

לקרן המדען הראשי

קוד זיהוי	א. נושא המחקר
13-0009-148	טיפול משולב בשפכי בתי בד "עקר" וגפת זיתים ליצור מוצרים ביוטכנולוגיים

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	
חוקר ראשי	עוזאיה	חסן
חוקרים משניים		
2	לנדאו	יאן
3	מרקוביץ	אלכס
4	הדר	יצחק
5	שבתאי	אריאל
6		
7		

ג. כללי			
מוסד מחקר של החוקר הראשי			
מו"פ אגודת הגליל			
תאריכים		סוג הדו"ח	
תקופת המחקר עבודה מוגש הדו"ח	התחלה	מסמך	
			סיום
	שנה חודש		שנה חודש
	11 / 2015		7 / 2017

ד. מקורות מימון עבורם מיועד דו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשלושת השנים בשקלים
קרן מדען ראשי – מרכז מצוינות		1,200,000

ה. תקציר

מוהל זיתים (עקר) ידוע בתכונותיו השליליות של זיהום מכוני טיהור שפכים וגם קרקעות. במהלך הפרויקט בנוסף להפקת 5 הפרקציות הפינוליות הרגילות (Anti-solvent, STP, FTP, AAA, nCAA) ממוהל הזיתים הצלחנו להפיק עוד 2 פרקציות מהאנטיסולבט. רמת הפינולים בפרקציות השונות היה בממוצע 189 מ"ג פינולים אקוולנט לחומצה קפאית לכל 800 מ"ג תמצית. בצענו אפיון לחומרים העיקריים שבכל פרקציה. בגלל שפרקציות האנטיסולבט היא העיקרית שכל ליטר של מוהל זיתים מכיל בסביבות 60 גרם תמצית שעלות הייצור שלה נמוכה יחסית אז פיתחנו שיטה להפיק מהפרקציה הזאת עוד שתי פרקציות שמכילות חומרים מיוחדים. בצענו בדיקת היכולת של 7 הפרקציות לתת הגנה על העור מפני קרינת שמש UV ע"י בדיקת פקטור ההגנה מהשמש שנקרא SPF והיחס בין UVA וגם UVB. התוצאות של 5 הפרקציות הרגילות הראו טווח SPF בין 9.9-33.4. החלטנו להתרכז בפרקציה של אנטיסולבנט שבבדיקה הראשונית הראתה תוצאות נמוכות אבל הפרקציות שהכנו אותן מהפרקציה הזאת שקראנו להן אתיל אצטט אנטיסולבנט ואתיל אצטט פזה שלישית הכילו מדד של SPF שנע בין 28-33.9 וזה ערך גבוה מאוד וחשוב לתעשייה. בנוסף לזה קבענו את תחום הגל הקריטי CW לכל פרקציה ומצאנו ערכים שנעים בין 345-380 וזה טוב מאוד. על ידי שימוש בשיטות הפרדה שונות הצלחנו במיוחד שימוש בשרף מיוחד מסוג XADs הצלחנו להגיע להפקת 10 גרם תמצית פעילה מאוד מכל ליטר של עקר שנותנת הגנה מצוינת לעור מפני קרינת השמש.

נבדקה פעילותן של 5 הפרקציות הפינוליות הרגילות (Anti-solvent, STP, FTP, AAA, nCAA) על התפתחות הטפיל קוקסידיה. פרקציית Antisolvent גרמה לעיכוב ספורולציה ב-40% מהאואוציסטות, לעומת הפרקציות האחרות אשר גרמו לעיכוב הקטן מ-7%. כמו כן, $K_2Cr_2O_7$ המשמש כחומר

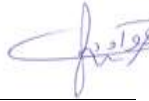
חיטוי נגד חיידקים מעודד ספורולציה והוחלט לסלקו מהמבחן. בנוסף לזה בדקנו שילוב בין פרקציית אנטיסולבנט עם חומצה גלית ומצאנו שריכוז חומצה גלית של 450ppm בנוסף ל-2000ppm אנטיסולבנט, הראו שיעור ספורולציה של כ-30%, לעומת שיעור ספורולציה של כ-40% בלי חומצה גלית. השילוב של אנטיסולבנט ו-550 ח"מ חומצה גלית גורם ל-70% עיכוב. בשלב הזה החלטנו לעבור לניסויים in vivo שבשלב הראשון, נלמד לאלח אפרוחים בגיל 10 ימים ב *Eimeria tenella* ו- *Eimeria necatrix* ואחר כך נזין אותן בפרקציות האנטיסולבנט בהשוואה לחומצה גלית בריכוזים שונים כדי להעריך את היכולת של הפרקציה הטבעית שלנו לתת הגנה לגוף האפרוחים מפני הקוקסידיות. תוצאות ראשוניות הראו שעל אף הבעייה שנגרמה מתמותה בסלמונלה, נלמדה הוקעה ישירה לזפק בשלושת המינונים והתקבלו lesions כמצופה. כמו כן, האפרוחים שקיבלו מים מטופלים שתו כמות דומה של מים.

כדי להפיק ביוצ'אר (סוג של מספח) הגפת המוצקה של הזיתים מזנים שונים עברה תהליך שריפה ללא חמצן (פירוליזה) בשתי טמפרטורות של 350 או 450 מעלות למשך 5 שעות. הצלחנו להפיק ביוצ'אר ביעילות קרוב ל-30% מהסוגים השונים של הגפת. ביוצ'אר מהזן של פקואל שהופק מתהליך דו פאזי הראאה את התוצאות הטובות ביותר בהרחקת מתכות כבדות ביעילות של יותר מ-85%. הביוצ'אר מהגפת היה יותר טוב מפיחם פעיל מסחרי בהרחקת מתכות שונות בעיקר נחושת ועופרת. ההרחקה מתבססת בעיקר על קבוצות פונקציונליות שנמצאות בפרקציה של הצילולוז שיש בביוצ'אר. כנראה שטח הפנים של הביוצ'אר משחק פחות בתהליך ההרחקה של המתכות. ביצענו שפעול פיזיקלי לביוצ'אר של הגפת והצלחנו לקבל פיחם פעיל עם שטח פנים גבוה פי כמה מביוצ'אר שגרם לעלייה ביכולת של הפיחם של הגפת להרחיק תרכובות רעילות שונות מקבוצת PAH מתמיסות מימיות. ללא ספק הביוצ'אר וגם הפיחם שהפקנו מהגפת הם בעלי יכולת סינון והרחקה של מזהמים שונים משפכי תעשייה כמו מתכות כבדות וגם PAH.

בחנו את הפוטנציאל של הפטרייה *Pleurotus* מזן הבר PC9 ושל המוטנט OE7, המתאפיין ביכולת פחותה לייצר צלולאזות, לטייב גפתות מהזנים סורי, נבלי, פיקואל ותערובת של זנים ע"י גידול שלהן למשך 22 יום, להזנת מעלי גירה. התוצאות הראו שבשונה מהמצופה, כי המוטנט משאיר יותר שמן בגפת מאשר זן הבר. לעומת זאת, לא ניכר חסרוננו בפירוק מרכיבי דופן התא, אך כן יתרון קל בפירוק הליגינין. בדקנו את הנעכלות in vitro למנה שמכילה 50%. לאור התוצאות כי למרות שלפיקואל יש את תכולת הפנולים הגבוהה ביותר, נעכלותו היתה הגבוהה ביותר, ללמד על ספציפיות בקשר פטריה גפת וחיידקי כרס גפת. קשה מתוך תוצאות המחקר להמליץ חד משמעית על עדיפות לזן הבר או למוטנט.

1. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן.

16.7.20		מו"פ הגליל	בכר עוואודה	גריס גדעון	חסן עזאיזה
17		אמדת הגליל האגודה הערבית המדעית למחקר ופיתוח בינאות 587			
תאריך	רשות המחקר	אמרכלות (רשות המחקר)	מנהל המכון	מנהל המחלקה	חוקר ראשי

דו"ח מדעי סופי למחקר מס 13-0009-148

טיפול משולב בשפכי בתי בד "עקר" וגפת זיתים ליצור מוצרים
ביוטכנולוגיים

דו"ח סופי-2014-2017

מוגש ע"י

פרופ' חסן עזאיזה – מו"פ אזורי אגודת הגליל – שפרעם

ד"ר מנאל חאג' זארובי - מו"פ אזורי אגודת הגליל – שפרעם

גברת סאמיה עבדאלהאדי - מו"פ אזורי אגודת הגליל – שפרעם

ד"ר יאן לנדאו – מכון וולקני – בית דגן

ד"ר אלכס מרקוביץ – מכון וטרינרי – בית דגן

פרופ' יצחק הדר – פקולטה לחקלאות –אוניברסיטה עברית –

רחובות

ד"ר אריאל שבתאי - מכון וולקני – נווה יער

הצהרה: אני מצהיר שהניסויים והתוצאות אינם מהווים המלצות
לחקלאים.

בברכה,



פרופ חסן עזאיזה

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

Abdelhadi, O. Samya, Dosoretz, G. Carlos, Rytwo, Giora, Gerchman, Yoram, Azaizeh, Hassan. 2017. Production of biochar from olive mill solid waste for heavy metal removal, *Bioresource Technology* 244:759-767. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08>.

מטרות של המחקר:

- א. הפקת ביוצ'אר מהגפת של הזיתים ושפעולו לייצור מספח להרחקת מתכות כבדות ומזהמים מקבוצת ה-PAH.
- ב. הפקת פרקציות מהעקר (מוהל הזיתים), איפיונם ובדיקה היכולת שלהן לתת הגנה על העור מפני קרינת שמש ו-UV ע"י בדיקת פקטור ההגנה מהשמש SPF והיחס בין UVA וגם UVB.
- ג. בדיקת הפוטנציאל של הפטרייה *Pleurotus* מזן הבר PC9 ושל המוטנט OE7 לטייב גפת מהזנים סורי, נבלי, פיקואל ותערובת של זנים, להזנת מעלי גירה.
- ד. טיפול/מניעת קוקסידיוזיס בעופות הגדלים על רפד.

תוצאות ודיון לכל מטרה:

A1) Production of biochar from olive mill solid waste for heavy metal and PAH removal

Abstract:

Commercial Activated Carbon (CAC) and biochar are useful tools for removing heavy metals (HM) from water, but their production is costly. We tested the production of biochar from solid waste of Picual and Souri olive cultivars, which were milled using two- or three-phase oil separation. The biochar yield was 24-35% of the biomass, with a surface area of 1.65 - 8.12 m²/g (using the Langmuir model), as compared to 1100 m²/g for CAC. Picual residue from the two-phase milling technique, when pyrolysed at 350⁰C, had the best cumulative removal capacity for Cd⁺², Cu⁺², Ni⁺², Pb⁺², Se⁺² and Zn⁺² compared to other biochar types and was more efficient than CAC. This suggests that surface area cannot be used as a sole predictor of HMs removal capacity. FTIR analysis revealed the presence of different functional groups in the different biochar types, which may be related to the differences in HMs removal capacities.

1.1 Materials and Methods:

OMSW of Picual and Souri cultivars were collected during the winters of 2015 and 2016 from two- and three-phase production sites at Kibutz Ramon, Iksal, Tzipori and Daliat el Carmel, Israel. The samples were dried under cover for two weeks then stored in plastic bags at room temperature (20-22⁰C).

1.1. Preparation of Biochar

The biochar was prepared from the two cultivars where each type was used as mixed biomass (Whole) or physically separated to cellulose (C) and Kernel (K) using sieves with diameter greater than 12 mesh. Pyrolysis was performed on each fraction in a special one liter jar at temperatures of 350⁰C or 450⁰C for 5 h. The yield of the different biochar samples was determined by weighting the resulting solid fraction.

1.2. Determination of the surface area using liquid phase adsorption

Aqueous Methylene Blue (MB, CARLO ERBA) was used as the adsorbate in a liquid phase adsorption experiment. An aqueous solution was prepared by mixing 40 mg of MB with 40 ml distilled water to obtain 1000 ppm, which was then diluted to obtain 33 ppm. Adsorption experiments were conducted by weighing 13 different biochar samples (2-1000 mg), placing them in 45 ml flasks with 30 ml MB solution, incubating for 24h at 25⁰C, and shaking at 100rpm. The

samples were allowed to settle for another 24h, and then the liquid was filtered through a 0.45µm filter (PTF-425-013). The concentration of the adsorbate (MB) in the adsorption samples (biochar) were determined by UV/visible spectrophotometer at 660 nm. The Langmuir model (eq. 1) was tested for equilibrium distribution at ambient temperature for the calculation of the surface area. The Langmuir model can be described by the following equation:

$$q_e = \frac{(q_m * K_a * C_e)}{1 + K_a * C_e} \quad (1)$$

where q_e (mg g⁻¹) is the adsorbed amount per gram of adsorbent, C_e (ppm) is the concentration in the aqueous solution, q_m (mg g⁻¹) is the maximum adsorption capacity and K_a (l mg⁻¹) is the Langmuir model constant.

Langmuir surface area results were compared with the Brunauer-Emmett-Teller (BET) model. The samples were analyzed using nitrogen adsorption-desorption at 77 K.

1.3. Heavy metals solution and removal capacity of the biochar

A stock solution of Cd⁺², Cu⁺², Ni⁺², Pb⁺², Se⁺² and Zn⁺² was prepared by dissolving their respective salts [Pb(NO₃)₂.6H₂O, Ni(NO₃)₂.6H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂SeO₄, 3CdSO₄.8.H₂O, CuCl₂.2H₂O] (all from Merck) in deionized water at a final concentration of 50ppm. The initial pH of the prepared stock solution was 5.2.

