	<b>תקופת המחקר:</b> 2001-2003	<b>קוד מחקר:</b> 204-0448-03
	<b>Subject:</b> IDENTIFICATION AND MANIPULATION OF NEW FLAVORS IN DIFFERENT APPLE CULTIVARS	<b>שם המחקר:</b> זיהוי ופיתוח טעמים בזני תפוח
	<b>Principal investigator:</b> DORON HOLLAND	<b>חוקר ראשי:</b> דורון הולנד
	<b>Cooperative investigator:</b> UZI RAVID, RAPHAEL ASSAF, IRIT BAR-YAACOV, EFRAIM LEWINSOHN	<b>חוקרים שותפים:</b> עוזי רביד, רפאל אסף, עירית בר-יעקב, אפרים לוינסון
	<b>Institute:</b> Agricultural Research Organization (A.R.O)	<b>מוסד:</b> מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

### תקציר

איכות התפוח הופכת להיות אחד הגורמים המרכזיים ברווחיות וביכולת ענף התפוח הישראלי להתחרות ביבוא מחו"ל. אחד ממרכיבי האיכות החשובים בתפוח הנם חומרי הטעם והריח בפרי. ידוע שנגזרות נדיפות של אסטרים (בעיקר אצטטים), כהלים ואלדהידים הן בעלות השפעה גדולה על הטעם והריח בפירות ולפיכך חשוב היה לזהותן כחלק ממרכיב האיכות של הטעם בתפוח. במחקר זה בוצעה עבודה לניתוח הרכב החומרים הנדיפים, המרכיבים את הארומה של זני התפוח 'גרני סמיט', 'סמוטי' (מוזהב), ו'פוגי'. לאחר שאופיינו המרכיבים נלמדה פעילות האנזים האחרון במסלול היצור שלהם לאורך ההבשלה. בשלב הסופי של העבודה הוספנו חיזונית כמויות מזעריות של חומרי ארומה אשר היו חסרים בתפוחי 'גרני סמיט' ונבחנה יכולת החדירה שלהם לקליפה ולציפה ומידת השפעתם על הטעם. ניתוח ההרכב של חומרי הטעם יצר פרופיל חומרים נדיפים אשר מאפיין כל אחד מהזנים הנ"ל. בציפת הזן 'גרני סמיט' לא נמצאו נגזרות אצטטיות, שלהן תרומה גדולה לארומה של התפוח. עובדה זו נתמכת בעבודה אנזימתית המראה שהאנזים אצטיל קו A-אצטיל-טרנספראז (AAT) איננו פעיל בציפה של 'גרני סמיט'. תכולת החומרים הנדיפים בתפוחים מאל-רום גבוהה משמעותית מזו של תפוחים שגדלו בנוה יער ואנו מניחים שהדבר נובע מתנאי סביבה שונים. תכולת החומרים הנדיפים במהלך ההבשלה נבחנה גם היא ונעשתה השוואה בין המרכיבים הארומטיים של הציפה לבין אלה של הקליפה. נמצא שמגוון האסטרים בקליפה רחב יותר מאשר בציפה בזן 'פוגי', ובתפוח מזן 'גרני סמיט' ישנם אסטרים בקליפה, אך בציפה אין. עבודת המחקר מראה שההבדלים בין חומרי הטעם של הזנים השונים מקורם בפעילות שונה של האנזים AAT ושיש קרוב לודאי אנזים AAT שונה בציפה ובקליפה של אותו תפוח וכן אנזימי AAT שונים בין זני תפוח שונים. מבחני הוספה של חומרי טעם (או הפרקורסורים שלהם) מראים בצורה חד משמעית שניתן לשנות באופן מלאכותי ודרמטי את הרכב חומרי ארומה בציפה ובקליפה של תפוחים. מבחני טעימה ראשוניים מראים שניתן לשפר את הטעם באמצעות הוספה של חומרים אלה.

רשימת פרסומים

לוינסון א. (2001) הטעם והארומה של הפרי – מנין ולאן? עלון הנוטע, 8(55): 359-356.

Holland D., Lewinsohn E., Ravid U., Bar-Yaakov I., Larkov O. and Bar E. (2003).

Different aroma producing acetyl transferases are present among apple varieties and among fruit pulp and peel (in prep.).

**זיהוי ופיתוח טעמים בזני תפוח**

Identification and manipulation of new flavors in different apple cultivars

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף מטעים

ע"י

דורון הולנד, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
רפאל אסף, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
אפרים לוינסון, תבלינים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
עוזי רביד, תבלינים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
עירית בר-יעקב, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
רות בן-אריה, המעבדה לחקר הקירור, ארגון מגדלי פירות, קרית שמונה  
אולגה לרקוב, תבלינים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
ליליה פריימן, תבלינים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער  
עינת בר, תבלינים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער

Doron Holland, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,  
Ramat Yishay 30095. vhhollan@agri.gov.il

Raphael Assaf, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,  
Ramat Yishay 30095.

Efraim Lewinsohn, Aromatic & Medicinal Plants, A.R.O., Newe Ya'ar Research  
Center, P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. twefraim@int.gov.il

Uzi Ravid, Aromatic & Medicinal Plants, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center,  
P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. uziravid@volcani.agri.gov.il

Irit Bar-Ya'akov, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,  
Ramat Yishay 30095. dholland@int.gov.il

Ruth Ben-Arie, Fruit Storage Research Laboratory, Kiryat Shmona, 10200.  
fruitlab@netvision.net.il

Olga Larkov, Aromatic & Medicinal Plants, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center,  
P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095. olgalarkov@volcani.agri.gov.il

Lilia Freiman, Aromatic & Medicinal Plants, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center,  
P.O.B. 1021, Ramat Yishay 30095.

Einat Bar, Aromatic & Medicinal Plants, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B.  
1021, Ramat Yishay 30095. mshalit@agri.gov.il

**תקציר**

איכות התפוח הופכת להיות אחד הגורמים המרכזיים ברווחיות וביכולת ענף התפוח הישראלי להתחרות ביבוא מחו"ל. אחד ממרכיבי האיכות החשובים בתפוח הנם חומרי הטעם והריח בפרי. ידוע שנגזרות נדיפות של אסטרים (בעיקר אצטטים), כהלים ואלדהידים הן בעלות השפעה גדולה על הטעם והריח בפירות ולפיכך חשוב היה לזהותן כחלק ממרכיב האיכות של הטעם בתפוח. במחקר זה בוצעה עבודה לניתוח הרכב החומרים הנדיפים, המרכיבים את הארומה של זני התפוח 'גרני סמיט', 'סמוטי' (מוזהב), 'ופוגי'. לאחר שאופיינו המרכיבים נלמדה פעילות האנזים האחרון במסלול היצור שלהם לאורך ההבשלה. בשלב הסופי של העבודה הוספנו חיזונית כמויות מזעריות של חומרי ארומה אשר היו חסרים בתפוחי 'גרני סמיט' ונבחנו יכולת החדירה שלהם לקליפה ולציפה ומידת השפעתם על הטעם. ניתוח ההרכב של חומרי הטעם יצר פרופיל חומרים נדיפים אשר מאפיין כל אחד מהזנים הנ"ל. בציפת הזן 'גרני סמיט' לא נמצאו נגזרות אצטטיות, שלהן תרומה גדולה לארומה של התפוח. עובדה זו נתמכת בעבודה אנזימתית המראה שהאנזים אצטיל קו A-אצטיל-טרנספראז (AAT) איננו פעיל בציפה של 'גרני סמיט'. תכולת החומרים הנדיפים בתפוחים מאל-רום גבוהה משמעותית מזו של תפוחים שגדלו בנוה יער ואנו מניחים שהדבר נובע מתנאי סביבה שונים. תכולת החומרים הנדיפים במהלך ההבשלה נבחנו גם היא ונעשתה השוואה בין המרכיבים הארומטיים של הציפה לבין אלה של הקליפה. נמצא שמגוון האסטרים בקליפה רחב יותר מאשר בציפה בזן 'ופוגי', ובתפוח מזן 'גרני סמיט' ישנם אסטרים בקליפה, אך בציפה אין. עבודת המחקר מראה שההבדלים בין חומרי הטעם של הזנים השונים מקורם בפעילות שונה של האנזים AAT ושיש קרוב לודאי אנזים AAT שונה בציפה ובקליפה של אותו תפוח וכן אנזימי AAT שונים בין זני תפוח שונים. מבחני הוספה של חומרי טעם (או הפרקורסורים שלהם) מראים בצורה חד משמעית שניתן לשנות באופן מלאכותי ודרמטי את הרכב חומרי ארומה בציפה ובקליפה של תפוחים. מבחני טעימה ראשוניים מראים שניתן לשפר את הטעם באמצעות הוספה של חומרים אלה.

**רשימת פרסומים**

- לוינסון א. (2001) הטעם והארומה של הפרי – מנין ולאן? עלון הנוטע, 55(8): 359-356.
- Holland D., Lewinsohn E., Ravid U., Bar-Yaakov I., Larkov O. and Bar E. (2003). Different aroma producing acetyl transferases are present among apple varieties and among fruit pulp and peel (in prep.).

