עמודת קירור שהופכת חזרה את האדים לנוזל, אשר מתנקז לכלי אחר.

תהליך הזיקוק הוא תהליך מורכב מכמה סיבות:

1- יש לחמם את הנוזל לטמפרטורה גבוהה (תלוי בשיטת הזיקוק אך בין $75-100^{\circ}\text{C}$), תהליך שצורך הרבה אנרגיה⁴⁹.

2- על מנת להוציא את כל האתנול מהתמיסה יש צורך לאדות גם הרבה מים ולכן לאחר הזיקוק עדיין האתנול שיתקבל יהיה בריכוז נמוך, מה שיגרום לכך שנצטרך לחזור על התהליך מספר פעמים⁴⁸.

ישנם מספר פתרונות על מנת לייעל את תהליך הזיקוק והם מתחלקים לשתי קבוצות:

1- טיפול בנוזל. פתרון זה כולל הזרמה של בועות אוויר תוך כדי תהליך הזיקוק על מנת להפריד בין מולקולות המים לאתנול ולאפשר בכך שהאתנול יתאדה ללא שיתאדו כמויות גדולות של מים במקביל. ישנה גם אפשרות להוסיף לתמיסה חומרים כימיים שיאפשרו לאתנול להתאדות בצורה טובה יותר⁸.

2- מזקקות מורכבות- הפתרון השני לייעול הזיקוק הוא בניית מזקקות ייעודיות שקירור האדים נעשה בהם בכמה שלבים, כך המים שמתאדים במקביל לאתנול מתקררים, נהפכים לנוזל וחוזרים לתמיסה מבלי לעבור לכלי הקיבול של האתנול.

בעזרת שיטות אלו ניתן בזקוק ראשון להגיע לריכוז אתנול של 35% ובזיקוק השני ל-95%⁸.

2 פערי ידע בתחום ההידרוליזה והתסיסה של אצת *Ulva sp.*

ישנם אתגרים רבים בתחום הפקת אתנול מאצות שהמחקר מתמודד איתם. במחקר זה התמודדנו עם שני פערים שקשורים להפקת אתנול: פירוק פחמימות מורכבות והתססת מגוון סוכרים.

פירוק פחמימות מורכבות: פרוק אצות הוא מורכב מכיוון שיש באצות בנוסף לעמילן אחוז גבוה של צלולוז, המי-צלולוז ואולבן, שהינם פחמימות מורכבות ועל מנת להפיק מהם חד סוכרים יש לבצע טיפול מקדים והידרוליזה. תהליכים אלו מורכבים, יקרים וגם יכולים לפגוע בסביבה²⁵. בנוסף, ההידרוליזה צריכה להיעשות באופן שלא תפגע בהמשך בשלבי התסיסה⁸.

התססת מגוון סוכרים- הפער השני, שנובע באופן ישיר מסוגיית הפחמימות המורכבות, הוא מגוון הסוכרים המתקבל. צלולוז מכיל גלוקוז. המיצולוז מכיל גלוקוז, קסילוז, חומצה גלוקורונית וכן כמויות קטנות של גלקטוז ופרוקטוז. עמילן מכיל גלוקוז. אולבן מכיל רמנוז וכמויות קטנות של חד סוכרים נוספים. יוצא שבסופו של דבר אמנם מתקבלת כמות גדולה של סוכרים אך היא כוללת שישה סוגים: רמנוז, גלקטוז, גלוקוז, קסילוז, פרוקטוז, וחומצה גלוקורונית^{50,51}. גלוקוז הוא חד הסוכר שנמצא אצה בכמות הגדולה ביותר (37%), לאחר מכן חומצה גלוקורונית (20%), רמנוז (21%) קסילוז (14%) ובכמויות קטנות מאוד גלקטוז (1-2%) ופרוקטוז (0-1%).

S. cerevisiae, המתסיס הטוב ביותר, מסוגל לצרוך ולהתסיס לאתנול רק גלוקוז ופרוקטוז. יוצא מזה שבהתססה של הידרוליזת אצות על ידי *S. cerevisiae* רק 40% מהסוכרים נצרכים, כפי שהראו Jiang et al (2016)²⁸ אשר סקרו מחקרים שהפיקו ביו-אתנול מאצות לאורך עשר שנים. במסקנות הם מציינים שאמנם כמות הסוכרים ב-*Ulva sp.* היא גבוהה, אך רמנוז מהאולבן וקסילוז מההמיצלולוז מהווים אחוז גבוה מכמות זו וה-*S. cerevisiae* אינו מסוגל לצרוך אותם. מכיוון שכך, כמות האתנול שהתקבלה נמוכה יחסית לכמות הסוכרים הנמצאים ב-*Ulva sp.*

מנגד, שימוש באורגניזם שמסוגל לצרוך את הסוכרים ש-*S. cerevisiae* לא צורך, כדוגמת *E. coli*, יביא לכך שתשואת האתנול המתקבלת תהיה נמוכה מכיוון שיכולת ההמרה של סוכר לאתנול ב-*E. coli* היא נמוכה בהרבה מאשר ב-*S. cerevisiae*^{44,52}.

פרמטרים נוספים שלא נבחנו במסגרת התזה אך יכולים לגרום לכך שתפוקת האתנול תהיה נמוכה יחסית הם מליחות ותוצרי פירוק רעילים. מכיוון שהאצות גדלות במים מלוחים הן סופחות את המלחים ולכן ההידרוליזת עלול להיות עם רמת מלחים גבוהה מזו שאופטימאלית למיקרו אורגניזם. דבר זה עלול לעכב את גידול המיקרואורגניזם ואת הפקת הביו-אתנול. רעלים

שנוצרים בפרוק של האצה כגון Hydroxymethylfurfural (HMF) עלולים לגרום גם הם לעיכוב בגידול של מיקרואורגניזמים^{53,54}.

3 מטרות המחקר

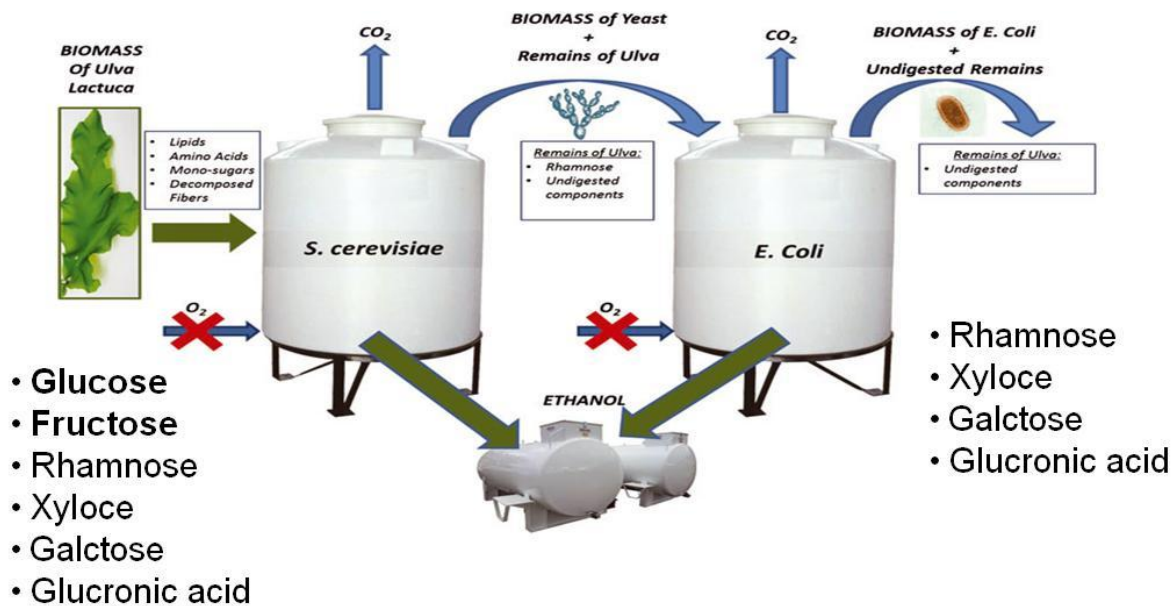
- הגדלת תשואת האתנול המתקבלת מהתססת *Ulva* sp.
- בחינת ההיתכנות של תסיסה דו שלבית להפקת אתנול מ- *Ulva* sp.
- מציאת השילוב הטוב ביותר של מיקרואורגניזמים לתסיסה דו שלבית
- מציאת ההידרוליזה שתפיק מהאצה את מירב הסוכרים.
- בדיקת היתכנות של תסיסה דו שלבית בתסיסה בנפח של 1 ליטר.

4 השערת המחקר

השערת המחקר היא שעל ידי שימוש בפרמטרים ותהליכים מסוימים במהלך ההידרוליזה נגדיל את כמות הסוכרים שניתן יהיה להפיק מאצת *Ulva* sp. לשם כך נבצע אופטימיזציה של תהליך ההידרוליזה. בנוסף, תסיסה דו שלבית באמצעות *S. cerevisiae* ו- *E. coli* תעלה את כמות האתנול שניתן יהיה להפיק מאצת *Ulva* sp. תוך ניצול מקסימלי של מגוון הסוכרים שהתקבלו בהידרוליזה

אנו מציעים תסיסה בשני שלבים, כאשר בכל שלב של תסיסה נשתמש במיקרואורגניזם שמסוגל לצרוך סוג אחר של סוכרים.

עקרון הפעולה: בשלב הראשון התססנו את ההידרוליזת עם המיקרואורגניזם שמסוגל לייצר הכי הרבה אתנול. אותו מיקרואורגניזם ייצרוך את כל הסוכרים שהוא מסוגל. בשלב השני נזקק מהתמיסה את הביו-אתנול, נהרוג את המיקרואורגניזם המתסיס ונבצע תסיסה מחדש עם אורגניזם אחר שמסוגל לפרק את יתר הסוכרים שנשארו וכן חומרים שהתפרקו מהמיקרו אורגניזם מהשלב הראשון. לאחר התסיסה השנייה נזקק שוב את האתנול שהתקבל (איור 5).



איור 5 - תרשים של תסיסה דו שלבית⁴⁰

5 מהלך העבודה, סקירה כללית

המחקר נערך בשלושה שלבים:

5.1 טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית

במסגרת המחקר בדקנו מהם הטיפול המקדים וההידרוליזה הטובים ביותר על מנת שנקבל את כמות הסוכרים הגבוהה ביותר. לשם כך בחנו שלושה טיפולים מקדימים: טיפול עם חומצה, טיפול עם חום וטיפול הידרו-תרמי בתת לחץ. בנוסף בדקנו הידרוליזה על ידי מספר אנזימים בכל מיני קומבינציות וכן כהידרוליזת המשך לטיפול המקדים. בשלב הבא בדקנו מה אחוז המוצקים שבזמן טיפול מקדים והידרוליזה יפרק את כמות הסוכרים הגדולה ביותר (כמות הסוכרים דווקא ולא אחוז הסוכרים). בשלב הבא בדקנו איזה גודל חלקיק עובר הידרוליזה בצורה הטובה ביותר. בסופו של דבר מצאנו את ההידרוליזה הטובה ביותר שעונה על הצרכים שלנו ושניתן בעזרתה להפיק את כמות הסוכרים הגדולה ביותר.

5.2 תסיסה דו שלבית

לאחר סיום שלב ההידרוליזה ולאחר שקיבלנו את תוצאות כמויות הסוכרים והבנו איזה הידרוליזה היא הכי אפקטיבית בשבילנו לצורך ההתססה עברנו לשלב התסיסה. מטרת הניסוי היא לבחון מהי הקומבינציה הטובה ביותר לתסיסה דו שלבית. בניסוי התסיסה הדו שלבית ערכתי את הניסוי פעמיים, ניסוי 1 נערך בהתאם למסקנות שעלו מתהליך ההידרוליזה, ניסוי 2 נערך בהתאם למסקנות שהתקבלו לאחר ניסוי 1.

5.3 הפקת אתנול בנפח גדול

השלב הסופי של המחקר היה לבחון את תהליך הפקת האתנול בנפח גדול יותר של 1L. השתמשנו בפרמטרים הטובים ביותר שהתקבלו בכל שלב וביצענו הפקת אתנול מלאה. לקחנו אצות שגדלו בים עם כמות הסוכרים הגדולה ביותר, ביצענו הידרוליזה בשיטה ובעומס מוצקים שראינו שהם הטובים ביותר, ערכנו תסיסה דו שלבית בפרמטרים ובזמן שהוכחו כיעילים ביותר. את תהליך התסיסה ביצענו בתוך פרמנטור ייעודי שמנתר חמצן, pH וטמפרטורה כל הזמן כך שניתן היה לעקוב באופן רציף אחרי התסיסה. לאחר כל שלב בתסיסה ביצענו במקביל לבדיקת האתנול גם זיקוק של האתנול.

6 שיטות וחומרים

6.1 טיפול מקדים והידרוליזה לאצת *Ulva sp.*

6.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית

לצורך אופטימיזציה של ההידרוליזה בדקנו שלושה אפשרויות לטיפולים מקדימים (לאחר הכנסת האצות למבחנות האצות עברו אוטוקלב במצב יבש):

1- הידרוליזה עם חומצה: 1 מ"ל של 2% חומצה גופרתית (H_2SO_4) (סיגמה-אולדריץ, ישראל) הוסף למבחנת 10 מ"ל עמידה לאוטוקלב עם 50mg (עומס מוצקים 5%) אצת *Ulva sp.* יבשה טחונה בגודל של $0.125 \leq d < 0.25$ mm. לאחר מכן המבחנה עברה אוטוקלב $120^\circ C$ למשך חצי שעה. לאחר שהמבחנה התקררה לטמפרטורת החדר, הוספנו $165 \mu\text{g/ml}$ של בופר פוספט (phosphate buffer 0.5 M) (סיגמה-אולדריץ, ישראל) וסתרנו את החומצה עם 3M NaOH (סיגמה-אולדריץ, ישראל) ל-pH 5.5.

2- הידרוליזה על ידי חימום: 1mL סודיום אצטט (sodium acetate) (סיגמה-אולדריץ, ישראל) $200 \mu\text{g}$ הוסף למבחנת 10 mL עמידה לאוטוקלב עם 50 mg (עומס מוצקים 5%) אצת *Ulva sp.* יבשה טחונה בגודל של $0.125 \leq d < 0.25$ mm. לאחר מכן המבחנה עברה אוטוקלב $120^\circ C$ למשך חצי שעה.

3- הידרוליזה על ידי חימום בלחץ גבוה: ההידרוליזה הוכן באמצעות ריאקטור מנתי בנפח של 0.25L. לריאקטור הוכנסה תערובת של 4g אבקת אצה עם 80mL מים מזוקקים. לאחר מכן הריאקטור חומם לטמפרטורה של $170^\circ C$ למשך 60 דקות. לאורך הניסוי התערובת עורבבה על ידי בוחש בתדירות של 70 RPM. לאחר שהריאקטור התקרר לטמפרטורת החדר ההידרוליזה פולטר בפילטר $22 \mu\text{m}$ והוכנס למבחנת 10mL עמידה

לאוטוקלב. (שלב זה נעשה ע"י סמיון גרייסרמן סטודנט לתואר שני במעבדה לביו-הנדסה סביבתית של ד"ר אלכסנדר גולברג.)

4- ללא טיפול מקדים: 1mL סודיום אצטט 200µm הוסף למבחנת 10mL עמידה לאוטוקלב עם 50mg אצת *Ulva sp.* יבשה טחונה (עומס מוצקים 5%).

בשלב השני לאחר כל אחד מהטיפולים המקדימים נעשתה גם הידרוליזה אנזימתית (למעט הבקרה) על ידי שלוש קומבינציות של אנזימים. את האנזימים מהסטוק הוספנו לבופר אצטט 200µm ואת הבופר עם האנזימים הוספנו להידרוליזתים שעברו טיפול מקדים.

קבוצות האנזימים (סיגמה-אולדריץ, ישראל) בהן השתמשנו :

Viscozyme: אנזים Viscozyme (v2010) בנפח של 33µg/mL מסטוק

Mix: 0.52 U amyloglucosidase, 0.7 U α-amylase, ואנזים 5.8 U cellulase מסטוק.

All: שילוב של אנזימים: Viscozyme +MIX.

את ההידרוליזת עם האנזימים שמנו באינקובטור למשך 24 שעות בטמפרטורה של 45 °C ב-150RPM. לאחר האינקובציה המבחנות נשקלו ונלקחה דגימת סוכר^{36,56}. לדוגמאות ללא האנזימים הוספנו 1mL סודיום אצטט.

את סיכום ההידרוליזות ניתן לראות בטבלה 2. לאחר האינקובציה נלקחה דגימת סוכרים של 100µm והם נמדדו ב-HPLC (שיטת מדידת הסוכרים נמצאת בפרק 6.4.1, פרוטוקול הפעלת ה-HPLC נמצא בנספחים 12.1). כמו כן, מכיוון שגם בתמיסה של האנזימים יש סוכר בכל הידרוליזה בשלב זה ובכל השלבים הבאים נלקחה גם דגימה מהאנזימים לצורך בדיקת סוכר.

טבלה 2 - טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.*

Name	Drying (°C)	Solid load	Heat acid	Heat (buffer)	Hydro-thermal	Temperature	Time heating (min)	Enzyme	Solid load	Temperature	Enzyme incubate (hr)
Acid	40	5	v			121	30		2.5		
Acid + Viscozyme	40	5	v			121	30	viscozyme	2.5	45	24
Acid +mix	40	5	v			121	30	mix	2.5	45	24
Acid +all	40	5	v			121	30	all	2.5	45	24
Heat	40	5		v		121	30		2.5		
Heat + Viscozyme	40	5		v		121	30	viscozyme	2.5	45	24
Heat + mix	40	5		v		121	30	mix	2.5	45	24
Heat + all	40	5		v		121	30	all	2.5	45	24
No pretreatment + Viscozyme	40	5						viscozyme	2.5	45	24
No pretreatment + mix	40	5						mix	2.5	45	24
No pretreatment + all	40	5						all	2.5	45	24
Hydro-thermal	40	5			v	170	60		2.5		
Hydro-thermal+ Viscozyme	40	5			v	170	60	viscozyme	2.5	45	24
Hydro-thermal+ mix	40	5			v	170	60	mix	2.5	45	24
Hydro-thermal+ all	40	5			v	170	60	all	2.5	45	24

6.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.* בעומס מוצקים משתנה

לאחר סיום שלב ההידרוליזה לקחנו שלוש הידרוליזות שבהן קיבלנו את אחוז הסוכרים הגבוה ביותר ובדקנו את ההשפעה של עומס המוצקים על ההידרוליזה. ההידרוליזות שנבחרו הן:

- Acid+ Viscozyme
- Acid +all
- No pretreatment+ all

ההידרוליזות נעשו בעומסי מוצקים של 10%, 15% ו-20% באותו תהליך שמתואר בפרק 6.1.1.
 סיכום ניסוי עומס מוצקים מופיע בטבלה 3.

טבלה 3 - ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva* sp. בעומס מוצקים משתנה

Name	Drying (°C)	Solid load	Heat acid	Temperature	Time heating (min)	Enzyme	solid load	Temperature	Enzyme incubate (hr)
acid + Viscozyme	40	10	V	121	30	Viscozyme	5	45	24
acid + Viscozyme	40	15	V	121	30	Viscozyme	7.5	45	24
acid + Viscozyme	40	20	V	121	30	Viscozyme	10	45	24
acid +all	40	10	V	121	30	all	5	45	24
acid +all	40	15	V	121	30	all	7.5	45	24
acid +all	40	20	V	121	30	all	10	45	24
No pretreatment + all	40	10				all	5	45	24
No pretreatment+ all	40	15				all	7.5	45	24
No pretreatment+ all	40	20				all	10	45	24

6.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.* בגודלי חלקיקים שונים

בניסוי נבדקה השפעת גודל החלקיקים על תהליך ההידרוליזה: ההידרוליזה שנעשתה היא Acid+ All enzyme כפי שמתואר בפרק 6.1.1, בעומס מוצקים של 20%. לצורך הניסוי השתמשנו באצות יבשות שנטחנו ל-7 גדלים שונים שניתן לראות בטבלה 4. דוגמא להבדלים בין גודלי החלקיקים נמצאת באיור 6.