1.3.1 Batch experiments

To test the potential of the biochar to remove heavy metals from solution we used 500 mg of biochar or the powdered commercial activated carbon (CAC, Merck) as control. To each 120 ml flask, a 50ml heavy metal mix solution was added. The flasks were incubated on a shaker at 100rpm at 25°C. Samples were taken in triplicates at five time intervals of: 0, 5, 15, 30, 60 min. After measuring pH, each sample was filtered using a 0.45 µm membrane (JET BIOFIL). Filtrate samples were digested using nitric acid (10%), and then incubated at least 24h before measuring the heavy metal concentration in each sample using an ICP (720-ES, Varian).

1.3.2 ATR-FTIR Analysis

Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra were measured on a Nicolet Avatar 320 FTIR (Nicolet Analytical Instruments) using a MIRacle ATR device with a diamond crystal plate (Pike Technologies). Spectra were recorded at 600-4000 cm⁻¹ nominal resolution with mathematical corrections yielding a 1.0 cm⁻¹ actual resolution. OMNIC 8.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) software analytical procedures were used to convert the spectra from ATR to absorbance and to perform additional analysis. Each spectrum was measured 100 times.

2. Results and Discussion

Yields of the different pyrolysed OMSW components (Whole, Cellulose or Kernels) are presented in Table 1. Biochar yield decreased as the temperature was increased, in accordance with previous work (Aljundi and Jarrah, 2008; Baccar et al., 2009).

2.1. Surface area

The calculated surface areas of the different biochar particles, based on either Langmuir model or BET theory, are summarized in Table 2. According to the Langmuir model, material from the three-phase process of both Picual and Souri, had a greater surface area than that from the two-phase process. The highest surface area (8.12 m²/g) was from the Picual three-phase material (Table 2).

2.2 Heavy metal removal by OMSW Biochar

Biochar made from unseparated OMSW (Whole) of Picual two-phase oil production at 350°C had the same ability to remove heavy metals as cellulose biochar produced at 350°C or at 450°C (Fig

1). The removal percentage was up to 88% except for Se, which was 5% and 18% for cellulose at 350⁰C or 450⁰C, respectively. From the economical and energetic aspects, it is better to produce biochar from cellulose at 350⁰C than at 450⁰C, and there is no need to separate cellulose from kernels. All biochar types had a very high removal capacity, with the greatest for Pb and Cu (99.69% and 98.63% respectively) and the least for Se (19.55%). Kernels alone had very low metal removal (for Pb up to 90% and less than 40% for the Cu) (data not shown).

The cumulative removal capacity by cellulose biochar of the Picual three-phase produced at 450⁰C was two-fold more than for cellulose or whole OMSW obtained at 350⁰C (Fig. 2), however, it was two-fold lower than Picual-cellulose two-phase obtained at the same temperature (Fig. 1). The removal capacity of the biochar for Pb and Cu was greater than 90%, however the removals of the other metals were ca 20% for each except for Se which was only 8%. Biochar produced from two-phase Picual was better than biochar produced from the three-phase, especially from the cellulose fraction (Figs. 1 and 2).

The cumulative removal capacity of biochar produced at 350⁰C or at 450⁰C from cellulose of Souri two-phase showed 1.5-fold more compared to OMSW whole after 60 min of incubation (Fig. 3). The removal capacity by cellulose obtained at 350⁰C or at 450⁰C was the same, ranging between 75-99%, except for Se where removal did not exceed 8%. Biochar produced from cellulose of the Souri two-phase was better for heavy metal removal than whole OMSW at both temperatures.

The removal capacity of biochar produced from cellulose of Souri three-phase obtained at 450⁰C was better than cellulose obtained at 350⁰C and whole OMSW (Fig. 4). The removal of Pb and Cu was greater than 80%, and the removal of the other metals ranged between 15%-30%. Similar to Picual, the cumulative removal capacity of biochar produced at 350⁰C or at 450⁰C from cellulose of the Souri two-phase was better than three-phase (Figs. 3 and 4).

2.3 Heavy metals removal by commercial activated carbon

The cumulative removal of heavy metals by commercial activated carbon (CAC) was less than that of Picual and Souri biochar, especially the two-phase (Fig. 5). The removal capacity for CAC of Pb and Cu after 60 min of incubation was 54% and 74% respectively, whereas the removal for the other metals did not exceed 30%. Biochar produced from OMSW was more efficient in heavy metal removal compared to CAC, therefore, producing biochar from the OMSW-cellulose is superior to the commercial CAC. There was no correlation between surface area and the removal capacity of the different OMSW biochars produced at different temperatures.

2.4 FTIR analysis of different biochar types

The results of the ATR-FTIR spectra were measured for the biochar produced at 350⁰C or at 450⁰C from the OMSW whole of the two cultivars Picual and Souri two- as well as the three-phase. The spectra showed the following 11 assignments (Fig. 6):

1. The band of xylan (hemicellulose) C=O is small in all samples. As the matter of fact traces of it can only be seen in both cultivars two-phase of the 450⁰C samples.
2. A very small shoulder slightly more noticeable in two-phase of the 450⁰C samples.
3. In all samples we can see this band. At 350⁰C in "Picual two-phase" relatively smaller, compared to the others. In the 450⁰C a larger band for the "Souri three-phase".
4. In the 350⁰C can be seen as band in both Souri two and three-phase (and shoulder only for the Picual). In the 450⁰C the band becomes even clearer for the Souri two-phase but flattens for the three-phase.
5. Appears in all. More notable on two-phase. This is especially emphasized in the 450⁰C. In the 350⁰C it appears the exact location and form differs.
6. Very small ("flat") on all samples.

7. Notable mainly on “Picual three-phase” samples. In the 450⁰C can be seen also for the “Souri two-phase”.
8. In both 350⁰C and 450⁰C, it is observed mainly in the Picual samples, more notable on the three-phase.
9. Appears in all samples. More flat in “Souri three-phase”.
10. Can be seen and very similar in all for the 350⁰C samples. In the 450⁰C it is slightly larger for the “Picual two-phase”.
11. Can be seen and it is very similar in all samples of the 450⁰C. In the 350⁰C it is slightly larger for Picual samples.

These functional groups found in both cultivars may explain in part why the biochar produced in the two-phase at 350⁰C (especially for the Picual) exhibits better removal capacity for the various heavy metals compared to the others. The more significant absorption bands for the two-phase samples, that are considerably smaller in the three-phase, are peaks 5 (C–H deformation in cellulose and hemi cellulose) and 9 (C–O stretch in cellulose and hemi cellulose) (Fig. 6). Combined with the fact that cellulose samples exhibit better performance than the "whole" samples, may lead to the conclusion that a main functional group in the successful metals removal is related to remains of cellulose: In the Picual samples those remains are larger, and in general- at 450⁰C remains of cellulose fraction decrease (as it is reduced by the facts that cellulose absorption bands flatten). In any case, the detailed link between specific functional groups and successful metals removal requires further investigation.

Table 1: The obtained mean yield (%) of biochar of the different OMSW types at 350⁰C and 450⁰C. Data is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Olive Cultivar	Process Type	Pyrolysis temperature	Yield (%)
Picual	Two-phases	Whole ^a @450 ⁰ C	25.69 $\pm$ 0.63
		Whole @350 ⁰ C	35.37 $\pm$ 0.45
		C ^b @450 ⁰ C	24.38 $\pm$ 0.67
		C @350 ⁰ C	34.38 $\pm$ 0.56
		K ^c @450 ⁰ C	26.79 $\pm$ 0.15
	Three-phases	Whole @450 ⁰ C	25.01 $\pm$ 0.19
		whole@350 ⁰ C	33.4 $\pm$ 0.06
		C @450 ⁰ C	24.16 $\pm$ 0.41
		C @350 ⁰ C	31.13 $\pm$ 0.06
		K @450 ⁰ C	26.71 $\pm$ 0.109
Souri	Two-phases	Whole @450 ⁰ C	26.34 $\pm$ 0.14
		Whole @350 ⁰ C	30.97 $\pm$ 0.08
		C @450 ⁰ C	23.62 $\pm$ 0.91
		C @350 ⁰ C	30.37 $\pm$ 0.28
		K @450 ⁰ C	27.33 $\pm$ 0.37
	Three-phases	Whole @450 ⁰ C	23.96 $\pm$ 1.08
		Whole @350 ⁰ C	31.47 $\pm$ 0.24
		C @450 ⁰ C	23.91 $\pm$ 0.4
		C @350 ⁰ C	31.53 $\pm$ 0.24

		K @450 ⁰ C	26.95 ± 0.41
--	--	-----------------------	--------------

a= OMSW not separated; b=Cellulose; c= Kernels

Table 2: The mean surface area of biochar produced at 450⁰C of the different OMSW types using Langmuir (MB) and BET methods. Data is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Type @450⁰C	SA_{MB} (m²/g)	SA_{BET}(m²/g)
Picual Two-phases	1.65 $\pm$ 0.14	1.0 $\pm$ 0.005
Picual Three-phases	8.12 $\pm$ 0.85	3.5 $\pm$ 0.0175
Souri Two-phases	3.48 $\pm$ 0.01	1.2 $\pm$ 0.006
Souri Three-phases	4.30 $\pm$ 1.22	5.3 $\pm$ 0.0265
Activated Carbon	-	1100 $\pm$ 5.5

Figure 1: The removal (%) values of the six heavy metals using the **Picual two-phases (a) Whole @350⁰C, (b) Whole @450⁰C, (c) Cellulose @350⁰C, and (d) Cellulose @450⁰C** biochar after incubation for 0, 5, 15, 30, 60 min. Data is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Figure 2: The cumulative removal (%) values of the six heavy metals using the **Picual three-phases** biochar after incubation for 0, 5, 15, 30, 60 min. Each bar is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Figure 3: The cumulative removal (%) values of the six heavy metals using the **Souri two-phases** biochar after incubation for 0, 5, 15, 30, 60 min. Each bar is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Figure 4: The cumulative removal (%) values of the six heavy metals using the **Souri three-phases** biochar after incubation for 0, 5, 15, 30, 60 min. Each bar is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

Figure 5: The cumulative removal (%) values of the six heavy metals using the **commercial activated carbon (CAC)** after incubation for 0, 5, 15, 30, 60 min. Each bar is mean of 3 replicates $\pm$ SD.

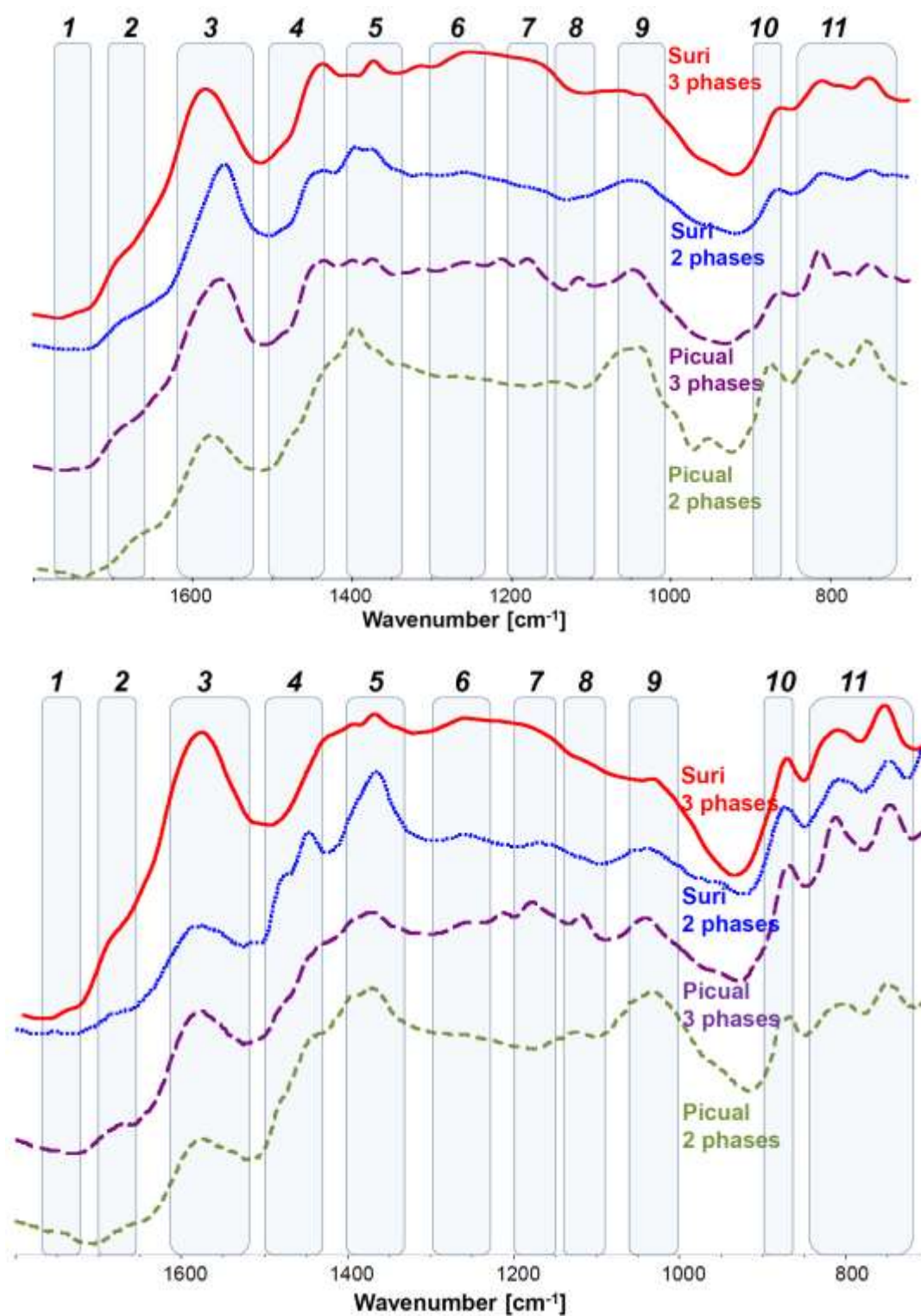


Figure 6: Summary of the functional groups associated with the different wavelength ranges between 800-1800 cm^{-1} obtained for the different biochar samples produced at 350°C (top) or at 450°C (bottom).