### מבוא (רקע מדעי ומטרות המחקר)

ענף גידול התפוח הוא בעל היקף גדול וכלל היצור העולמי הנו 50 מיליון טון. זהו ענף מפותח מאוד ובשווקים קיים פרי כל השנה במחירים יחסית נמוכים. הפרי האיכותי בעל המראה והטעם המעולים זוכה למחירים של עד פי שלוש. כיוון הצריכה המסתמן כיום הוא לפירות גדולים ואיכותיים יותר ובעלי טעם מיוחד. ענף התפוח ראה בשנים האחרונות מהפכות גדולות במיוחד בשל השינויים בדרישות הצרכנים. זנים כמו 'גרני סמיט' וזנים אדומים, שהיו מאוד מבוקשים, קרנם ירדה והם נדחקים ומקבלים מחירים נמוכים. לעומתם, הזנים הזהובים וזנים חדשים בי-קולור, בעלי ארומות מיוחדות, כמו הזן 'גאלה' והמוטנטים שלו הם מאוד מבוקשים. זנים בעלי טקסטורה וארומה מצוינות, כדוגמת 'פוג'י', הם בעייתיים מבחינת ההחדרה לשוק בשל צבעם הלא מושך. זנים אפילים חדשים ומעניינים, כדוגמת 'פינק לידי', הם חסרי ארומה מיוחדת ולכן הם בעייתיים. אין היום בשימוש כל מדד כמותי ואיכותי למרכיבי הארומה בתפוח הישראלי ואין שום אמות מידה השוואתיות לגבי קביעת דרגת איכות ארומטית בישראל וכיצד היא משפיעה על טעם התפוח.

בפרויקט זה למדנו את ההרכב של חומרי הארומה, המשפיעים על הטעם, בפירות תפוח מהזן 'פוג'י', הנחשב בעל ארומה חזקה ובפירות מהזן 'גרני סמיט', הנחשב זן תפוח חסר ארומה מיוחדת. העבודה התמקדה בנגזרות אצטטיות, המוכרות כבעלות חשיבות בתרומתן לארומת התפוח. האינפורמציה שהצטברה מעבודה זו תהיה חיונית ביותר לשיפור איכות פרי התפוח בישראל ובעולם. הידע שהצטבר יאפשר למצוא מתאם בין נוכחות חומרים מסוימים בפרי לטעמו. יתאפשר פיתוח אמצעי מדידה ובחינה יעילים של איכויות פרי לשימוש גם בתכניות השבחה וגם במערכות גידול של זנים קיימים. יתר על כן, בטווח ארוך זיהוי של אנזימים וגנים שקובעים את ייצורם של חומרי טעם חשובים יאפשר ייצור זול של חומרי טעם אלה ושיפורם בפירות. כמו כן תתאפשר מניפולציה של טעמים בזנים חשובים של תפוח אשר הארומות שלהם לוקות בחסר. עבודה ראשונית בכוון זה נעשתה בעבודת מחקר זו.

בעבודתנו התקדמנו מאוד בבניית פרופיל המאפיין נוכחות של חלק חשוב מחומרי הארומה בתפוחים הגדלים בישראל במטרה להגדיר סטנדרט איכותי של הרכב ארומטי בתפוח. סטנדרט איכות כזה הנו בעל חשיבות גדולה ביותר מבחינה שיווקית ויגרום להעלאת איכות התפוח המשווק בארץ. ממצאים ראשוניים מעבודה ביוכימית בארץ ובעולם מראים שיש ירידה באיכות הארומה של תפוחים במהלך האחסון וניתן לשפר פרמטרים אלה באמצעות טיפולים מתאימים. הדרכים לעשות זאת לא הוגדרו עדיין ולא ברור מה ההשפעה של השיטות השונות על איכות הטעם כפי שחש אותה הצרכן.

מטרות המחקר:

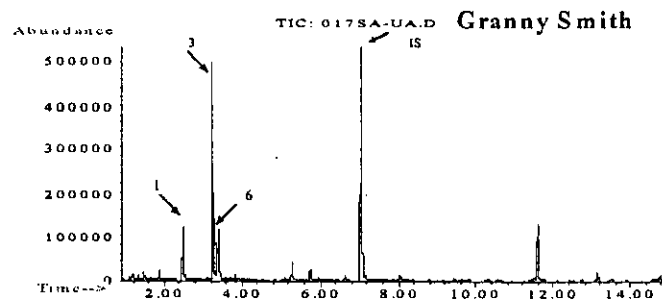
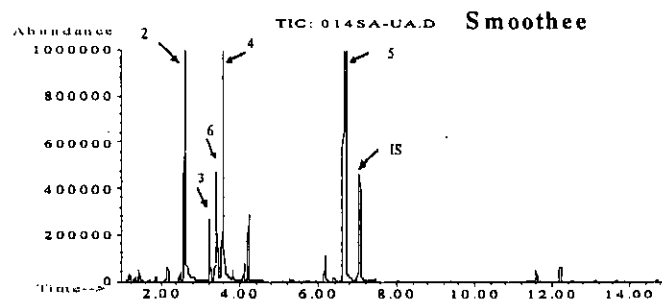
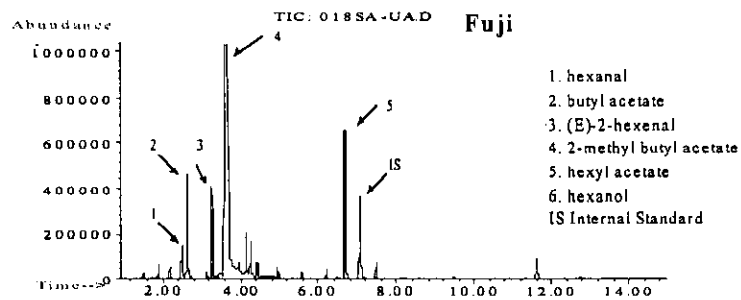
1. א. לזהות בתפוח חומרים נדיפים, אשר מהווים חומרי טעם וריח בעלי חשיבות לאיכות הטעם בתפוח.
- ב. לקבוע הנקיון האופטי של ethyl-2-methyl butanoate ושל 2-methyl butanoate בזני תפוח שונים.
2. לבחון מהם ההבדלים האיכותיים והכמותיים בחומרי הטעם הנ"ל בין זנים חסרי או חלשי ארומה ('גרני סמיט') וזנים בעלי ארומות מיוחדות וחזקות ('פוג'י').
3. לבחון האם מקור ההבדלים בחומרים הנדיפים האסטרניים acetyl CoA-acetyl- transferase (AAT) וללמוד האם קיים יותר מאנזים AAT אחד בזני התפוח השונים.

4. לקבוע את הספציפיות של AAT לסובסטרטים כוהליים שונים והאם יש הבדלים מהבחינה הזו בין זני התפוח השונים.
5. לבחון את תכולת החומרים הנדיפים במהלך ההבשלה של התפוח ולזהות את השלבים בהם חלה הצטברות משמעותית של הנדיפים בכל אחד מהזנים באופן שניתן יהיה להשוות ביניהם.
6. לשנות ולשפר ארומות בזנים חסרי או חלשי ארומה ובתפוחים שאוחסנו לתקופה ממושכת באמצעות חשיפה לפרקורסורים של חומרי ארומה במהלך אחסון התפוחים.

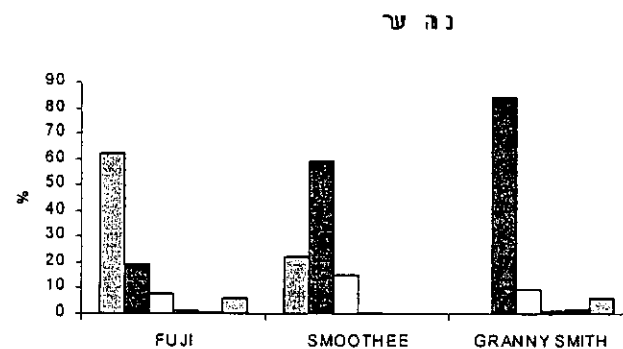
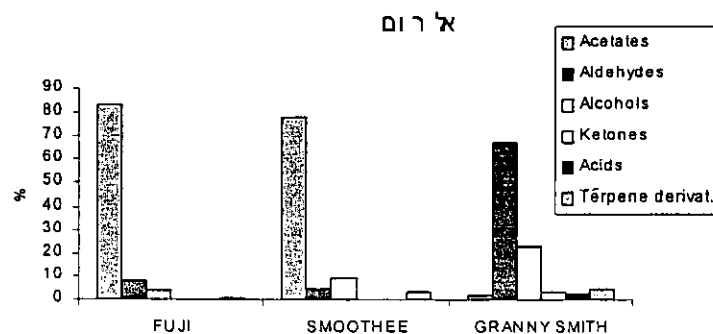
#### פירוט הניסויים והתוצאות שהתקבלו