איור 6 - גודל חלקיקים של אצה *Ulva sp.*

A: אצות טחונות לחלקיקים בגודל ≥ 4 מ"מ. B: אצות טחונות לחלקיקים בגודל $0.5 \geq * > 2$ מ"מ. C: אצות טחונות לחלקיקים בגודל $0.063 > * > 0.125$ מ"מ

טבלה 4 - גודל חלקיקים של אצות

Mesh - גודל הרשת בא השתמשו לסינון החלקיקים

#	(mesh)	(mm)
1	$* \geq 5$	$* \geq 4$
2	$5 > * \geq 10$	$4 > * \geq 2$
3	$10 > * \geq 35$	$2 > * \geq 0.5$
4	$35 > * \geq 60$	$0.5 > * \geq 0.25$
5	$60 > * \geq 120$	$0.25 > * \geq 0.125$
6	$120 > * \geq 230$	$0.125 > * \geq 0.063$
7	$230 > *$	$0.063 > *$

6.2 הפקת אתנול באמצעות התססה דו שלבית של אצות *Ulva sp.*

6.2.1 גידול וייבוש אצות *Ulva sp.*

אצות שגדלו בים מול תחנת הכוח רידינג בכלוב בנפח 2 קוב ונקצרו בתאריך 03.05.2017¹⁹ יובשו כשלושה ימים בחוץ באזור מוצל ולאחר מכן בתנור בחום של 40 °C למשך כמה שעות עד שאחוז הלחות היחסית בתוך האצה ירדה מ-22%. האצות נטחנו לגודל $0.125 \text{ mm} \geq * > 0.25$.

6.2.2 גידול המיקרואורגניזמים

S. cerevisiae (Ethanol Red, Batch 62186/2, 'Leaf', France) נלקח מסטוק -80 °C וגודל למשך לילה על צלחת YPD (Yeast extract, Peptone and Dextrose) באינקובטור 32 °C. מושבה בודדת הועברה למדיום של הידרוליזת מאצות (אצות עברו הידרוליזה של חומצה ו-Enzyme mix כפי שמתואר בפרק 6.1.1) למשך לילה שלם באינקובטור ב 150 RPM 32 °C.

חיידק *E. coli* K-12 MG1655 נלקח מסטוק -80 °C וגודל למשך לילה על צלחת LB (Lysogeny Broth) באינקובטור 37 °C. מושבה בודדת הועברה למדיום הידרוליזת אצות (אצות עברו הידרוליזה של חומצה ו-Enzyme mix כפי שמתואר בפרק 6.1.1) למשך לילה שלם באינקובטור ב 150 RPM 37 °C.

6.2.3 התססה דו שלבית של אצות *Ulva sp.*

6.2.3.1 ניסוי תסיסה דו שלבי מספר 1- הפרדה בין הנוזל למוצק בשלב ההידרוליזה האנזימתית.

הידרוליזה- לתוך מבחנת 50mL עמידה לאוטוקלב הוכנסו 2gr אצות יבשות. (עומס מוצקים 10%). נעשה טיפול מקדים על ידי חומצה H_2SO_4 20mL ולאחר מכן המבחנות עברו אוטוקלב 121 °C במשך 30 דקות. לאחר התקררות הנוזל הוסף 3.3mL פוספט בופר (0.5 M phosphate buffer) והחומצה נסתרה עם 3M NaOH ל-5 pH. לאחר מכן ההידרוליזה עבר צנטריפוגה במשך 10 דקות 4,500 RPM והנוזל הופרד ממוצקי האצות. הנוזל נשמר בקירור 4°C ומוצקי האצות עברו הידרוליזה אנזימתית (עומס מוצקים 10%) באמצעות Enzyme Mix. לכלי המכיל 20mL סודיום אצטט 200µM הוספו האנזימים: 36 U amyloglucosidase α-; 19 U amylase; 33 U cellulase. תמיסת האנזימים עברה בפילטר 22µm, עורבבה עם מוצקי האצות והוכנסה לאינקובטור ל-24 שעות 150 RPM 45 °C. לאחר מכן חוברו ביחד הנוזל מהטיפול המקדים שנשמר בינתיים בקירור ההידרוליזה שעבר הידרוליזה אנזימתית. לאחר החיבור ההידרוליזה המאוחד עבר צנטריפוגה ל-10 דקות 4,500RPM והופרד המוצק מהנוזל.

בשלב זה נלקחה דגימת סוכר ואתנול מן הנוזל. ההידרוליזת חולק למבחנות 10 mL עמידות לאוטוקלב, 3 mL בכל מבחנה. המבחנות עם הנוזל נשקלו.

תסיסה- בשלב הראשון של התסיסה לכל מבחנה המכילה 3mL הידרוליזת הוסף 75µL של סטרטר *E. coli* או *S. cerevisiae*, בהתאם לניסוי (**טבלה 5**). ההידרוליזת עם ה-*S. cerevisiae* הוטסו באינקובטור 32 °C, 150 RPM, 24 שעות. ההידרוליזתים המכילים *E. coli* הוטסו באינקובטור 37 °C, 150 RPM, 24 שעות. התסיסה התבצעה במבחנות אטומות בתנאים אנאירוביים (למעט חמצן התחלתי במבחנות). לאחר 24 שעות המבחנות נשקלו ונלקחה דגימה (200µL) מכל מבחנה לצורך בדיקת אתנול וסוכר. לאחר מכן ההידרוליזתים הוכנסו לכלי עם מים חמים (80 °C) למשך 25 דקות ללא פקק לצורך אידוי אתנול. ההידרוליזתים עברו אוטוקלב, נשקלו ונלקחה דגימה (200µL) מכל מבחנה לצורך בדיקת אתנול וסוכר.

בשלב השני של התסיסה לכל מבחנה של הידרוליזת הוסף 75µL של סטרטר (*E. coli* או *S. cerevisiae* בהתאם לניסוי) (**טבלה 5**). ההידרוליזתים עם ה-*S. cerevisiae* הוטסו באינקובטור 32 °C, 150 RP, 24 שעות. ההידרוליזתים עם ה-*E. coli* הוטסו באינקובטור 37 °C, 150 RPM, 24 שעות. לאחר 24 שעות ההידרוליזתים נשקלו ונלקחה דגימה (200µL) לצורך בדיקת אתנול וסוכר.

6.2.3.2 ניסוי תסיסה דו שלבי מספר 2- ללא הפרדה בין המוצק לנוזל לאחר הטיפול המקדים

הידרוליזה- לתוך בקבוק זכוכית 100mL הוספו 4g אצות יבשות (עומס מוצקים של 10%). mL 40 H₂SO₄ (2%) הוספו לבקבוק. לאחר מכן אוטוקלב 121 °C למשך חצי שעה, לאחר שהנוזל התקרר הוספו 6.6mL פוספט בופר (phosphate buffer 0.5 M) והחומצה נסתרה עם NaOH 3M ל-pH-5. לתוך Enzyme Mix (עומס מוצקים של 5%). לתוך 40mL של סודיום אצטט 200µM הוספו האנזימים: 72 U α-amylase ; 28 U cellulase ; 66 U. ההידרוליזת הוכנס לאינקובטור ל-24 שעות 45 °C 150 RPM. לאחר מכן נלקחה דגימת סוכר ואתנול. למבחנות ההידרוליזת הועבר למבחנות 10mL עמידות לאוטוקלב, 3mL בכל מבחנה. המבחנות עם הנוזל נשקלו.

תסיסה- לכל מבחנה של 3mL הידרוליזת הוסף 75µL של סטרטר *E. coli* או *S. cerevisiae* בהתאם לניסוי (**טבלה 5**). ההידרוליזתים עם ה-*S. cerevisiae* הוטסו באינקובטור 32 °C, 150 RPM למשך 24 שעות. ההידרוליזתים עם ה-*E. coli* הוטסו באינקובטור 37 °C, 150 RPM למשך 48 שעות. התסיסה התבצעה בתוך מבחנות אטומות בתנאים אנאירוביים למעט כמות החמצן הראשונית שנשארה במבחנה. לאחר כל 24 שעות המבחנות נשקלו ונלקחו 200µL

נוזל דגימה לצורך בדיקת אתנול וסוכר. לאחר שלב התסיסה הראשון ההידרוליזתים הוכנסו לכלי עם מים חמים בטמפרטורה של 80 °C למשך 30 דקות עם פקק פתוח לצורך אידוי אתנול. ההידרוליזתים עברו אוטוקלב, נשקלו ונלקחו 200µg נוזל דגימה לצורך בדיקת אתנול וסוכר. בשלב השני של התסיסה לכל מבחנה של הידרוליזת הוסף 75µg של סטרטר *E. coli* או *S. cerevisiae* בהתאם לניסוי (טבלה 5).

ההידרוליזתים עם ה- *S. cerevisiae* הוטסו באינקובטור 32 °C 150 RPM למשך 24 שעות. ההידרוליזתים עם ה- *E. coli* הוטסו באינקובטור 37 °C 150 RPM למשך 48 שעות. התסיסה התבצעה בתוך מבחנות אטומות בתנאים אנאירוביים. לאחר כל 24 שעות המבחנות נשקלו ונלקחו 200µg נוזל דגימה לצורך בדיקת אתנול וסוכר. לאחר שלב התסיסה השני ההידרוליזתים נשקלו ונלקחו 200µg נוזל דגימה לצורך בדיקת אתנול וסוכר.

טבלה 5 - סיכום ניסוי 1 ו-2, התססה דו שלבית לאצת *Ulva sp.*

Exp	Name	Hydrolysis	Step 1-organism	Fermentation (hr)	Ethanol evaporation (min)	Step 2-organism	Fermentation (hr)
1	Y-E 1	Acid + enzyme mix separately	<i>S. cerevisiae</i>	24	25	<i>E. coli.</i>	24
	Y-Y 1	Acid + enzyme mix separately	<i>S. cerevisiae</i>	24	25	<i>S. cerevisiae</i>	24
	E-Y 1	Acid + enzyme mix separately	<i>E. coli</i>	24	25	<i>S. cerevisiae</i>	24
	E-E 1	Acid + enzyme mix separately	<i>E. coli</i>	24	25	<i>E. coli.</i>	24
2	Y-E 2	Acid+ enzyme mix	<i>S. cerevisiae</i>	24	30	<i>E. coli.</i>	48
	Y-Y 2	Acid+ enzyme mix	<i>S. cerevisiae</i>	24	30	<i>S. cerevisiae</i>	24
	E-Y 2	Acid+ enzyme mix	<i>E. coli</i>	48	30	<i>S. cerevisiae</i>	24
	E-E 2	Acid+ enzyme mix	<i>E. coli</i>	48	30	<i>E. coli.</i>	48

6.3 הפקת אתנול בנפח 1L

אצות- אצות מזן *Ulva sp.*, נקצרו בתאריך 28.06.17. אצות שנקצרו בתאריך זה נמצאו מכילות את כמות הסוכרים הגבוהה ביותר⁵⁷. האצות יובשו 72 שעות באזור מוצל ולאחר מכן בתנור

(40°C) עד שהלחות היחסית בתוך האצה ירדה מ-22%. האצות נטחנו לגודל $0.125 \leq d < 0.25$ mm.

הידרוליזה- הידרוליזה בשיטת Acid+ Enzyme mix בעומס מוצקים 10% בשני כלי זכוכית 1L. לכל כלי הוספו 25g אצות יבשות ובנוסף 250mL חומצה H_2SO_4 (2%) והם עברו אוטוקלב 121 °C, 30 דקות. לאחר התקררות הנוזל הוכנס 42mL פוספט בופר (phosphate buffer 0.5 M) לכל בקבוק והחומצה נסתרה עם 3M NaOH ל-pH-4.5. הידרוליזה אנזימתית נעשתה באמצעות Enzyme Mix. אנזימים בנפחים הבאים: α -amylase, 897U amyloglucosidase, 830U cellulase, 354 הוכנסו לתוך 500mL סודיום אצטט $200 \mu M$. לכל כלי זכוכית המכיל הידרוליזת הוסף 250mL מתמיסת האנזימים. ההידרוזילתים הוכנסו לאינקובאטור למשך 24 שעות $45^\circ C$ 150 RPM. לאחר מכן נלקחו דגימות סוכר ואתנול.

גידול מיקרואורגניזמים - גידול *S. cerevisiae* ו-*E. coli* כמפורט בפרק 6.2.2.

תסיסה שלב ראשון על ידי *S. cerevisiae* - ההידרוזילת הועבר לפרמנטור מדגם MINIFOR (LAMBDA MINIFOR, Switzerland) (איור 7) שעבר אוטוקלב. pH התמיסה הועלה ל-5.5 על ידי הוספת 3M NaOH ולאחר מכן הוסף 25mL של *S. cerevisiae* מסטרט. התסיסה התקיימה בתנאים אנאירוביים במשך 24 שעות $32^\circ C$ מהירות בחישה של 8Hz. טמפרטורה ו-pH נמדדו בצורה רציפה, אתנול וסוכר נמדדו לאחר 24 שעות.

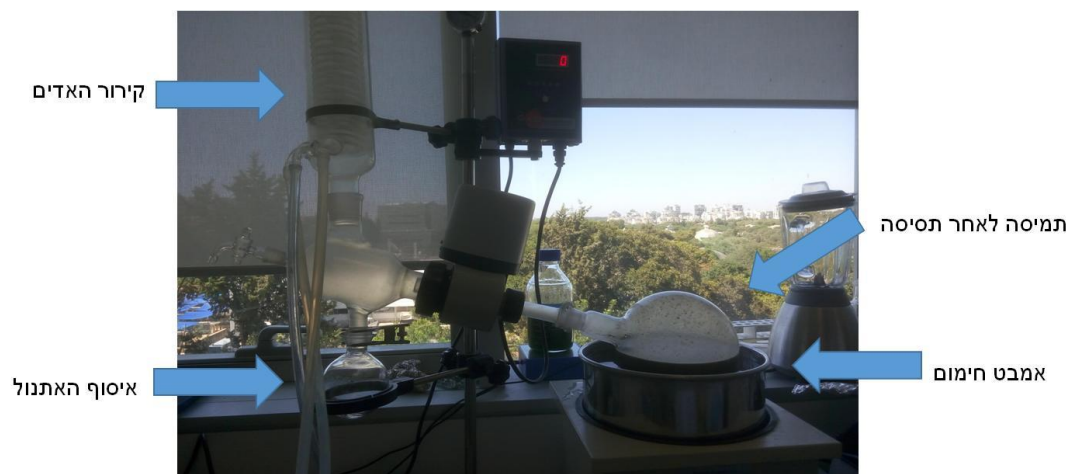


איור 7 - פרמנטור MINIFOR 1L

זיקוק- התמיסה הועברה למאדה מסתובב מדגם RE201D (Zhengzhou Keda, China) (איור 8) למיכל זכוכית 2L. תהליך הזיקוק התבצע החל מרגע הגעת המים באמבט החימום לטמפרטורה הרצויה. הזיקוק התבצע בתנאים הבאים: טמפרטורת מים באמבט 78°C מהירות סיבוב 50 RPM, לחץ במערכת 65-70 Kpa, טמפרטורת מי קירור 15°C . זמן זיקוק 25 דקות. לאחר הזיקוק נאסף הנוזל שזוקק, כ- 200-150 mL, אל מבחנה אטומה. נערכו מדידות אתנול ע"מ לוודא אי הימצאות אתנול בתמיסת המקור. הנוזל שזוקק מן התמיסה עבר בדיקת אתנול וזוקק פעמיים נוספות על מנת להגיע לנוזל בריכוז אתנול גבוה יותר.

תסיסה שלב שני על ידי *E. coli* - לאחר זיקוק התמיסה היא עברה אוטוקלב בתוך מיכל הפרמנטור 121°C למשך חצי שעה. לאחר התקררות הנוזל ה-pH הועלה ל-6 והוכנסו 25mL *E. coli* מסטרטר. התסיסה התבצעה בתנאים אנאירוביים במשך 36 שעות ב 37°C ובמהירות בחישה של 8HZ. טמפרטורה ו-pH נוטרו בצורה רציפה, אתנול וסוכר נמדדו לאחר 24 ו-36 שעות.

זיקוק- עם סיום שלב התסיסה השני התמיסה זוקקה פעם אחת (ולא שלוש) באותם תנאים כמו לאחר שלב התסיסה הראשון.



איור 8 - מאדה מסתובב

6.4 שיטות אנליטיות לחישוב כמות סוכרים ואתנול

6.4.1 כימות סוכרים בעזרת מכשיר HPLC

כימות הסוכרים נעשה על ידי מכשיר:

PAEC-PAD (High Pressure Anion-Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection) (Dionex, Thermo Fischer Scientific, MA, USA).

דגימות ההידרוליזה נמהלו פי 100 והדגימות שנלקחו בתהליך התסיסה נמהלו פי 50. הדגימות פולטרו והוכנסו למבחנות ייעודיות למכשיר (פרוט תוכנית הפעולה של המכשיר נמצא בנספחים (12.1)). הסוכרים שנבדקו הם רמנוז, גלקטוז, גלוקוז, פרוקטוז, קסילוז וחומצה גלוקרונית. לצורך בדיקת הסוכרים היה צורך להכין מבחנות עם ריכוזים ידועים של כל אחד מהסוכרים. לאחר קבלת התוצאות בניתי משוואת ישר עם המהולים הידועים וכך חישבתי את כמות הסוכרים שנמצאים בכל דגימה. ביחידות mg sugar/mL. לצורך חישוב כמות הסוכרים מתוך החומר היבש תוצאות הסוכרים שהתקבלו ביחידות של mg sugar/mL הוכפלו בנפח הדגימה (נפח הדגימה חושב בעזרת מדידת משקל המבחנה לפני כל לקיחת דגימה) ולאחר מכן חולקו התוצאה במשקל האצה היבש. רמת הדיוק של המכשיר היא גבוהה ועומדת על סטייה של כ- 1-1.5%. לאורך הניסויים נתקלנו בבעיה של ירידה ברגישות המכשיר שגרמה לקפיצות מסוימות ולהבדלים בין תוצאות הסוכרים. על מנת להתמודד עם הבעיה בכל פעם נירמלנו את התוצאות שהתקבלו בניסוי ביחס לתוצאות שהתקבלו מתמיסה עם ריכוז ידוע שהרצנו במכשיר לאחר כל עשר דגימות.

6.4.2 חישוב כמות אתנול באמצעות קיט אתנול

חישוב כמות האתנול בתהליך התסיסה נעשה בעזרת אתנול קיט (K-ETOH, Magazme Ireland). הדגימות שנלקחו בתהליך התסיסה נמהלו פי 50. לצורך חישוב כמות האתנול הכנו 5 מבחנות עם ריכוזי אתנול ידועים (1,0.75,0.5,0.25,0.125 mg ethanol/mL) וכן מבחנת בלנק עם מים בלבד. לאחר מכן הוכנסו לתוך צלחת של 96 באריות הריאגנטים הבאים על פי הפרוטוקול (איור 9):

Wavelength:	340 nm
Microplate:	96-well (e.g. clear flat-bottomed, glass or plastic)
Temperature:	~ 25°C
Final volume:	0.257 mL
Linearity:	0.1-1.2 µg of ethanol per well (in 0.01-0.20 mL sample volume)

Pipette into wells	Blank	Sample	Standard
distilled water	0.210 mL	0.200 mL	0.200 mL
sample solution	-	0.010 mL	-
standard solution	-	-	0.010 mL
solution 1 (buffer)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
solution 2 (NAD ⁺)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
solution 3 (Al-DH)	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A ₁) after approx. 2 min and start the reactions by addition of:			
suspension 4 (ADH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
Mix* and read the absorbances of the solutions (A ₂) at the end of the reaction (approx. 5 min). If the reaction has not stopped after 5 min, continue to read the absorbances at 1 min intervals until the absorbances increase constantly over 1 min**.			

איור 9- פרוטוקול להרצת לקיט אתנול (מתוך החוברת שהגיע עם הקיט)

המדידות התבצעו בספקטרופוטומטר (Tecan, infinite M200 PRO) באורך גל של 340nm. לאחר קבלת התוצאות הורדתי את קריאות הרקע A2-A1 וכן את הקריאה שהתקבלה רק ממים. מהריכוזים הידועים של אתנול בניתי משוואת קו ישר וכך חישבתי את כמות האתנול. תוצאות האתנול המתקבלות הן ביחידות של mg ethanol /mL. לאחר מכן הכפלתי את התוצאה בנפח הדגימה וחילקתי במשקל החומר היבש בכל מבחנה או בכמות הסוכרים ע"פ צורך. על פי היצרן הסטייה של התוצאות היא בין 0.023-0.046 mg/l במידה ודוגמים בנפח של 2mL. מכיוון שאת הדגימות הרצנו בפלטת 96, כלומר 200 מיקרו ליטר דגימה, הסטייה של התוצאות גדולה יותר באופן יחסי.