A2) PAH's removal by charcoal derived from olive mill solid wastes (OMSW)

Experimental conditions:

The PAH's stock solution was prepared by dissolving Pyrene ($C_{20}H_{12}$), fluoranthene ($C_{26}H_{16}$) and phenanthrene ($C_{14}H_{10}$) (Merck) in 80:20 ACN, deionized water at concentration of 33ppm.

a. Biochar without activation:

To test the potential of the produced biochar to remove PAH's from solution we used 500 mg of either biochar or the commercial activated carbon (CAC, Merck) as control, which was placed in 120 ml plastic flasks in triplicates. To each flask, a 50 ml PAH's solution was added. The flasks were incubated on a shaker at 120rpm at 25°C. Samples were taken in triplicates after five min of incubation. The samples were filtered using a filter membrane of 0.22 μ m (JET BIOFIL). The results showed that biochar produced at 350°C or at 450°C from both two as well as three phase using the different fractions resulted in low removal capacity to all the PAHs (Figs 1, 2), whereas commercial CAC resulted in high removal capacity, 92-100% removal (Fig. 3)..

Fig. 1. The cumulative removal (%) values of the three PAH's using the **Picual and Suri- two and three phase** biochar obtained at 450°C after incubation for 5 min. Each data point represents an average of 3 replicates $\pm$ SD.

Fig. 3. The cumulative removal (%) values of the three PAH`s using the **Picual and Suri- two and three phase** biochar obtained at 350°C after incubation for 5 min. Each data point represents an average of 3 replicates $\pm$ SD.

Fig. 3. The removal (%) values of the three PAH`s using the **Commercial Activated Carbon (CAC)** after incubation for 5 min. Each data point represents an average of 3 replicates $\pm$ SD.

b. Biochar after physical activation:

Picual and Suri two and three phase biochar which obtained after pyrolysis process at 3500°C for 5h, where activated physically under inert atmosphere using argon gas at 900°C for 6h.

The activated carbons have been tested to remove PAHs (Fig.4).

Fig. 4. The Cumulative removal (%) values of the three PAH's using the **Physical Activated Biochar (PAB)** after incubation for 5 min. Each data point represents an average of 3 replicates $\pm$ SD.

- As we can see, the physical activation increased the adsorption capacity of the PAHs (Fig. 4). Whole Picual two phase has the better removal capacity compared with the other biochar and the activated biochar and reached ca63% removal for the 3 PAHs.

B) Production of sunscreen from the olive mill wastewater for skin protection

Introduction:

Olive mill wastewater (OMW) is one of the byproducts of olive oil production, and is claimed to be one of the most polluting load. It also exhibits high toxicity to plants, bacteria and aquatic organisms due to its compositions of polyphenols (up to 20 g/l). So far, there is no accepted treatment method for the waste generated during olive oil production.

For a long time, OMW has been regarded as a hazardous waste with negative impact on the environment. However, this view is changing, and the potential of OMW to become a starting material, rich in bioactive compounds, is being recognized. In particular, polyphenols, abundant in OMW, are natural antioxidants for the food and pharmaceutical industries. A number of studies have also shown that polyphenols are effective as antibacterial, antiviral, and antifungal compounds.

Polyphenols from OMW have been recently tested, also in our lab, for their potential for protection against sunlight. The preliminary results showed that polyphenols are potentially effective for protecting the skin from the solar UV radiation, indicated by its promising values of the Sun Protection Factor (SPF).

The aim of the research

Extraction and preparation of enriched OMW polyphenols fractions, optimized for skin protection against UV radiation.

Goals :

- 1) Preparation of different fractions of polyphenols extracted from OMW to evaluate their protection effectiveness against UV radiation.
- 2) Determination of SPF and the critical wavelength (CW) of the different polyphenol fractions by using the spectrophotometer.
- 3) The study of the fractionation of the best samples for the optimization of SPF values.
- 4) Analysis, characterization and quantification of the enriched polyphenols of the active fraction with HPLC. In order to understand the extent to which certain polyphenols are involved in the enhancement of activity against solar light.

- 5) Advanced analysis and standardization to prepare a sunscreen product from OMW.

Here we describe each of the goals in more detail:

1. Preparation of different fractions of polyphenols from OMW.

The OMW was generated from the olive oil production using the three phase's centrifugation process. OMW for this study was obtained from a nearby olive mill press in the Galilee region and stored at 4°C for almost a year.

Five different OMW fractions were prepared as described in Fig 1. The total phenols (TP) in the different fractions were determined according to the Folin-Cioacateau method, and the major phenolics will be identified and quantified by using reversed phase HPLC – Thermo Scientific Finnigan Surveyor system equipped with PDA plus detector.

The separation between solids and liquid of OMW was done by centrifugation at 8000 g for 10 min, followed by filtration.

The filtered liquid, which is OMW after centrifuge (OAC) was characterized by measuring three parameters:

- a) pH = 4.9
- b) COD = 84 g/l
- c) Quantification of Total Phenols (TP) = 3.3 g/l.

Five fractions were prepared From OAC under a variety of conditions as described in Fig 1: Antisolvent, s-TP, f-TP, AAA and nCAA.

The f-TP fraction was prepared exactly as the s-TP but at a higher temperature of 60°C.

Total phenols (TP) for the five fractions were determined according to the Folin-Cioacateau method (Table 1).

Table 1: Total Phenols was determined as equivalent to Caffeic acid:

Fractions	Antisolvent	s-TP	f-TP	AAA	nCAA
TP [ppm]	6.22	22.28	18.76	52.20	22.82

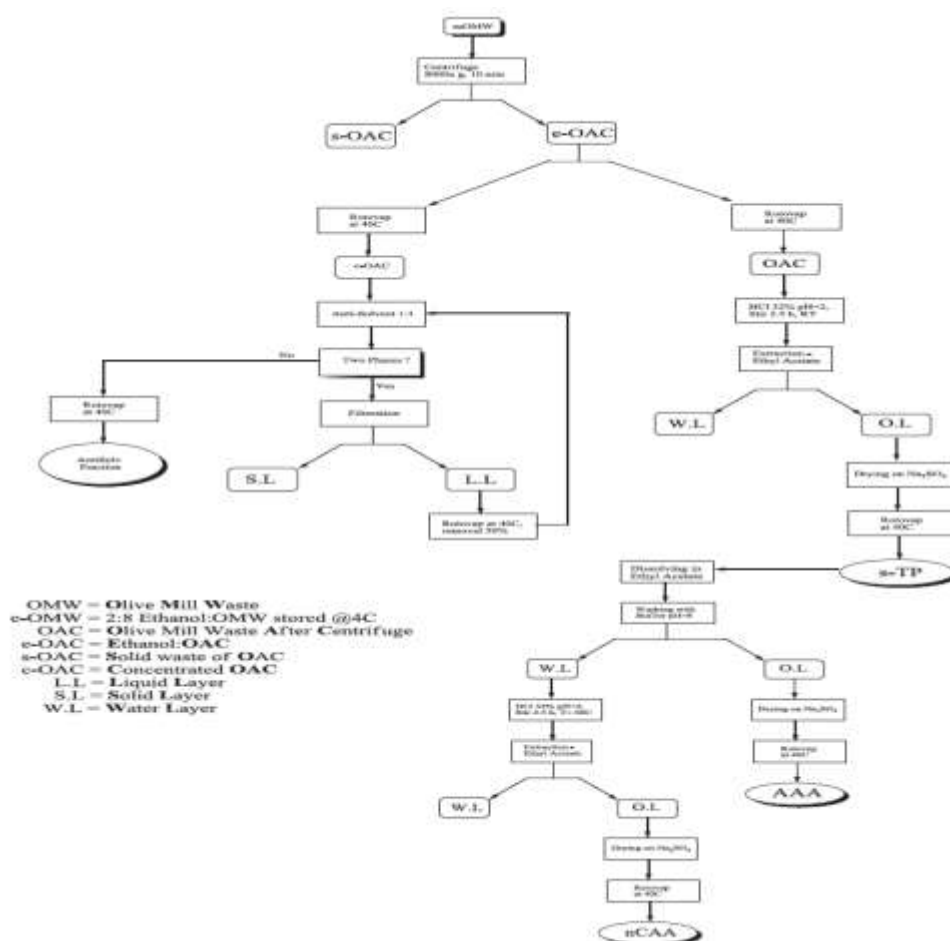


Fig. 1. Extraction process of the AntiSolv, s-TP, AAA and nCAA fractions.

Figure 1 shows that all fractions, except for Antisolvent, are obtained from Ethylacetate (EtOAc) extraction (with an aqua layer of treated OAC with different conditions). EtOAc solvent was found to be the most efficient, relative to other organic solvents, for the extraction of polyphenols from OMW.

The Antisolvent fraction (Fig. 1) wasn't prepared from EtOAc extraction, unlike the other 4 fractions; instead it was concentrated from the original water solvent. Therefore, Antisolvent fraction contains other organic components (like sugars) besides polyphenols. This resulted in low concentration of polyphenols in comparison to the other 4 fractions as evident from Table 1. For this reason we decided to extract the polyphenols from Antisolvent fraction with EtOAc. This extract resulted indeed in higher TP (41.06 ppm) with respect to the original Antisolvent (6.22 ppm). The "EtOAc extract of Antisolvent" is an additional fraction to the above mentioned five fractions.

Since, the original Antisolvent fraction contains all polyphenols in OMW, it was fractionated further. To do so, we utilized the polar properties of the various polyphenols, by using different solvents with increasing polarity for the extraction process (see Scheme 1).

The Antisolvent fraction was dissolved in water and extracted first with a nonpolar solvent of hexane followed by a second extraction with the more polar chloroform and then followed by a third extraction with an even more polar solvent of ethylacetate (EtOAc 3rd phase) (Scheme 1)

Scheme 1: Extraction of polyphenols from Antisolvent with different solvents

TP were determined for the EtOAc extracts from the Antisolvent fraction as summarized in Table 2. The EtOAc third phase which was obtained from the fractionation process (Scheme 1) were more than those obtained from the direct antisolvent extraction using ethylacetate.

Table 2: Total Phenols was determined as equivalent to Caffeic acid.

Fraction	Antisolvent	EtOAc extract of Antisolvent	EtOAc 3 rd phase extract of Antisolvent
TP [ppm]	6.22	41.06	61.08

We have prepared in total seven fractions for the SPF determination using the spectrophotometer.

All the seven fractions were dried under reduced pressure at 45°C and stored at 4°C.

The seven fractions were:

- 1) Antisolvent
- 2) s-TP
- 3) f-TP
- 4) AAA
- 5) nCAA
- 6) EtOAc of Antisolvent
- 7) EtOAc 3rd phase of Antisolvent

The yield of the different fractions from one liter of OMW was determined as well (Tables 3-5).

Table 3: The yield of Antisolvent, s-TP and f-TP produced from each 1 liter OMW.

OMW	Antisolvent	s-TP	f-TP
1 liter	40.55 gr	6.10 gr	3.70 gr

Table 4: The yield of AAA and nCAA produced from total amount of 6 gr s-TP.

Fraction name	AAA	nCAA
6 gr s-TP	3.36 gr	1.95 gr

Table 5: The yield of chloroform and ethylacetate extraction from total 10 g Antisolvent.

Fraction name	Chloroform phase	EtOAc 3 rd phase
10 gr Antisolvent	100.18 mg	218.50 mg

2. Determination of the SPF of the different OMW fractions using ultraviolet spectrophotometry:

The harmful effects of solar radiation are caused predominantly by a UV region of the electromagnetic spectrum, which can be subdivided into three parts: UVA, from 320 to 400 nm; UVB, from 290 to 320 nm and UVC, from 200 to 290 nm. The atmosphere filters the UVC radiation before reaching earth, however, the UVB radiation is not completely filtered out by the ozone layer and is responsible for the sunburn damage. The UVA radiation reaches the deeper layers of the epidermis and provokes serious problems of the skin. For example, UV radiation has been implicated as a causative factor of skin cancer.

The efficacy of a sunscreen is usually expressed in terms of its SPF, which is defined as the ratio of the UVB energy from 290 nm to 320 nm required to produce a minimal erythema dose (MED) on protected skin, to that of the unprotected skin. The higher the SPF, the more effective is the product in preventing sunburns. Nevertheless, it is necessary to standardize methods to determine the SPF of these products.

***In vitro* UVB methodologies are in general of two types:**

- 1) Methods that involve the measurement of absorption or the transmission of UV radiation through sunscreen product films in quartz plates or bio-membranes.
- 2) Methods in which the absorption characteristics of the sunscreens agents are determined based on spectrophotometric analysis of dilute solutions (Mansur *et al.*, 1986).