1. בדיקת תכולת מרכיבים נדיפים בציפת תפוח מהזנים 'פוגיי', 'סמוטי' ו'גרני סמיט' מאל-רום במועד הקטיף (11/10/01, 11/9/01, 11/10/01 בהתאמה).  
לאנליזות נלקחו 5 תפוחים (250-300 גרם כל אחד) מכל זן ובית גידול. מכל מדגם 2 חזרות. הפירות קולפו, נחתכו, עברו הומוגניזציה וצנטריפוגציה והוסף סטנדרט פנימי, המאפשר חישוב כמותי. הוסף NaCl לצורך דאקטיביזציה של אנזימים. האנליזה נעשתה בשיטת HS-SPME-Capillary-GC-MS (Headspace - Solid Phase Micro Extraction - Capillary - GC-MS), שכוללת סיפוח וריכוז של הנדיפים מהאווירה שמעל התמצית המימית של התפוח (Head Space) לפולימר מסוג Polydimethyl Siloxane-Divinylbenzen. החומרים שנספחו לפולימר הוזרקו ישירות לקולונה קפילרית Rtx-5Sil MS של גז כרומוטוגרף - ספקטרומטר המסות מטיפוס GCD PLUS. שיטה זו מחליפה את שיטת המיצוי הקונבנציונלי, הנעשית בעזרת ממסים אורגניים. בשיטה זו ניתן לאחסן את התמצית המימית לתקופה ממושכת (עד 3 חודשים), ללא שינוי בהרכב החומרים.
- התקבל פרופיל חומרים נדיפים אשר מאפיין כל אחד מהזנים הנ"ל. בזן 'גרני סמיט' לא נמצאו נגזרות אצטטיות שלהן תרומה גדולה לארומה של התפוח (תרשים 1).
2. השוואה של תכולת החומרים הנדיפים הקיימים בציפת זני תפוח 'פוגיי', 'סמוטי' ו'גרני סמיט' מאל-רום במועד הקטיף בשנת 2001. בזן 'פוגיי' תכולת הנדיפים הגבוהה ביותר ונמצאו חומרים נדיפים בעלי ארומה חזקה במיוחד. תכולת הנדיפים בזן 'סמוטי' נמוכה יותר מאשר בזן 'פוגיי' אולם גבוהה בהרבה מאשר בזן 'גרני סמיט' (תרשים 2).
3. השוואה בין תכולת חומרים נדיפים בציפת תפוחים ממטע אל-רום (אזור גבוה וקר) וממטע נוח יער (אזור נמוך וחם יותר) במועד הקטיף בשנת 2001. פרופיל החומרים הנדיפים בתפוחים מאל-רום ומנוה יער דומה, אולם תכולתם גבוהה באל-רום מזו אשר בנוה יער (תרשים 2). אנו מניחים שההבדל נובע מתנאי סביבה שונים, הידועים כמשפיעים על איכות הפרי.

תרשים 1: כרומטוגרמות של חומרים נדיפים עיקריים בציפה של שלושה זני תפוח במועד הקטיפ



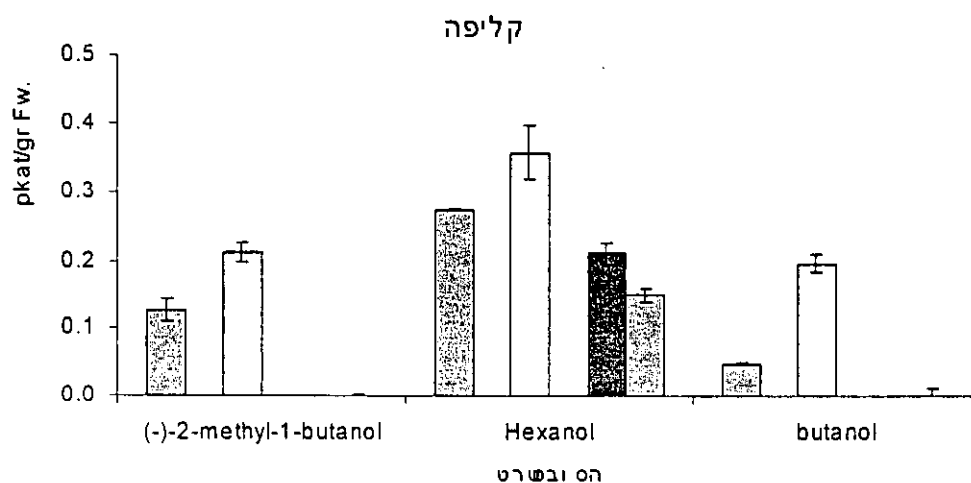
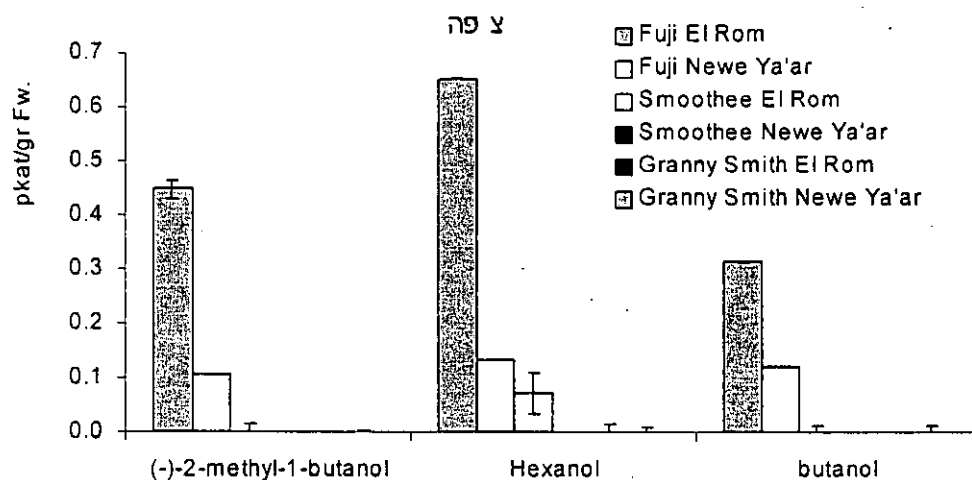
תרשים 2: תכולת חומרים נדיפים בציפת תפוחים מזנים שונים מאל-רום ומנוה יער במועד הקטיפ



4. השוואת פעילות של האנזים AAT בציפה ובקליפה של זני התפוח 'פוגי', 'סמוטי' ו'גרני סמיט' מאל-רום ומנוה יער, במועד הקטיף בשנת 2001. בכל בדיקה אנזימתית נבחנו שלושה סובסטרטים כוהליים: הקסנול, 2-מתיל-1-בוטנול ובוטנול. פעילות ה-AAT נבדקה בשיטה רדיואקטיבית עם  $C^{14}$ -Acetyl-CoA לפי Shalit M. et al. 2001. J. Agric. Food Chem., 49: 794-799. נמצאו הבדלים מהותיים ברמת הפעילות האנזימתית בין הזנים השונים, וכן נמצאו הבדלים גדולים בין הפעילות האנזימתית בקליפה לעומת הציפה. בולט במיוחד העדר פעילות אנזימתית בציפה של 'גרני סמיט'. ב'פוגי' הפעילות בציפה היא גבוהה, במיוחד בזנים שגודלו באל-רום (תרשים 3).

### תרשים 3: פעילות האנזים AAT מציפה ומקליפה על שלושה סובסטרטים כוהליים

בשלושה זני תפוח מאל-רום ומנוה יער במועד הקטיף



5. נבדקה תכולת החומרים הנדיפים בציפה ובקליפה בזני התפוח 'גרני סמיט' ו'פוגי' ממטע אל-רום במועד ההבשלה בשנת 2002.