6.4.3 ניתוח סטטיסטי של התוצאות

תוצאות הסוכרים שהתקבלו מה-HPLC עברו אנליזה כפי שמתואר בפרק שיטות אנליטיות. לאחר קבלת התוצאות הסופיות של כל מבחנה התוצאות נותחו בתוכנת אקסל. בין כל התוצאות נעשה מבחן T -test one tail $\alpha < 0.05$.

7 תוצאות

7.1 טיפול מקדים והידרוליזה של אצות *Ulva* sp.

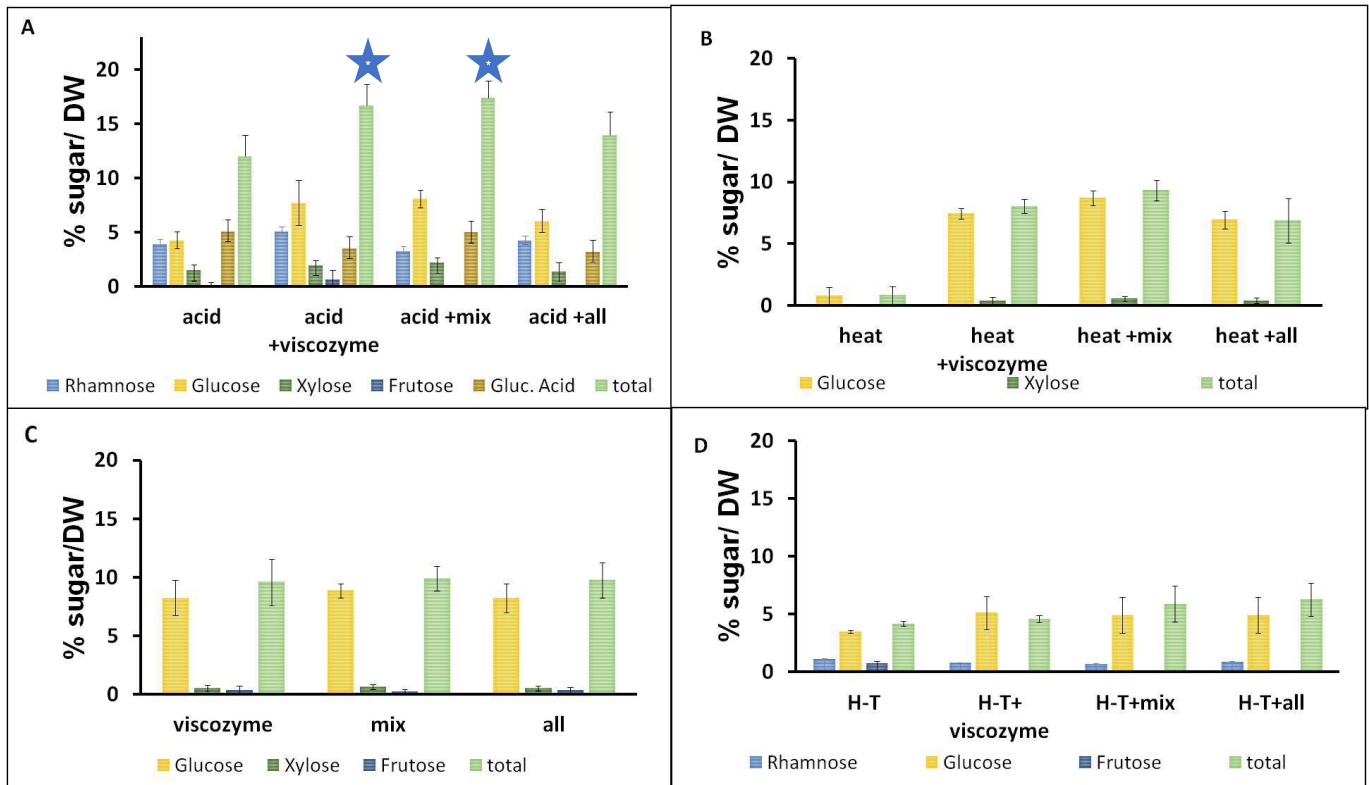
7.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה

במהלך הניסוי ביצענו מספר טיפולים מקדימים והידרוליזות אנזימתיות על מנת למצוא מהו השילוב הטוב ביותר בין טיפול מקדים והידרוליזה. הניסוי כלל שלושה סוגים של טיפול מקדים: חומצה + חימום, רק חימום וטיפול הידרותרמי. לאחר הטיפול המקדים ערכנו הידרוליזה אנזימתית ע"י שילוב שלוש קומבינציות של אנזימים. לאחר קבלת התוצאות הורדנו מהתוצאות את הסוכרים שהגיעו עם האנזימים.

מתוצאות ההידרוליזה ניתן לראות (איור 10) שהטיפול המקדים היעיל ביותר הוא עם חומצה, שם התקבל אחוז הסוכר הגבוהה ביותר כ- $12.01 \pm 1.97\%$ סוכר מאצה יבשה וגם את המגוון הגדול ביותר של סוכרים (איור 10A) בדגש על אחוז גבוה של רמנוז 3.95% וחומצה גלוקורונית 4.3% , לעומת שאר הטיפולים המקדימים. בשאר הטיפולים המקדימים ללא אנזימים התקבלו תוצאות נמוכות של סוכרים. הוספת האנזימים לאחר הטיפול המקדים העלתה בעיקר את אחוז הגלוקוז. השימוש ב- Enzyme mix לאחר חומצה הפיק את סך הסוכרים הגבוה ביותר כ- $17.42 \pm 1.42\%$ סוכר מאצה יבשה (טבלה 1S). ישנו הבדל מובהק (טבלה 2S) בין טיפול מקדים בחומצה לעומת טיפול מקדים עם חומצה והידרוליזה עם enzyme mix ו- Viscozyme.

בטיפול מקדים על ידי חימום בלבד (איור 10B), הסוכרים שהתקבלו הם גלוקוז ופרוקטוז בפחות מאחוז. לאחר הוספת האנזימים (ההבדל בין האנזימים השונים הוא זניח ולא מובהק סטטיסטית) התקבלו $6-8\%$ גלוקוז. בשימוש בהידרוליזה אנזימתית בלבד (איור 10C) התקבלו אחוזים גבוהים בעיקר של גלוקוז: $7-8\%$ (ההבדל בין הקומבינציות של האנזימים הוא זניח ואף לא מובהק סטטיסטית) ופחות מאחוז של קסילוז ופרוקטוז. התוצאות לאחר טיפול מקדים הידרו-תרמי מראות אחוזים נמוכים של סוכרים: כאחוז של רמנוז, גלוקוז וקסילוז. גם לאחר הוספת האנזימים, כמויות הסוכרים שהתקבלו נמוכות משאר ההידרוליזות בצורה משמעותית, $3-5\%$ אחוז גלוקוז. ההבדל בין הטיפול ההידרו-תרמי בלבד לבין השימוש באנזימים השונים הוא זניח ולא מובהק סטטיסטית.

ניתוח סטטיסטי של כלל התוצאות מראה שיש הבדל מובהק בין טיפול מקדים עם חומצה לבין שאר הטיפולים המקדימים. טיפול עם חומצה בלבד נמצא כטיפול המניב ביותר, כמו כן הידרוליזה אנזימתית (כל שלוש הקומבינציות של האנזימים) לאחר טיפול מקדים בחומצה הניבה את התוצאה הטובה ביותר בצורה מבוהקת לעומת ההידרוליזות האנזימתית לאחר שאר הטיפולים המקדימים (טבלה 2S בנספחים).



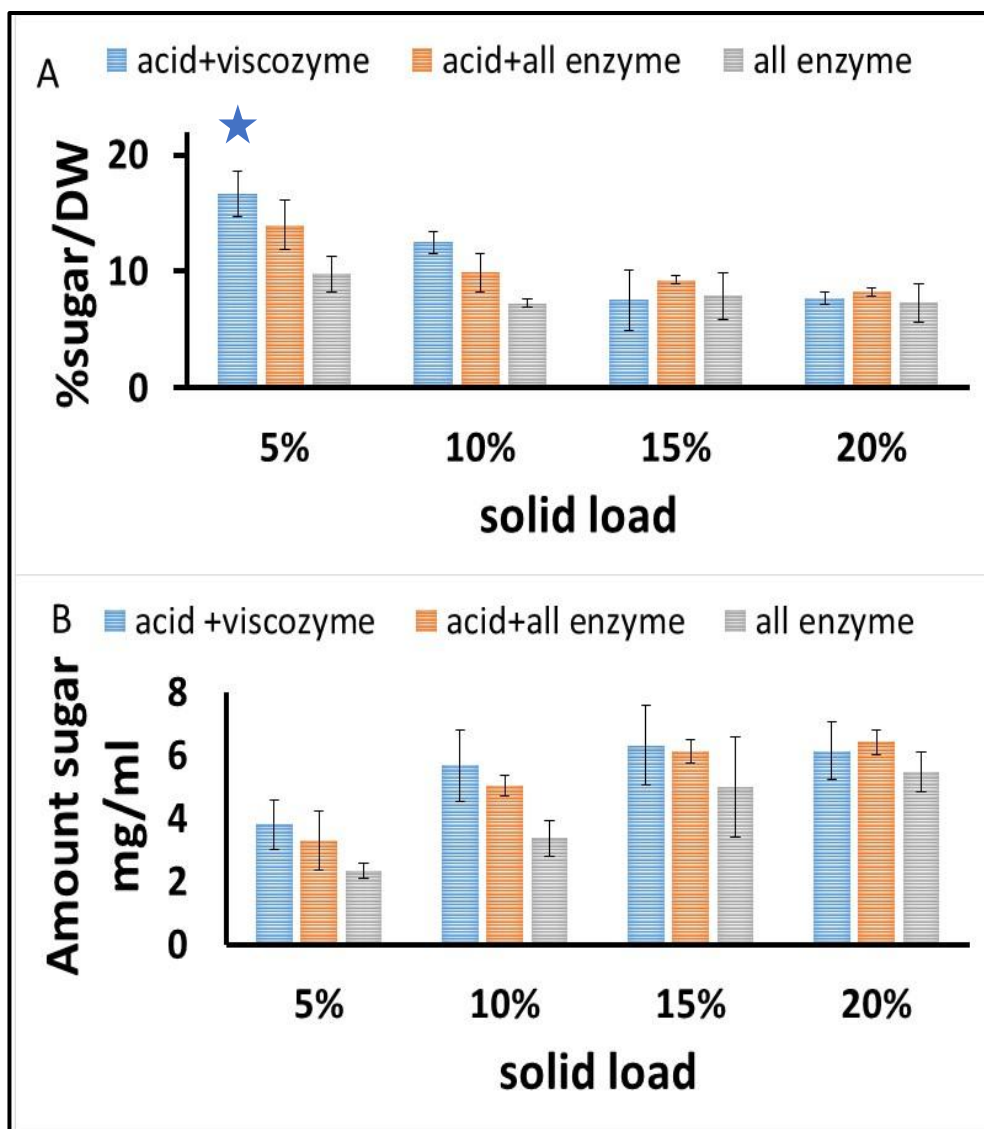
איור 10 - טיפול מקדים והידרוליזה של אצת *Ulva sp.*

תוצאות סוכרים שהתקבלו מהטיפולים המקדימים ומההידרוליזה האנזימתית. איור A: טיפול מקדים על ידי חומצה. איור B: טיפול מקדים על ידי חימום. איור C: תוצאות של הידרוליזה אנזימתית בלבד. איור D: טיפול מקדים על ידי הידרו-תרמי, H-T-Hydrothermal. ציר Y בכל הגרפים מציג את אחוז הסוכרים מתוך חומר האצה היבשה שהוכנס לדגימה. ציר X בכל הגרפים מציג את הטיפול המקדים וההידרוליזה האנזימתית שנעשו. העמודות מציגות את ממוצע התוצאות + סטיית תקן. את התוצאות של כל הסוכרים ניתן למצוא בנספחים בטבלה 1S. מובהקות סטטיסטית נבדקה בין כלל התוצאות ($\alpha < 0.05$ T-test one tail). את טבלת ה-T-test ניתן לראות בנספחים טבלה 2S. בעמודות המסומנות בכוכבית התקבלו התוצאות הגבוהות משאר התוצאות בצורה מבוהקת. לכל ניסוי נעשו שלוש חזרות וכל חזרה הייתה כפולה (n=6).

7.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה בעומס מוצקים משתנה

לאחר ביצוע ההידרוליזה בחרנו שלוש הידרוליזות מייצגות שאחוז הסוכרים שהתקבל בהן היה הגבוה ביותר. באותן הידרוליזות בדקנו מהו עומס המוצקים האופטימלי. בניסוי נבדקו שני פרמטרים: פרמטר ראשון הוא סוכרים שהתקבלו, המוצגים כאחוז סוכרים מתוך אצה יבשה. הפרמטר השני הוא כמות סוכרים בדגימה, המוצגת ב- mg sugar/mL. הבדיקה של כמות הסוכרים נעשתה מתוך הבנה שבסופו של דבר כמות האתנול שתתקבל בתסיסה תהיה בהלימה לכמות הסוכרים בפועל בהידרוליזה. ההידרוליזות נעשו בארבעה עומסי מוצקים התחלתיים שונים: 5%, 10%, 15% ו-20% (טבלה 3). תוצאות תשואת הסוכרים (איור 11A וטבלה 5S) מראות שככל שעומס המוצקים נמוך יותר היעילות של הטיפול המקדים וההידרוליזה עולה ואחוז הסוכרים מתוך החומר היבש גדל. ההבדל העיקרי הוא בין 5% לשאר עומסי מוצקים. בהידרוליזה עם Acid+ Viscozyme יש הבדל מובהק בין עומסי המוצקים השונים, בטיפול Acid + all enzyme יש הבדל מובהק רק בין 5% ל-15% ובכל השאר ההבדל אינו מובהק. בהידרוליזה של All enzyme אין הבדל מובהק בין עומסי מוצקים שונים (טבלה 3S).

לעומת זאת, בבחינה של כמות הסוכרים למ"ל התוצאות הפוכות- ככל שעומס המוצקים גבוה יותר כך כמות הסוכר בדגימה גדולה יותר. כפי שניתן לראות (איור 11B וטבלה 6S), מבחינה סטטיסטית יש הבדל מובהק בין הכמות סוכר שהתקבלו בכול ההידרוליזות בעומס מוצקים 5% לבין שאר עומסי המוצקים. בטיפול והידרוליזה של Acid+ Viscozyme אין הבדל מובהק בין עומס מוצקים 10% ל-15% ו-20% לעומת זאת בטיפול של Acid + all enzyme יש גם כן הבדל מובהק בין 10% ל-15% ו-20%. בהידרוליזה של All enzyme יש הבדל מובהק בין 10% ל-15% ו-20% אך לא בין 15% ל-20% (טבלה 4S). בעומס מוצקים של 10% בהידרוליזה Acid+ All enzyme נותנים כ- 2.2mg/mL גלוקוז וכמות המקסימלית של רמנוז (1.31 mg/mL), קסילוז (0.72 mg/mL) וחומצה גלוקורונית (1.07 mg/mL). לעומת זאת בעומסי מוצקים של 15% מתקבל כ- 3.46mg/mL גלוקוז וב-20% מתקבל כ- 4.1mg/mL גלוקוז. אך כמויות נמוכות של רמנוז (0.65 mg/mL) וחומצה גלוקורונית (0.62mg/mL)

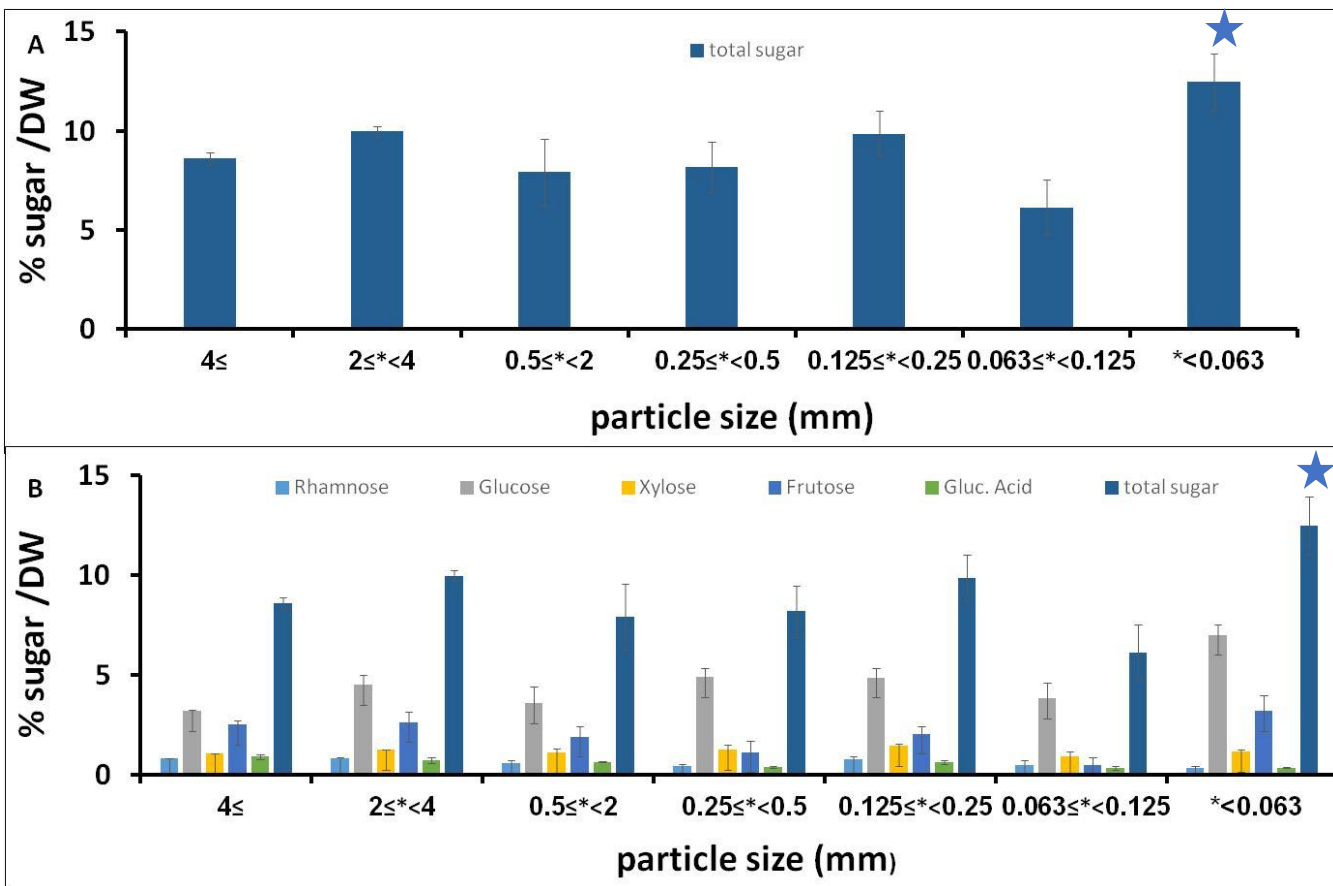


איור 11- עומס מוצקים, השוואה בין תשוואה לכמות סוכר

השוואה בין עומס מוצקים- באיור מוצגת השוואה בין אחוז סוכרים המתקבל בארבע רמות שונות של עומס מוצקים ושלוש הידרוליזות שונות: Acid+ Viscozyme, Acid+ all enzyme ו- only all enzyme. באיור A: מוצגת תשוואת הסוכרים בעומסי מוצקים שונים: ציר Y מציג את אחוז הסוכרים למשקל של אצה יבשה ובציר X מוצגים עומסי מוצקים שונים. באיור B: מוצגת כמות הסוכרים שהתקבלה לכל מ"ל בדגימה. ציר Y מציג את כמות הסוכרים ביחידות של mg/mL. ציר X מבטא את עומס המוצקים. לכל ניסוי נעשו שתי חזרות וכל חזרה הייתה כפולה (n=4). העמודות מציגות את ממוצע התוצאות + סטיית תקן. מובהקות סטטיסטית נבדקה בין כלל התוצאות (T-test one tail $\alpha < 0.05$). את טבלת ה- T-test ניתן לראות בנספחים **טבלה מספר 3S ו-4S** בהתאמה. פרוט תוצאות הסוכרים נמצאים בנספחים **טבלאות 5S ו-6S** בהתאמה בעמודות המסומנות בכוכבית התקבלו התוצאות הגבוהות ביותר שמובהקות סטטיסטית. לכל ניסוי נעשו שני חזרות וכל חזרה הייתה כפולה (n=4).