Mansur *et al.*, (1986), developed a very simple equation which substitutes the *in vitro* method, utilizing UV spectrophotometry,

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda). \quad (1)$$

Where $EE(\lambda)$ is the erythmal effect spectrum, $I(\lambda)$ is the solar intensity spectrum, $Abs(\lambda)$ is the absorbance of sunscreen product and CF is the correction factor (=10).

The $EE \times I$ values are constants (Sayre *et al.*, 1979) and are shown in Table 6.

Table 6 – Normalized product function used in the calculation of SPF (Sayre *et al.*, 1979).

Wave length (λ nm)	290	295	300	305	310	315	320	Total
$EE \times I$ (normalized)	0.015	0.0817	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.018	1

Methods used to evaluate only UVB SPF values proved to be inadequate, because the harmful consequences of UVA exposure have become known. Therefore, increasing concern with the effects of the UVA radiation has led to the development of broad-spectrum sunscreens. For example, COLIPA (The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) group has developed *in vitro* measures of UVA wavelength.

***In vitro* UVA methodology or the Critical Wavelength (CW) method:**

This method is based on the use of the spectrophotometer with integration boundaries from 290 nm to 400 nm. The wavelength at which the summed absorbance reaches 90% of total absorbance is defined as the critical wavelength (Eq. 2),

$$\int_{290}^{\lambda_{CW}} Abs(\lambda) \times d(\lambda) = 0.9 \int_{290}^{400} Abs(\lambda) \times d(\lambda). \quad \text{Eq. 2}$$

Where the wavelength increment $d(\lambda)$ is taken to be 1nm. The sunscreen products are then classified as broad-spectrum when the CW is longer than 370 nm.

Results

Sample preparation and measurements using the spectrophotometer:

Each sample was dissolved in MeOH:H₂O (1:1) with a concentration of 800 ppm. The UV absorption of the samples was measured with Evolution 260 Bio UV-Visible spectrophotometer in the range of 290 to 400 nm.

The values of SPF and CW were calculated by using Eqs. 1 and 2.

Figure 2: Absorption curves of all the polyphenol fractions obtained with UV range

Table 7: Summary of the different parameters SPF, CW and TP as well.

Fraction	Conc. [ppm]	SPF	CW	TP [ppm] eq to Caffeic acid
Antisolvent	800	9.90	380	6.22
s-TP	800	19.87	355	22.28
f-TP	800	16.00	350	18.76
AAA	800	9.86	360	52.20
nCAA	800	33.38	345	22.82
EtOAc of Antisolvent	800	27.97	345	41.06
EtOAc 3 rd phase of Antisolvent	800	33.89	345	61.08

The Antisolvent fraction has the lowest SPF value but the highest CW. The CW value qualifies the fraction to the category of “broad-spectrum sunscreen”. The ethylacetate extracts of the different fractions of s-TP, f-TP have an improved SPF but rather lower CW values than the Antisolvent. The nCAA is an interesting fraction, the SPF value is 3 times higher than the Antisolvent. Both fractions “EtOAc of Antisolvent” and “EtOAc 3rd phase of Antisolvent” showed a great improvement within the SPF values relatively to Antisolvent, especially the EtOAc 3rd phase. From Table 7, both fractions nCAA and “EtOAc of Antisolvent” have the best SPF values and were chosen for further study. The SPF and CW values of these two fractions make the

assumption that they might contain the same type of polyphenols. Analysis and identification of both fractions will be carried out by HPLC.

As we see from Table 7, the CW values for all the fractions except for Antisolvent were lower than 370 nm; hence, the fractions can no longer be under the category of broad spectrum. This factor cannot be ignored due to its importance. An effort to improve the CW value, along side with the SPF, is underway.

As we mentioned before, OMW contains, alongside polyphenols, different sugars. Some of these sugars are attached chemically to polyphenols and others are free. Since ethylacetate extraction leaves most sugars in the water layer of OMW, and hence, yields a relative large polyphenols fraction, therefore these sugars have great impact on the CW values compared to polyphenols alone. Therefore, it is safe to assume that the sugars/polyphenols in OMW are responsible for broad-spectrum protection (UVA) and polyphenols without sugars are responsible for the protection against UVB (SPF).

3. The fraction with the best SPF result was chosen for further study and fractionation for the optimization of SPF values.

The EtOAc 3rd phase was chosen for further fractionation with a Solid Phase Extraction (SPE) technology.

An enriched fraction with optimal polyphenols was obtained using this method. The SPF results were encouraging (more than 33) but further study is still needed to confirm the reproducibility of the results.

4. HPLC spectra for some fractions:

Analysis and characterization of the different fractions by HPLC is necessary in order to analyze and identify the major peaks of polyphenols that contribute to the activity against UV radiation.

Some fractions were measured with HPLC and from a preliminary analysis we could characterize two major polyphenols: Hydroxytyrosol (7.8 min) and p-coumaric acid (14.54 min) (Figures 3-5).

The HPLC samples were prepared in MeOH:H₂O 1:1 with a concentration of 2000 ppm.

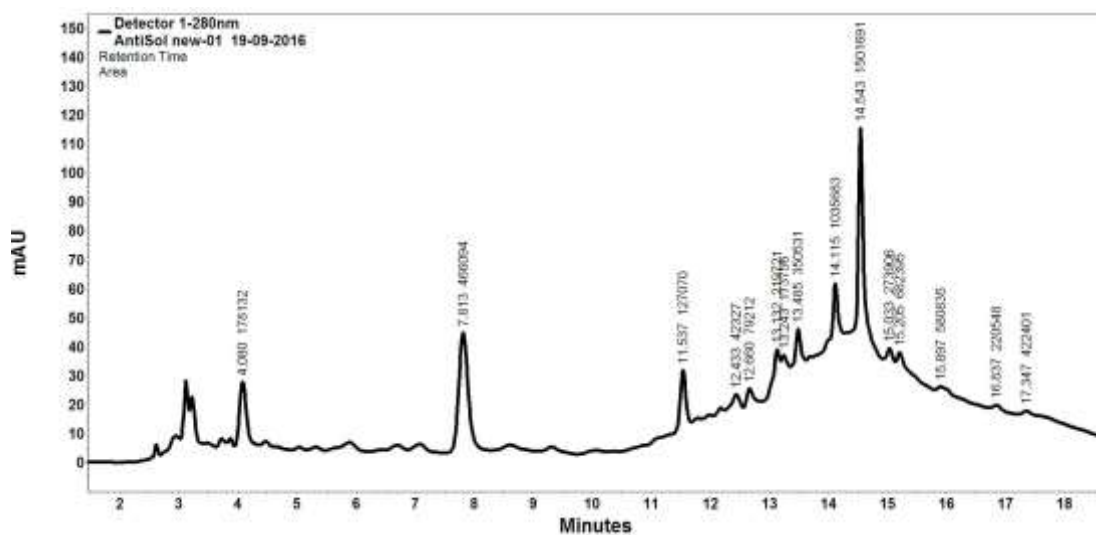


Figure 3: HPLC of Antisolvent fraction.

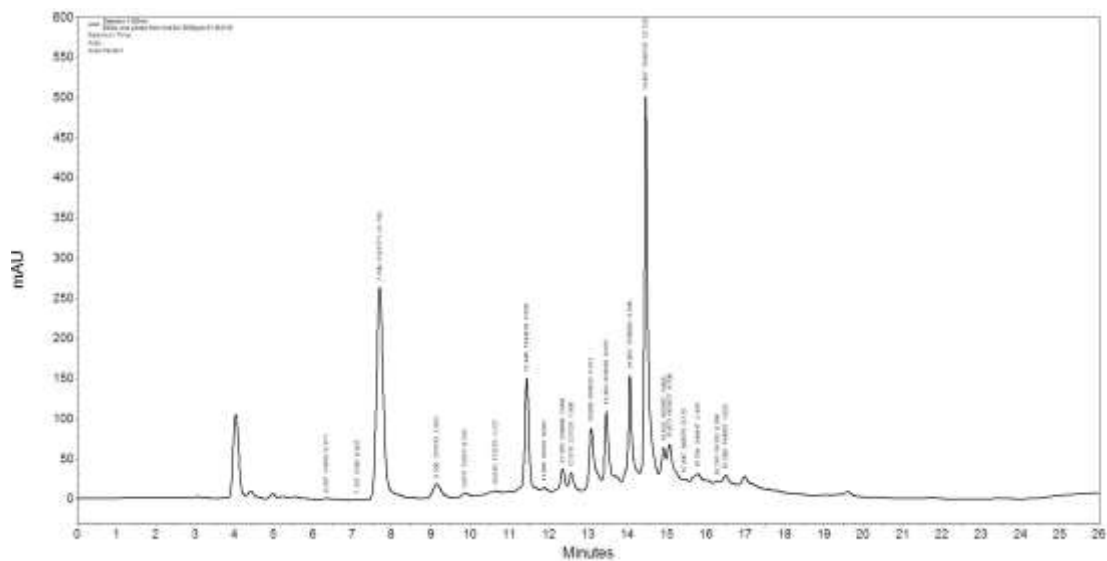


Figure 4: HPLC of EtOAc phase of Antisolvent.

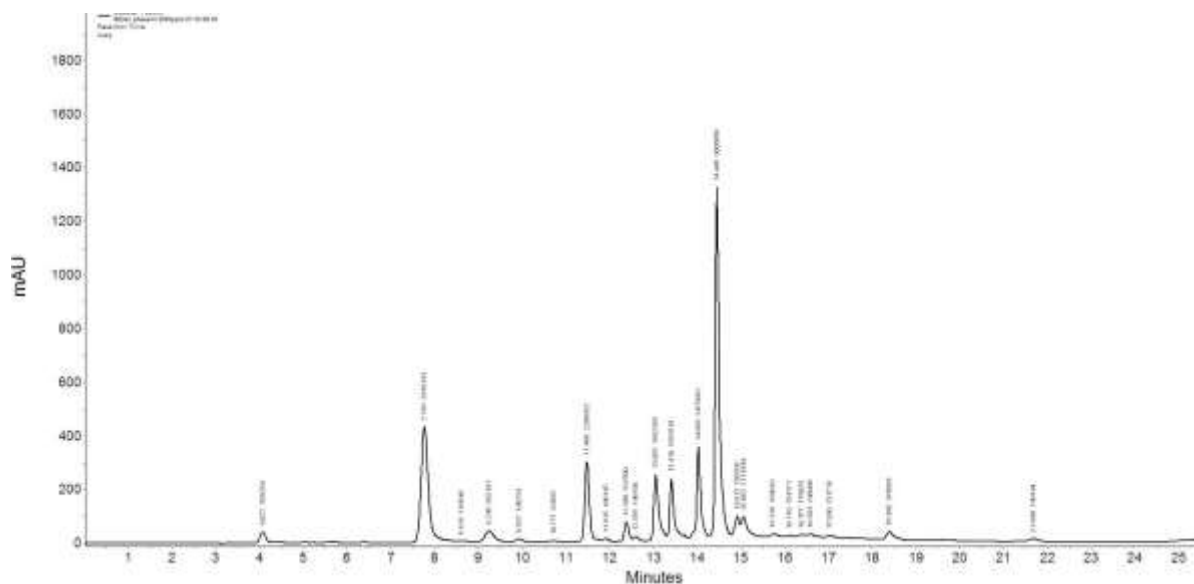


Figure 5: HPLC of EtOAc 3rd phase of Antisolvent.

5) Advanced analysis and standardization to prepare a sunscreen product from OMW.

The fraction of EtOAc 3rd phase (Table 7) was produced from OMW after storing for one year at 4°C. This fraction has the best SPF values (33.89) relatively to Antisolvent and other fractions. This fraction was chosen for further study and development. Nevertheless, the CW values of the “EtOAc 3rd phase” fraction was lower than 370; hence, it can no longer be under the category of broad spectrum. This factor cannot be ignored due to its importance.

At the same time we received new OMW (fall-2016) from the Galilee region, and new fractions of Antisolvent and “EtOAc 3rd-2016” were produced for comparison with older fractions. From Table 8, both fractions of EtOAc 3rd have better SPF values than the Antisolvent-2016 but the SPF value of the EtOAc 3rd 2015 is much higher (33.65) than the EtOAc 3rd-2016 (19.7). The CW values of both EtOAc 3rd were lower than 370 nm.

These results gave rise to two challenges; the first challenge is to solve the non-unity (different qualities) of the EtOAc 3rd from different sources of OMW (which is due to the differences of the SPF values), and have to find a method to produce similar qualities or unity of the same fraction that is produced from different sources of OMW. The second challenge is to improve the CW values of a potential fraction to a value above 370 nm in order to guarantee the category of broad spectrum of a product.

The UV absorption of several commercially available phenols was studied using HPLC-technique. Many phenols and polyphenols (such as: HT, Caffeic, Ferulic, vanillic acid etc.) have maximum absorption in the UV range between 250-320 nm. Other phenols especially those who are connected covalently to glycosides (such as: chlorogenic acid, Quercetin and Rutin) several high absorption points in the UV range between 220-280 nm, and an increasing absorption curve that starts from 290 up to

360 nm, the later type of phenols (phenolic glycosides) in principle can contribute to the CW values.

From our recent intensive studies, we concluded that polyphenols in OMW are responsible for the SPF values and active against UVB radiation (280 nm – 320 nm), while phenolic glycosides in OMW are active against UVA radiation (320 nm – 400 nm) and responsible for the CW values.

The fractionation process of Antisolvent with different organic solvents leads to extracts with mainly polyphenols that absorb UVB but with nearly no glycosides, that due to its high solubility in water they prefer to remain in the water layer of the Antisolvent.