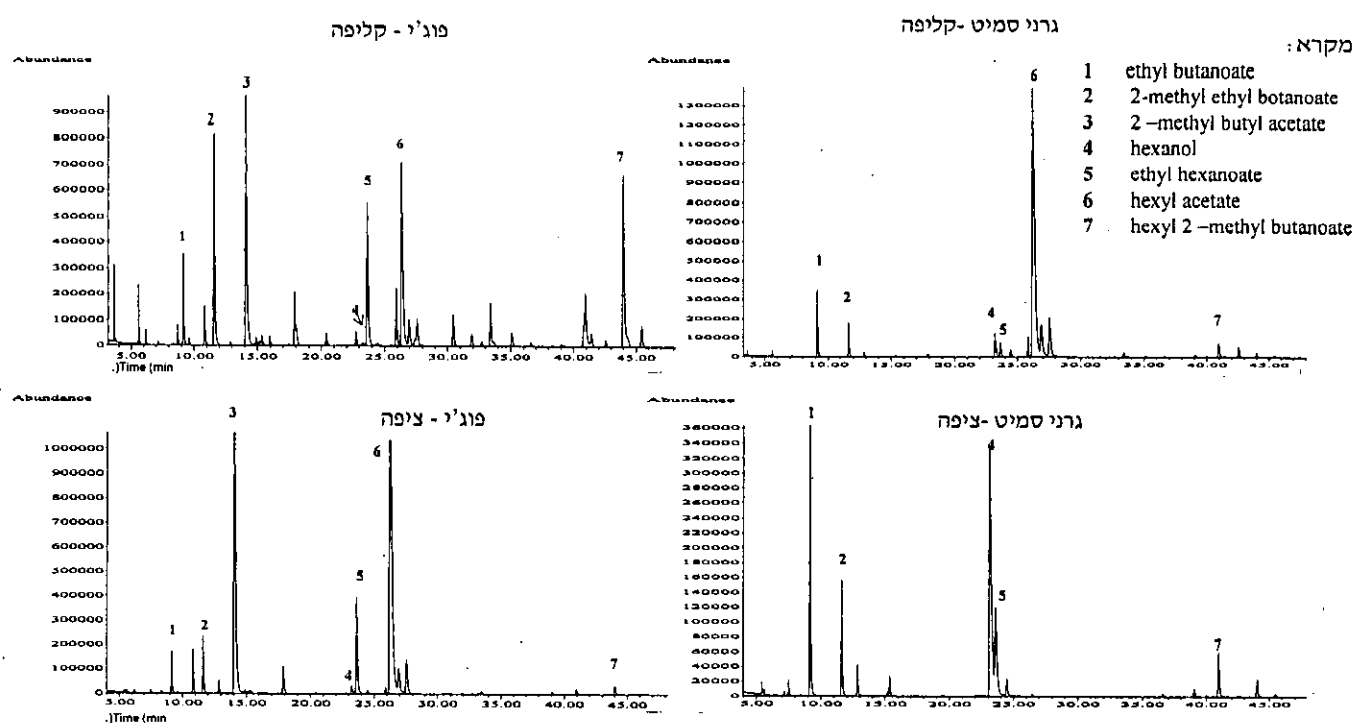
הבדיקה של ארומת התפוח (תכולה והרכב) נעשתה בשיטה שפורטה בסעיף 1 לעיל. בדיקת הנדיפים נעשתה ב- Auto - Head Space - Solid Phase Micro Extraction - Capillary - Gas

(Auto-HS-SPME-GC-MS) Chromatography - Mass Spectrometry  
MSD של חברת Agilent.

נצפו הבדלים משמעותיים בהרכב ובכמות החומרים הנדיפים שמקורם בקליפה לעומת אלה שמקורם בציפה. מסתבר שיש הבדל בכמות ובמגוון של האצטטים בין הקליפה לציפה. ההבדלים הדרמטיים ביותר הם בתפוחי 'גרני סמיט', בהם אין אצטטים בציפה בעוד שבקליפה מצטבר בעיקר הקסיל אצטט. בתפוחי 'פוגי' המרכיב העיקרי של האצטטים הוא 2 - מתיל בוטיל אצטט ובכמות נמוכה יותר הקסיל אצטט, המצטברים בקליפה אך בכמות רבה יותר בציפה (תרשים 4).

#### תרשים 4: כרומטוגרמות SPME של חומרים נדיפים בקליפה ובציפה

של תפוחים מהזנים 'גרני סמיט' ו'פוגי' במועד הקטיפה

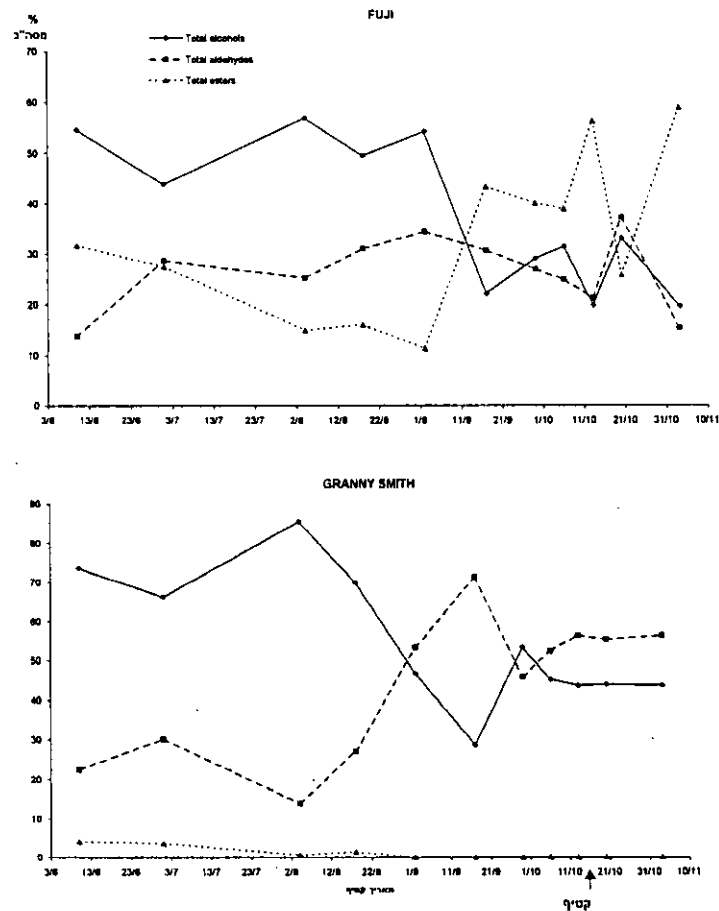


6. נבדקה תכולת החומרים הנדיפים (אסטרים, אלדהידים וכהלים) במהלך ההבשלה בזני התפוח 'גרני סמיט' ו'פוגי' ממטע אל-רום בשנת 2002. בכל אחד משני זנים אלה נבדקה תכולת הנדיפים בציפה ובקליפה בנפרד, החל משלבים צעירים מאוד של התפתחות התפוח (אמצע יוני, קוטר פרי 35-40 מ"מ) ועד כשבועיים לאחר הקטיפה המסחרי (לאחר הקטיפה נלקח לקט לבדיקות). התוצאות מראות שחומרים נדיפים נוצרים במהלך כל שלבי ההבשלה של התפוח. בראש וראשונה נוצרים כהלים אשר רמתם הגבוהה ביותר היא בחנטים הצעירים (במהלך חודש יוני). אלדהידים מתחילים להצטבר החל מחודש אוגוסט ומלווים בהדרגה בירידה ברמת הכהלים. האסטרים, חומרי הארומה הראשיים, מתחילים להצטבר החל מחודש ספטמבר וב'פוגי' ממשיכים להצטבר גם בלקט שנאסף לאחר הקטיפה המסחרי (תרשים 5). בהשוואת מהלך שינוי אצטטים שונים בציפה ובקליפה נמצאו הבדלים משמעותיים ביותר בתפוחי 'גרני סמיט'. כמו שנמצא לעיל, אין אצטטים בציפה בעוד שבקליפה מצטברים בכמות

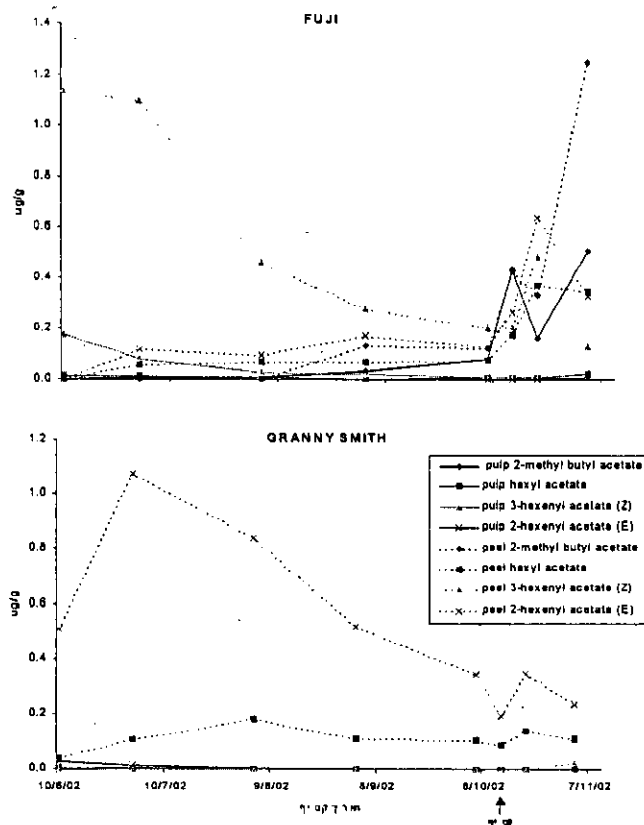
מעטה 2 - הקסניל אצטט והקסיל אצטט. בתפוחי 'פוג'י' המרכיב העיקרי של האצטטים בציפה הוא 2 - מתיל בוטיל אצטט ובקליפה 2 - מתיל בוטיל אצטט ופחות הקסיל אצטט (תרשים 6).