7.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה

בשלב הבא בדקנו האם יש לגודל החלקיקים השפעה על תוצאות ההידרוליזה. ההידרוליזה נעשתה עם אצה יבשה שנטחנה לגדלים שונים כפי שמפורט בפרק השיטות (טבלה 4). מהתוצאות שהתקבלו (איור 12) ניתן לראות שאין הבדל בין גדלי החלקיקים השונים למעט חלקיק בגודל <0.063 mm (גודל החלקיק הקטן ביותר שהתשואה של סך הסוכרים שהתקבלה ממנו גבוהה יותר משאר הגדלים בצורה מובהקת. (איור 12A וטבלה S7). ניתן לראות שבחלקיק בגודל <0.063 mm אחוז הגלוקוז שהתקבל גבוה בצורה מובהקת משאר החלקיקים (איור 12B וטבלה S8).



איור 12- טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה

מציג את אחוז הסוכר שהתקבל בהידרוליזה עם גודל חלקיקים משתנה, הגדלים נעו בין 7-1. ניתן לראות בטבלה 4 את גודל החלקיקים. באיור A: מוצג אחוז סך הסוכרים שהתקבלו מחומר יבש לאחר הטיפול המקדים וההידרוליזה. באיור B: מוצגים אחוזי סוגי הסוכרים השונים שהתקבלו מהחומר היבש לאחר הטיפול המקדים וההידרוליזה. ציר Y בשני הגרפים מציג את אחוז הסוכר שהתקבל מהחומר היבש. ציר X מציג את גודל חלקיק האצות ב-mm. העמודות

בשני הגרפים מציגות את ממוצע התוצאות + סטיית תקן. מובהקות סטטיסטית נבדקה בין כלל התוצאות (T-test one tail $\alpha < 0.05$). את טבלת ה- T-test ניתן לראות בטבלה 8S-17S בהתאמה. בעמודות המסומנות בכוכבית בכל איור, התקבלו התוצאות הגבוהות ביותר שמובהקות סטטיסטית. לניסוי נעשו 3 חזרות (n=3).

7.2 תוצאות תסיסה דו שלבית של אצת *Ulva sp.*

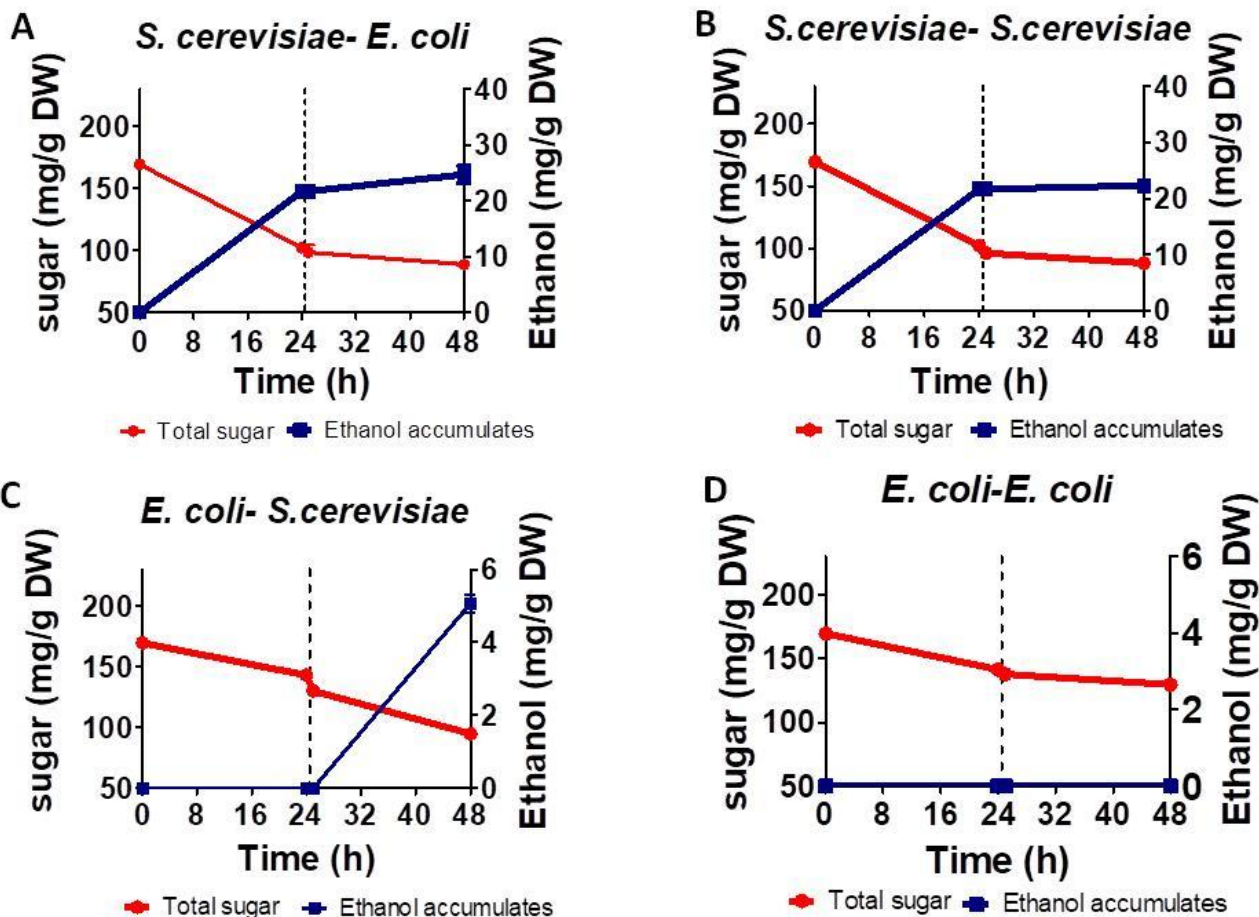
בשלב התסיסה הדו שלבית ערכתי שני ניסויים של תסיסה דו שלבית במספר קומבינציות של מיקרואורגניזמים כפי שיפורט בהמשך. הניסוי הראשון נעשה לאחר הפקת לקחים והסקת מסקנות מתהליך ההידרוליזה ופיילוטים שערכתי. הניסוי השני שעשיתי הוא לאחר הפקת לקחים מהניסוי הראשון, להלן אציג את תוצאות הניסויים:

7.2.1 תסיסה דו שלבית ניסוי מספר 1

בניסוי תסיסה מספר 1 נעשה טיפול מקדים עם חומצה בעומס מוצקים של 10% ולאחר מכן הופרד הנוזל מהמוצקים על מנת שגם ההידרוליזה האנזימתית תהיה בעומס מוצקים של 10%. לאחר מכן חיברתי בין הנוזל שהתקבל לאחר הטיפול המקדים והנוזל שהתקבל לאחר ההידרוליזה האנזימתית. כמות סך הסוכרים שהתקבלו מהטיפול המקדים עם חומצה וההידרוליזה האנזימתית היא 169 mg/ g DW וכמות הגלוקוז היא 55 mg/ g DW. תוצאות מגוון הסוכרים שהתקבלו נמצאות בטבלה 9S. מתוך כלל הסוכרים שהתקבלו כ- mg/ g 21.3DW הם סוכרים שהגיעו מהאנזימים (תוצאות התסיסה שיוצגו בהמשך כוללות את הסוכרים מהאנזימים).

מתוצאות התסיסה הדו שלבית בקומבינציות השונות שהתקבלו (איור 13 וטבלה 6) ניתן לראות שתסיסה עם *S. cerevisiae* בשלב הראשון הפיקה הכי הרבה אתנול, כ- 21.43mg/ g DW, לעומת תסיסה בשלב הראשון עם *E. coli* שבה לא התקבל אתנול כלל. בשלב השני בהתסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *E. coli* הפיק כ- 3 mg/ g DW אתנול. זאת לעומת תסיסה של *S. cerevisiae* אחרי *S. cerevisiae* שהפיק 0.6 mg/ g DW אתנול ו- *S. cerevisiae* שבא אחרי *E. coli* שהפיק כ- 5.7 mg/ g DW אתנול. *E. coli* שבא אחרי *E. coli* לא הפיק אתנול כלל. לאחר שכלול שני השלבים ניתן לראות שהתססה *S. cerevisiae* → *E. coli* תיתן את כמות האתנול הגבוהה ביותר- כ 24.4mg/ g DW לעומת 22.6 mg/ g DW אתנול שהתקבל מתסיסה של *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae*. בחינה של ה- CUY-carbon utilization yield (תשואת פחמן), מדד אשר מציג את אחוז הפחמן שהפך לאתנול מתוך כלל הפחמן שיצא בתהליך התסיסה. ה- CFU מחושב על פי המשוואה הבאה:

בתסיסה דו שלבית על ידי *E. coli* → *S. cerevisiae* נוצל אחוז הפחמן הגבוה ביותר לאתנול, כ-30.4% זאת לעומת 28.8% שנוצלו בתסיסה של *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae*, למרות שסך הפחמן שנצרך במשך התהליך זהה (טבלה 6).



איור 13 - תסיסה דו שלבית ניסוי 1, שינוי באתנול וסוכר לאורך התסיסה

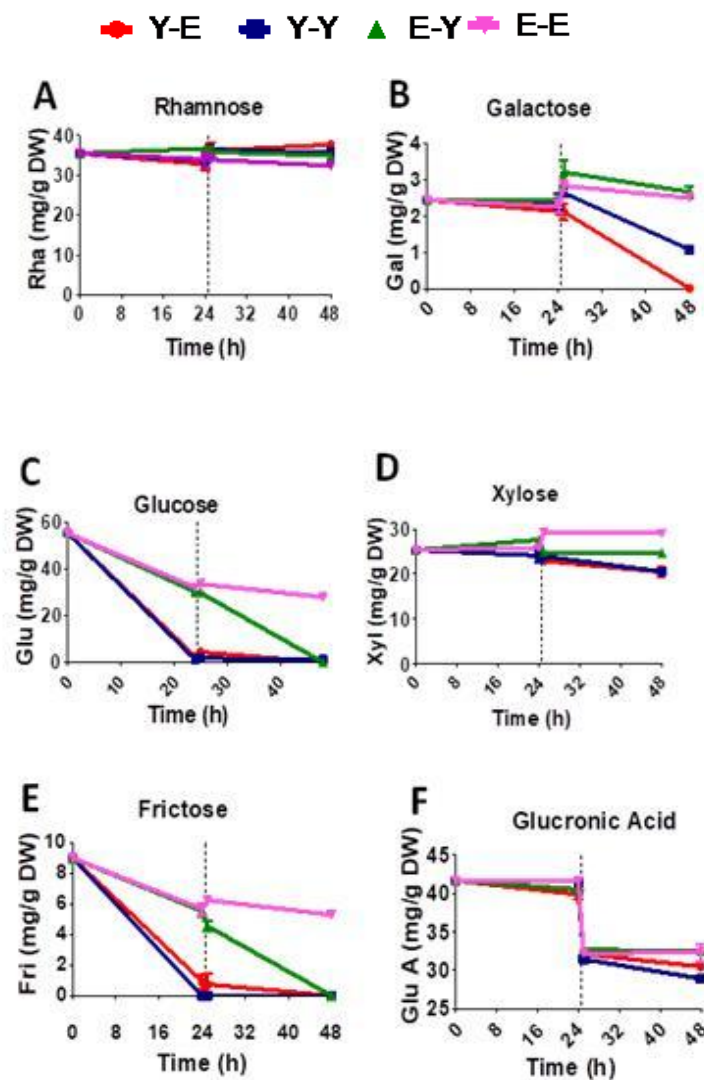
ניסוי 1, שינוי בסך סוכרים ואתנול לאורך תסיסה דו שלבית בארבע קומבינציות A: תסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae*; B: תסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *E. coli*; C: תסיסה דו שלבית *E. coli* → *E. coli*; D: תסיסה דו שלבית *E. coli* → *S. cerevisiae*. אורך כל שלב הוא 24 שעות, אתנול וסוכר נבדקו לפני ואחרי כל שלב. לאחר בדיקת אתנול לאחר שלב התסיסה הראשון האתנול אודה והדגימות עברו אוטוקלב על מנת להרוג את המיקרואורגניזם שהתסיס. המעבר בין שלבי התסיסה מסומן על גבי האיור בקו שחור מקווקו. לאחר מכן התחילה התסיסה בשלב השני. ציר ה Y השמאלי מציג את כמות הסוכר ביחידות של mg/g DW. ציר ה Y הימני מציג את כמות האתנול ביחידות של mg/g DW. ציר X מציג את זמן התסיסה. הקו האדום מציג את ממוצע+ סטיית תקן של השינוי בסך כל

הסוכרים לאורך התסיסה הודו שלבית. הנקודות האדומות לאורך הקו האדום מציגות את הזמנים בהם נמדדו הסוכרים. הקו הכחול מציג ממוצע+ סטיית תקן של סך האתנול שהצטבר לאורך התסיסה הודו שלבית, מכיוון שלאחר שלב התסיסה הראשון כל האתנול שהתקבל אודה. הריבועים הכחולים לאורך הציר מציגים את הזמנים בהם נמדד האתנול. לכל ניסוי נעשו 3 חזרות (n=3).

טבלה 6 - ניסוי 1, שינוי באתנול וסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית

exp1	Step-1 initial (sugar mg/g DW)	Step-1 final (sugar mg/g DW)	Δ sugar decrease Step 1 (sugar mg/g DW)	Ethanol step 1 (mg/g DW)	Ethanol step 1 (mg /g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	Step- 2 initial (sugar mg/g DW)	Step-2 final (sugar mg/g DW)	Δ sugar decrease Step 2 (sugar mg/g DW)	Ethanol step 2 (mg/g DW)	Ethanol step 2 (mg/g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	Δ total sugar decrease (gr/g DW)	Ethanol total (mg/g DW)	Ethanol (mg/g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	CUY %
Y-E a	169.41	103.80	65.61	24.57	0.37	103.22	91.92	11.23	4.10	0.37	77.42	28.67	0.37	37.03
Y-E b	169.41	100.21	69.20	19.43	0.28	94.87	86.81	8.06	2.60	0.32	82.59	22.03	0.27	26.67
Y-E c	169.41	102.68	66.73	20.29	0.30	97.28	87.24	10.05	2.34	0.23	82.17	22.63	0.28	27.53
Y-E	169.41	102.23	67.18	21.43	0.32	98.46	88.68	9.78	3.01	0.31	80.73	24.44	0.30	30.41
Y-Y a	169.41	102	67.42	23.35	0.35	98.00	88.17	9.83	0.00	0.00	81.24	23.35	0.29	28.74
Y-Y b	169.41	100.73	68.68	21.37	0.31	95.30	89.06	6.24	0.93	0.15	80.35	22.30	0.28	27.75
Y-Y c	169.41	106.10	67.76	21.19	0.33	95.30	87.04	8.62	0.91	0.15	80.77	22.10	0.29	28.97
Y-Y	169.41	102.95	67.95	21.97	0.33	96.21	88.09	8.23	0.61	0.10	80.79	22.58	0.28	28.49
E-Y a	169.41	142.22	27.19	0	0.00	128.43	95.62	32.81	4.80	0.15	73.79	4.80	0.07	6.50
E-Y b	169.41	141.80	27.61	0	0.00	130.74	93.67	37.08	5.17	0.14	75.74	5.17	0.07	6.82
E-Y c	169.41	144.97	40.92	0	0.11	131.36	95.20	26.04	5.24	0.13	76.77	5.24	0.14	13.94
E-Y	169.41	143.00	31.90	0.00	0.04	130.18	94.83	31.98	5.07	0.14	75.44	5.07	0.09	9.09
E-E a	169.41	145.06	24.35	0	0.00	139.37	124.96	14.41	0	0.00	44.45	0.00	0.00	0.00
E-E b	169.41	138.06	31.35	0	0.00	134.07	131.94	2.13	0	0.00	37.47	0.00	0.00	0.00
E-E c	169.41	141.16	29.20	0	0.01	140.14	131.94	16.17	0	0.05	52.45	0.00	0.03	3.03
E-E	169.41	141.43	28.30	0.00	0.00	137.86	129.62	10.90	0.00	0.02	44.79	0.00	0.01	1.01

בבחינה של השינוי בסוכרים לאורך תהליך התסיסה הדו שלבית, ניתן לראות (איור 14 וטבלה 9S) שכצפוי הגלוקוז הוא הסוכר הדומיננטי ביותר, הוא מתקבל בהידרוליזה בכמות הגדולה ביותר ונצרך לגמרי על ידי ה-*S. cerevisiae*. לעומת זאת ה-*E. coli* צורך את הגלוקוז אך לא את כולו (ובהתאם כמות האתנול שמתקבלת). ניתן לראות שהרמנוז וכן החומצה גלוקורונית אינם נצרכים כלל והקסילוז נצרך בכמות קטנה על ידי ה-*E. coli* בשלב השני לאחר תסיסה על ידי *S. cerevisiae*. נקודה נוספת היא שבאטוקלב בין השלבים סוכרים רבים עוברים שינויים. ברובם יש פרוק שמתבטא בכמות הסוכרים איתה מתחיל השלב השני של התסיסה (הבולט ביותר הוא חומצה גלוקורונית) וישנם סוכרים שהריכוז שלהם עולה במעט כגון הקסילוז.



איור 14 - ניסוי 1, שינוי בסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית

תוצאות הסוכרים שהתקבלו לאורך התסיסה הדו שלבית בקומבינציות השונות. A: תוצאות רמנוז, B: תוצאות גלקטוז, C: תוצאות גלוקוז, D: תוצאות קסילוז, E: תוצאות פרוקטוז, F: תוצאות חומצה גלוקרונית. ציר Y בכל הגרפים מציג את כמות הסוכר ההתחלתית מכל סוג סוכר. ציר X מציג את הזמן. כל שלב בתסיסה נערך במשך 24 שעות ולאחר מכן הדגימות עברו אוטוקלב. הקו השחור המקווקו מציג את המעבר בין השלבים של התסיסה. כל קו בצבע מציג קומבינציה שונה של תסיסה דו שלבית. התוצאות הן ממוצע+סטיית תקן של כל דגימה של סוכר לאורך התסיסה הדו שלבית. כל ניסוי נעשה עם 3 חזרות (n=3).

מבחן סטטיסטי (טבלה 7) שנעשה בין תוצאות האתנול שהתקבלו בכל תהליך התסיסה הדו שלבית הראה שבתסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae* → *E. coli* התקבלה כמות גבוהה יותר של אתנול באופן מובהק לעומת תסיסה חד שלבית של *S. cerevisiae*. כמות האתנול המתקבלת בתסיסה דו שלבית מסוג *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae* אינה גבוהה באופן מובהק מן הכמות שמתקבלת בתסיסה חד שלבית של *S. cerevisiae*. תסיסה דו שלבית של *E. coli* → *S. cerevisiae* עדיפה באופן מובהק מתסיסה של *E. coli* בלבד.