In this stage of the project, we didn't proceed with further fractionation of the "EtOAc 3rd-2015" by using Solid Phase Extraction (SPE) - as planned previously - because first; we have to find an optimized method to obtain similar SPF values from different batches of OMW. And second, to find conditions for increasing CW values.

Commercially available phenols of OMW were added with concentration of 100 ppm to "EtOAc 3rd-2016" fraction (Table 8), in order to study their influence on the improvement of the SPF values. All the added phenols contributed significantly to the SPF values, from 19.7 of the original fraction to values above 30, with a preference to p-coumaric acid addition that contributed to the best SPF value (36.2). We observed as well that CW values dropped from 360 nm to the lowest value of 353 nm while adding Ferulic acid.

Table 8: The effect of different phenols on the SPF and CW parameters of the "EtOAc 3rd 2016" fraction

Fraction	Original sample (800 ppm in MeOH: H ₂ O 1:1)		Original sample plus 100 ppm Vanillic acid		Original sample plus 100 ppm 3,4-dihydroxy benzoic acid		Original sample plus 100 ppm p. coumaric acid		Original sample plus 100 ppm Caffeic acid		Original sample plus 100 ppm Ferulic acid	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
AS-2016	11.17	378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOAc 3 rd - 2016	19.7	360	27.56	356	29	34	36.2	362	34	357	33.8	353
EtOAc 3 rd - 2015	33.65	343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Since, p-coumaric acid addition in Table 8 yielded the best results of SPF values; it was used in a new experiment with varied concentrations to different fractions (Table 9A). That is in order to find an optimized concentration that yields SPF values above 30. It was found (Table 9A and 9B) that added concentrations of p-coumaric acid between 20 ppm and 30 ppm would be sufficient to reach the desired result with different fractions. Any concentration above 40 ppm of p-coumaric acid added to the different fractions would yield the same SPF values due to saturation.

For next studies, we decided to use a concentration of 30 ppm of p-coumaric acid to any fraction in order to get SPF values above 30 and of the same degree. As a result of this addition, it was guaranteed to obtain similar results of any potential fraction that comes from different sources of OMW.

Table 9A: The effect of different concentrations of p-coumaric acid on the SPF and CW values of different fractions

Fraction	Original sample (800 ppm in MeOH: H ₂ O 1:1)		Original sample plus 10 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 20 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 30 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 40 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 50 ppm p- coumaric acid	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
AS-2016 cont7	11.17	378	-	-	-	-	28.5	365	-	-	-	-
EtOAc 1 st - 2016	12	370	23.41	355	32	350	33.67	350	33.0	346	33.75	353
EtOAc 3 rd - 2016	14.75	350	-	-	-	-	28.9	338	-	-	34.16	350

Table 9B: The effect of different concentrations of p-coumaric acid and TiO₂ on the SPF and CW parameters of different fractions

Fraction	Original sample plus 100 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 150 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 200 ppm p- coumaric acid		Original sample plus 30 ppm p- coumaric acid + 10 ppm TiO ₂		Original sample plus 40 ppm p- coumaric acid + 50 ppm TiO ₂		Original sample plus 50 ppm p- coumaric acid + 100 ppm TiO ₂	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
AS-2016 cont7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOAc 1 st - 2016	33.31	345	33.7	345	33.1	345						
EtOAc 3 rd - 2016	-	-	-	-	-	-	27.6	338	28.86	338	28.67	339

Titanium dioxide (TiO₂) is used in most sunscreens as inorganic physical sun blockers to block UVA and UVB rays, similar to zinc oxide (ZnO). The combination of both minerals assures a broadband UV protection. Different concentrations of TiO₂ were added to “EtOAc 3rd-2016” fraction (Table 9B) to study their influence on CW values, but unfortunately, at any added concentration of TiO₂ (from low to high) there was no improvement with CW values and not even for the SPF values.

The OMW is rich with glycosides and free sugars that are considered to be responsible for the UVA blockage, and in which they exist in the original prepared fraction of AS-2016. Other prepared fractions containing low amount of glycosides because they tend to stay in the water layer of the Antisolvent during the extraction process with organic solvent. Different types of sugars (Table 10) from simple (Galactose) to complicated (Maltodextrin) were added to the “EtOAc 1st-2016” fraction in a concentration of 30 ppm each. The results presented with no improvement with the CW values (CW<370 nm).

Table 10: The effect of different types of sugars on SPF and CW parameters

Fraction	Original sample (800 ppm in MeOH: H ₂ O 1:1)		Original sample + 30 ppm p- coumaric acid + 30 ppm Galactose		Original sample + 30 ppm p- coumaric acid + 30 ppm Sucrose		Original sample + 30 ppm p- coumaric acid + 30 ppm Maltodextrin	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	SPF	SPF	CW
AS-2016 cont4	11.37	378	-	-	-	-	-	-
EtOAc 1 st 2016	10,3	368	28.47	348	28.20	346	27.17	347

We decided to add commercially available phenolic glycoside that exists naturally in OMW like Oleuropein (Table 11), to “EtOAc 3rd 2016” fraction, but there was no significant change in the CW values and the fraction is still not considered a broad spectrum.

Table 11: The effect of different concentrations of Oleuropein on the SPF and CW values of “EtOAc 3rd 2016” fraction

Fraction	Original sample (800 ppm in MeOH: H ₂ O 1:1)		Original sample plus 10 ppm Oleuropein		Original sample plus 20 ppm Oleuropein		Original sample plus 30 ppm Oleuropein		Original sample plus 50 ppm Oleuropein		Original sample plus 100 ppm Oleuropein	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
EtOAc 3 rd 2016	14.75	357	13.43	363	13.26	361	13.25	360	13.7	365	13.21	361

More of the natural glycosides were tested on the “EtOAc 1st 2016” fraction (Table 12) and part of them caused an enhancement to the SPF values, like Chlorogenic acid, but others like Rutin contributed to both factors (SPF and CW), and it was found to be very effective by increasing the CW values of “EtOAc 1st 2016” fraction, at a concentration of 60 ppm. To the same sample was added 30 ppm p-coumaric acid that yielded values of SPF>30 and CW>370 nm (Table 12).

Table 12: The effect of different phenolic-glycoside on the SPF and CW parameters of “EtOAc 1st 2016” fraction

Fraction	Original sample (800 ppm in MeOH: H ₂ O 1:1)		Original sample + 30 ppm Chlorogenic acid		Original sample + 30 ppm Quercetin		Original sample + 30 ppm Rutin		Original sample + 60 ppm Rutin		Original sample + 30 ppm p-coumaric acid + 60 ppm Rutin	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
AS-2016 mix	11	378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOAc 1 st -2016	13.34	355	28.57	342	24.6	342	27.42	365	21.4	373	32	373

The phenolic glycoside of Rutin was proven to be effective on the enhancement of CW values when added to different fractions (Table 13); its addition can convert any fraction to become a broad-spectrum sunscreen. It was noticed that the SPF values were affected and increased as well.

The addition of 30 ppm of p-coumaric acid and 60 ppm Rutin to any fraction yielded similar values of SPF and CW despite the differences in these values of the original samples (Table 13).

Table 13: The effect of p-coumaric acid and Rutin on the values of SPF and CW of different fractions

Fraction	Original Sample 800 ppm in MeOH:H ₂ O 1:1		Original sample + 30 ppm p-coumaric acid		Original sample + 30 ppm p-coumaric acid + 60 ppm Rutin		Original sample + 60 ppm Rutin		Original sample + 100 ppm Rutin	
	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW	SPF	CW
Antisolvent	10.71	377	26	365	29.2	377	19.25	377	23.35	377
EtOAc 1 st	11.41	358	28.06	343	27.33	373	21.07	372	24.79	374
EtOAc 3 rd -2016	14.75	357	31.4	345	29.43	373	23.28	374	24.74	374

EtOAc 3rd-2015	28.36	344	-	-	-	-	28.73	372	28.63	374
CL 2nd-2016	8.80	356	28.56	337	28.56	373	-	-	-	-
STP	10.40	367	28.56	345		373	18.96	374	22.53	376
FTP	8.77	364	28.1	343	28.93	373	16.43	374	21.33	376

In order to understand better to what extent is the effect of Rutin addition on different fractions, SPF and CW values of Rutin only were tested with different concentrations (Table 14). There is a clear conclusion that Rutin itself can be considered as a sunscreen and it contributes not only to the CW values but to the SPF values too when added to different fractions. Afterall, the addition of two different phenols (p-coumaric acid and Rutin) were required to improve the SPF and CW values of different fractions and their contribution to the final results are massive.

Table 14: The effect of Rutin in different concentrations on SPF and CW values.

Rutin in MeOH:H ₂ O 1:1	SPF	CW
60 ppm	7.35	379
100 ppm	20.5	383

In general, OMW contains the phenols for the UVB protection, and the phenolic glycosides for the UVA protection, the only matter is to find a method to selectively extract the active phenols and phenolic glycosides, in order to obtain a natural sunscreen product, without the necessity of any additions of commercially available phenols. For that reason, an experiment was planned, using non-ionic adsorbent resins of XADs (Rohm and Hass Co.). The copolymerised XAD resins are made of styrene-divinylbenzene or acrylate-divinylbenzene with different specific surface and porosity. The main concept of the methodology is that polyphenols and phenolic glycosides contained in the Antisolvent fraction of OMW (1) could be selectively adsorbed by a series of adsorption resins affording extracts useful as natural sunscreen with good SPF and CW values.

Different types of resins (Table 15) were tested in the adsorption experiments. Prior to use, each resin (1gr) was rinsed with water and acetone, then added to a solution of Antisolvent (200 mg in 20 ml H₂O) and shaken for 3h. With time, the white color resin was changing to brownish, indicating an adsorption process of Antisolvent content. The water solutions of AS were decanted and the resins were washed with MeOH/IPA/EtOH/H₂O to extract the adsorbed organic phenols. The organic solvents were evaporated and the extracts were dried for the evaluation of SPF and CW values. The washed Resins were regenerated/reactivated and were ready to be used again.

Table 15: SPF and CW of the extracts of different XAD resins

Sample 800 ppm in MeOH:H ₂ O 1:1	SPF	CW	Range	Yield from 200 mg %
Antisolvent	12.30	376	375-380	

Extract-Resin-1	19.69	377	375-380	54	27
Extract-Resin-2	19.60	377	375-380	40	19.95
Extract-Resin-3	20.30	377	375-380	32	16.25
Extract-XAD-4	20.60	376	375-380	47,1	23
Extract-XAD-16	20.54	376	375-380	46	23
Extract-XAD-1600	22.30	377	375-380	40	20
Extract-XAD-1180	22.00	377	375-380	38	19
Extract-XAD-7HP	24.15	379	375-380	30	15
Extract-XAD-16HP	22.40	378	375-380	41	20

Figure 6: The absorption spectra of the extracts of different resins versus UV range

From Table 15 and Figure 6, we can see that the SPF values of the extracts with all types of resins used, were increased almost two times (24.15 of XAD7HP) more than the original sample of Antisolvent (12.3) and CW values in all experiments were above 370 nm. These preliminary results indicated that the resins could selectively adsorb/extract phenols and phenolic glycosides from the Antisolvent solution and these extracts yielded reasonable SPF values and CW >370 nm.

It was obvious from Figure 6 that XAD7HP was the most efficient resin; its extract gave the highest SPF and CW values. The extracts of the other resins afforded values within similar range.

Two resins of XAD7HP and XAD16 were chosen for further studies as adsorbent resins. Each experiment of the same resin was duplicated to check the reproducibility of the results; the experiment was carried out under the same conditions as described above using water solutions of Antisolvent. From Table 16, the SPF and CW values of the extract XAD7HP 1st (23.56, 376 respectively) and 2nd (19.53, 374) were similar with tiny differences. The same conclusion goes with the extract of XAD16. But, an interesting result was observed, when extract of XAD7HP was mixed with extract of

XAD16, the values of SPF were obtained even higher (25.41, 24.76) than the individual resins, and CW was already above 380 nm.

Table 16: Duplicated exp. With XAD7HP and XAD16

Sample 800 ppm in MeOH:H₂O 1:1	SPF	CW
Ext of XAD7HP 1st	23.56	376
Ext of XAD7HP 2nd	19.53	374
Ext of XAD16 1st	20.96	377
Ext of XAD16 2nd	18.41	378
Mixed Ext XAD7HP+XAD16 1st	25.41	382
Mixed Ext XAD7HP+XAD16 2nd	24.76	380

The resin adsorption experiments were planned usually for 3 h. This time duration was chosen after studying the resin adsorption capacity of XAD7HP and XAD16 (Tables 17, 18A and 18B). The experiment in Table 17 was performed in duplicates, and the Antisolvent was prepared from OMW of year 2015 and OMW of year 2016.

Aqua solution of Antisolvent (100 mg/15 ml water) was added first to XAD7HP resin (0.5 gr) and shaken for 3h at room temperature, then the aqua solution was decanted directly into XAD16 resin (0.5 gr) and shaken for another 3h. The extract solution of both resins (that were extracted with MeOH/EtOH/IPA/H₂O) were evaporated and dried. The same experiment was repeated but with time duration of overnight instead of 3h. Solutions of all extracts were prepared in MeOH:H₂O (1:1) with concentration of 800 ppm. The results in Table 17, showed similar values of SPF and CW of a certain extract within 3h and overnight experiment, with slightly higher values of the 3h experiment.

Table 17: Antisolvent solution on XAD7HP then on XAD16 for 3h and overnight experiments.