תרשים 5: מהלך שינוי כמות החומרים הנדיפים (SPME ישיר) בציפת תפוח

מהזנים 'פוג'י' וגרני סמיט' במהלך גדילת הפרי



תרשים 6: השינוי בכמות האצטטים בציפה ובקליפה של תפוחים מהזנים 'גרני סמיט' ו'פוגי'



#### במהלך גדילת הפרי

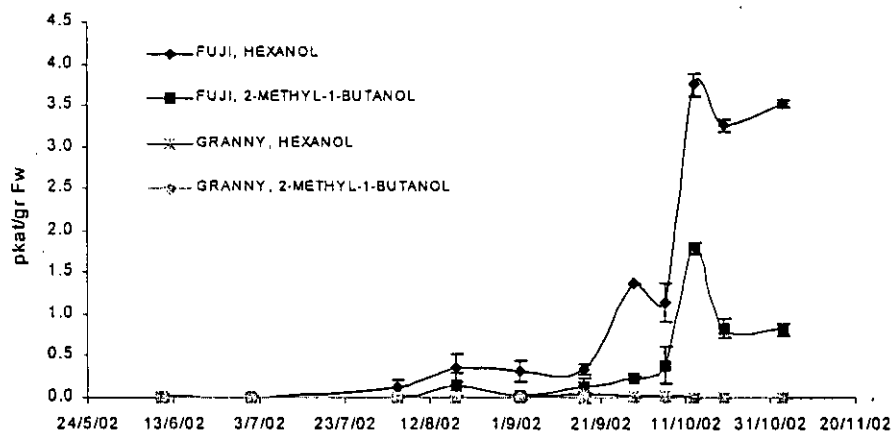
7. נבדקה פעילות האנזים AAT במהלך ההבשלה של זני התפוח 'גרני סמיט' ו'פוגי' ממטע אל-רום בשנת 2002. בכל אחד מהם נבדקה הפעילות בציפה ובקליפה בנפרד, החל מאמצע יוני, קוטר פרי 35-40 מ"מ) ועד כשבועיים לאחר הקטיף המסחרי (לאחר הקטיף נלקח לקט לבדיקות). הפעילות נבדקה על שני סובסטרטים כהליים, הקסנול ו-2 - מתיל - 1 - בוטנול. הבדיקה נעשתה בשיטה רדיואקטיבית עם  $H^3$ -Acetyl-CoA.

התוצאות מראות שיש פעילות של האנזים AAT לאורך כל מהלך ההבשלה, ובשני הזנים הפעילות במגמת עליה החל מתחילת חודש אוגוסט, ומגיעה לשיאה בתקופת הקטיף המסחרי. אופי הפעילות בשני הזנים שונה. בזן 'פוגי' יש תגובה לשני הסובסטרטים בקליפה ובציפה, במיוחד ל-2 - מתיל - 1 - בוטנול. בזן 'גרני סמיט' תגובת ה-AAT בציפה לשני הסובסטרטים אפסית, ובקליפה התגובה לבוטנול אפסית ולהקסנול ניכרת (תרשים 7). תוצאות אלה מראות את מהלך הפעילות לאורך תקופת ההבשלה ומראות שיש התאמה בין אנאליזות תכולת החומרים לבין הפעילות האנזימטית. מתוצאות אלה ניתן להסיק שההבדלים בתכולת החומרים הארומטיים בין הקליפה והציפה וכן בין הזנים השונים מקורן בפעילות שונה של האנזים AAT ולא באי זמינות של הסובסטרט. כמו כן, ניתן להסיק שהמגוון בתכולת חומרי ארומה בין זנים שונים של תפוח נובע כנראה מגנים שונים המקדדים ל-AAT.

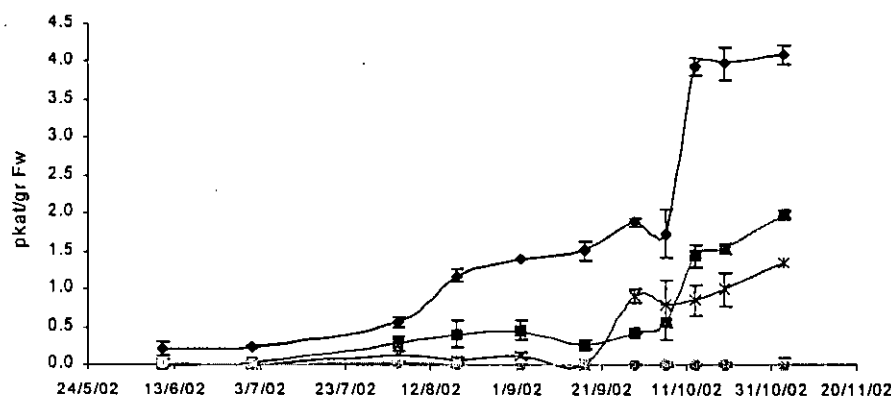
תרשים 7: פעילות AAT מציפה ומקליפה על שני סובסטרטים כהליים בזני התפוח 'פוגיי'

ו'גרני סמיט' במהלך גדילת הפרי

צ פה



ק ליפה



תאריך זימה

8. לאור התוצאות שהתקבלו, בקשנו לבדוק האם תוספת חיצונית של כהל או אצטט לאווירה בה נמצאים תפוחים מהזנים 'פוגיי' ו'גרני סמיט' תשפיע בדרך כלשהי על תכולת הנדיפים וטעמם של תפוחים אלה. לשם כך נלקחו מאל-רום תפוחים משני הזנים, במועד ההבשלה (בסמוך לקטיף המסחרי 20/10/03), והוכנסו לצנצנת הרמטית בנוכחות הקסנול, 2 – מתיל – 1 – בוטנול ו- 2 – מתיל בוטיל אצטט. בכל צנצנת, בנפח שלושה ליטר, הוכנסו שלושה תפוחים ללא פגמים, בגודל 75-80. כבקורת נשמרו תפוחים בצנצנת באווירה רגילה. מכל חומר הוספו לאווירה שני נפחים:  $2\mu\text{l}$  ו-  $10\mu\text{l}$ . ה- 2 – מתיל בוטיל אצטט היה food grade כדי לאפשר טעימת פרי ששהה בנוכחותו. לאחר יממה נבדקו החומרים הנדיפים בציפה ובקליפה בשיטה שפורטה לעיל. בנוסף, הוקמה קבוצת טעימה, המורכבת ממגוון של אנשים שאינם מומחים בטעימה. בזן 'גרני סמיט' לא הורגש הבדל בטעם ובארומה בין הבקורת לתוספת  $2\mu\text{l}$  של 2 – מתיל בוטיל אצטט, אך רב הטועמים ציינו לטובה בטעם ו/או בארומה את התפוחים ששהו באווירה עם  $10\mu\text{l}$  של 2 – מתיל בוטיל אצטט. בזן 'פוגיי' הבקורת נמצאה כטעימה ביותר, מתוקה ביותר והכי ארומטית וקרובה לה תוספת  $10\mu\text{l}$  של 2 – מתיל בוטיל אצטט. תוספת  $2\mu\text{l}$  נמצאה הכי פחות טעימה.

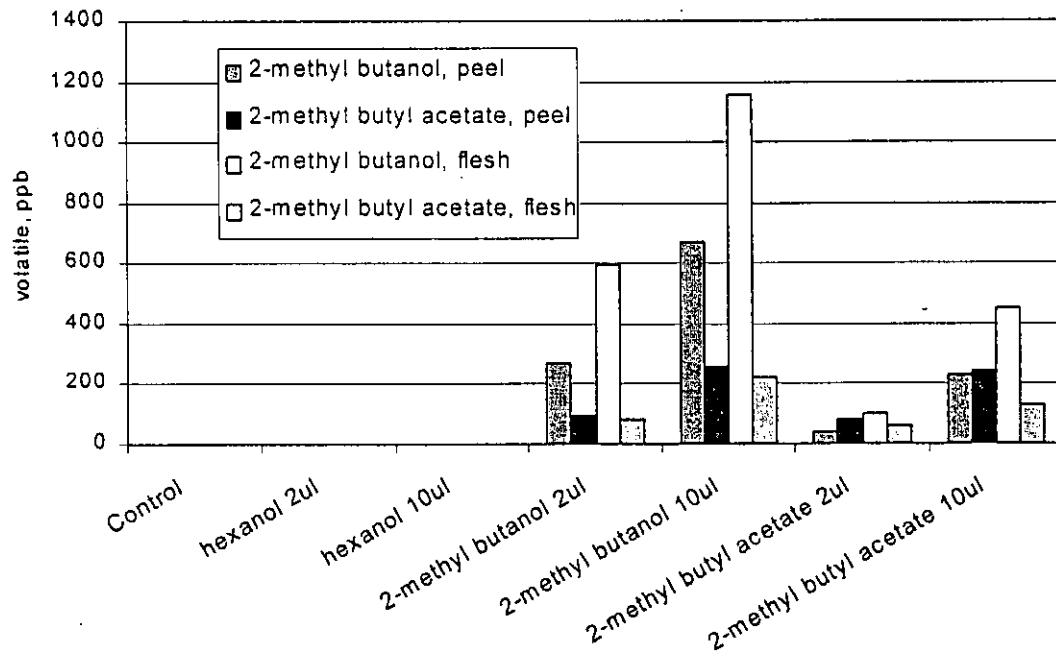
תוצאות בדיקת החומרים הנדיפים בזן 'גרני סמיט' (תרשים 8) הראו שתוספת חיצונית של 2 – מתיל בוטנול העלתה את ריכוז הכוהל הזה בקליפה ובציפה ואף העלתה את ריכוז ה- 2 – מתיל בוטיל אצטט. תוספת 2 – מתיל בוטיל אצטט העלתה מעט את ריכוז האצטט הזה והכוהל המתאים בקליפה ובציפה. תוספת הקסנול העלתה אף היא את ריכוז הכוהל הזה בקליפה ובציפה אך ההקסיל אצטט עלה רק בקליפה. תוספת 10  $\mu$ l נתנה תגובה גדולה משל 2  $\mu$ l, אך לא פי חמש.