טבלה 7 - T-test ניסוי 1 תסיסה דו שלבית סה"כ אתנול שהתקבל

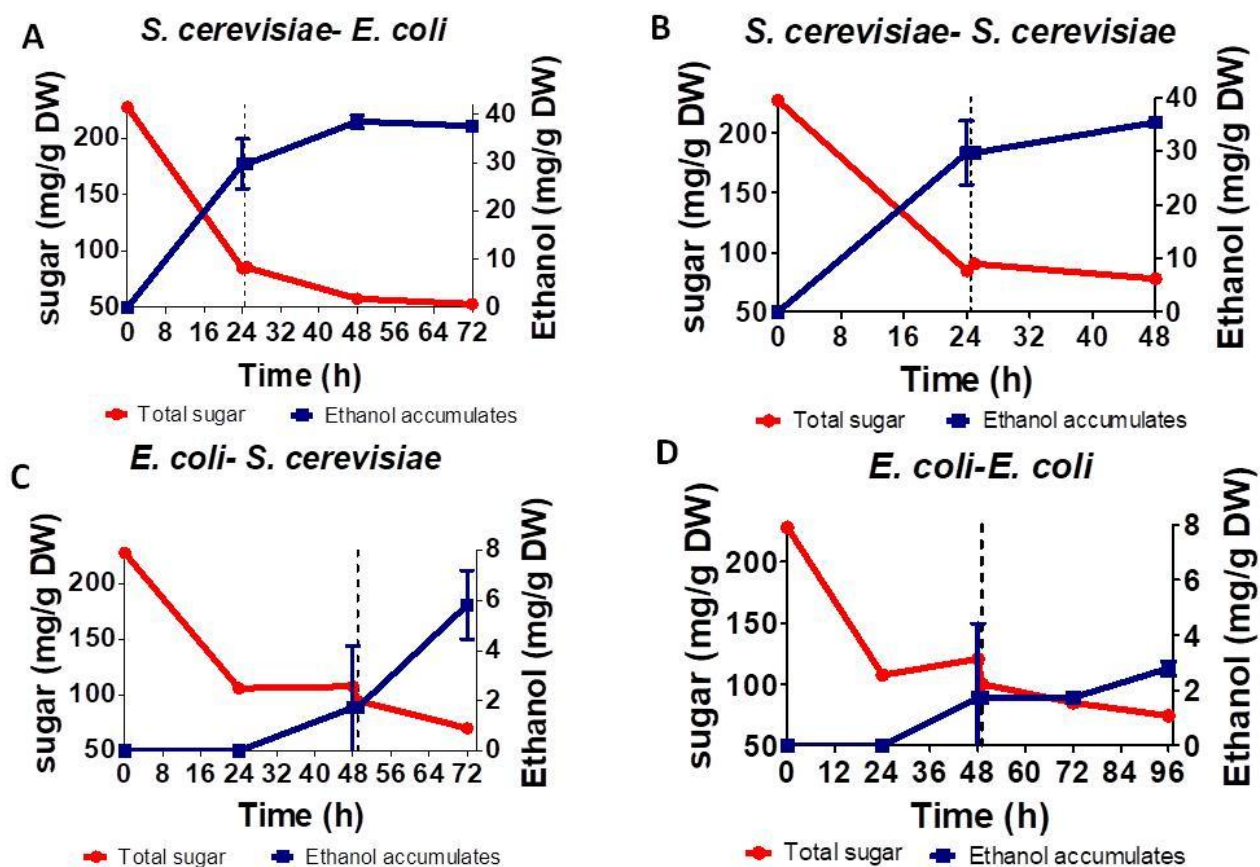
exp 1	Y	E	Y-E	Y-Y	E-Y
E	0.000				
Y-E	0.000	0.000			
Y-Y	0.143	0.000	0.106		
E-Y	0.000	0.009	0.000	0.000	
E-E	0.000	-	0.000	0.000	0.000

טבלה 7- תוצאות של T-test (T-test one tail $\alpha < 0.05$) שנעשה בין כמויות האתנול שהתקבלו בתסיסות השונות. הנתונים לתסיסה בשלב אחד של *S. cerevisiae* (Y) הם ממוצע של אתנול שהתקבל בשלב הראשון בתסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae* - *E. coli* ו- *S. cerevisiae* - *S. cerevisiae*. הנתונים לתסיסה בשלב אחד של *E. coli* (E) הם ממוצע של אתנול שהתקבל בשלב הראשון בתסיסה דו שלבית של *E. coli* - *E. coli* ו- *S. cerevisiae* - *E. coli*.

7.2.2 תסיסה דו שלבית ניסוי 2

בניסוי תסיסה מספר 2 נעשה טיפול מקדים עם חומצה בעומס מוצקים של 10% ובשונה מניסוי 1 לא הופרדו הנוזלים מהמוצקים לאחר ההידרוליזה החומצית. מכיוון שכך ההידרוליזה האנזימתית נעשתה בעומס מוצקים של 5%. בנוסף, זמן התסיסה של *E. coli* התארך ל-48 שעות בעוד זמן התסיסה על ידי *S. cerevisiae* נשאר 24 שעות. כמות הסוכרים שהתקבלו מההידרוליזה היא 227 mg/g DW וכמות הגלוקוז היא 101.74 mg/g DW , כפול מהכמות שהתקבלה בניסוי מספר 1. שאר הסוכרים שהתקבלו זהים בכמותם לכמויות שהתקבלו בניסוי 1. (טבלה 10S). מתוך כלל הסוכרים שהתקבלו כ- 27.3 mg/g DW הם גלוקוז ופרוקטוז שהגיעו מהאנזימים (תוצאות התסיסה שיוצגו בהמשך כוללות את הסוכרים מהאנזימים). בתוצאות ניסוי 2 של התסיסה הדו שלבית בקומבינציות שנבדקו (איור 15 וטבלה 8) ניתן לראות שתסיסה עם *S. cerevisiae* בשלב הראשון הפיקה את כמות האתנול הגבוהה ביותר, כ- 30.72 mg/g DW , לעומת תסיסה בשלב הראשון עם *E. coli* שבא לאחר 48 שעות התקבלו כ- 3.47 mg/g DW אתנול. בשלב השני של התסיסה *E. coli* שבא אחרי *S. cerevisiae* הפיק כ- 8.8 mg/g DW אתנול (אף על פי שהתסיסה נמשכה 48 שעות התוצאה המקסימאלית של אתנול התקבלה לאחר 24 שעות). לאחר מכן תסיסה של *S. cerevisiae* אחרי *S. cerevisiae* הפיקה כ- 4.9 mg/g DW אתנול. תסיסה של *S. cerevisiae* שבא אחרי *E. coli* הפיקה כ- 4.9 mg/g DW אתנול. *E. coli* שבא אחרי *E. coli* הפיק 1 mg/g DW אתנול לאחר 48 שעות. משכלול שני השלבים של התסיסה ניתן לראות שהתססה דו שלבית *S. cerevisiae*→*E. coli* נותנת את כמות האתנול הגבוהה ביותר, כ- 39.59 mg/g DW אתנול. תסיסה של *S. cerevisiae*→*S. cerevisiae* נתנה את הכמות השנייה הכי גבוהה, 34.41 mg/g DW אתנול. תסיסה דו שלבית *E. coli*→*S. cerevisiae* נתנה 7.56 mg/g DW אתנול והתססת *E. coli*→*E. coli* נתנה כ- 2.7 mg/g DW אתנול בלבד.

S. cerevisiae → *S. cerevisiae* ל- *S. cerevisiae* → *E. coli* תסיסה בין תסיסה
 בכמות הסוכר שנצרך בתהליך התסיסה הדו שלבית (Δ total sugar), לעומת
S. cerevisiae → *E. coli* (טבלה 8), בבחינה של ה-CUY ניתן לראות שבתסיסה דו שלבית
S. cerevisiae → *S. cerevisiae* ובתסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae* → *E. coli* אחוז הפחמן
 שנוצל לאתנול כמעט זהה, כ- 23.2% ו- 22.8% בהתאמה, על אף ההבדלים בניהם בתהליך
 התסיסה.



איור 15 - ניסוי 2, שינוי באתנול וסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית

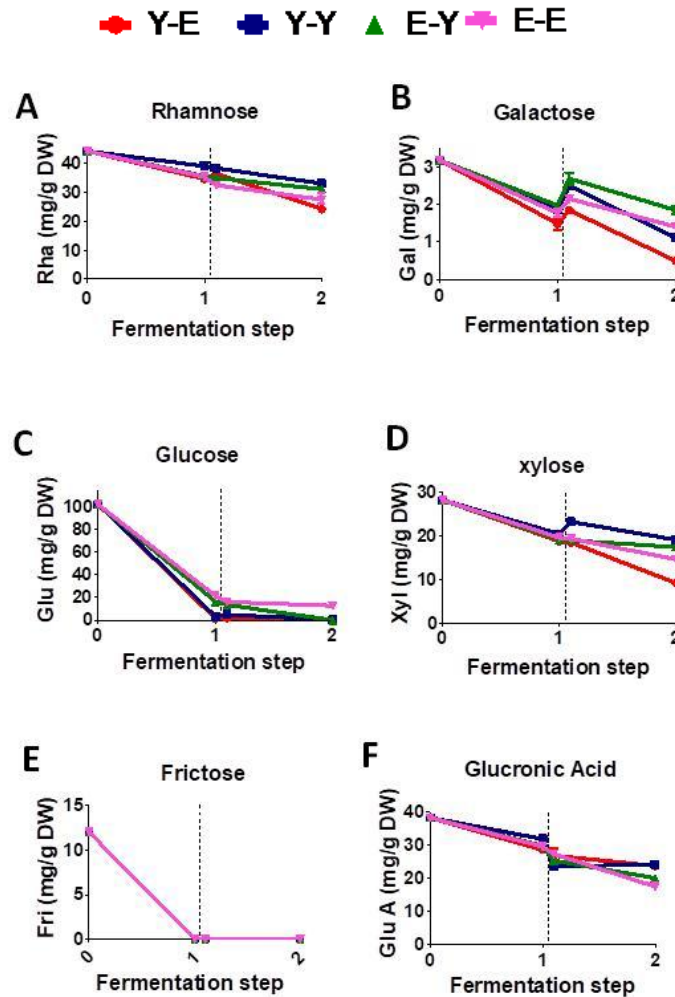
ניסוי 2 שינוי בסך סוכרים ואתנול לאורך תסיסה דו שלבית בארבע הקומבינציות שנבדקו.
 A: תסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *E. coli*; B: תסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *S. cerevisiae*;
 C: תסיסה דו שלבית *E. coli* → *S. cerevisiae*; D: תסיסה דו שלבית *E. coli* → *E. coli*.
 אורך כל שלב של תסיסת *S. cerevisiae* הוא 24 שעות ו-*E. coli* הוא 48 שעות.
 לאחר התסיסה בשלב הראשון נלקחה דגימה לאתנול וסוכר, האתנול אודה
 והדגימות עברו אוטוקלב על מנת להרוג את המיקרואורגניזם שהתסיס. המעבר בין שלבי
 התסיסה מסומן על גבי האיור בקו שחור מקווקו. לאחר מכן התחילה התסיסה בשלב השני.
 ציר Y השמאלי מציג את כמות הסוכר ביחידות של mg/g DW, ציר Y הימני מציג את

כמות האתנול ביחידות של mg/g DW. ציר X מציג את זמן התסיסה. הקו האדום מציג את ממוצע+ סטיית תקן כמות כל הסוכרים לאורך התסיסה הדו שלבית והנקודות האדומות לאורכו מציגות את הזמנים בהם נמדדו הסוכרים. הקו הכחול מציג ממוצע+ סטיית תקן של סך האתנול שהצטבר לאורך התסיסה הדו שלבית, מכיוון שלאחר שלב התסיסה הראשון כל האתנול שהתקבל אודה. הריבועים הכחולים לאורך הציר מציגים את הזמנים בהם נמדד האתנול. לכל ניסוי נעשו 3 חזרות (n=3).

טבלה 8 - ניסוי 2 שינוי אתנול וסך הסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית

Exp2	Step-1 initial (sugar mg/g DW)	Step-1 final (sugar mg/g DW)	Δ sugar decrease Step 1 (sugar mg/g DW)	Ethanol step 1 (mg/g DW)	Ethanol step 1 (mg /g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	Step- 2 initial (sugar mg/g DW)	Step- 2 final (sugar mg/g DW)	Δ sugar decrease Step 2 (sugar mg/g DW)	Ethanol step 2 (mg/g DW)	Ethanol step 2 (mg/g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	Δ total sugar decrease (gr/g DW)	Ethanol total (mg/g DW)	Ethanol (mg/g DW)/ Δ Sugar decrease (mg/g DW)	CUY %
Y-E a	227.76	85.67	142.09	25.12	0.18	91.00	57.89	33.11	7.34	0.22	169.87	32.46	0.19	19.11
Y-E b	227.76	85.55	142.21	29.49	0.21	84.18	57.50	26.68	8.61	0.32	170.26	38.10	0.22	22.38
Y-E c	227.76	82.84	144.92	37.54	0.26	81.05	57.47	23.58	10.46	0.44	170.29	48.00	0.28	28.19
Y-E	227.76	84.69	143.07	30.72	0.21	85.41	57.62	27.79	8.80	0.33	170.14	39.52	0.23	23.22
Y-Y a	227.76	93.91	133.85	21.88	0.16	89.23	78.31	10.92	5.05	0.46	149.45	26.93	0.18	18.02
Y-Y b	227.76	98.69	129.07	27.94	0.22	92.56	78.37	14.19	5.71	0.40	149.39	33.65	0.23	22.52
Y-Y c	227.76	97.51	130.25	36.35	0.28	89.69	77.46	12.23	6.32	0.52	150.30	42.67	0.28	28.39
Y-Y	227.76	96.70	131.06	28.72	0.22	90.49	78.05	12.44	5.69	0.46	149.71	34.41	0.23	22.98
E-Y a	227.76	106.53	121.23	5.44	0.04	97.01	69.79	27.21	3.30	0.12	157.97	8.74	0.06	5.53
E-Y b	227.76	105.55	122.21	0.00	0.00	94.29	69.15	25.14	2.95	0.12	158.61	2.95	0.02	1.86
E-Y c	227.76	106.83	120.92	4.97	0.04	94.00	72.46	21.54	6.03	0.28	155.29	10.99	0.07	7.08
E-Y	227.76	106.30	121.45	3.47	0.03	95.10	70.47	24.63	4.09	0.17	157.29	7.56	0.05	4.82
E-E a	227.76	107.35	120.41	0.00	0.00	101.32	78.60	22.72	1.04	0.05	149.15	1.04	0.01	0.70
E-E b	227.76	108.44	119.32	0.00	0.00	101.13	68.61	32.51	1.34	0.04	159.15	1.34	0.01	0.84
E-E c	227.76	106.70	121.05	0.00	0.00	98.00	75.51	22.49	0.83	0.04	152.25	0.83	0.01	0.54
E-E	227.76	107.50	120.26	0.00	0.00	100.15	74.24	25.91	1.07	0.04	153.52	1.07	0.01	0.69

בבחינה של השינוי בסוכרים לאורך תהליך התסיסה הדו שלבית, ניתן לראות (איור 16 וטבלה 10S) שהגלוקוז מתקבל בהידרוליזה בכמות הגדולה ביותר ונצרך כולו בכל התסיסות כבר בשלב הראשון לעומת התוצאות בניסוי 1 (איור 14). בנוסף, יש ירידה מתונה במדידות כל שאר הסוכרים שכל הנראה נובעת מדה-סנסיטיביזציה של מכשיר ה-HPLC. בשלב השני ניתן לזהות ירידה במדידות הרמנוז והקסילוז בתסיסה של *E. coli* לאחר *S. cerevisiae*. לעומת זאת בשאר התסיסות אין הבדל בירידה של הסוכרים בשלב התסיסה השני.



איור 16 -ניסוי 2, שינוי בסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית

תוצאות הסוכרים שהתקבלו לאורך התסיסה הדו שלבית בקומבינציות השונות. A: תוצאות רמנוז, B: תוצאות גלקטוז, C: תוצאות גלוקוז, D: תוצאות קסילוז, E: תוצאות פרוקטוז, F: תוצאות חומצה גלוקרונית. ציר Y מציג את כמות הסוכר ההתחלתית בכל סוכר, ציר X מציג את שלב התסיסה (בניגוד לאיור 5 לא הוצגו זמנים מכיוון שזמני התסיסות היו שונים בין הקומבינציות השונות). לאחר שלב התסיסה הראשון נלקחה דוגמה של סוכרים והדגימות

עברו אטוקלב, הקו השחור המקווקו מציג את המעבר בין השלבים של התסיסה. כל קו בצבע מציג קומבינציה שונה של תסיסה דו שלבית. התוצאות הן ממוצע+סטטיית תקן של כל דגימה של סוכר לאורך התסיסה הדו שלבית. בכל ניסוי נעשו 3 חזרות (n=3).

מבחן סטטיסטי (טבלה 9) שנעשה בין תוצאות האתנול שהתקבלו בכל תהליך התסיסה הדו שלבית הראה שתסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae*→*E. coli* נתנה תוצאה גבוהה בצורה מובהקת מאשר תסיסה של שלב אחד רק עם *S. cerevisiae*. לעומת זאת, בדומה לניסוי 1, כמות האתנול שהתקבלה מתסיסה דו שלבית *S. cerevisiae*→*S. cerevisiae* אינה גבוהה באופן מובהק מכמות האתנול שהתקבלה מתסיסה חד שלבית של *S. cerevisiae*. תסיסה דו שלבית של *E. coli*→*S. cerevisiae* עדיפה בצורה מובהקת מתסיסה של *E. coli* בלבד.

טבלה 9 - T-test ניסוי 2 תסיסה דו שלבית סה"כ אתנול שהתקבל

	Y	E	Y-E	Y-Y	E-Y
E	0.000				
Y-E	0.039	0.000			
Y-Y	0.178	0.000	0.236		
E-Y	0.000	0.018	0.002	0.003	
E-E	0.000	0.346	0.001	0.001	0.027

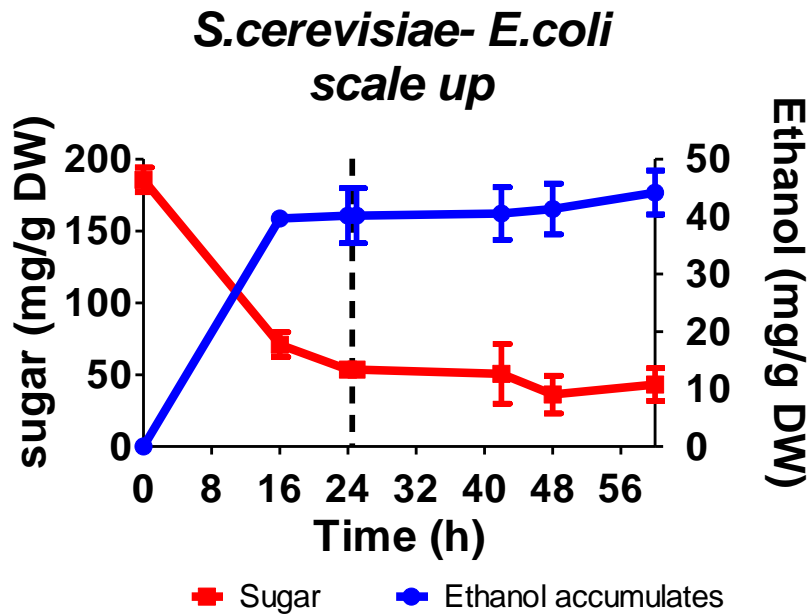
טבלה 9- תוצאות של T-test (T-test one tail $\alpha < 0.05$) שנעשה בין תוצאות סך האתנול שהתקבל בתסיסות השונות בניסוי 2. הנתונים לתסיסה בשלב אחד של *S. cerevisiae* (Y) הם ממוצע של אתנול שהתקבל בשלב הראשון בתסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae*→*E. coli* ו- *S. cerevisiae*→*S. cerevisiae*. הנתונים לתסיסה בשלב אחד של *E. coli* (E) הם ממוצע של אתנול שהתקבל בשלב הראשון בתסיסה דו שלבית של *E. coli*→*S. cerevisiae* ו- *E. coli*→*E. coli*.

7.3 הפקת אתנול בנפח גדול 1L

7.3.1 תסיסה דו שלבית של אצת

ניסוי תסיסה דו שלבית בנפח של ליטר נעשה לאחר בחינת ההידרוליזה הטובה ביותר ושיטת ההתססה הטובה ביותר. האצות היבשות עברו טיפול מקדים עם חומצה ולאחר מכן ההידרוליזה אנזימתית על ידי Enzyme mix. התסיסה נעשתה בפרמנטור בנפח ליטר עם מערבול. טמפרטורה וpH נמדדו באופן רציף.

כמות כלל הסוכרים שהתקבלו מההידרוליזה היא 185 ± 7 mg/ g DW וכמות הגלוקוז היא 20.3 mg/ g DW (טבלה 11S). מתוך כלל הסוכרים שהתקבלו כ- 90 ± 2 mg/ g DW הם גלוקוז ופרוקטוז שהגיעו מהאנזימים (תוצאות התסיסה שיוצגו בהמשך כוללים את הסוכרים מהאנזימים). בתוצאות ניסוי תסיסה דו שלבית בקנה מידה תהליכי (איור 17) ניתן לראות שבשלב הראשון של התסיסה עם ה- *S. cerevisiae* האתנול התקבל כבר לאחר 16 שעות (לא נעשו מדידות לפני) וכמות האתנול שהתקבלה לאחר 24 שעות גבוהה מהתוצאות בניסוי 2, כ- 40.15 ± 3 mg/ g DW לעומת זאת בשלב התסיסה השני עם ה- *E. coli* כמות האתנול שהתקבלה הייתה נמוכה משמעותית מהתוצאות בניסוי 1 ו-2 והתקבל רק 3 mg/g DW אתנול.



איור 17 - ניסוי scale up, שינוי באתנול וסך הסוכרים לאורך תסיסה דו שלבית.

ניסוי scale up, שינוי בסך סוכרים ואתנול לאורך תסיסה דו שלבית של *S. cerevisiae*-*E. coli*. אורך שלב תסיסה של *S. cerevisiae* הוא 24 שעות ושל *E. coli* הוא 36 שעות. לאחר התסיסה בשלב הראשון נלקחה דגימה לאתנול וסוכר, האתנול זוקק והתמיסה עברה אוטוקלב על מנת להרוג את ה- *S. cerevisiae* - המעבר בין שלבי התסיסה מסומן על גבי האיור בקו שחור מקווקו. לאחר מכן התחילה התסיסה בשלב השני על ידי *E. coli*. ציר Y השמאלי מציג את כמות הסוכר ביחידות של mg/g DW, ציר Y הימני מציג את כמות האתנול ביחידות של mg/g DW. ציר X מציג את זמן התסיסה. הקו האדום מציג ממוצע+ סטיית תקן של השינוי בסך כל הסוכרים לאורך התסיסה הדו שלבית, הנקודות האדומות לאורכו מציגות את הזמנים בהם נמדדו הסוכרים. הקו הכחול מציג ממוצע+ סטיית תקן של סך האתנול שהצטבר לאורך התסיסה הדו שלבית, מכיוון שלאחר שלב התסיסה הראשון כל

האתנול שהתקבל זוקק. הריבועים הכחולים לאורך הציר מציגים את הזמנים בהם נמדד האתנול. לניסוי נעשו שלוש חזרות (n=3) לכל בדיקת אתנול נעשו 2 חזרות בקיט.

7.3.2 זיקוק אתנול

זיקוק אתנול התבצע לאחר כל שלב של תסיסה אך זיקוק שני ושלישי התבצע רק לאחר השלב הראשון, שבו נעשתה תסיסה על ידי *S. cerevisiae*, מכיוון שכמות האתנול שהתקבלה הייתה גבוהה לעומת השלב השני, שבו נעשתה תסיסה על ידי *E. coli*, שם כמות האתנול שהתקבלה הייתה נמוכה מאוד ובאמצעים שעמדו לשרותינו לא היה טעם לבצע עוד זיקוק.

ריכוז האתנול שהתקבל לאחר שלב התסיסה הראשון הוא 2 ± 0.2 mg/mL אתנול בתוך תמיסה בנפח ליטר. בזיקוק הראשון זוקקה בכל אחת מהחזרות תמיסה בנפח 115 mL בממוצע וריכוז האתנול שהתקבל בה היה 5.22 ± 0.9 mg/mL בממוצע. בזיקוק השני זוקק הנוזל שהתקבל מהזיקוק הראשון, ומתוכו זוקק בממוצע נוזל בנפח כ- 20 mL בריכוז אתנול 9.18 ± 0.23 mg/mL. בזיקוק השלישי זוקק בממוצע כ- 2 mL נוזל ומכיוון שכך בזיקוק השלישי בחזרות 1-2 האתנול נאבד במערכת ולכן כמות האתנול שהתקבלה הייתה זניחה. לעומת זאת בחזרה 3 ריכוז האתנול שהתקבל היה כ- $15. \pm 0.3$ mg/mL.

8 דיון

8.1 ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה של אצות *Ulva sp.*

8.1.1 טיפול מקדים והידרוליזה

בשלב הראשון של המחקר נבדקה מהי ההידרוליזה הטובה ביותר ולשם כך נבחנו מספר שיטות לביצוע הידרוליזה הכוללות טיפול מקדים וקומבינציות שונות של הידרוליזה אנזימתית. ככל שהתקדם התהליך עלה צורך להגדיר במדויק את הקריטריונים שעל פיהם הידרוליזה וטיפול מקדים יוגדרו כ-טובים ביותר, כיוון שיש מדדים רבים שבאמצעותם ניתן להגדיר מהי ההידרוליזה הטובה ביותר וחלקם אף סותרים, כגון: כמות סוכרים שמתקבלת לעומת תשואת סוכרים (אחוז סוכרים מהאצה), זמן ההידרוליזה לעומת כמות סוכרים שתתקבל וכן השקעת אנרגיה בתהליך ההידרוליזה, עלות ההידרוליזה (חומרים), השפעות סביבתיות ועוד. מדדים נוספים שבאו בחשבון הם סוג הסוכרים המתקבלים ומגוון הסוכרים.

לבסוף הקריטריונים שנבחרו להגדרת ההידרוליזה האופטימלית הם כמות הסוכר הסופית שהתקבלה ומגוון הסוכרים שהתקבלו. ההחלטות שקיבלנו מתאימות לאופי המחקר אך יכול להיות שלצרכים אחרים דווקא הידרוליזות אחרות יתאימו יותר. הסיבה שבחרנו במדדים אלו היא שבהם כמות הסוכר בדגימה משפיעה ישירות על כמות האתנול שתתקבל. מגוון הסוכרים חשוב

לנו מכיוון שבתסיסה דו שלבית רצינו לראות כיצד והאם *S. cerevisiae* וה-*E. coli* צורכים את אותם סוכרים בשלבי התסיסה השונים.

טיפול מקדים על ידי חומצה (על אף שהתהליך לא ידידותי לסביבה) נתן את מגוון הסוכרים הגבוה ביותר לעומת שאר הטיפולים המקדימים (**איור 10 טבלה 1S**). לאחר מכן ההידרוליזה עם האנזימים הגדילה בעיקר את כמות הגלוקוז. ה-enzyme mix הוא קומבינציית האנזימים הטובה ביותר מכיוון שכמות הסוכרים העצמיים שלו היא הקטנה ביותר לעומת היעילות שלו ולכן נעשה בו שימוש בניסויי התסיסה הדו שלביים. תוצאת הטיפול המקדים וההידרוליזה הגבוהה ביותר שהתקבלה היא $17.42 \pm 1.42\%$ סוכר מאצה יבשה, מתוך זה 8% גלוקוז. Wang et al.³³ (2011) שביצעו טיפול מקדים והידרוליזה על ידי חומצה ואנזימים קיבלו 13.8% גלוקוז. במאמרם אין התייחסות לסוכרים העצמיים של האנזימים ויתכן שזה ההסבר לפער בין התוצאות. לעומת זאת, Trivedi et al.³⁶ (2013) ביצעו טיפול מקדים בחום ולאחר מכן ההידרוליזה אנזימתית וקיבלו 22% גלוקוז מחומר יבש. תוצאה זו שונה מהתוצאות שאנחנו קיבלנו ניתן לתלות את זה בסוג האצות ותנאי המחקר.

8.1.2 טיפול מקדים והידרוליזה בעומס מוצקים משתנה

עריכת ניסויים בטיפול מקדים והידרוליזה בעומס מוצקים משתנים נועדו לבחון את השפעת עומס המוצקים בטיפול מקדים והידרוליזה על כמות ותשואת הסוכרים המתקבלת (**איור 11**). כפי ששערנו, עומס המוצקים נמצא ביחס הפוך לתשואת הסוכרים מאצה יבשה אך ביחס ישיר לכמות הסוכרים למ"ל ההידרוליזה. מהתוצאות עלה שאנזימים יעילים יותר בעומס מוצקים גבוה ואכן ככל שעומס המוצקים היה גבוה יותר כך כמות הסוכרים (בעיקר גלוקוז) הייתה גבוהה יותר (**איור 11 וטבלה 3**). הבחירה לבצע את ניסויי התסיסה הדו שלבית בעומס מוצקים של 10% (10% בטיפול המקדים 5% בהידרוליזה האנזימתית) נעשתה כיוון שלעומס המוצקים בהידרוליזה יש השפעה על כמות הרמנוז והקסילוז שמתקבלים⁵⁸ ומעל 10% עומס מוצקים יש ירידה משמעותית בכמות שהתקבלה מהם.

8.1.3 טיפול מקדים והידרוליזה בגודל חלקיקים משתנה

בדיקת השפעת גודל החלקיקים על ההידרוליזה נעשתה בעומס מוצקים 20% מכיוון שבשלב זה עוד סברנו שזה עומס המוצקים הטוב ביותר ובהתאם ניתן לראות שאחוז הרמנוז, הקסילוז והחומצה הגלוקרונית נמוך. על פי התוצאות החלקיקים הקטנים ביותר ($>0.063\text{mm}$ *) הניבו את אחוז הסוכרים הגבוה ביותר- 12% (תנאי ההידרוליזה היו שונים במעט מניסויי טיפול מקדים והידרוליזה) אך בשאר גדלי החלקיקים לא ניתן לראות הלימה בין גודל החלקיקים לבין אחוז הסוכרים שהתקבלו (**איור 12**).⁴⁵ Bikker et al (2016) ביצעו טיפול מקדים והידרוליזה

אנזימתית בחלקיקים בגודל 2mm ובעומס מוצקים זהה אך הפיקו סה"כ 6% בלבד של סוכרים מהחומר היבש לעומת 10% במחקר זה (איור 12). אם כן לא ניתן להראות שגודל החלקיקים הוא הגורם להבדלי התוצאות.

8.2 ניסוי תסיסה דו שלבית של אצת *Ulva sp.*

ההשערה השערת המחקר הייתה שתסיסה דו שלבית *S. cerevisiae* → *E. coli* תיתן את כמות האתנול הכי גבוהה. בתוצאות התקבלו 24.4 mg/ g DW אתנול בניסוי 1 ו- 1 mg/ g *S. cerevisiae* → 39.59DW אתנול בניסוי 2. התסיסה הדו שלבית השניה הכי יעילה הייתה ע"י *S. cerevisiae* - 22.6 mg/ g DW אתנול בניסוי 1 ו- 34.41 mg/ g DW אתנול בניסוי 2.

בתהליך ההידרוליזה לאחר טיפול מקדים עם חומצה הופרד מוצק מהנוזל ועבר ההידרוליזה עם אנזימים מכיוון שבמחקר הוכח משלב ההידרוליזה שאנזימים יעילים יותר בעומס מוצקים גבוה. בדיעבד כמות הסוכרים שהתקבלה (169 mg/ g DW וכמות גלוקוז 55 mg/ g DW) הייתה נמוכה מאשר בטיפול מקדים והידרוליזה שנעשו ללא הפרדה כמו בניסוי 2 (7.2.2) (mg/ g DW) 227 וכמות גלוקוז 101.74 mg/ g DW). כמות האתנול שהתקבלה בשלב התסיסה הראשון על ידי *S. cerevisiae* קטנה בכ-30% מהתוצאה שהתקבלה בניסוי 2 (כ- 21.43mg/ g DW) אתנול לעומת כ- 30.72mg/ g DW אתנול בניסוי 2), על אף שבו ההידרוליזה הכיל כמות גלוקוז כפולה. הסבר אפשרי לפער בתוצאות הוא שפולימרים קצרים של צלולוז או עמילן נשארו בנוזל, לא עברו את ההידרוליזה האנזימתית ולכן לא התפרקו לחד סוכרים. מכיוון שכך לא ניתן היה למדוד אותם ב-HPLC אך ככל הנראה הם נצרכו על ידי המיקרואורגניזמים המתסיסים או עברו ההידרוליזה אנזימתית במקביל לתסיסה (תהליך זה מוכר כ-SSF הידרוליזה ותסיסה במקביל) ע"י אנזימים שנשארו בתמיסה מתהליך ההידרוליזה האנזימתית.

בתסיסה בשלב הראשון על ידי *E. coli* נצרך כ- 25 mg/ g DW גלוקוז אך בתהליך לא התקבל אתנול כלל לאחר 24 שעות. גם בניסוי 2, בו נצרך 80 mg/ g DW גלוקוז, התופעה חזרה על עצמה וכמות האתנול שהתקבלה ע"י *E. coli* לאחר 48 שעות הייתה זניחה (כ- 3.47mg/ g DW) אתנול).

בתסיסות הדו שלביות ששלב התסיסה השני בהן נעשה על ידי *E. coli* לאחר *S. cerevisiae* אחרי 24 שעות כבר התקבל אתנול (3 mg/ g DW אתנול בניסוי 1, 8.8 mg/ g DW) בניסוי 2) למרות שבתחילת התסיסה לא היה גלוקוז כלל. בנוסף, בתסיסה של *E. coli* אחרי *E. coli* לאחר 24 שעות לא התקבל אתנול כלל.

הסבר אפשרי לתופעת העדר האתנול בתסיסות שלא כללו *S. cerevisiae* בשלב ראשון הוא שבהידרוליזת חסר מרכיב מסוים שהכרחי ליכולת ה-*E. coli* להפיק אתנול אך אינו הכרחי ליכולת ה-*S. cerevisiae* להפקת האתנול, או שיש ל-*S. cerevisiae* אפשרות מטבולית לייצר את אותו מרכיב. ההשערה שה-*S. cerevisiae* מייצר את אותו מרכיב יכולה להיתמך ע"י העובדה שבשלב התסיסה השני (בניסויי *S. cerevisiae* → *E. coli*) לאחר שהאוטקלב מפרק את ה-*S. cerevisiae* ה-*E. coli* שמוכנס לאותה תמיסה מצליח להפיק אתנול למרות שכמות הגלוקוז נמוכה משמעותית מהמדיום של השלב הראשון.

השוואה של תוצאות התסיסה הדו שלבית למחקרים שנעשו היא בעייתית מכמה סיבות. במספר מחקרים^{16,60,51,59} להידרוליזת נוספו חומרים לפני שלב התסיסה כגון גלוקוז ו-yeast extract שהשפיעו על תוצאות האתנול שהתקבל. בנוסף, במחקרים שהצגנו (טבלה 1) תשואת האתנול היא ביחס לגלוקוז ששמר מסוגל להתסיס. על מנת להתגבר על הפערים באופן הצגת התוצאות נערוך השוואה רק בין יחס אתנול שהתקבל לכמות הגלוקוז בתמיסה. במחקרים שהוצגו תשואת האתנול נמצאת בטווח 0.4-0.5 g Ethanol /g sugar. יחס האתנול לגלוקוז בתמיסה שהתקבל בשלב התסיסה הראשון ע"י *S. cerevisiae* הינו 0.382 g Ethanol /g Glu בניסוי 1, 1 g 0.3 Ethanol /g Glu בניסוי 2 ו- 0.44 g ethanol /g Glu בניסוי תסיסה בנפח 1L (שם תהליך התסיסה היה היעיל ביותר). תוצאת ההתססה בנפח 1L נמצאת בטווח התוצאות של המאמרים הנסקרים ולכן האתנול שהתקבל בשלב התסיסה השני ע"י *E. coli* הינו אתנול עודף ויתרון של שיטת ההתססה הדו שלבית על פני זו החד שלבית.

בשלב התסיסה השני על ידי *E. coli* לאחר *S. cerevisiae* או לאחר *E. coli* לא הייתה כלל השפעה להארכת התסיסה מעבר ל-24 שעות.

במשך ניסויי תסיסה דו שלבית 1 ו-2 היו מספר פרמטרים שהשפיעו על תוצאות הניסויים מלבד השיטות האנליטיות שבהם השתמשנו (HPLC ואתנול קיט, שעליהם נכתב בפרק שיטות):

- נפח דגימה קטן: ניסויי התסיסה הדו שלבית נעשו בתוך מבחנות אוטוקלב 10 מ"ל עם נפח דגימה של 3~ מ"ל. זהו נפח דגימה נמוך במיוחד שנלקחו הרבה דגימות מתוכו (בכל פעם 200 מיקרו ליטר) ולכן אע"פ שבכל פעם הדגימה נשקלה והתוצאות נורמלו לנפח יכול להיות ששינויים בנפח השפיעו על התוצאות.
- אוויר בדגימה: למרות שהתסיסות נעשו בתנאים אנרוביים קשה לדעת כמה החמצן הקיים באוויר המבחנה בתחילת התסיסה ולאחר לקיחת דגימות למדידת סוכר ואתנול השפיע, אם בכלל, על התסיסות ועל היוצרות האתנול.

8.3 הפקת אתנול בנפח של 1L

8.3.1 תסיסה דו שלבית

בניסוי הפקת אתנול בנפח של 1L התקבל כמות אתנול גבוהה ($40.15 \pm 3 \text{ mg/ g DW}$) ביחס לניסוי תסיסה 2 למרות שכמות הגלוקוז ההתחלתית הייתה מעט יותר נמוכה מאשר בניסוי 2 ($90 \pm 2 \text{ mg/ g DW}$ לעומת 101 mg/ g DW) וזה כתוצאה מהתנאים האופטימליים שהיו בפרמנטור והבחישה לאורך כל שלב התסיסה. לעומת זאת בשלב השני של תסיסה על ידי *E. coli* כמות האתנול שהתקבלה הייתה נמוכה משמעותית מניסויים 1 ו-2 על אף התנאים האופטימליים בתהליך התסיסה.

8.3.2 זיקוק אתנול

זיקוק אתנול לריכוז של 95% מתמיסה שעברה התססה דורש שימוש במכשור ייעודי עקב המורכבויות הכרוכות בתהליך (כמפורט בפרק 1.5.5) וגם אז יש צורך בשני זיקוקים, הראשון מרכז את התמיסה לריכוז של 37-40% אתנול והשני ל-95% אתנול⁶¹. במחקר שלנו השתמשנו במזקקת פשוטה ולכן הצלחנו להגיע לריכוז 15% אתנול בלבד, ריכוז שאינו יכול לשמש כמקור אנרגיה לתחבורה מכיוון שצריך ריכוז 95% אתנול על מנת למהול אתנול עם דלק פוסילי⁵. למרות שציפינו שלא נגיע לריכוז אתנול גבוה היה צורך לבדוק כיצד שלב זיקוק האתנול משפיע על ההיתכנות של תסיסה דו שלבית. בשלב התסיסה השני זיקוק האתנול מורכב יותר ולא בהכרח משתלם מכיוון שריכוז האתנול נמוך ויש צורך לזמן זיקוק ארוך יותר או לחלופין מספר חזרות רב. הליך זה דורש שימוש ביותר אנרגיה (על מנת לחמם את התמיסה ל-70-100 מעלות לאורך כל זמן הזיקוק⁶¹) ועלול להיות יקר ולא אפקטיבי.

9 מסקנות

תוצאות המחקר הראו שטיפול מקדים על ידי חומצה (H_2SO_4 2%) והידרוליזה אנזימתית בשילוב האנזימים Enzyme mix הכולל את האנזימים: α -amylase, amyloglucosidase ו-cellulose נותן את אחוז ומגוון הסוכרים הגבוה ביותר מאצה יבשה: רמנוז (3.31%) גלקטוז (0.11%) גלוקוז (8.08%) קסילוז (2.23%) פרוקטוז (0.08%) וחומצה גלוקורונית (5.04%), סה"כ $17.42 \pm 1.42\%$.

בהתססה דו שלבית של אצה *Ulva* sp. בשלב ראשון על ידי *S. cerevisiae* ובשלב השני על ידי *E. coli* מתקבלת תשואת אתנול גבוהה ב-23% לעומת התססה בשלב אחד רק על ידי *S. cerevisiae* (39.59 mg/ g DW לעומת 30.72 mg/ g DW).

בתסיסה דו שלבית נעשה שימוש ב-74% מכלל הסוכרים באצה (לעומת 62% בתסיסה חד שלבית על ידי *S. cerevisiae*) בספרות אין התייחסות נרחבת לטיפול מקדים והידרוליזה

ותסיסה דו שלבית, **חדשנותו** של המחקר הוא בכך שהוא נותן פתרון לשני פערים שעלו מהספרות. הראשון הוא הפער ביכולת להפיק אחוז סוכרים גבוה מהאצות, השני הוא היכולת לנצל את מגוון הסוכרים ולהפיק כמות גדולה של אתנול מהסוכרים הנמצאים באצה.

10 מחקרי המשך

יתרונו של מחקר זה בכך שהוא מקיף באופן יסודי את כל השלבים בהפקת אתנול מאצת . *Ulva* sp: ייבוש האצה, טחינה לחלקיקים, בחירה של עומס מוצקים וטיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית, התססה חד ודו שלבית וזיקוק האתנול. בכל שלב נבחנו מגוון אפשרויות ונבחרה הדרך שנמצאה האופטימלית על מנת להגיע לתוצאות של הפקת סוכר בכמות גדולה יותר מהאצה בשלבי ההידרוליזה ובהתאם הפקה של אתנול רב יותר בתהליך התסיסה. מחקרי המשך אפשריים יוכלו לעסוק בייעול ושיפור תהליך התסיסה הדו שלבית כך שיוכל להתאים לתעשייה, בהתאם לפערים שעלו בניסוי תסיסה דו שלבית בנפח 1L. פערים כגון תשואת אתנול נמוכה בשלב התסיסה השני וקושי לזקק ריכוז אתנול נמוך.

בנוסף, לאחר שתסיסה דו שלבית הוכחה כשיימה וכמשפרת את תשואת האתנול יש לחקור האם כל התהליך יעיל מבחינה אנרגטית וכלכלית והאם וכיצד ניתן לשפר היבטים אלו של התהליך.

כיוון נוסף שיש צורך לחקור הוא טיפול המשך בשאריות מתהליך התסיסה הן על מנת לנצל ולהפיק את מירב האנרגיה מהביו-מסה והן מכיוון שהפסולת עשירה בחומר אורגני ובכל מקרה היא תצטרך לעבור טיפול לפני שניתן יהיה לשחרר אותה למערכת הביוב⁶² פסולת התהליך כוללת את המוצקים, שאריות האצות, שניתן לייבש ולשרוף וכך להפיק מהם פחם או ביודיזל. כמו כן הפסולת כוללת את התמיסה הנוזלית לאחר שזוקק ממנה האתנול, איתה ניתן לדשן את האצות.

תרומה נוספת שמעלה המחקר הנוכחי היא הימצאות מאגר נתונים שמכיל את תוצאות הניסויים בפילוח לפי סוגי טיפול וסוגי סוכרים שהתקבלו (**טבלאות 1S, 5S ו- 6S**) כך במידה שיתעורר צורך למצות סוכר מסוים ניתן יהיה להשתמש בנתונים שנאספו על מנת להתאים את הטיפול המקדים, עומס המוצקים וההידרוליזה הנכונה שיש לעשות על מנת להפיק את הכמות הגדולה ביותר מן הסוכר המבוקש.

1. Administration USEI. June 2019. 2019;0035(June).
2. van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2006;90(4):391-418. doi:10.1007/s10482-006-9085-7
3. Samoli E, Atkinson RW, Analitis A, et al. Associations of short-term exposure to traffic-related air pollution with cardiovascular and respiratory hospital admissions in London, UK. *Occup Environ Med*. 2016;73(5):300-307. doi:10.1136/oemed-2015-103136
4. IEA. Energy and Climate Change. *World Energy Outlook Spec Rep*. 2015:1-200. doi:10.1038/479267b
5. Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv*. 2010;28(6):817-830. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001
6. U.S. Energy Information Administration. *February 2018 Monthly Energy Review*. Vol 0035.; 2018. doi:10.1002/da.22823
7. Naik SN, Goud V V, Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels : A comprehensive review. 2010;14:578-597. doi:10.1016/j.rser.2009.10.003
8. Jay J. Cheng. *Biomass to Renewable Energy Processes.*; 2017.
9. Bothast MRJ. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. 2005:19-25. doi:10.1007/s00253-004-1819-8
10. Demirbas A. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl Energy*. 2009;86(SUPPL. 1):S108-S117. doi:10.1016/j.apenergy.2009.04.036
11. Shapouri, Hosein, Duffield, James A., and Wang MM. The Energy Balance of Corn Ethanol: An Update.
12. Second generation bioethanol production HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, Sebayang AH. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2016;66:631-653. doi:10.1016/j.rser.2016.07.015
13. Rocca S, Agostini A, Giuntoli J, Marelli L. *Microalgae.*; 2015. doi:10.2790/125847
14. Khan, Hussain M. Production of biofuels from marine macroalgae *Melanthamnus afaqhusainii* and *Ulva fasciata*. *J Chem Soc Pakistan*. 2015;37(2):371-379.
15. Fernand F, Israel A, Skjeremo J, Wichard T, Timmermans KR, Golberg A. Offshore macroalgae biomass for bioenergy production: Environmental aspects, technological achievements and challenges. *Renew Sustain Energy Rev*. 2016. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.046
16. Poespowati T, Mahmudi A, Dewi RK, et al. Hydrothermal acid and enzyme of indonesian macro-algae (*Ulva lactuca*) for ethanol production. *Int J ChemTech*

- Res. 2013;150(October):106-112. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.103
17. Hollis L, Barnhill E, Conlisk N, et al. Finite element analysis to compare the accuracy of the direct and MDEV inversion algorithms in MR elastography. *IAENG Int J Comput Sci.* 2016;43(2):137-146. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.012
 18. Bleakley S, Hayes M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods.* 2017;6(5):33. doi:10.3390/foods6050033
 19. Chemodanov A, Jinjikhshvily G, Habiby O, et al. Net primary productivity, biofuel production and CO2 emissions reduction potential of *Ulva* sp. (Chlorophyta) biomass in a coastal area of the Eastern Mediterranean. *Energy Convers Manag.* 2017;148:1497-1507. doi:10.1016/j.enconman.2017.06.066
 20. Nikolaisen L, Daugbjerg Jensen P, Svane Bech K, et al. *Energy Production from Marine Biomass (Ulva Lactuca)*. Danish Technological Institute; 2011.
 21. Jiang R, Linzon Y, Vitkin E, Yakhini Z, Chudnovsky A, Golberg A. Thermochemical hydrolysis of macroalgae *Ulva* for biorefinery: Taguchi robust design method. *Sci Rep.* 2016;6(27761). doi:doi:10.1038/srep27761
 22. Road L. *Mediterranean Marine Science.* 2018;19.
 23. Bruhn A, Dahl J, Nielsen HB, et al. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresour Technol.* 2011;102(3):2595-2604. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.010
 24. Saqib A, Tabassum MR, Rashid U, Ibrahim M, Gill SS, Mehmood MA. Marine macro algae *ulva*: a potential feed-stock for bio-ethanol and biogas production. 2013;1(3):155-163.
http://www.researchgate.net/publication/256836825_MARINE_MACRO_ALGAE_ULVA_A_POTENTIAL_FEED-STOCK_FOR_BIO-ETHANOL_AND_BIOGAS_PRODUCTION.
 25. Lynd LR. OVERVIEW AND EVALUATION OF FUEL ETHANOL FROM CELLULOSIC BIOMASS: Technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annu Rev Energy Environ.* 1996;21(1):403-465. doi:10.1146/annurev.energy.21.1.403
 26. Løvlie A, Bråten T. On the division of cytoplasm and chloroplast in the multicellular green alga *Ulva mutabilis* Føyn. *Exp Cell Res.* 1968;51(1):211-220.
 27. Korzen L, Pulidindi IN, Israel A, Abelson A, Gedanken A. Marine integrated culture of carbohydrate rich *Ulva rigida* for enhanced production of bioethanol. *RSC Adv.* 2015;5(73):59251-59256. doi:10.1039/C5RA09037G
 28. Jiang R, Ingle KN, Golberg A. Macroalgae (seaweed) for liquid transportation biofuel production: what is next? 2016. doi:10.1016/j.algal.2016.01.001
 29. Roesijadi G, Jones SB, Snowden-Swan LJ, Zhu Y. Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis (PNNL-19944). 2010.
 30. Roesijadi AG, Copping A, Huesemann M. Techno-Economic Feasibility Analysis of Offshore Seaweed Farming for Bioenergy and Biobased Products. 2008.
 31. Postma PR, Suarez-Garcia E, Safi C, et al. Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresour Technol.* 2017;224:670-679. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.071
 32. Jiang R, Linzon Y, Vitkin E, Yakhini Z, Chudnovsky A, Golberg A. Thermochemical

- hydrolysis of macroalgae *Ulva* for biorefinery: Taguchi robust design method. *Sci Rep*. 2016;6(1):27761. doi:10.1038/srep27761
33. Wang X, Liu X, Wang G. Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation. *J Integr Plant Biol*. 2011;53(3):246-252. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.01024.x
 34. Lee SE, Kim YO, Choi WY, Kang DH, Lee HY, Jung KH. Two-step process using immobilized *saccharomyces cerevisiae* and *pichia stipitis* for ethanol production from *Ulva pertusa* Kjellman Hydrolysate. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23(10):1434-1444. doi:10.4014/jmb.1304.04014
 35. Butterworth PJ, Warren FJ, Ellis PR. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch/Staerke*. 2011;63(7):395-405. doi:10.1002/star.201000150
 36. Trivedi N, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile. *Bioresour Technol*. 2013;150(October):106-112. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.103
 37. Yanagisawa M, Kawai S, Murata K, Yanagisawa M, Kawai S, Murata K. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. 2013;5979. doi:10.4161/bioe.23396
 38. Barnett JA. A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast*. 2003;20(6):509-543. doi:10.1002/yea.986
 39. Wargacki AJ. An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. 2012;308. doi:10.1126/science.1214547
 40. Golberg A, Vitkin E, Linshiz G, et al. Proposed design of distributed macroalgal biorefineries: Thermodynamics, bioconversion technology, and sustainability implications for developing economies. *Biofuels, Bioprod Biorefining*. 2014;8:67-82. doi:10.1002/bbb.1438
 41. Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*. 2008;1:1-14. doi:10.1186/1754-6834-1-7
 42. van der Wal H, Sperber BLHM, Houweling-Tan B, Bakker RRC, Brandenburg W, López-Contreras AM. Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresour Technol*. 2013;128:431-437. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.094
 43. Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, et al. EcoCyc: Fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):605-612. doi:10.1093/nar/gks1027
 44. Kim NJ, Li H, Jung K, Chang HN, Lee PC. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol*. 2011;102(16):7466-7469. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.071
 45. Bikker P, van Krimpen MM, van Wikselaar P, et al. Biorefinery of the green seaweed *Ulva lactuca* to produce animal feed, chemicals and biofuels. *J Appl Phycol*. 2016;28:3511-3525. doi:10.1007/s10811-016-0842-3

46. Trivedi N, Reddy CRK, Radulovich R, Jha B. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Res.* 2015;9:48-54. doi:10.1016/j.algal.2015.02.025
47. El-Sayed WMM, Ibrahim HAH, Abdul-Raouf UM, El-Nagar MM. Journal of Biotechnology & Biomaterials Evaluation of Bioethanol Production from *Ulva lactuca* By *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol Biomater.* 2016;6(6). doi:10.4172/2155-952X.1000226
48. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA. *Brewing Science and Practice.*
49. Access O. An Overview of Bioethanol Production From Algae.
50. Robin A, Chavel P, Chemodanov A, Israel A, Golberg A. Diversity of monosaccharides in marine macroalgae from the Eastern Mediterranean Sea. *Algal Res.* 2017;28:118-127. doi:10.1016/J.ALGAL.2017.10.005
51. Kim NJ, Li H, Jung K, Chang HN, Lee PC. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol.* 2011;102(16):7466-7469. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.071
52. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. Dilute acid pretreatment , enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol §. 2003;40(2005):3693-3700. doi:10.1016/j.procbio.2005.04.006
53. Almeida JRM, Röder A, Modig T, Laadan B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(6):939-945. doi:10.1007/s00253-008-1364-y
54. Trivedi N, Reddy CRK, Radulovich R, Jha B. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Res.* 2015;9:48-54. doi:10.1016/j.algal.2015.02.025
55. Shefer S, Israel A, Golberg A, Chudnovsky A. Carbohydrate-based phenotyping of the green macroalga *Ulva fasciata* using near-infrared spectrometry: Potential implications for marine biorefinery. *Bot Mar.* 2017;60(2):219-228. doi:10.1515/bot-2016-0039
56. Korzen L, Pulidindi IN, Israel A, Abelson A, Gedanken A. Single step production of bioethanol from the seaweed *Ulva rigida* using sonication. *RSC Adv.* 2015;5(21):16223-16229. doi:10.1039/C4RA14880K
57. Chemodanov A, Robin A, Golberg A. Design of marine macroalgae photobioreactor integrated into building to support seagrass culture for biorefinery and bioeconomy. *Bioresour Technol.* 2017;241:1084-1093. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.061
58. Jiang R, Linzon Y, Vitkin E, Yakhini Z, Chudnovsky A, Golberg A. Thermochemical hydrolysis of macroalgae *Ulva* for biorefinery: Taguchi robust design method. *Sci Rep.* 2016;6(1):27761. doi:10.1038/srep27761
59. Tsubaki S, Oono K, Hiraoka M, et al. Hydrolysis of green-tide forming *Ulva* spp. by microwave irradiation with polyoxometalate clusters. *Green Chem.* 2014;16(4):2227-2233. doi:10.1039/C3GC42027B
60. Choi W-Y, Kang D-H, Lee H-Y. Enhancement of the saccharification yields of *Ulva pertusa* kjellmann and rape stems by the high-pressure steam pretreatment

process. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2013;18(4):728-735. doi:10.1007/s12257-013-0033-x

61. Access O. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %.
62. Pimentel D, Patzek T, Cecil G. Ethanol Production : Energy , Economic , and Environmental Losses. 2007:25-41.

12.1 פרוטוקול HPLC

לצורך ניתוח כמות סוכרים שהתקבלו בתהליך של טיפול מקדים, הידרוליזה ותסיסה הדגימות נמהלות במים DWW (פי 100 בדגימות משלב טיפול מקדים והידרוליזה, ופי 50 משלב תסיסה). הדגימות פולטרו בפילטר 0.22 מיקרון (Millipore, USA) לתוך מבחנות HPLC (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). לאחר מכן הדגימות מוכנסות למכשיר HPLC:

HPAEC-PAD (High Pressure Anion-Exchange Chromatography coupled with Pulsed Amperometric Detection

למכשיר חיישן Dionex ICS-5000 (Pomplsed Amperometric Detection), שתי משאבות עבודה (Dionex, Thermo Fischer Scientific, MA, USA), קולונה (Aminopack PA 10). וגלאי אלקטרוכימי עם אלקטרודה Ag / Cl המשמשת לזיהוי פחמימות על פי צורת גל. הדגימות נשמרות באוטוספמלר בטמפ' של 5 מעלות.

אנליזת הסוכרים במכשיר מתחילה עם הזרקה של של 4.8 Mm KOH מתוך ה-eluent על ידי משאבה מספר 1 לתוך הקולונה, לאחר מכן מוזרמים מים נקיים, 480 mM NaOH ו-Sodium acetate 1M+ 100mM NaOH על ידי משאבה 2 ביחד עם הדגימה על פי תוכנית פעולה שהוגדרה. בסוף התהליך מבוצעת שטיפה של הקולונה במים. סה"כ משך הזמן ההרצה של התוכנית לכל דגימה היא 47 דקות. התהליך נעשה בטמפ' של 30 מעלות וקצב זרימה של 0.25 מ"ל בדקה. מבחנות בריכוזים ידועים נעשו לכל סוכר שנבדק (רמנוז, גלקטוז, גלוקוז, פרוקטוז, קסילוז, וחומצה גלוקרונית), מ-1.25 µg/ml- 80 µg/ml והם משמשים כסטנדרט לתהליך כימות הפיקים שמתקבלים מהמכשיר לכמות סוכרים בדגימה.

12.1 הידרוליזה, עומס מוצקים וגודל חלקיקים

טבלה 1S - תוצאות סוכרים מטיפול מקדים והידרוליזה

	Rha	Gal	Glu	Xyl	Fri	Glu A	Total sugar
acid	3.95 ± 1.0	0.11 ± 0.00	4.29 ± 0.79	1.52 ± 0.50	0.17 ± 0.00	5.14 ± 0.79	12.01 ± 1.97
acid + Viscozyme	5.13 ± 1.0	0.32 ± 0.09	7.73 ± 2.09	2.00 ± 0.39	0.69 ± 0.00	3.57 ± 0.83	16.69 ± 1.94
acid +mix	3.31 ± 0.7	0.11 ± 0.08	8.08 ± 0.83	2.23 ± 0.42	0.08 ± 0.00	5.04 ± 1.20	17.42 ± 1.57
acid +all	4.28 ± 1.1	0.25 ± 0.11	6.05 ± 1.06	1.41 ± 0.82	0.07 ± 0.00	3.26 ± 1.01	13.96 ± 2.13
heat	0.00 ± 0.0	0.02 ± 0.02	0.78 ± 0.71	0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.83 ± 0.70
heat + Viscozyme	0.00 ± 0.0	0.15 ± 0.06	7.42 ± 0.42	0.39 ± 0.28	0.17 ± 0.00	0.00 ± 0.00	8.02 ± 0.57
heat +mix	0.00 ± 0.0	0.04 ± 0.04	8.69 ± 0.59	0.54 ± 0.20	0.03 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.34 ± 0.84
heat +all	0.00 ± 0.0	0.14 ± 0.10	6.94 ± 0.72	0.38 ± 0.22	0.07 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.89 ± 1.79
Viscozyme	0.00 ± 0.0	0.15 ± 0.11	8.24 ± 1.49	0.53 ± 0.26	0.31 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.57 ± 2.01
mix	0.00 ± 0.0	0.05 ± 0.04	8.85 ± 0.60	0.64 ± 0.19	0.19 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.90 ± 1.03
all	0.00 ± 0.0	0.14 ± 0.09	8.24 ± 1.23	0.54 ± 0.21	0.33 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.77 ± 1.51
H-T	1.14 ± 0.21	0.06 ± 0.04	1.30 ± 0.08	0.94 ± 0.00	0.47 ± 0.03	0.00 ± 0.00	4.21 ± 0.20
H-T+ Viscozyme	0.83 ± 0.21	0.12 ± 0.04	3.50 ± 0.12	0.12 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	4.26 ± 0.30
H-T+ mix	0.67 ± 0.12	0.11 ± 0.06	5.12 ± 1.43	0.26 ± 0.25	0.07 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.85 ± 1.53
H-T+ all	0.88 ± 0.07	0.20 ± 0.05	4.91 ± 1.57	0.21 ± 0.21	0.08 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.88 ± 1.44

בטבלה מוצגים תוצאות הסוכרים שהתקבלו בטיפולים המקדימים ובהידרוליזה האנזימתית. מוצג ממוצע + סטיית תקן, המספרים המוצגים הם אחוז סוכר לחומר יבש (%sugar/ DW)

טבלה 2S - פלט T-test לתוצאות סה"כ סוכרים לניסוי טיפול מקדים והידרוליזה אנזימתית

	Acid	Acid + Viscozyme	Acid + mix	Acid +all	Heat	Heat + Viscozyme	Heat + mix	Heat +all	Viscozyme	Mix	All	H-T	H-T+ Viscozyme	H-T + mix
acid + Viscozyme	0.037													
acid +mix	0.019	0.351												
acid +all	0.198	0.125	0.069											
heat	0.001	0.000	0.000	0.001										
heat + Viscozyme	0.026	0.002	0.001	0.009	0.000									
heat +mix	0.076	0.004	0.002	0.023	0.000	0.069								
heat +all	0.027	0.003	0.002	0.011	0.006	0.222	0.077							
Viscozyme	0.144	0.011	0.006	0.051	0.002	0.176	0.444	0.116						
mix	0.126	0.006	0.002	0.036	0.000	0.043	0.292	0.054	0.424					
all	0.136	0.008	0.004	0.043	0.001	0.100	0.372	0.079	0.459	0.462				
H-T	0.011	0.003	0.001	0.008	0.007	0.003	0.004	0.100	0.031	0.005	0.004			
H-T+ Viscozyme	0.012	0.003	0.001	0.008	0.007	0.003	0.004	0.105	0.032	0.005	0.005	0.445		
H-T+ mix	0.032	0.007	0.004	0.018	0.016	0.091	0.042	0.319	0.092	0.036	0.011	0.199	0.208	
H-T+ all	0.031	0.007	0.004	0.018	0.014	0.085	0.039	0.320	0.090	0.033	0.011	0.184	0.193	0.496

טבלה 3S - פלט T-test לתוצאות שה"כ תשואת סוכרים בעמוס מוצקים שונים

	Acid+ Viscozyme 5%	Acid+ Viscozyme 10%	Acid+ Viscozyme 15%	Acid+ Viscozyme 20%	Acid+ all enzyme 5%	Acid+ all enzyme 10%	Acid+ all enzyme 15%	Acid+ all enzyme 20%	All enzyme 5%	All enzyme 10%	All enzyme 15%
Acid+ Viscozyme 10%	0.058										
Acid+ Viscozyme 15%	0.020	0.109									
Acid+ Viscozyme 20%	0.008	0.024	0.483								
Acid+ all enzyme 5%	0.125	0.158	0.051	0.025							
Acid+ all enzyme 10%	0.026	0.045	0.265	0.169	0.088						
Acid+ all enzyme 15%	0.013	0.028	0.291	0.062	0.048	0.377					
Acid+ all enzyme 20%	0.009	0.019	0.406	0.220	0.031	0.225	0.038				
All enzyme 5%	0.008	0.089	0.210	0.120	0.043	0.478	0.370	0.181			
All enzyme 10%	0.007	0.058	0.460	0.282	0.021	0.134	0.028	0.089	0.086		
All enzyme 15%	0.016	0.007	0.462	0.462	0.045	0.265	0.288	0.438	0.214	0.390	
All enzyme 20%	0.011	0.008	0.471	0.425	0.032	0.196	0.186	0.315	0.139	0.490	0.420

טבלה 4S - פלט T-test כמות סוכרים בעומס מוצקים שונים

	Acid+ Viscozyme 5%	Acid+ Viscozyme 10%	Acid+ Viscozyme 15%	Acid+ Viscozyme 20%	Acid+ all enzyme 5%	Acid+ all enzyme 10%	Acid+ all enzyme 15%	Acid+ all enzyme 20%	All enzyme 5%	All enzyme 10%	All enzyme 15%
Acid+ Viscozyme 10%	0.014										
Acid+ Viscozyme 15%	0.009	0.288									
Acid+ Viscozyme 20%	0.003	0.299	0.434								
Acid+ all enzyme 5%	0.255	0.009	0.008	0.003							
Acid+ all enzyme 10%	0.010	0.195	0.081	0.050	0.008						
Acid+ all enzyme 15%	0.001	0.269	0.409	0.486	0.001	0.004					
Acid+ all enzyme 20%	0.000	0.165	0.453	0.331	0.000	0.002	0.199				
All enzyme 5%	0.008	0.001	0.002	0.000	0.058	0.000	0.000	0.000			
All enzyme 10%	0.264	0.010	0.009	0.002	0.454	0.002	0.000	0.000	0.013		
All enzyme 15%	0.073	0.275	0.171	0.139	0.048	0.482	0.095	0.059	0.006	0.047	
All enzyme 20%	0.012	0.414	0.223	0.201	0.010	0.178	0.103	0.049	0.000	0.006	0.321

טבלה 5S - אחוז סוכרים שהתקבל ניסוי טיפול מקדים והידרוליזה בעומסי מוצקים שונים

	solid load	Rha	Gal	Glu	Xyl	Fri	Glu A	Total sugar
Acid+ Viscozyme	5%	5.13 ± 1.2	0.32 ± 0.11	6.01 ± 1.1	2.00 ± 0.48	0.69 ± 0.99	3.57 ± 1.0	16.69 ± 1.94
Acid+ Viscozyme	10%	3.47 ± 2.0	0.18 ± 0.12	5.56 ± 0.1	1.88 ± 0.47	1.01 ± 1.37	1.19 ± 0.7	12.48 ± 0.98
Acid+ Viscozyme	15%	1.65 ± 1.3	0.08 ± 0.08	4.42 ± 2.8	1.34 ± 0.91	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.0	7.55 ± 2.60
Acid+ Viscozyme	20%	0.86 ± 0.4	0.02 ± 0.04	5.29 ± 0.5	1.26 ± 0.28	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.0	7.68 ± 0.51
Acid+ all enzyme	5%	4.28 ± 1.3	0.25 ± 0.14	5.64 ± 1.1	1.41 ± 1.00	0.07 ± 0.06	3.26 ± 1.2	13.96 ± 2.13
Acid+ all enzyme	10%	2.38 ± 0.7	0.09 ± 0.00	5.22 ± 1.3	1.58 ± 0.06	0.05 ± 0.07	0.06 ± 0.0	9.88 ± 1.70
Acid+ all enzyme	15%	1.50 ± 0.6	0.06 ± 0.02	5.74 ± 0.5	1.64 ± 0.32	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.0	9.26 ± 0.36
Acid+ all enzyme	20%	0.90 ± 0.3	0.06 ± 0.01	5.50 ± 0.5	1.46 ± 0.12	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.0	8.26 ± 0.35
All enzyme	5%	0.00 ± 0.0	0.14 ± 0.11	7.35 ± 2.4	0.54 ± 0.25	0.33 ± 0.36	0.00 ± 0.0	9.77 ± 1.51
All enzyme	10%	0.02 ± 0.0	0.05 ± 0.04	6.56 ± 0.3	0.46 ± 0.14	0.15 ± 0.14	0.15 ± 0.1	7.25 ± 0.35
All enzyme	15%	0.02 ± 0.0	0.04 ± 0.00	5.73 ± 0.3	0.46 ± 0.25	0.16 ± 0.22	0.19 ± 0.1	7.90 ± 2.01
All enzyme	20%	0.02 ± 0.0	0.07 ± 0.02	6.41 ± 1.7	0.52 ± 0.27	0.30 ± 0.43	0.36 ± 0.2	7.30 ± 1.68

טבלה 6S - כמות סוכרים שהתקבלה טיפול והידרוליזה בעומסי מוצקים שונים

	solid load	Rha	Gal	Glu	Xyl	Fri	Glu A	Total sugar
		mg sugar /ml						
Acid+ Viscozyme	5%	1.20	0.06	1.63	0.50	0.02	0.83	4.25
Acid+ Viscozyme	10%	1.31	0.07	2.13	0.72	0.37	1.07	5.67
Acid+ Viscozyme	15%	1.15	0.06	1.84	0.67	0.37	0.96	5.05
Acid+ Viscozyme	20%	0.91	0.05	2.47	0.75	0.02	0.82	4.99
Acid+ all enzyme	5%	0.83	0.04	2.20	0.60	0.02	0.70	4.39
Acid+ all enzyme	10%	1.08	0.04	2.30	0.70	0.02	0.90	5.04
Acid+ all enzyme	15%	0.88	0.03	3.46	0.98	0.02	0.74	6.12
Acid+ all enzyme	20%	0.65	0.04	4.01	1.06	0.02	0.62	6.41
All enzyme	5%	0.00	0.02	2.08	0.12	0.07	0.00	2.29
All enzyme	10%	0.01	0.02	3.06	0.21	0.07	0.01	3.37
All enzyme	15%	0.02	0.03	3.85	0.30	0.10	0.00	4.30
All enzyme	20%	0.02	0.05	5.66	0.45	0.25	0.00	6.44

טבלה 7S - פלט T-test סך סוכרים הירוליזה עם גודל חלקיקי שונים

	1	2	3	4	5	6
2	0.012					
3	0.344	0.418				
4	0.377	0.062	0.414			
5	0.162	0.452	0.123	0.120		
6	0.057	0.005	0.126	0.076	0.012	
7	0.031	0.037	0.021	0.017	0.058	0.002

טבלה 8S - פלט T-test גלוקוז בהידרוליזה עם גודל חלקיקים שונה

	1	2	3	4	5	6
2	0.037					
3	0.037	0.127				
4	0.012	0.230	0.058			
5	0.017	0.253	0.065	0.483		
6	0.208	0.092	0.378	0.067	0.074	
7	0.002	0.004	0.004	0.005	0.006	0.002

12.2 תסיסה דו שלבית ניסויים 2-1

טבלה 9S - כמות סוכרים שהתקבלו לאורך תסיסה דו שלבית ניסוי 1

Exp 1	#	sugar initial (mg/ g DW)	step 1 (mg/ g DW)	between steps (mg/ g DW)	step 2 (mg/ g DW)
time (hr)		0	24		48
Rhamnose	Y-E	35.49 ± 0.0	32.74 ± 0.4	36.17 ± 1.2	37.66 ± 1.1
	Y-Y	35.49 ± 0.0	33.71 ± 0.5	36.43 ± 0.8	35.68 ± 0.4
	E-Y	35.49 ± 0.0	36.72 ± 1.0	35.84 ± 1.3	34.88 ± 0.1
	E-E	35.49 ± 0.0	33.98 ± 2.6	33.84 ± 0.9	32.44 ± 0.9
Galactose	Y-E	2.46 ± 0.0	2.14 ± 0.0	2.12 ± 0.4	0.00 ± 0.0
	Y-Y	2.46 ± 0.0	2.40 ± 0.4	2.65 ± 0.1	1.08 ± 0.1
	E-Y	2.46 ± 0.0	2.46 ± 0.2	3.22 ± 0.6	2.68 ± 0.3
	E-E	2.46 ± 0.0	2.27 ± 0.3	2.85 ± 0.2	2.51 ± 0.1
Glucose	Y-E	55.39 ± 0.0	2.39 ± 0.8	4.38 ± 0.8	0.00 ± 0.0
	Y-Y	55.39 ± 0.0	1.11 ± 0.2	1.68 ± 0.3	1.08 ± 0.1
	E-Y	55.39 ± 0.0	30.17 ± 2.6	29.77 ± 2.0	0.00 ± 0.0
	E-E	55.39 ± 0.0	32.00 ± 0.6	33.55 ± 2.5	27.93 ± 1.9
Xylose	Y-E	25.33 ± 0.0	24.13 ± 1.2	22.93 ± 1.2	20.51 ± 2.0
	Y-Y	25.33 ± 0.0	24.12 ± 2.4	23.97 ± 0.0	20.53 ± 0.4
	E-Y	25.33 ± 0.0	27.62 ± 0.3	24.86 ± 0.7	24.69 ± 1.2
	E-E	25.33 ± 0.0	25.88 ± 0.8	29.12 ± 0.0	29.12 ± 0.7
Fructose	Y-E	9.02 ± 0.0	0.92 ± 0.8	0.74 ± 1.3	0.00 ± 0.0
	Y-Y	9.02 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
	E-Y	9.02 ± 0.0	5.53 ± 0.7	4.56 ± 0.5	0.00 ± 0.0
	E-E	9.02 ± 0.0	5.69 ± 0.7	6.26 ± 0.4	5.30 ± 0.1
Glucronic Acid	Y-E	41.73 ± 0.0	39.92 ± 1.1	32.13 ± 0.8	30.51 ± 0.5
	Y-Y	41.73 ± 0.0	41.60 ± 0.2	31.48 ± 0.5	28.91 ± 0.6
	E-Y	41.73 ± 0.0	40.55 ± 0.5	32.69 ± 0.2	32.58 ± 0.5
	E-E	41.73 ± 0.0	41.61 ± 0.9	0.27 ± 0.3	32.32 ± 1.9
total sugar	Y-E	169.41 ± 0.0	102.23 ± 2.5	98.46 ± 5.9	88.68 ± 3.7
	Y-Y	169.41 ± 0.0	102.23 ± 1.8	96.21 ± 1.6	88.09 ± 1.0
	E-Y	169.41 ± 0.0	143.00 ± 1.7	130.18 ± 1.5	94.83 ± 1.0
	E-E	169.41 ± 0.0	141.43 ± 3.5	137.86 ± 3.3	129.62 ± 4.0

טבלה 10S - תוצאות סוכרים מניסוי תסיסה דו שלבי מספר 2

exp 2		sugar initial (mg/ g DW)	Sugar step 1 (mg/ g DW)		Sugar between steps (mg/ g DW)	Sugar step 2 (mg/ g DW)	
		0	24	48		24	48
Rhamnose	Y-E	44.12 ± 0.0	34.57 ± 0.7	- ± -	36.17 ± 1.8	24.17 ± 0.42	27.31 ± 0.1
	Y-Y	44.12 ± 0.0	38.96 ± 1.3	- ± -	36.43 ± 0.7	32.93 ± 0.6	- ± -
	E-Y	44.12 ± 0.0	35.53 ± 0.2	36.40 ± 1.16	35.84 ± 1.0	31.02 ± 1.1	- ± -
	E-E	44.12 ± 0.0	35.22 ± 0.4	38.78 ± 0.63	33.84 ± 0.7	27.44 ± 2.1	27.26 ± 2.3
Galactose	Y-E	3.17 ± 0.0	1.48 ± 0.3	- ± -	2.12 ± 0.4	0.50 ± 0.1	0.58 ± 0.1
	Y-Y	3.17 ± 0.0	1.86 ± 0.1	- ± -	2.65 ± 0.1	1.11 ± 0.1	- ± -
	E-Y	3.17 ± 0.0	1.86 ± 0.1	1.97 ± 0.02	2.46 ± 0.2	1.85 ± 0.2	- ± -
	E-E	3.17 ± 0.0	1.77 ± 0.2	2.10 ± 0.10	2.85 ± 0.2	1.51 ± 0.1	1.40 ± 0.1
Glucose	Y-E	101.74 ± 0.0	1.20 ± 0.3	- ± -	4.38 ± 0.8	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.1
	Y-Y	101.74 ± 0.0	3.46 ± 1.0	- ± -	1.68 ± 0.3	0.63 ± 0.1	- ± -
	E-Y	101.74 ± 0.0	19.90 ± 0.9	16.23 ± 0.58	16.77 ± 2.0	0.09 ± 0.2	- ± -
	E-E	101.74 ± 0.0	21.27 ± 0.5	16.39 ± 0.49	16.55 ± 2.5	12.82 ± 0.7	12.71 ± 0.5
Xylose	Y-E	28.27 ± 0.0	18.78 ± 0.2	- ± -	22.93 ± 1.2	9.18 ± 0.1	7.67 ± 0.7
	Y-Y	28.27 ± 0.0	20.48 ± 0.4	- ± -	23.97 ± 0.0	19.17 ± 0.5	- ± -
	E-Y	28.27 ± 0.0	19.17 ± 0.1	21.33 ± 0.41	24.86 ± 0.7	17.47 ± 0.3	- ± -
	E-E	28.27 ± 0.0	19.62 ± 0.2	24.00 ± 0.82	19.41 ± 0.4	14.64 ± 0.9	15.38 ± 1.3
Fructose	Y-E	12.06 ± 0.0	0.00 ± 0.0	- ± -	0.74 ± 1.3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
	Y-Y	12.06 ± 0.0	0.00 ± 0.0	- ± -	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	- ± -
	E-Y	12.06 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.00	4.56 ± 0.5	0.00 ± 0.0	- ± -
	E-E	12.06 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.00	6.26 ± 0.4	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
Glucronic Acid	Y-E	38.39 ± 0.0	28.66 ± 0.7	- ± -	32.13 ± 0.8	23.78 ± 0.5	17.46 ± 0.3
	Y-Y	38.39 ± 0.0	31.95 ± 0.6	- ± -	31.48 ± 0.5	24.20 ± 0.5	- ± -
	E-Y	38.39 ± 0.0	29.84 ± 0.8	32.07 ± 0.63	32.69 ± 0.2	20.05 ± 0.6	- ± -
	E-E	38.39 ± 0.0	29.62 ± 0.5	34.45 ± 1.26	32.24 ± 0.3	28.42 ± 1.0	17.49 ± 1.7
total sugar	Y-E	227.76 ± 0.0	84.69 ± 1.6	- ± -	98.46 ± 4.3	57.62 ± 0.2	53.02 ± 0.3
	Y-Y	227.76 ± 0.0	96.70 ± 2.5	- ± -	96.21 ± 1.6	78.05 ± 0.5	- ± -
	E-Y	227.76 ± 0.0	106.30 ± 0.7	107.99 ± 2.28	130.18 ± 1.5	70.47 ± 1.8	- ± -
	E-E	227.76 ± 0.0	107.50 ± 0.9	120.73 ± 3.52	137.86 ± 3.3	84.83 ± 4.4	74.24 ± 5.1

12.3 הפקת אתנול בקנה מידה מעבדתי

תוצאות סוכרים

טבלה 11S - סוכרים בקט scale

Scale up	Repeat	hydrolysis	step 1	Between fermentation steps	step 2 24 h	step 2 36 h
Rhamnose	1	54.13	32.90	33.84	30.39	
	2	58.48	30.05	27.60	31.92	31.76
	3	47.97	31.47	30.39	30.14	31.70
Galactose	1	5.80	1.06	0.29	0.12	
	2	9.54	1.46	1.06	0.82	0.63
	3	7.01	1.22	1.17	1.23	1.24
Glucose	1	92.82	1.09	0.55	0.00	
	2	88.24	0.75	1.04	0.29	0.29
	3	87.11	0.57	0.92	3.24	3.60
Xylose	1	23.46	14.36	12.80	0.10	
	2	24.46	15.07	12.87	3.04	0.53
	3	21.00	14.50	13.07	12.56	13.17
Fructose	1	5.77	0.00	0.00	0.00	
	2	0.21	0.05	0.05	0.05	0.05
	3	6.88	0.14	0.14	0.14	0.14
Glucronic Acid	1	8.30	6.28	1.99	0.00	
	2	9.67	5.18	2.02	1.78	1.77
	3	5.60	4.77	1.17	1.01	1.28
total sugar	1	190.28	55.68	49.47	30.61	
	2	190.61	52.57	44.64	37.91	35.03
	3	175.57	52.68	46.88	48.33	51.13

Abstract

The increasing trend in world's population and life's expectancy and quality led to an growing use of fossil fuels. The use of fossil fuels causes air pollution, morbidity and enhances the greenhouse effect. Fossil fuels are a non-renewable resource; therefore the transition to renewable energy and bio-fuels is of much importance.

Bio-ethanol is the world's most commonly used renewable fuel for transportation. Bio-ethanol can be produced from several carbon sources such as corn, sugar cane and algae. The use of algae as a raw material for the production of ethanol can be an environmental solution, since algae grows in the sea and does not consume agricultural areas and fresh water. In our work we used *Ulva* sp. algae as a carbon source for ethanol production. *Ulva* sp. have a high amount of carbohydrates and high potential for ethanol producing.

The present study answers two knowledge gaps of ethanol production from algae. The first gap is the difficulty to break the complex carbohydrates present in the cell wall, such as cellulose and hemicelluloses into monosaccharide's that microorganisms can ferment to produce ethanol . Therefore, the first part in the research examines various methods of *Ulva* sp. hydrolysis, looking for the best parameters for pre-treatment and enzymatic hydrolysis.

The second gap is the ability to ferment a variety of monosaccharide's such as Rhamnose, Xylose, and Glucronic Acid into ethanol.

After pre-treatment and enzymatic hydrolysis was performed, we carried out a two-step fermentation process. In the first step, fermentation was carried out by *Saccharomyces cerevisiae*, which is defined as the best fermenting organism and has high yield abilities of producing ethanol from glucose, but cannot consume other sugars. In the second step we used *Escherichia coli*, an organism able to ferment a wider variety sugars to ethanol but with low ethanol yield, so the sugars that were not consumed in the first step would be used in the second step. In total, we examined six combinations of single and two-step fermentation experiments (*S. cerevisiae* only, *E. coli* only, *S. cerevisiae*→ *E. coli*, *S. cerevisiae*→ *S. cerevisiae*, *E. coli* → *S. cerevisiae* and *E. coli* → *E.coli*.) After obtaining the best hydrolysis and fermentation results at a small scale, we tested the whole process of producing ethanol from *Ulva* sp. (pretreatment, enzymatic hydrolysis and two step fermentation) in a 1L volume scale up.

The results showed that pre-treatment with acid (2% H₂SO₄) followed by enzymatic hydrolysis with an 'Enzyme mix' (amyloglucosidase 3.5μL/mL, α-

amylase 1 μ L/mL and cellulase 1 μ L/mL for 24h at 45°C and 150 RPM) produces the highest percentage of monosaccharides from *Ulva* sp.: Rhamnose (3.31%) Galactose (0.11%) Glucose (8.08%) Xylose (2.23%) Fructose (0.08%) and Glucuronic Acid (5.04%). The total level of monosaccharides was $17.42 \pm 1.42\%$.

We then carried two-step fermentation experiments. Fermentation in the first step by *S. cerevisiae* produced 30.72 ± 5.6 mg ethanol / g Dry Weight. Fermentation in the second step, by *E. coli* produced 8.8 ± 1.57 mg ethanol / g DW. The total ethanol produced from two-step fermentation is 39 mg ethanol / g DW.

In the scale-up of the two-step fermentation to 1L, fermentation in the first step by *S. cerevisiae* produced 40.15 mg ethanol / g DW. Fermentation in the second step by *E. coli* produced only 3.04 mg ethanol / g DW. In total, the scaled-up two-step fermentation process produced 43.19 mg ethanol / g DW, only 8% more ethanol compared to single-step fermentation by *S. cerevisiae*.

Conclusion: combination of acid pre-treatment and enzymatic hydrolysis gives the highest percentage of sugars from dry algae (17% sugar from algae). The two-step fermentation from *Ulva* sp. (first by *S. cerevisiae* and then by *E. coli*) resulted in an ethanol yield of 23%, the highest compared to fermentation in one step only by *S. cerevisiae* (39.59 mg ethanol / g DW vs. 30.72 mg ethanol / g DW).



Tel Aviv University

Faculty of Exact Sciences

Raymond and Beverly Sackler

**Environmental impact of ethanol production process from the
alga *Ulva* sp. by fermentation in multistep processes with
Saccharomyces cerevisiae and *Escherichai coli*.**

This paper was submitted as the thesis for the M.Sc. degree

At Porter School of the Environment and Earth Sciences

The Department of Environmental Studies

By: Amichai Gillis

This study was carried out under the supervision of:

Prof. Alexander Golberg, Porter School of Environment and Earth
Sciences, TAU.

Prof. Martin Kupiec, Biotechnology, Faculty of Life Sciences, TAU.

March 2020