Exp. Time	Source	Sample 800 ppm in H₂O:MeOH 1:1	SPF	CW	Amount/yield [mg]
3 h		AS-2015	8,44	378	100 mg
	AS-2015-1	Extract of XAD7HP	25,47	372	22,8
		Extract of XAD16	15,96	370	29,4
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	29,14	373	
	AS-2015-2	Extract of XAD7HP	26,29	372	22
		Extract of XAD16	17,57	378	20,7
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	27,02	378	
		AS-2016	9,59	378	100 mg
	AS-2016-1	Extract of XAD7HP	18,04	370	22,4
		Extract of XAD16	6,54	367	52,6
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	22,99	371	

	AS-2016-2	Extract of XAD7HP	18,2	374	27,6
		Extract of XAD16	21,26	369	80,3
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	28,12	373	
Exp. Time	Source	Sample	SPF	CW	Amount [mg]
Overnight		AS-2015	8,44	378	100
	AS-2015-1	Extract of XAD7HP	24,88	373	20
		Extract of XAD16	7,12	370	23,9
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	24,22	375	
	As-2015-2	Extract of XAD7HP	22,76	371	20,5
		Extract of XAD16	9,75	369	24,2
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	24,74	374	
		AS-2016	11,58	378	100
	AS-2016-1	Extract of XAD7HP	18,82	370	22,8
		Extract of1 XAD16	6,04	365	24,5
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	20,94	370	
	AS-2016-2	Extract of XAD7HP	24,36	374	20
		Extract of XAD16	6,2	365	28,3
		Mixed extracts XAD7HP+XAD16	23,91	374	

Total Phenols (Eq to Caffeic acid) and carbohydrates (eq to D-(+)-Glucose) - of the Antisolvent fraction and all extracts of Table 17 - were measured and calculated (Tables 18A and 18B). If we have a look at the concentration of the carbohydrates, for example of “Aqua after XAD16” of AS-2015-1 at 3h exp. (346.79 ppm) and overnight (480.11), we can see values at the same range, and again there is a slight preference to the 3h experiment. The low concentration of carbohydrates in the aqua solution of Antisolvent after XAD16 experiment indicates a good absorption process on the resin. And in our case there were more carbohydrates in the overnight experiment than 3h. Most probably, the adsorption process of the resin was at equilibrium after 3h. Concentrations of TP and carbohydrates, in the aqua solution of Antisolvent, after passing on XAD7HP were lower than the original fraction. The concentrations were kept decreasing after passing the aqua solution on the second resin of XAD16. The extracts of the resins contained higher concentration of TP and carbohydrates in comparison to the original sample of Antisolvent. Again, the highest concentrations were obtained with the mixed extracts of XAD7HP and XAD16. The mixed extract is a fraction enriched with phenols and phenolic glycosides.

Table 18A: TP and carbohydrates of the Antisolven_{aq} and extracts during 3h

Exp. Time	Source	Sample	Concentration ppm [mg/l]	D-(+)-Glucose [mg/l]	TP [mg Caffeic acid/l]
3h		AS-2015 100 mg /15 ml	6666	802.26	447
	AS-2015-1	Aqua after XAD7HP		759.59	203.47
		Extract of XAD7HP	4000	656.49	652.86
		Aqua after XAD16		346.79	100.1

		Extract of XAD16	4000	1366.94	1215.1
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	1598	776.32
	AS-2015-2	Aqua after XAD7HP		572.13	445.71
		Extract of XAD7HP	4000	346.79	648.76
		Aqua after XAD16		275.4	120.69
		Extract of XAD16	4000	578.13	464.08
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	723.44	964.9
		AS-2016 100 mg / 15 ml	6666	672	665
	AS-2016-1	Aqua after XAD7HP		644.66	259.08
		Extract of XAD7HP	4000	222.16	474.29
		Aqua after XAD16		121,17	220,2
		Extract of XAD16	4000	222.16	372.24
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	447.32	1071.02
	AS-2016-2	Aqua after XAD7HP		425.4	358.98
		Extract of XAD7HP	4000	321.42	741.63
		Aqua after XAD16		195.23	248.27
		Extract of XAD16	4000	635.6	895.75
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	827.92	1695.5

Table 18B: TP and carbohydrates of the Antisolven_{aq} and extracts during overnight

Exp. Time	Source	Sample	Concentration ppm [mg/l]	D-(+)-Glucose [mg/l]	TP [mg Caffeic acid/l]
Overnight		AS-2015 100 mg/15ml water	6666	802.26	447
	AS-2015-1	Aqua after XAD7HP		850.26	201.43
		Extract of XAD7HP	4000	540.82	878.37
		Aqua after XAD16		480.11	94.8
		Extract of XAD16	4000	353.51	332.45
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	1393.81	1228
	AS-2015-2	Aqua after XAD7HP		647.28	219.8
		Extract of XAD7HP	4000	534.85	576.33
		Aqua after XAD16		580.86	113.16
		Extract of XAD16	4000	385.6	262.04
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	1917.46	1948.56
		AS-2016 100mg/15ml water	6666	672	665
	AS-2016-1	Aqua after XAD7HP		511.83	262.65
		Extract of XAD7HP	4000	370.67	638.57
		Aqua after XAD16		319.66	113.67
		Extract of XAD16	4000	147.54	308.98
		Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	572.68	1026
	AS-2016-2	Aqua after XAD7HP		557.35	249.90
		Extract of XAD7HP	4000	493.81	922.24

	Aqua after XAD16		369.66	110.1
	Extract of XAD16	4000	46.79	242.65
	Mixed extracts XAD7HP & XAD16	4000	626.42	1000

The resin adsorption capacity was followed up after 3h and after overnight as discussed above (Table 17, 18A and 18B). A new experiment was planned to follow up the adsorption capacity of XAD7HP and XAD16 every hour during 4h. In this experiment at time=0 a sample of the Antisolvent solution was picked up for TP and carbohydrates measurements. The Antisolvent solution was then added to XAD7HP for 4h. Every hour a sample was withdrawn for the same measurements. After 4h the Antisolvent solution was decanted directly into XAD16 resin for another 4h with continues measurements in each hour. Table 19 summarized the results, and it was observed that after the second hour on XAD7HP there were hardly any changes with the concentration of TP and carbohydrates. The same observation was made within XAD16. The results indicated that the resin reached equilibrium with the Antisolvent solution after nearly 2-3h.

Table 19: concentrations of TP and carbohydrates of the Antisolvent solution every 60 min of the exp.

Time (hours)	TP [mg Caffeic acid/l]	Efficiency %	D-(+)-Glucose [mg/l]	Efficiency %
XAD 7HP				
0	300.82	6.01	973.66	19.47
1	132.45	2.65	666.94	13.34
2	134.49	2.69	619.18	12.38
3	131.43	2.62	567.69	11.35
4	142.65	2.85	487.09	9.74
XAD 16				
1	108.98	2.18	500.52	10.01
2	103.88	2.07	477.38	9.54
3	100.82	2.01	468.43	9.36
4	101.84	2.03	452.76	9.05

A large-scale experiment was planned to produce extract fractions in grams, utilizing XAD7HP and XAD16 resins. From previous experiments, it was clearly concluded; that mixed extracts of both resins yielded the highest values of SPF and CW, therefore the best results were obtained. In the large-scale experiment, 10 gr productions of the mixed extracts were planned in addition to 10 gr extract of each resin.

An amount of 7.87 gr Antisolvent in 600 ml water were added to 30 g resin of XAD7HP for 3h (Table 20), the solution was decanted into another 30 g resin of XAD16 and shacked for another 3h at RT. The resins were washed with organic solvents to dissolve all absorbed phenols. The organic phase of each resin was evaporated and dried separately to obtain two extracts of XAD7HP and XAD16. This process was repeated 8 times, and 63 gr in total of Antisolvent were consumed, using the same resins after reactivation. An amount of 8.8 gr extract from XAD7HP resin and 7.6 gr extract from XAD16 resin were obtained.

A new set of another 47 gr Antisolvent was used and added to both resins as described above. This time both extracts were mixed to obtain 10 gr of mixed fraction.

In Table 20 the results were summarized. The SPF value of the mixed extracts (31.21) was higher than the values of the individual extracts. CW values of the three extracts were above 370 nm with the highest value of the mixed extract again (382). TP and carbohydrates for all the fractions were calculated and summarized in Table 21. The concentrations of TP and carbohydrates are the highest in the mixed fraction, which explains the reason behind obtaining the best values of SPF and CW.

Table 20: the yield, pH, SPF and CW results of the 3 fractions produced from Antisolvent by XAD resins

Sample	Amount [gr]	pH $\pm$ 3std	SPF $\pm$ 3std	CW $\pm$ 3std
AS 2016	63	5.28 $\pm$ 0.15	11.27 $\pm$ 0.70	378 $\pm$ 1.15
Ext. XAD 7HP	8.8	4.41 $\pm$ 0.18	26.83 $\pm$ 2.30	377 $\pm$ 0.57
Ext. XAD 16	7.6	4.28 $\pm$ 0.06	18.78 $\pm$ 0.51	377 $\pm$ 1.10
Mixed Ext. (XAD 7HP + XAD16)	10	4.3 $\pm$ 0.09	31.21 $\pm$ 2.32	382 $\pm$ 1.50

Table 21: TP and carbohydrate results of the different fractions

Sample conc. 1600 ppm	TP [mg Caffeic acid/l]	Yield %	D-(+)-Glucose [mg/l]	Yield %
AS 2016	108.23 $\pm$ 5	6.76	292.55 $\pm$ 40	18.3
XAD 7HP	210.78 $\pm$ 47.11	13.17	292.05 $\pm$ 35.85	18.25
XAD 16	150.57 $\pm$ 35.9	9.41	244.1 $\pm$ 72.32	15.25
Mix (XAD 7HP + XAD 16)	378.54 $\pm$ 91.42	23.65	586.6 $\pm$ 298.67	36.67

We produced 2 fractions from 63 gr Antisolvent by using XAD resins:

1) The extract of XAD7HP (8.8 gr)

2) The extract of XAD16 (7.6 gr)

We produced a third fraction from another 47 gr Antisolvent using the same resins

3) The mixed extracts of XAD7HP and XAD16 (10 gr)

In total: from **110 gr** Antisolvent **26.4 gr mixed** fraction can be obtained. In order to have 100 gr mixed fraction we need to produce **417 gr Antisolvent**.

Yield of Antisolvent preparation:

From each **5 liters OMW** it was produced **216.72 gr** ($\pm$ 25.94 gr, 3std) **Antisolvent** (W/V)% = 4.33 % = (4.33 gr/100 ml).

In order to produce **100 gr** of the active mixed fraction of both resins (XAD7HP and XAD16) we need to start with **10 liters of OMW**.

10 L OMW

433.44 g Antisolvent

100 g active mixed suns cream.

HPLC analysis of Antisolvent (Fig. 7), extract of XAD7HP (Fig. 8), extract of XAD16 (Fig. 9) and the mixed extracts (Fig. 10) were measured. The peak at 6.47 min is Hydroxytyrosol, at 10.02 min is Tyrosol, at 13.2 min is Caffeic acid, at 13.74 min is Vanillic acid, at 14.67 min is p-coumaric acid.

From HPLC, we can see clearly, concentrations of phenols in the mixed fraction are the highest in comparison with the separated extracts. The concentration of the phenolic glycosides is indicated by the hilly peak from 12 min to 17 min, and again it is the highest within the mixed extracts (Fig. 10).