תוצאות בדיקת החומרים הנדיפים בזן 'פוגיי' (תרשים 9) הראו שתוספת חיצונית של 2 – מתיל בוטנול העלתה את ריכוז ה- 2 – מתיל בוטיל אצטט בקליפה ובציפה. כך גם תוספת 2 – מתיל בוטיל אצטט. תוספת הקסנול העלתה את ריכוז הכוהל הזה ואת ריכוז ההקסיל אצטט בקליפה ובציפה. תוספת 10  $\mu$ l לא תמיד נתנה תגובה גדולה משל 2  $\mu$ l, וכשהתגובה עולה היחס אינו קבוע. בשני הזנים לא נמצא הבדל בין הטיפולים בכמות האלדהידים והטיפול בכוהל ספציפי גרם לעליה בכמות האצטט של אותו הכוהל ולא השפיעה על כהלים ואסטרים אחרים. ניסוי זה הראה שכהלים ואצטטים שמוספים לאווירה חודרים לתפוח ואף משפיעים על טעמו.

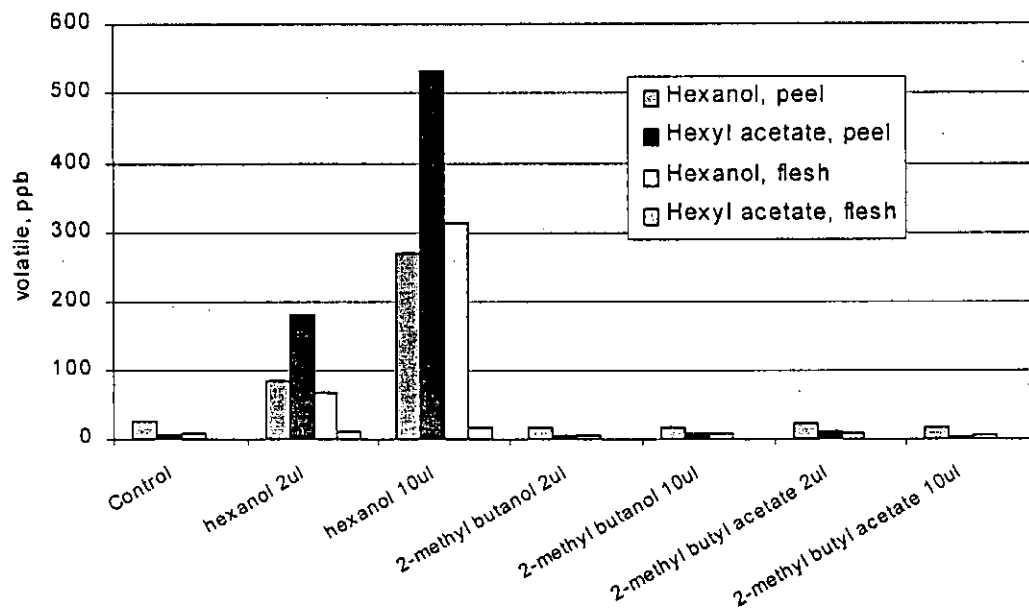
9. בבדיקת הניקיון האופטי של המרכיב methyl butyl acetate – 2 נמצא רק אננטיומר אחד בעל הקונפיגורציה האבסולוטית (S). הבחינה נעשתה ע"י השוואתו לתערובת רצמית בקולונה כירלית מטיפוס R $\beta$ DEX<sub>sm</sub> בטכניקת Auto-SPME-Chiral-GC-MS. המרכיב הזה ידוע בתרומתו האופיינית לארומה של התפוח, ושמם אותנו כסמן כימי לאיכות הזנים בניסיונות שונים.

תרשים 8: הרכב חומרים נדיפים בציפה ובקליפה של זן התפוח 'גרני סמיט' לאחר אחסון באווירה  
 -המכילה הקסנול, 2 - מתיל בוטנול ו-2 - מתיל בוטיל אצטט

### 2-methyl butanol and 2-methyl butyl acetate

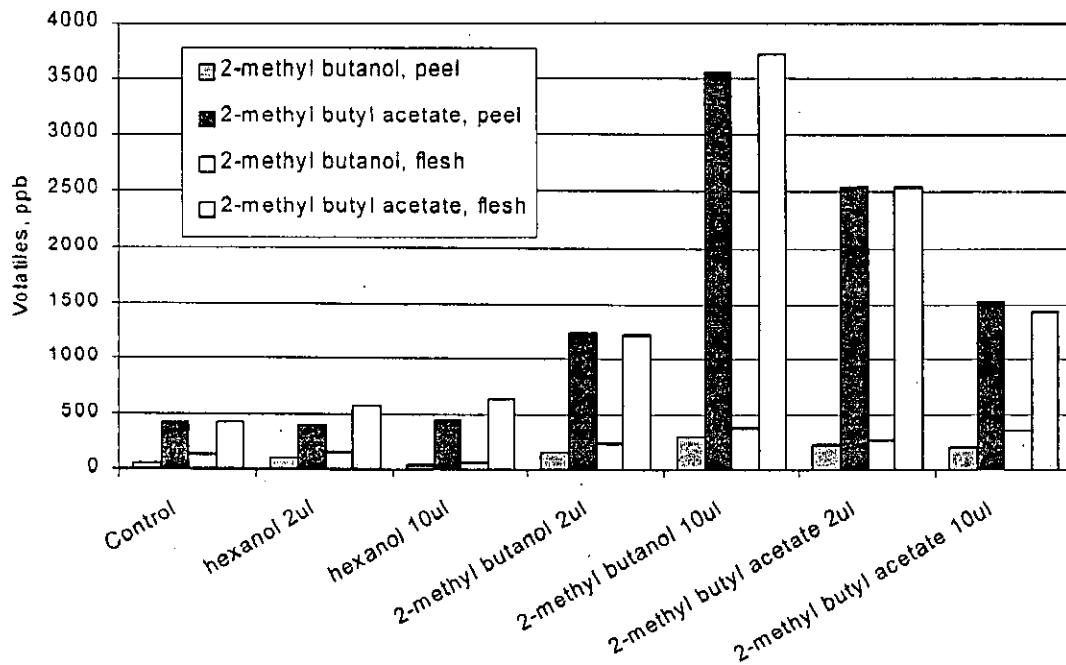


### Hexanol and Hexyl acetate

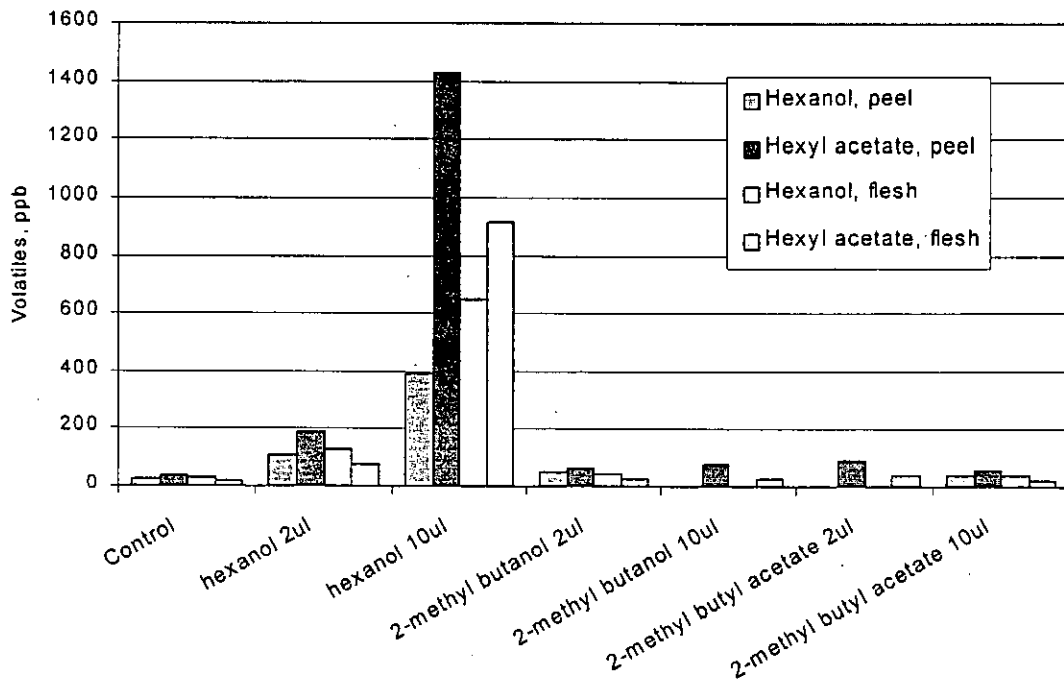


תרשים 9: הרכב חומרים נדיפים בציפה ובקליפה של זן התפוח 'פוגי' לאחר אחסון באווירה המכילה הקסנול, 2 – מתיל בוטנול ו-2 – מתיל בוטיל אצטט

### 2-methyl butanol and 2-methyl butyl acetate

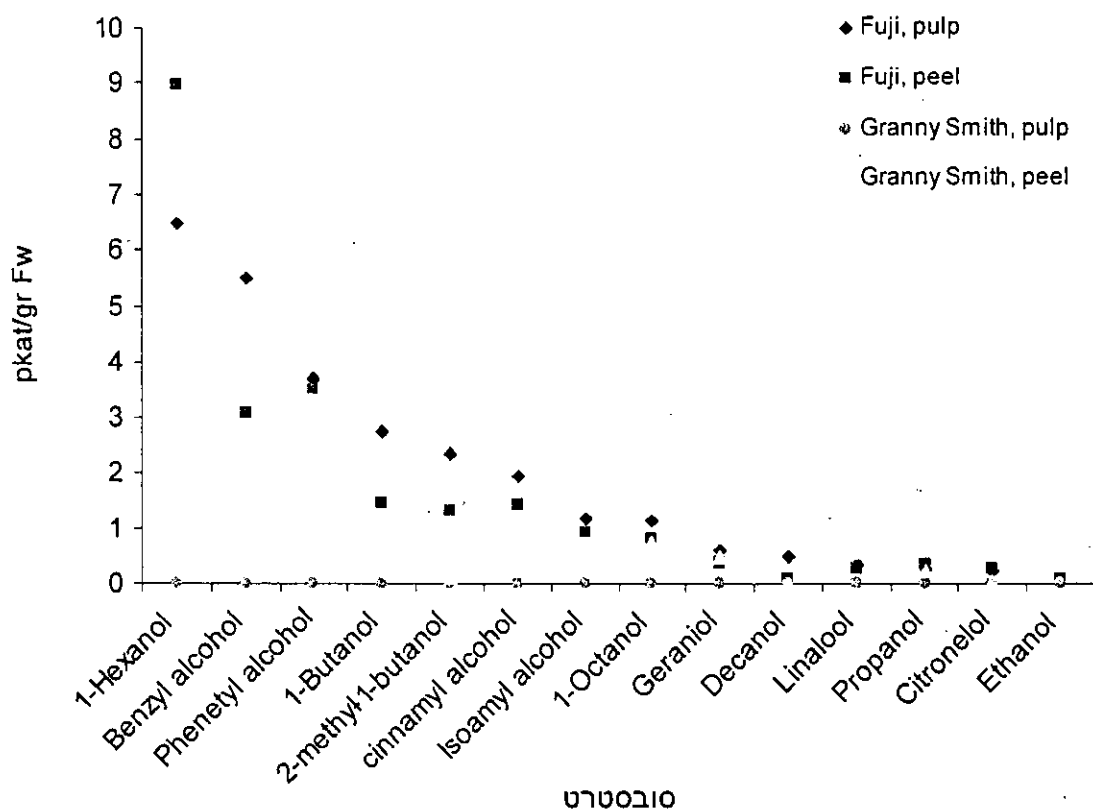


### Hexanol and Hexyl acetate



10. כדי לאפיין את פעילות ה-AAT שמקורו בציפה ובקליפה של זני תפוח 'פוג'י' ו'גרני סמיט' נעשתה בדיקת פעילות של ה-AAT על שורה של סובסטרטים כהליים מקבוצות כימיות שונות (תרשים 10). הבדיקה נעשתה על תפוחים בשלים מאל-רום בשנת 2003, בשיטה רדיואקטיבית עם  $H^3$ -Acetyl-CoA. מתוצאות בדיקה זו עולה שאנזימים שונים בעלי אפיניות שונה לסובסטרטים שונים נמצאים בקליפה ובציפה של 'פוג'י' וגם של 'גרני סמיט'. התוצאות מראות, שההבדלים בתכולת חומרי הארומה הנדיפים, מקורם בפעילות שונה של האנזים AAT. בעצם ניתן לומר שהסיבה לשונות בין הזנים שנבדקו ובין הקליפה והציפה של אותו התפוח מקורה בשונות בפעילות אנזימית AAT.

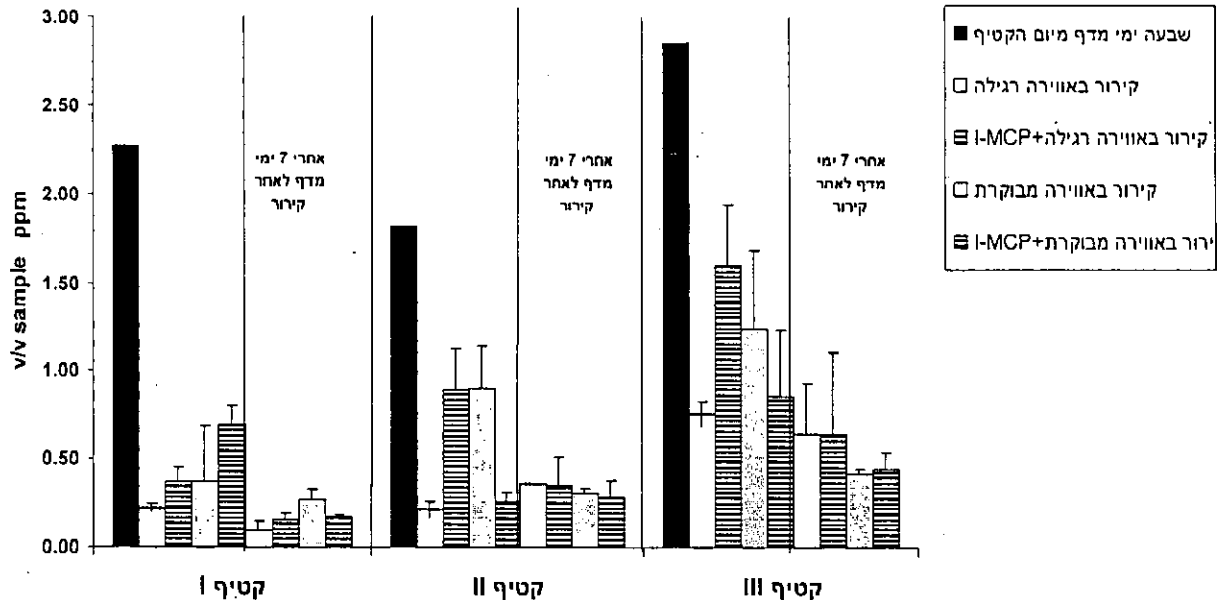
תרשים 10 : פעילות AAT מציפה וקליפה של תפוחים מהזנים 'פוג'י' ו'גרני סמיט' בשלים על סובסטרטים כהליים שונים



11. נבדקה תכולת החומרים הנדיפים בציפת התפוח והשפעת חומרים מעכבי קישור אתילן במהלך האחסון על תכולתם של הנדיפים. נבדקה תכולת נדיפים בתפוחים מהזן 'רויאל גאלה', מניסיון קירור, הנעשה בניהולה של פרופסור רות בן אריה. בניסיון זה נבחנו איכות הפרי של התפוח 'רויאל גאלה' משלושה מועדי קטיף (8/8/01, 12/8/01, 15/8/01): בקטיף, לאחר שבעה ימי מדף, לאחר קירור 0 מ"צ למשך 98 יום ובתנאי אחסון שונים: אוירה רגילה ואוירה מבוקרת ( $1.5\% O_2$  +  $2\% CO_2$ ) בנוכחות וללא מעכבי אתילן (1-MCP). תוצאות הניסוי (תרשים 11) מורות על כך שבפירות 'רויאל גאלה' טיפול ב-1-MCP מעכב ירידה בתכולת הנדיפים בהשוואה לפירות לא מטופלים ויעילותו מבחינה זו דומה לטיפול באוירה מבוקרת. יש לציין שהתוצאות הן של שנת אחסון אחת בלבד.

### תרשים 11: תכולת נדיפים בציפת תפוח מזן 'רויאל גאלה' בשלושה מועדי קטיף

#### ובארבעה טיפולי אחסון בקירור



#### מסקנות והשלכות על המשך ביצוע המחקר

1. בדיקה כמותית השוואתית של תכולת חומרי ארומה המאפיינים תפוח (בעיקר אצטטים) מראה שהזן 'פוג'י' (שהוא הארומטי ביותר) מכיל כמות גדולה ביותר של חומרי ארומה ואחריו הזן 'סמוטי'. בזן 'גרני סמיט' יש יחסית מעט מאוד חומרי ארומה, והוא אכן ארומטי פחות.
2. בזן 'גרני סמיט' יש מעט מאוד אצטטים. בציפת זן זה מצטברים אלדהידים וכוהלים, שהם סובסטרטים לקבלת אצטטים באמצעות האנזים AAT. עובדה זו מצביעה על כך שבציפה של הזן 'גרני סמיט' פעילות האנזים AAT נמוכה ביותר. בקליפה של 'גרני סמיט' יש יכולת לסנטז אצטטים בכמות נמוכה. ממצאים אלה נתמכים ע"י תוצאות בדיקה של פעילות האנזים בציפה ובקליפה של תפוחי 'גרני סמיט'.
3. תנאי הגידול משפיעים על תכולת חומרי ארומה בתפוח. תכולת הנדיפים של תפוחים במטעי אל-רום גבוהה בהרבה מזו שנמדדה בתפוחים הגדלים בנוה יער.
4. הצטברות של אצטטים מתרחשת החל מחודש אוגוסט ונמשכת גם לאחר הקטיף המסחרי. רמות גבוהות של אצטטים נצפות כבר בתקופת הקטיף המסחרי.
5. בזן 'רויאל גאלה' ניתן לעכב את ירידת התכולה של חומרי הארומה ע"י שימוש ב-I-MCP. טיפול בחומר זה במהלך האחסון באווירה רגילה יעיל כמו טיפול באווירה מבוקרת.

6. כל הנתונים שנאספו מראים שהביוכימיה של סינטזת האצטטים שונה בין תפוחי 'גרני סמיט' לתפוחי 'פוג'י'. כמו כן באותו התפוח הביוכימיה של יצירת אצטטים בקליפה שונה מזו הפועלת בציפה. מקור ההבדלים בפעילות שונה של האנזים AAT ולא באי זמינות של הסובסטרט.
7. העדר אצטטים בציפה בוגרת של תפוחי 'גרני סמיט', הנתמכת ברמת פעילות מזערית של AAT, מרמזת שפעילות נמוכה של אנזים זה בציפה של 'גרני סמיט' היא האחראית לארומה הנמוכה בתפוח זה. לאור נתונים אלה אנו מציעים שלאנזימי AAT בתפוח יש כנראה מספר צורות שונות, המקודדות ע"י גנים נפרדים, ובאות לידי ביטוי בשונות הקיימת בספציפיות לסובסטרט, בתזמון של הפעילות ובספציפיות לרקמה.
8. בהוספת כהל או אצטט לאווירה בה נמצאים תפוחים בשלים מהזנים 'פוג'י' ו'גרני סמיט' חדרו החומרים לתפוח והשפיעו על תכולת הנדיפים וטעמם של תפוחים אלה. כלומר ניתן לשנות באופן דרמטי את הרכב חומרי הארומה בתפוח ע"י הוספה מזערית של חומרי ארומה מלאכותיים באופן חיצוני.

השלכות על המשך ביצוע המחקר:

1. א. יש היום בידינו אפשרות אוביקטיבית לזהות מרכיבי איכות של טעם התפוח באמצעות מדידה של תכולת נדיפים בטכניקת Auto-SPME-GC-MS.
- ב. יש אפשרות לבדיקת הנקיון האופטי של מרכיבי התפוח הכירליים בעזרת Auto-SPME-Chiral-GC-MS.
2. נקבע אופטימום להצטברות מרכיבי איכות טעם בתפוח ואנו יודעים מהו הזמן שבו תכולתם היא אופטימלית. יכולות אלה מאפשרות לנו להשוות את הכמות של חומרים נדיפים באופן מדויק בין זנים שונים ובין רקמות שונות של הפרי.
3. יש צורך לבצע ניסוי אחסון של פירות תפוח בתנאים שונים ולבחון כיצד מושפעת תכולת חומרי הארומה מתנאי האחסון השונים.
4. יש פוטנציאל לשפר את הטעם של תפוחי-גרני-סמיט ע"י הוספת אצטטים ממקור חיצוני במהלך האחסון. אנו מתכננים ניסוי מסוג זה בעונת הפרי הקרובה.
5. יש ככל הנראה בקרה שונה של יצירת אצטטים בקליפה ובציפה ובין זנים שונים של תפוח. כלומר, קרוב לודאי שבתפוח נמצא יותר מגן אחד המקודד לאנזימי ה-AAT והם מבקרים את יצירת האצטטים באופן שונה.

#### רשימת פרסומים

- לוינסון א. (2001) הטעם והארומה של הפרי – מנין ולאן? עלון הנוטע, 55(8): 359-356.
- Holland D., Lewinsohn E., Ravid U., Bar-Yaakov I., Laryov O. and Bar E. (2003). Different aroma producing acetyl transferases are present among apple varieties and among fruit pulp and peel (in prep.).

תודה מיוחדת לצוות המטע באל-רום ובמיוחד לדיויד הרמן על נכונותם לתת לנו פרי לצורך  
הבדיקות שנערכו בניסוי זה.  
תודה לאלון זקס על העזרה הטכנית במחקר זה.

# סיכום דו"ח לשנים 2001-03: זיהוי ופיתוח טעמים בזני תפוח

מספר הנושא: 03-0448-204

החוקרים: דורון הולנד, רפאל אסף, אפרים לוינסון, עוזי רביד, עירית בר-יעקב, רות בן-אריה, אולגה לרקוב, ליליה פריימן, עינת בר

## 1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

לזהות בתפוח חומרים נדיפים המהווים חומרי טעם וריח בעלי חשיבות לאיכותו, לבחון הבדלים בחומרים אלה בין זנים עתירי וחסרי ארומה, לבחון האם מקור ההבדלים באנזים אצטיל קו A-אצטיל-טרנספראז (AAT), לקבוע את הספציפיות של AAT לסובסטרטים כהללים והאם יש הבדל בין הזנים, לבחון את תכולת הנדיפים במהלך ההבשלה של התפוח.

## 2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.

בדיקת תכולת חומרי ארומה בזנים 'פוגי', 'גרני סמיט' ו'סמוטי'. יש פרופיל של אצטטים, כוהלים ואלדהידים בציפת ובקליפת התפוח. בזן 'גרני סמיט' אין כמעט אצטטים בציפה ויש מעט בקליפה. 2. השוואה בין תפוחים מאל-רום ומנווה יער. תכולת חומרי הארומה גבוהה יותר באל-רום. 3. בדיקת פעילות AAT והתפתחות חומרי ארומה במהלך ההבשלה. פעילות וחומרים נדיפים קיימים מתחילת ההתפתחות, הצטברות אצטטים ב'גרני סמיט' וב'פוגי' מתחילה כבר בראשית ספטמבר. נמצא שהביוכימיה של יצירת אצטטים בקליפה שונה מזו שבציפה. 4. בהוספת כהל או אצטט לאווירה בה נמצאים תפוחים בשלים מהזנים 'פוגי' ו'גרני סמיט' חדרו החומרים לתפוח והשפיעו על תכולת הנדיפים וטעמים של תפוחים אלה.

## 3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

יש כיום ביכולתנו לאפיין איכותית וכמותית את הרכב ותכולת הארומות בזני תפוח. אנו יודעים שתכולת חומרי הארומה קשורה בפעילות האנזים AAT. העדר פעילות של אנזים זה משמעותה כנראה העדר החומרים הנדיפים, החשובים בארומת התפוח. יש בידינו קריטריונים לקביעת האופטימום של הקטיפ מבהינת הארומות וכיצד זה מושפע בתנאי איחסון. יש בידינו יכולת לשפר טעם באמצעות מניפולציה של AAT או באמצעות הוספה מלאכותית של מרכיבי ארומה מסוימים לאווירה בה מאוחסן התפוח. אנו יודעים היום באיזה שלב במהלך ההבשלה מצטברים האצטטים ועל כך שיש הבדל בין הקליפה והציפה.

## 4. הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.

שיפור הטעם באמצעות הוספת ארומות במהלך האחסון. יש מקום לבצע ניסויים בהיקף חצי מסחרי בתחום זה. מעקב אחר תכולת חומרי הארומה לאחר אחסון בקירור. פעילות אנזים אצטיל קו A-אצטיל-טרנספראז במהלך ההבשלה. ברור לנו היום ששינוי פעילות AAT יביא לשינוי ארומה. זוהי תשתית טובה מאד לבידוד הגנים של AAT וביטויים בתפוחי 'גרני סמיט'.

## 5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט.

בצורה מצומצמת בדיווח ראשוני בישיבה במו"פ צפון. מאמר בנושא זה נמצא כעת בכתובה לעיתונות בינלאומית.

## 6. פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:

\* רק בספריות \* ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) \* חסוי - לא לפרסום.