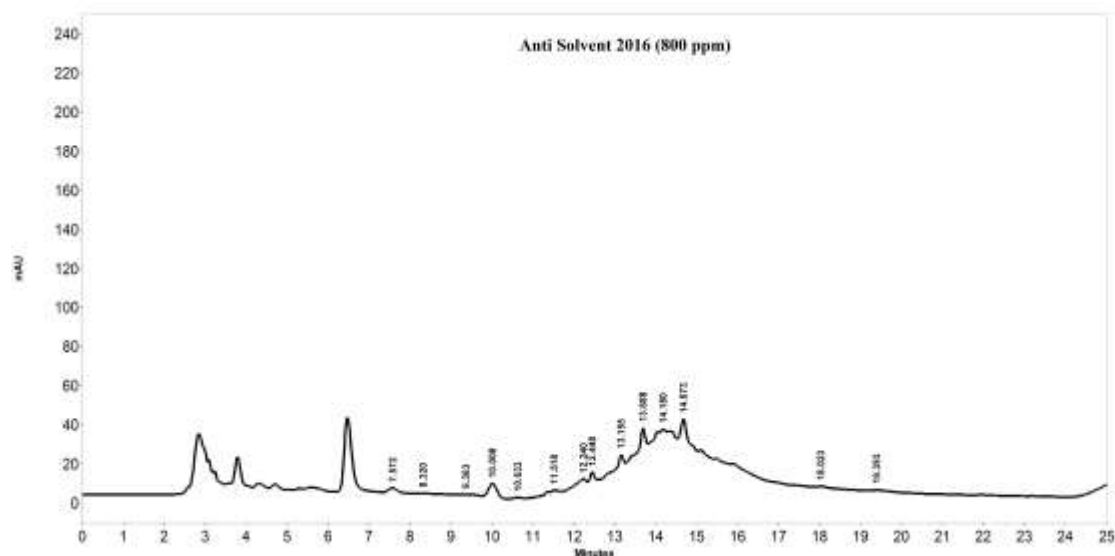


Figure 7: HPLC analysis of Antisolvent

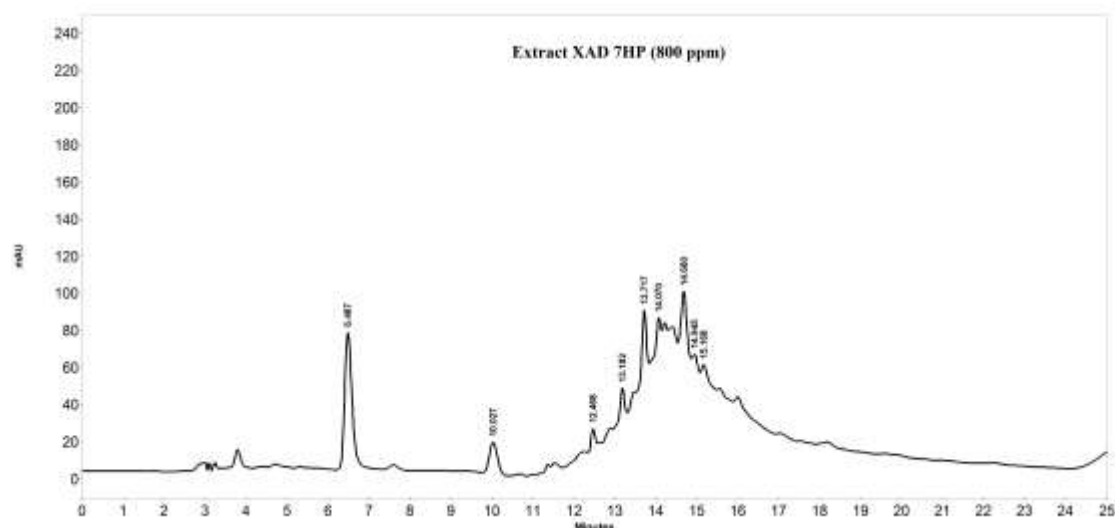


Figure 8: HPLC analysis of XAD7HP extract

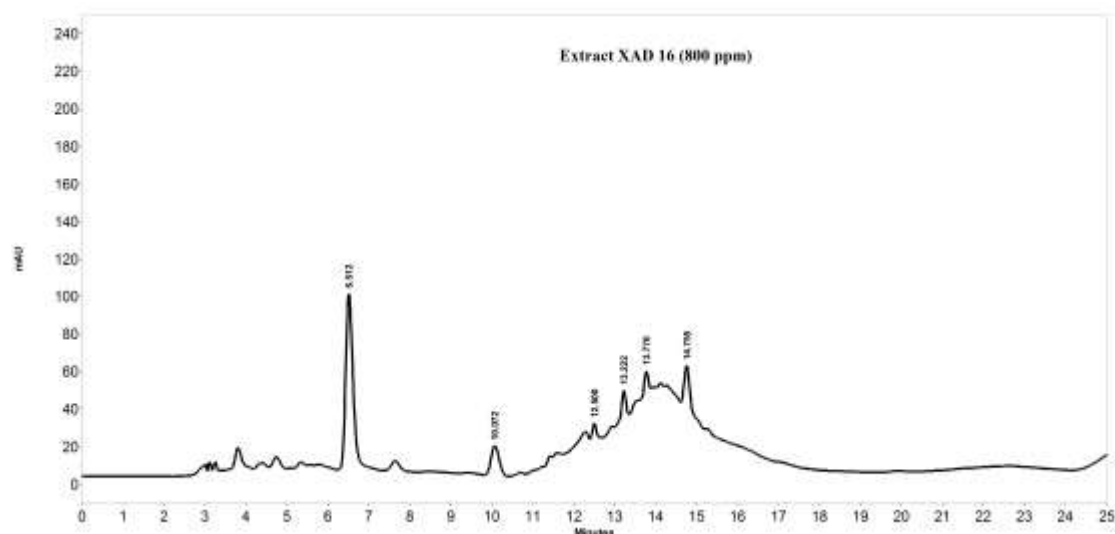


Figure 9: HPLC analysis of XAD16 extract

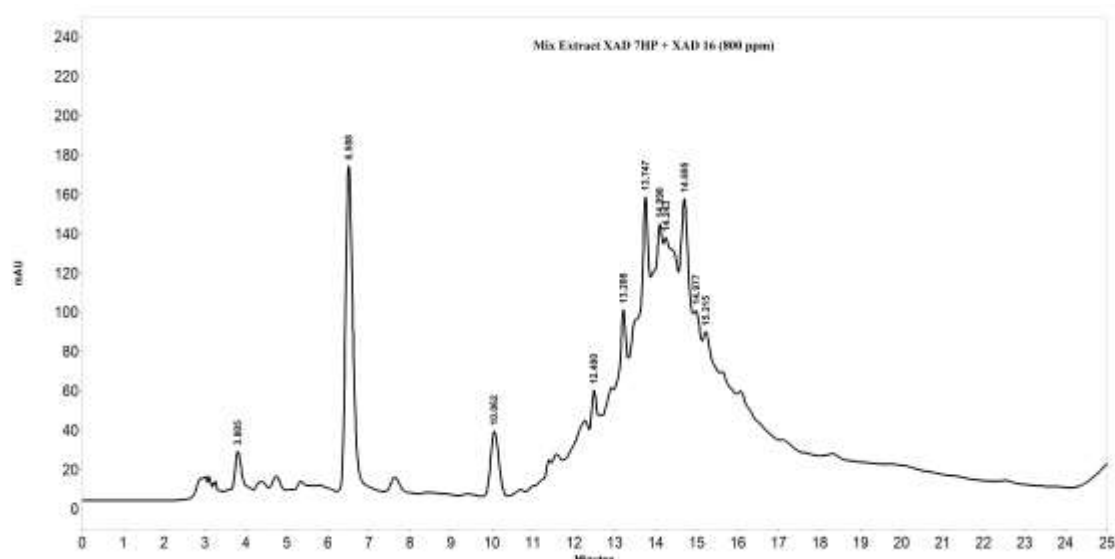


Figure 10: HPLC analysis of mixed extracts of XAD7HP and XAD16

We could accomplish the production of a natural sunscreen product, produced from OMW. A product that protects against sunlight with high values of SPF and CW. Values required for a product to pass the standard regulation.

Our future achievements still need to overcome a few more challenges, which are:

- 1) To study the decomposition of the phenols and the toxicity level of the active fraction after its exposure to sunlight at the peak of the heat time of the day.
- 2) pH adjustment of the product to be suitable on the skin.
- 3) Finding the method to develop the product from powder like to a cream like.
- 4) Testing the product on cell culture.

References:

- 1) MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 61, p. 121-124, 1986.
- 2) SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochem. Photobiol.*, Oxford, v. 29, p. 559-566, 1979.
- 3) A. Agalias; T Manios; A.L. Skaltsounis. *J.Agric.Food Chem.* 2007, 55, 2671-2676.

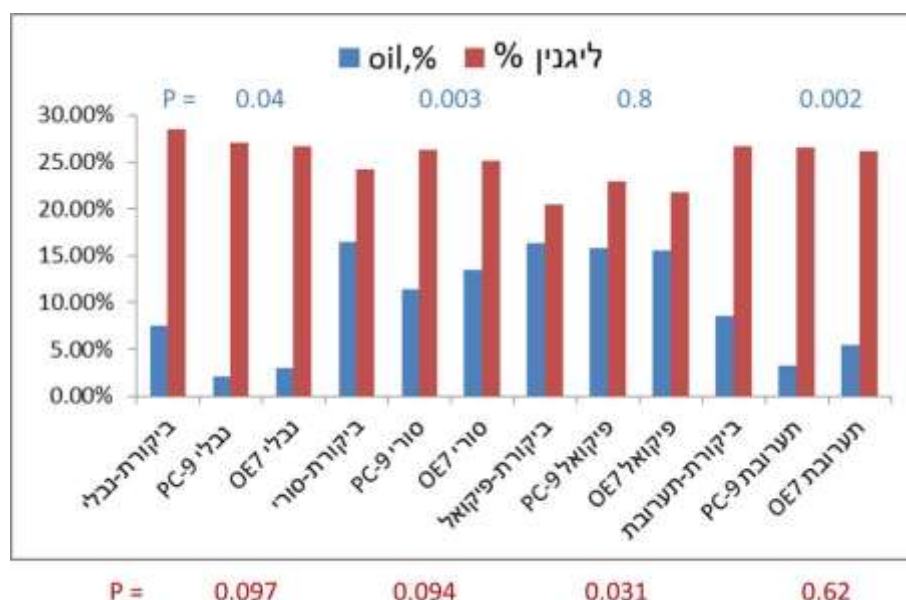
ג) בדיקת הפוטנציאל של הפטרייה *Pleurotus* מזן הבר PC9 ושל המוטנט OE7 לטייב גפת מהזנים סורי, נבלי, פיקואל ותערובת של זנים, להזנת מעלי גירה.

בשנת 2016 בחנו את הפוטנציאל של הפטרייה *Pleurotus* מזן הבר PC9 ושל המוטנט OE7, המתאפיין ביכולת פחותה לייצר צלולאזות, לטייב גפתות מהזנים סורי, נבלי, פיקואל ותערובת של זנים, להזנת מעלי גירה. שני זני הפטרייה גודלו על כל אחת מהגפתות למשך 22 יום, וביצועיהן הושוו לגפת ביקורת, קרי, גפת שהוחזקה בתנאי הניסוי, ללא פטריה. על בסיס תוצאות קודמות, מהן למדנו כי השמן הוא מקור פחמן ואנרגיה מועדף על הפטריות, נולד הצורך לבחון את השפעת כושר ייצור הצלולאזות על טיוב הגפת. בטבלה מספר 1 מוצגים עיקר הממצאים על פירוק מרכיבי דופן התא ע"י הפטריות. המובהקויות מציינות הבדלים סטטיסטיים, לאחר תיקון בונפרוני, בין שני זני הפטרייה. ניתן לראות, בשונה מהמצופה, כי המוטנט משאיר יותר שמן בגפת מאשר זן הבר. לעומת זאת, לא ניכר חסרונם בפירוק מרכיבי דופן התא, אך כן יתרון קל בפירוק הליגנין.

טבלה 1. פירוק שמן ומרכיבי דופן התא ע"י פטריות *Pleurotus* מזן PC9 ו OE7

			oil,%		NDF %		ליגנין %		ADF	
	ביקורת	נבלי	7.57%		78.48%		28.48%		60.79%	
22days	PC-9	נבלי	2.16%		79.22%		27.04%		61.44%	
	OE7	נבלי	2.98%	0.041	76.29%	0.084	26.67%	0.094	64.53%	0.045
	ביקורת	סורי	16.40%		68.12%		24.17%		53.94%	
22days	PC-9	סורי	11.36%		72.30%		26.28%		58.14%	
	OE7	סורי	13.50%	0.003	70.17%	0.288	25.14%	0.097	56.31%	0.227
	ביקורת	פיקואל	16.32%		58.15%		20.45%		45.58%	
22days	PC-9	פיקואל	15.76%		57.03%		22.98%		46.00%	
	OE7	פיקואל	15.56%	0.801	55.91%	0.702	21.77%	0.031	47.20%	0.666
	ביקורת	תערובת	8.51%		75.66%		26.66%		59.32%	
22days	PC-9	תערובת	3.28%		74.67%		26.54%		61.24%	
	OE7	תערובת	5.51%	0.002	75.05%	0.835	26.22%	0.617	61.09%	0.868

המתאם הזה, של פירוק שמן וליגנין מובא גם באיור מספר 1. שוב, המובהקויות מציינות הבדלים סטטיסטיים, לאחר תיקון בונפרוני, בין שני זני הפטרייה.



איור 1. השפעת זן הפטרייה, PC9 או OE7 על תכולת השמן וריכוז הליגנין בגפתות שונות.

לסיכום, מתוך מגוון הניסויים שנערך עד כה, כולל האנליזות המוצגות לעיל, מערך הניסוי שעשה שימוש במוטנט OE7 הוא המבטיח ביותר להמשך העבודה על טיוב גפת למעלי גירה. יש הבדלים בסיסיים בין הערכים התזונתיים של הגפתות השונות, כמו גם התבססות שונה של הפטריות עליהן. הממצא המובהק ביותר הוא פירוק מופחת של שמן ע"י המוטנט בהשוואה לזן הבר. מאחר וניסיון העבר שלנו מלמד כי הפטרייה מפחיתה את ריכוז הפנולים בגפת ומורידה את רעילותה (כפונקציה של ריכוז הפנולים בגפת וריכוז הגפת במנה), קביעת מדד שיורכב מאחוז השמן בגפת, ריכוז הפנולים ונעכלות הגפת (כאשר מהווה עד 50% מהמנה, ע"פ מבחני רעילות שערכנו בעבר), בתום תקופת הגידול, תוך שימוש במוטנט OE7 במשכי זמן שונים, ייתן אומדן לגבי פוטנציאל הטיוב של הגפת להזנת מעלי גירה.

בשנת 2017 בחנו את הפוטנציאל של הפטרייה *Pleurotus* מזן הבר PC9 ושל המוטנט OE7, המתאפיין ביכולת פחותה לייצר צלולאזות, לטייב גפת מהזנים סורי, נבלי, פיקואל ותערובת של זנים, להזנת מעלי גירה. שני זני הפטרייה גודלו על כל אחת מהגפתות למשך 22 יום, וביצועיהן הושוו לגפת ביקורת, קרי, גפת שהוחזקה בתנאי הניסוי, ללא פטריה. על בסיס תוצאות קודמות, מהן למדנו כי השמן הוא מקור פחמן ואנרגיה מועדף על הפטריות, נולד הצורך לבחון את השפעת כושר ייצור הצלולוזות על טיוב הגפת. בשנה שעברה דיווחנו כי המוטנט משאיר יותר שמן בגפת מאשר זן הבר. לעומת זאת, לא ניכר חסרונם בפירוק מרכיבי דופן התא, אך כן יתרון קל בפירוק הליגנין. המתאם הזה, של פירוק שמן וליגנין מובא גם באיור מספר 2. שוב, המובהקויות מציינות הבדלים סטטיסטיים, לאחר תיקון בונפרוני, בין שני זני הפטרייה. בשתי שנות המחקר הראשונות מצאנו הבדלים בסיסיים בין הערכים התזונתיים של הגפתות השונות, כמו גם התבססות שונה של הפטריות עליהן, והממצא המובהק ביותר היה פירוק מופחת של שמן ע"י המוטנט בהשוואה לזן הבר. הסקנו מתוך התוצאות של שתי שנות המחקר הראשונות כי שימוש במוטנט OE7 הוא המבטיח ביותר להמשך העבודה על טיוב גפת למעלי גירה. מאחר וניסיון העבר שלנו מלמד כי הפטרייה מפחיתה את ריכוז הפנולים בגפת ומורידה את רעילותה (כפונקציה של ריכוז הפנולים בגפת וריכוז הגפת במנה), קביעת מדד שיורכב מאחוז השמן בגפת, ריכוז הפנולים ונעכלות הגפת (כאשר מהווה עד 50% מהמנה, ע"פ מבחני רעילות שערכנו בעבר), בתום תקופת הגידול, תוך שימוש במוטנט OE7 במשכי זמן שונים, ייתן אומדן לגבי פוטנציאל הטיוב של הגפת להזנת מעלי גירה.

ואכן, בשנת המחקר השלישית בחנו את השפעת זן הפטרייה, PC9 או OE7, על ריכוז הפוליפנולים ונעכלות החומר היבש בגפתות השונות. שני הזנים הפחיתו באופן ניכר ומובהק את ריכוז הפוליפנולים בגפתות השונות, אולם בעוד לא היה הבדל בין זן הבר למוטנט בפירוק פוליפנולים בגפת הסורי והנבלי, לזן הבר היה יתרון על המוטנט בפירוק פוליפנולים של זן הפיקואל ולמוטנט היה יתרון בפירוק פוליפנולים של הגפת המעורבת (איור 2). באופן מפתיע, דווקא גפת שגודל עליה זן הבר נעכלה טוב יותר כשהיוותה 50% מהמנה, בהשוואה למוטנט. יתרון זה בלט בגפת סורי ופיקואל ולא היה נבדל בנבלי (איור 3). לאור התוצאות כי למרות שלפיקואל יש את תכולת הפנולים הגבוהה ביותר, נעכלותו היא הגבוהה ביותר, ללמד על ספציפיות בקשר פטריה גפת וחיידקי כרס גפת. קשה מתוך תוצאות המחקר להמליץ חד משמעית על עדיפות לזן הבר או למוטנט.

איור 2. השפעת זן הפטרייה, PC9 או OE7 על ריכוז הפנוליפנולים בגפתות שונות.

איור 3. השפעת זן הפטרייה, PC9 או OE7 על נעכלות החומר היבש של הגפתות השונות.

ד1) השפעת העקר והפרקציות שלהן על קוקסידיות

1. יש השפעה מועטה של גולמי על ספורולציה של קוקסידיות

נבדקה השפעת העקר הגולמי לאחר תהליך הסינון (OAC). עקר גולמי מסונן הוא מעכב חלש של ספורולציה.

2. הפרקציה היחידה הפעילה נגד ספורולציה היא Antisolvent והפוטסיום דיכרומט

פוגע בבדיקה.

נבדקה פעילותן של 5 פרקציות פנוליות שונות (Anti-solvent, STP, FTP, AAA, nCAA) על התפתחות הטפיל (טבלה 1).

טבלה 1- השפעת פרקציות "עקר" בריכוז 4000ppm מומסות ב5% DMSO

מכל פרקציות ה"עקר" שנבדקו, רק פרקציית Antisolvent (מסומן בצהוב)

גרמה לעיכוב ספורולציה ב-40% מהאואוציסטות, לעומת הפרקציות האחרות אשר גרמו לעיכוב הקטן מ-7%. כמו כן, $K_2Cr_2O_7$ המשמש כחומר חיטוי נגד חיידקים מעודד ספורולציה והוחלט לסלקו מה מבחן (טבלה 1).

3. יש dose-response לשיעור ספורולציה בנוכחות אנטיסולבנט ואין צורך ב-DMSO (גרפים 2-3).

גרף 2- אחוז ספורולציה
לאחר טיפול
ב 10% Antisolvent
DMSO- בריכוזים שונים
למשך 24h.

גרף 3- אחוז ספורולציה
לאחר טיפול ב-
Antisolvent בריכוזים
שונים למשך מעל ל-
48h

4. Gallic acid מעכבת ספורולציה בשילוב עם אנטיסולבנט (גרפים 4-5)

גרף 4- אחוז ספורולציה
לאחר טיפול ב Gallic
acid בריכוזים שונים
בשילוב Antisolvent
2000 ppm אשר הומס
ב-10% DMSO

גרף 5- אחוז ספורולציה
לאחר טיפול ב Gallic
acid בריכוזים שונים
בשילוב Antisolvent
2000 ppm אשר הומס

במים.

כאשר ריכוז החומצה גאלית הינו 450ppm ב-2000ppm אנטיסולבנט, שיעור ספורולציה של כ-30%, לעומת שיעור ספורולציה של כ-40% בלי חומצה גאלית. השילוב של אנטיסולבנט ו-550 ח"מ חומצה גאלית גורם ל-70% עיכוב (גרף 6). ניתן להוריד שיעור ספורולציה לפחות מ-20% בשילוב אנטיסולבנט 4000 ח"מ ו-550 חל"מ חומצה גאלית. בהמשך נבחן השילוב של פרקצית Anti-solvent בריכוז 4000ppm שהומס במים, בשילוב ריכוזים משתנים של חומצה גאלית.

גרף 6- אחוז ספורולציה לאחר טיפול ב Gallic acid בריכוזים שונים בשילוב

Antisolvent 4000 ppm אשר הומס במים

5. חומצה ואנילית היא מעכב חלש של ספורולציה על שיעור ספורולציה

נבדקה גם חומצה וונילית כתוצר פירוק של פוליפנולים במעי החיה ובשילוב עם Anti-solvent. השפעתה הייתה חלשה מזו של חומצה גאלית (גרף 7) ולא היה dose-response מעל 50 ח"מ.

גרף 7 - אחוז

ספורולציה לאחר

טיפול ב Vanillic

acid בריכוזים

שונים

גרף 8- אחוז

ספורולציה לאחר

טיפול ב Vanillic

acid בריכוזים

שונים בשילוב

Antisolvent

2000 ppm

22) טיפול/מניעת קוקסידיוזיס בעופות הגדלים על רפד

מטרתנו לבדוק אם אנטיסולבנט הניתן במים יש בכוחו להפחית תופעות הקשורות לקוקסידיוזיס. היה בתכנון לבצע ניסוי הקדמי שלו שתי מטרות: ללמוד את ההוקעה של *Eimeria* באפרוחים בני שבוע; ו-2 לוודא שאפרוחים שותים מים עם 4000 ח"מ של אנטיסולבנט ו-600 ח"מ של חומצה גאלית. נמצא in vitro עיכוב של 80% ספורולציה של אואוציסטות בשנה השנייה של הפרויקט. דר' ליאורה גור הצליחה

לאתר אואוציסטות של *E. tenella* והניסוי נעשה על 5 קבוצות של 6 אפרוחים כ"א:

1. 6 מודבקים במינון 1×10^4 (5 + אפרוח ספייר מודבק, סה"כ 6 אפרוחים)
2. 6 מודבקים במינון 5×10^4 (5 + אפרוח ספייר מודבק, סה"כ 6 אפרוחים)
3. 6 מודבקים במינון 10×10^4 (5 + אפרוח ספייר מודבק, סה"כ 6 אפרוחים)
4. 6 אפרוחי ביקורת, לא מודבקים (5 + אפרוח ספייר, סה"כ 6 אפרוחים)
5. 6 אפרוחים מטופלים בחומר הנבדק

נרכשו 35 אפרוחים מגזע כבד, בהנחה שעד להדבקה וגם לאחריה תהיה תמותה של אפרוחים. סה"כ 2 אפרוחים עודפים לכל קבוצה. האפרוחים שוכנו בתאים מבוקרי אקלים של 6 מבודדים במכון הוטרינרי. הדבקת קבוצות 1-3 חלה ביום 14 להגעתם, על אף שהתכנית הייתה להתחיל טיפול כבר בגיל 4 ימים. הסיבה – הצורך להכין חומר חדש בכל יום וימי חג. סה"כ נדרש כ-56 גרם אנטיסולבנט $4g/l \times 14d$ (X 1 l/d = 56g) ו-8.4 גרם חומצה גאלית $(0.6g/l \times 14d \times 1 l/d)$ כאשר הצריכה היא 1 ליטר ל-6 אפרוחים ביום בממוצע. תוכנן לבדוק הפרשת קוקסידיה אחת ל-4 ימים להמשיך הניסוי למשך 4 שבועות.

החל מהגעתם, חלק מהאפרוחים בכל הקבוצות רבצו שעות רבות והתברר שהם סבלו מסלמונלה. לפי בדיקתנו מקור המחלה לא היה במזון. מאחר שקבוצה אחת של אפרוחים חלה במבנה אחר, ייתכן שהאפרוחים היו מודבקים בסלמונלה בתחילה.

על אף הבעייה שנגרמה מתמותה בסלמונלה, נלמדה הוקעה ישירה לזפק בשלושת המינונים והתקבלו lesions כמצופה. כמו כן, האפרוחים שקיבלו מים מטופלים שתו כמות דומה של מים.



בילטראלי בצקום של lesion איוור 1:
אפרוח, 4 ימים אחרי הדבקה ב-
100,000 *E. tenella* אואוציסטות של
(צילום: דר' ליאורה גור; בית דגן,
2017)

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערות: דוחות שיוגשו בסטטוס פרסום "מוגבל רק לספריות" יחשבו ע"י הקרן כדוחות שאינם מוגבלים לפרסום ויפורסמו באתר המדען הראשי של משרד החקלאות ופיתוח הכפר.

אנא פרט מהם הניסויים שנעשו תוך השוואה לתכנית העבודה המתוכננת והתאמתם למטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה המקיפה
הניסויים שנעשו תואמות את תוכנית המחקר שהוגשה ואושרה כולל השנוי שהיה בשנה השלישית.
ממוהל הזיתים הפקנו פרקציות לטיפול בקוקסידיות וגם כחומרים להגנה מפני קרינת שמש כולל UV מהגפת הפקנו מספח ביולוגי להרחקת מתכות כבדות. השתמשנו בפטריות לשיפור העיכול של הגפת.
מהם עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח?
הפרקציות שהופקו היו עם פעילות אנטי אוקסידנטית ונתנו הגנה על העור מפני קרינת שמש ו UV
המספח – ביוצאר היה יעיל בהרחקת מתכות כבדות ממים וגם להרחקת חומרים מקבוצת PAH
פטריות המאכל עזרו בפירוק הלגנין ונתנו שיפור לרמת הנעכלות של הגפת.
בעקבות הניסויים שנעשו, אנא פרט והסבר כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח או חלק מהן
המטרות שהוצבו נחקרו והתקבלו תוצאות שיובילו לפרסום לפחות לשני מאמרים מדעיים וגם לפטנט.
הדוח מתאר את התוצאות בפירוט כולל המוצרים שהתקבלו.
בהתאם להצעה המקיפה, ציין מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני דרך, כולל אבני דרך כמותיות (סעיפים IV-VI) ומהם הקריטריונים שפורטו בהצעה המקיפה כבוחן להצלחת המחקר אכן הושגו
כל המטרות שהצבנו נחקרו והביאו לתוצאות טובות מאוד חוץ מרמת הנעכלות שהשתפרה מעט יחסית.
מוהל הזיתים ללא ספק אפשר לנצל אותו להפיק משחה טבעית להגנה על העור מפני קרינת שמש ו UV
מהן המסקנות המדעיות ומהן ההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד?
המשחה שהתקבלה תוגש לרישום לפטנט וננבא לקבל מימון מהתעשייה להמשך יישום.
הפרקציות ממוהל הזיתים נגד קוקסידיות טובות ויוגשו לקרנות תחרותיות למימון לבדיקה על העופות.
המספח הוא טוב מאוד להרחקת מתכות כבדות ממים ומשפכים וגם PAH ואפשר לבדוק נושא המסחור
מהן הבעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך?
הפרקציות שנבדקו נגד קוקסידיות לא היה אפשר לבצע מחקר מקיף על עופות לכן תוגש בהקדם הצעה להמשך לקבלת מימון לבדיקה יותר מקיפה
השפעול של הביוצאר היה טוב להרחקת מתכות כבדות וגם PAH אבל נבדוק עוד שיטות אחרות לשפעול.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
יש מאמר בשלבי פרסום מתקדם. יוגש עוד מאמר. היו כמה הרצאות בכנסים לאומיים ובנלאומיים בנושאים השונים. לפני חודש היה כנס ביוון שהוצג נושא המספח. המשחה תירשם כפטנט.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
⏪
⏪ חסוי – לא לפרסום: כמו שכתבתי למעלה אנחנו בשלבי רישום פטנט על המשחה לכן נא לא לפרסם - חסוי

האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים