

נושא: ביוכימיה של יצירת לינלול ואאוגנול בריחן מתוק

חוקר ראשי: דר' אפרים לוינסון מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

חוקרים שותפים: 3

תקופת מחקר: 1997-1999

מאמרים: 1

תקציר

בזיל מתוק הוא גידול חשוב בארץ כתבלין טרי ויבש המיועד ליצוא המגיע כיום לערכים של כ \$10,000,000 לשנה. במסגרת תוכנית זו התחלנו לאפיין את המערכות הביוכימיות האחראיות ליצירתם של החומרים הכימיים העיקריים הקובעים את הארומה ואת האיכות של הבזיל: לינלול, אסטרגול, אאוגנול ומתיל אאוגנול. חומרים אלו מהווים את המרכיבים העיקריים בשמן האתרי ומכאן את ערכו של הבזיל כתבלין.

מטרת המחקר: הבנת הביוכימיה הקשורה לביוסינתזה של חומרים אלו, תקל על זיהויים ובידודם של הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים בביוסינתזה האאוגנול והלינלול בבזיל.

מהלך העבודה והתוצאות: במסגרת תוכנית זו אפינו את המערכות הביוכימיות האחראיות ליצירת אסטרגול ומתיל אאוגנול. תחילה היה עלינו לפתח שיטה ביוכימית שתאפשר לנו גילוי וזיהוי אנזים מפתח בביוסינתזה של מתיל כביקול. הבדיקה היא פשוטה ומתבססת על מעקב של קבוצה מתילית רדיואקטיבית. האנזים מעביר קבוצת מתיל מהפרקורסור

SAM (S-adenosyl-methionine) לכביקול, ליצירת מתיל כביקול. בשלב שני, אפינו אנזים ייחודי זה, שזוהה עד כה רק בבזיל מתוק ולא נמצא באף מקור ביולוגי אחר. בדקנו את השפעתם על הפעילות האנזימטית של פרמטרים כגון pH, טמפרטורה, תלות בקופקטורים, ועוד. מצאנו גם שהאנזים פעיל בעיקר בעלים צעירים. עצם קיומו של אנזים זה מחזק את היפותזה העבודה בנוגע למסלול הביוכימי לייצור מתיל-כביקול בבזיל ומצביע על כך שיצירת השמן האתרי מתבצע רק בשלבים מסוימים בהתפתחות הצמח. בנוסף מצאנו שטיפוסים שונים של בזיל מתוק, השונים בהרכבם הכימי, בעלי אנזימים ייחודיים, המבדילים זן אחד מהשני. המצאות או אי המצאות של אנזימי מתילטרנספראז, והספציפיות כלפי הסובסטרט המקבל את קבוצת המתיל יכולים להסביר ברמה הביוכימית את ההבדלים בהרכבם הכימי של הזנים השונים.

ב. תקציר:

בזיל מתוק הוא גידול חשוב בארץ כתבלין טרי ויבש המיועד ליצוא המגיע כיום לערכים של כ \$10,000,000 לשנה. במסגרת תוכנית זו התחלנו לאפיין את המערכות הביוכימיות האחראיות ליצירתם של החומרים הכימיים העיקריים הקובעים את הארומה ואת האיכות של הבזיל: לינולול, אסטרגול, אאוגנול ומתיל אאוגנול. חומרים אלו מהווים את המרכיבים העיקריים בשמן האתרי ומכאן את ערכו של הבזיל כתבלין. הבנת הביוכימיה הקשורה לביוסינתזה של חומרים אלו, תקל על זיהויים ובידודם של הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים בביוסינתזה האאוגנול והלינולול בבזיל. במסגרת תוכנית זו איפיינו את המערכות הביוכימיות האחראיות ליצירת אסטרגול ומתיל אאוגנול. תחילה היה עלינו לפתח שיטה ביוכימית שתאפשר לנו גילוי וזיהוי אנזים מפתח בביוסינתזה של מתיל כביקול. הבדיקה היא פשוטה ומתבססת על מעקב של קבוצה מתילית רדיואקטיבית. האנזים מעביר קבוצת מתיל מהפרקורסור SAM (*S*-adenosyl-methionine) לכביקול, ליצירת מתיל כביקול. בשלב שני, איפיינו אנזים ייחודי זה, שזוהה עד כה רק בבזיל מתוק ולא נמצא באף מקור ביולוגי אחר. בדקנו את השפעתם על הפעילות האנזימית של פרמטרים כגון pH, טמפרטורה, תלות בקופקטורים, ועוד. מצאנו גם שהאנזים פעיל בעיקר בעלים צעירים. עצם קיומו של אנזים זה מחזק את היפותזת העבודה בנוגע למסלול הביוכימי לייצור מתיל-כביקול בבזיל ומצביע על כך שיצירת השמן האתרי מתבצע רק בשלבים מסוימים בהתפתחות הצמח. בנוסף מצאנו שטיפוסים שונים של בזיל מתוק, השונים בהרכבם הכימי, בעלי אנזימים ייחודיים, המבדילים זן אחד מהשני. המצאות או אי המצאות של אנזימי מתילטרנספראז, והספציפיות כלפי הסובסטרט המקבל את קבוצת המתיל יכולים להסביר ברמה הביוכימית את ההבדלים בהרכבם הכימי של הזנים השונים. ולבסוף, הידע שצברנו בהבנת התהליכים הפיזיולוגיים והביוכימיים הקשורים לביוסינתזה של חומרים אלו, יקלו על בידוד הגנים (שקובעים את הימצאותם של חומרים אלו בזני בזיל, וקובעים את איכותו).

ג. מבוא:

בזיל מתוק (*Ocimum basilicum* L.) הוא גידול חשוב בארץ כתבלין טרי ויבש המיועד ליצוא המגיע כיום לערכים של כ \$10,000,000 לשנה. כיום הגידול מתרכז בשני זנים. אחד מהם טופח בנוה-יער, מקורו אמריקאי, ערכו כתבלין מצוין, אך בתנאי גידול בישראל מתקבלים עלים גדולים מידי ויש קשיים מסוימים בשווקו בחו"ל. הוא גם רגיש למחלות קרקע. הזן השני, המכונה "שווצרי", בעל תכונות מורפולוגיות וחיי מדף מעולים אך הרכבו הכימי של השמן האתרי שונה מהזן האמריקני. יש מקום לשיפור הרכבו הכימי של זן זה כדי להתאימו לדרישות השוק הקולינרי. בנוסף לכך, קיים טיפוס נוסף (אכזוטי) בעל הרכב כימי מיוחד במינו שמיועד להפקת שמן אתרי ובעל פוטנציאל שווקי רב. לכן, יש לאפיין את המערכות הביוכימיות האחראיות ליצירתם של החומרים הכימיים העיקריים הקובעים את הארומה של הבזיל: *linalol*, *eugenol*-*i*, *methyl-chavicol* (*estragole*) חומרים אלו מהווים את המרכיבים העיקריים בשמן האתרי, ומכאן השפעתם על איכותו של הבזיל כתבלין. הבנת הביוכימיה הקשורה לביוסינתזה של חומרים אלו, תקל על זיהויים ובידודם של הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים בביוסינתזה האאוגנול והלינולול בבזיל. מעט מאד ידוע על הפיזיולוגיה של יצירת חומרים אלו במיני בזיל. הידע שהפקנו ונפיק מעבודה זו נחוץ להבנת הגורמים המשפיעים על הווצרותם של חומרים אלו. ידע זה יתרום לתהליכי טיפוח לקבלת זני איכות בבזיל ליצוא, וזאת ע"י שיפור הארומה, תוך כדי העלאת התכולה ושינוי בהרכב של השמן האתרי בשיטות ביוטכנולוגיות.

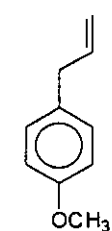
מטרות המחקר

הצבנו לעצמנו ללמוד את התהליכים הביוכימיים שמובילים לביוסינתזה של לינלול, מתיל-כביקול ואאוגנול בבזיל מתוק, ואת אופן בקרתם של המסלולים הביוכימיים הללו. יש עניין רב לשלוט תוך כדי טיפוח על כמות והרכב של תרכובות הטעם והריח. ניתן לעשות זאת בעזרת הבנת הפיזיולוגיה של יצירת השמן האתרי, וגם בשיטות גנטיות (הן בשיטות קונבנציונליות, והן ע"י הנדסה גנטית (Lewinsohn 1996)). בעבר התרכזנו בעיקר בלימוד התנאים האגרוטכניים האופטימאליים לגידול הבזיל בתנאי חקלאות אינטנסיביים (פוטבסקי 1978, בטלהיים 1993, פליישר 1980, Putievsky and Sanderovich 1983, Putievsky and Basker 1977, Putievsky 1993, Putievsky 1983) וגם למדנו מעט על הפיזיולוגיה של יצירת המרכיבים העיקריים של השמן האתרי בבזיל מתוק (Werker et al, 1993). עבודתנו בשנים האחרונות התבססה על מציאת טיפוסים גנטיים חדשים היכולים לשמש כמקור לזנים חדשים, ואיפיון המרכיבים הכימיים של השמן האתרי (Grayer et al, 1996, Paton and Putievsky 1996). העבודה הנוכחית קידמה אותנו לממד חשוב נוסף: הבנת הביוכימיה הקשורה בייצור מרכיבי השמן האתרי. הבנה זו מלמדת על אופן בקרת הייצור של חומרים אלו בריקמות הצמח ומקנה את התשתית להפעלת שיטות ביוטכנולוגיות מודרניות, שיאפשרו שינוי קיצוני בהרכב השמן האתרי בלי לפגוע בתכונות אגרונומיות אחרות של הזנים (Lewinsohn 1996). בידוד הגנים האחראים לתהליכים הביוכימיים הרצויים ושליטתם בעזרת שיטות ביוטכנולוגיות תביא ליצירת זנים בלעדיים בעלי איכות מעולה וזנים עתירי יבול ותאפשר לחקלאות ישראל להמשיך להוביל בנושא איכות זנים בבזיל.

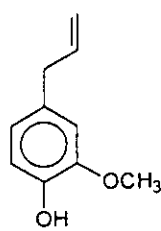
בזיל מתוק ומרכיביו

בזיל מתוק (*Ocimum basilicum* L.), משפחת השפתניים (Lamiaceae) הוא צמח חשוב ביותר לענף התבלינים בישראל. הסוג *Ocimum* מכיל בתוכו כ-150 מינים של צמחים עשבוניים ושיחים שמקורם באזורים הטרופיים של אסיה, אפריקה, מרכז ודרום אמריקה (Simon et al., 1990). בוטנית, לבזיל גבעול מרובע, עלים ריחניים ונגדיים ופרחים קטנים מסודרים בתפרחת, בדומה לשאר הצמחים המשתייכים למשפחה זו. לבזיל שימושים רבים במטבח המערבי וההודי. הוא מתאים מאוד למאכלים המכילים שום, עגבניות, חצילים, ובמיוחד מקובל במטבח האיטלקי. עקב גידול דרמטי בדרישה לבזיל טרי ויבש, עבר הבזיל מגידול בגינות לגידול בתנאי חקלאות מודרנית בעיקר בארה"ב, ישראל, הודו, ואירופה. לישראל יתרון אקלימי על אירופה בגידול זה, במיוחד בחודשי החורף. יתרון שמקנה לחקלאי ישראל יכולת תחרותית טובה. במשך שמונת השנים האחרונות, פיתחנו בונה-יער זני בזיל ייחודיים המהווים היום את הבסיס ליצוא הגדל לאירופה.

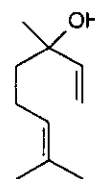
המרכיבים העיקריים של השמן האתרי של בזיל הם לינלול, אאוגנול ומתיל-כביקול, הידוע גם כאסטרגול. (ראה איור 1).



Methyl-chavicol
(Estragole)



Eugenol



Linalool

איור 1. המרכיבים העיקריים בשמן האתרי של בזיל מתוק (*Ocimum basilicum*).

לינלול הוא בעל ריח מרענן, קליל שהוגדר לא פעם כריח מתוק, המזכיר רענונות או פרי-הדר. לינלול משמש להכנה של דברי מזון רבים כגון דברי חלב, סוכריות, משקאות ואפילו דברי מאפה (Burdock 1995). בזיל יכול לספק את הביקוש ההולך וגדל של לינלול טבעי. רוב הלינלול שבשימוש תעשייתי הוא סינתטי, המיוצר משרף של עצי מחט (Dawson 1994), כמוצר לוואי בתהליך ייצור וויטמין E, דבר שהביא לבעיות אספקה של לינלול כשייצור הויטמינים קטן (Clark, 1988).

אאוגנול, הוא אליל-פנול בעל טעם חזק המזכיר ציפורן. אאוגנול הוא אכן מרכיב חשוב בשמנים אתרים מצמחים טרופים כגון קינמון וציפורן. קיים בעולם ביקוש המוערך בלמעלה ממאה מיליוני דולרים לאאוגנול, אשר משמש חומר גלם לתעשיית הבשמים ומשמש גם כחומר מוצא ליצור ונילן, חומר הנותן לוניל את טעמו הייחודי ובשימוש רחב ביותר בתעשיית המזון. אאוגנול אף הוא חומר אנלגטי בשימוש ברפואת שיניים וברפואה וטרינרית. זני בזיל שפיתחנו עד כה מכילים עד 40% אאוגנול. וכך, ביטוי יתר של המסלול הביוסנתתי ליצור אאוגנול יכול להגביר את רמת האאוגנול ולספק את הביקוש ההולך וגדל של אאוגנול. לעומת זאת בזנים אמריקאים של בזיל למאכל ישנה דרישה להפחתת רמת האאוגנול ככל האפשר. שליטה במסלול הביוסנתתי של האאוגנול תביא להתאמת זנים על פי דרישה.

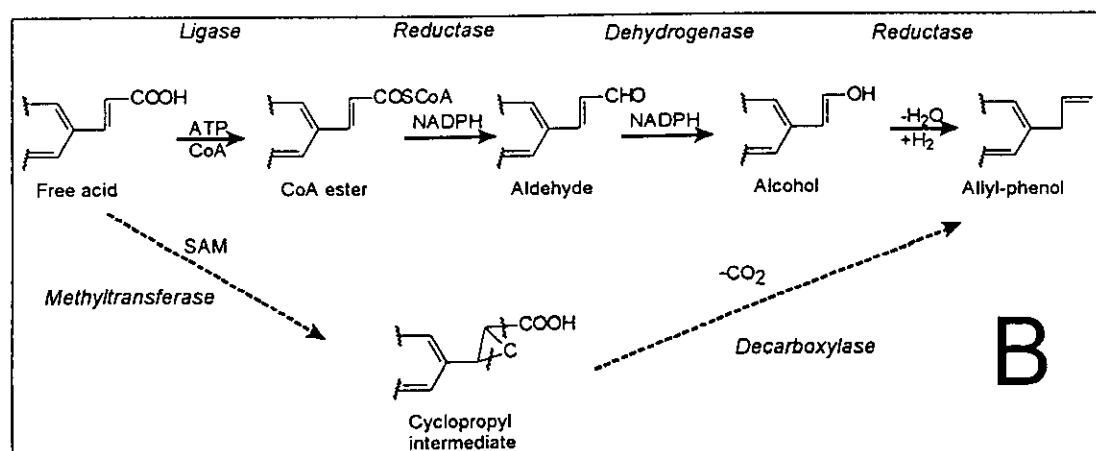
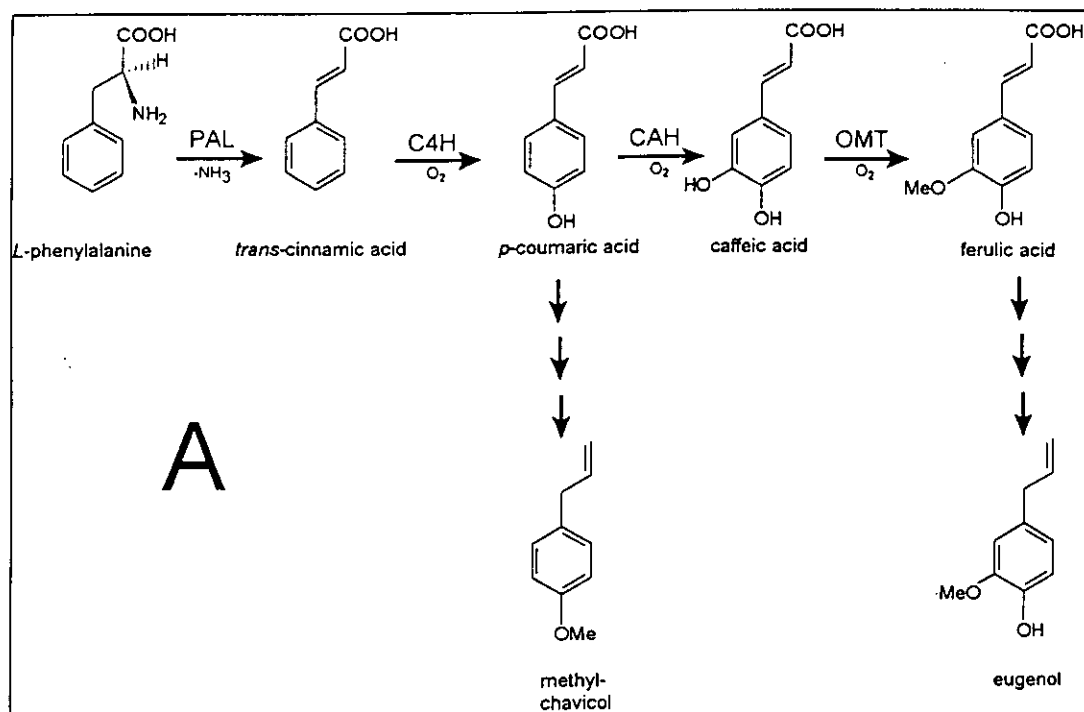
מתיל-כביקול (אסטרגול, איור 1) בדומה לאאוגנול, הוא אליל-פנול, אך בעל ריח הרבה פחות חזק ממנו. ריח המתיל-כביקול מזכיר טריות ועשביה, ומזכיר את ריחו של אניס והשומר. מתיל-כביקול הוא מרכיב חשוב בלענה דרקונית (*tarragon, Artemisia dracuncululus*). בזיל מתוק בעל יבולים גבוהים, ואילו הטררגון הוא צמח שמקורו בצפון אירופה, גידולו איטי ובעייתי בתנאי ישראל, הוא אינו מייצר זרעים, ויבוליו נמוכים יחסית.

בהתייחס להרכבם הכימי, ניתן להבחין בכמה קבוצות כמוטיפיות של בזיל, אשר תכולת השמן האתרי מורכב מיחסים שונים של לינלול, מתיל-כביקול, אאוגנול, מתיל אאוגנול, מתיל - צינמט או ציטראל. בנוסף, ישנם טיפוסים כימיים של בזיל המכילים תימול, קמפור ואלמנים, אך הם פחות נפוצים. הטיפוסים החשובים ביותר מבחינה כלכלית הם הטיפוס השווצרי - המכיל לינלול (~40%) ואאוגנול (~30%) והטיפוס האמריקאי, המכיל לינלול (45-55%) ו- מתיל-כביקול (20-30%) ועוד חומרים אחרים בריכוזים של פחות מ-10%. בנוסף, הבזיל האכזוטי מכיל ריכוז גבוה מאד (>70%) מתיל-כביקול ומעט לינלול, ומשמש לתעשיית השמן האתרי. מכאן אנו למדים, שהפוטנציאל הביוכימי של בזיל מתוק הוא בלתי נדלה, ושליטה במסלולים ביוסינתטיים אלה תביא לקבלת זנים ייחודיים, שגידולם בישראל יביא רווחים נאים לחקלאים. מקובל לחשוב שיצירה ואגירה של שמן אתרי בצמחים רבים קשורה בהופעה של איברים מיוחדים בצמח כגון בלוטות, ביבי שרף וכד' (Fahn, 1979) אשר מבודדים את השמנים האתרים משאר רקמות הצמח ומונעות הרעלה עצמית של הצמחים שמייצרים את השמנים. בבזיל מתוק, בדומה למינים אחרים ממשפחת השפתניים, בלוטות רבות

מכסות בעיקר את צדו התחתון של העלה והגבעול. בלוטות זעירות אלו בנויות מכמה תאים בלבד, אוגרות את שמן האתרי (Werker et al. 1993), אך אין כיום הוכחות ישירות שהשמן האתרי של הבזיל אכן מיוצר בבלוטות הללו. בניסויים מוקדמים הראנו שיצירת השמן האתרי בבזיל הוא פונקציה של גודל וגיל העלה. עלים צעירים מכילים כמות רבה (ב % של שמן אתרי, והכמות היחסית ב- % יורדת עם התפתחות העלה (Werker et al. 1993). בכל זאת העלה ממשיך ליצר ולאגור שמן אתרי משך התפתחותו. תכולת השמן האתרי פוחתת עם הזדקנות העלים, אך איכותו משתפרת (עקב עליה ב % המתיל-כביקול) (בטלהיים וחובי 1993). בתפרחות תכולת השמן האתרי מרובה מזו של העלים. במסגרת פרוייקט זה, התחלנו לאפיין את הפרמטרים הפיזיולוגיים המשפיעים על הרמה וההרכב של השמן האתרי בבזיל מתוק.

ביוסינתזה של אליל-פנולים: אאוגנול ומתיל-כביקול (אסטרגול)

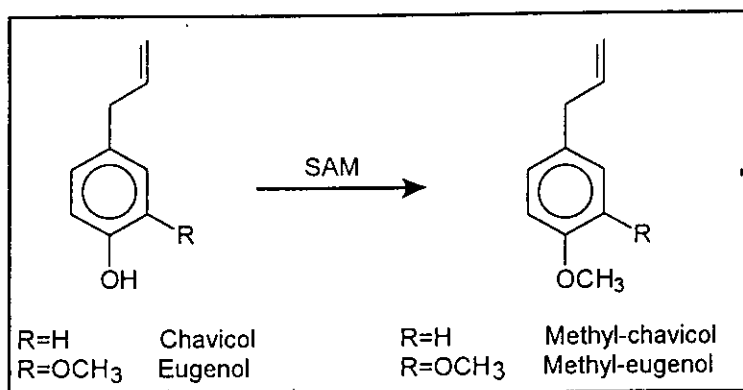
שני חומרים חשובים המקנים את התכונות הייחודיות לבזיל הם אאוגנול ומתיל-כביקול (אסטרגול). חומרים אלו הנם אליל-פנולים (ראה איור 1). אליל-פנולים משתייכים לקבוצת הפניל-פרופנאידים, הכוללת בתוכה מטבוליטים משניים רבים וחשובים לתפקוד הצמח כגון פיגמנטים (אנטוציאנינים ופלבונים), וכן חומרים פיטואלקסינים (איזו-פלבונים), המשמשים כחומרי בניה לדפנות תאים והגנה פיזית כגון ליגנין, ועוד. מניסיונות שנעשו ע"י איטלקים בשנות השבעים התגלה שפנילאלנין - חומצה אמינית ארומטית - משמשת פרקורסור לאליל-פנולים בבזיל (Manitto et al 1974, Manitto et al 1975). הוכחה נוספת לקיומו של מסלול ביוסינתטי זה בזני בזיל הינו האבחון, בידוד ואיפיון האנזים שמזרז את הדאמינציה של פנילאלנין לקבלת חומצה צינמית (PAL) Phenylalanine ammonia-lyase מעלי בזיל מתוק שדווח עליו לאחרונה (Hao et al, 1996). עבודות אחרות הראו שבקינמון, צמח טרופי המכיל כמויות גדולות של אאוגנול בעליו, ישנה אינקורפורציה של סימון רדיואקטיבי מפניל-אלנין אל תוך אאוגנול (Senanayake et al 1977). למרות שידוע כי בצמחים שונים פניל-אלנין משמש חומר מוצא לאליל-פנולים, אין היום קונצנזוס על אופן הביצוע של השלבים המאוחרים יותר בביוסינתזה של אאוגנול ואליל-פנולים אחרים הן בבזיל או בצמחים אחרים. מתברר שבקינמון ישנה גם אינקורפורציה של סימון רדיואקטיבי ממתינן אל תוך אאוגנול (Senanayake et al 1977). מתינן משמש פרקורסור ל-S-adenosine methionine (SAM) הידוע כתורם קבוצות מתיליות בתהליכי מתיל אסטרפיקציה שונים. SAM משמש גם פרקורסור ל-ACC חומר ביניים חשוב בסינתזת ההורמון הצמחי אתילן. העבודות של האיטלקים (Manitto et al 1975, Manitto et al, 1974) הראו שפחמן מס' 1 מפנילאלנין עובר שיחלוף ואינו נקלט במולקולת האאוגנול. לעומת זאת, (Klischies et al 1975) הראו ששחלוף כזה אינו קיים והניחו שאאוגנול נוצר ע"י חיזור של Coniferyl alcohol, שהוא פרקורסור של ליגנין בצמחים עילאיים. ראה איור 2.



איור 2. A. ביוסינתזה מוצעת של האליל-פנולים בבזיל מתוק. פנילאלינין עובר דאמינציה לחומצה צינמית ע"י Phenylalanine ammonia-lyase (PAL). אנוים זה בודד ואופיין לאחרונה (Hao et al 1996). ולאחר תגובת הדרוקסילציה מתקבלת חומצה קומרית, המשמשת חומר מוצא למתיל-כביקול. חומצה קומרית עוברת הדרוקסילציה נוספת ומתיל-אסטרפיקציה לקבלת חומצה פרולית, חומר מוצא לאאוגנול. B. הפיכתם של החומצות הצינמיות המותמרות לאליל-פנולים לא ברור בוודאות אם המסלול הוא דרך חיזור החומצה לקבלת אלדהיד וכהל (מסלול הלינגין, קווים שלמים ל Klischies et al 1975), או האם ישנו תהליך של מתילציה ודקרבוקסילציה תוך כדי שחלוף פחמן מס 1 (קווים מקווקווים) (Manitto et al 1975, Manitto et al, 1974).

מסלול מקביל לפרופניל-פנולים קיים כנראה בצמחי אניס (*Pimpinella anisum*) ליצירת טראנס-אנתול (*anethole*), איזומר פרופנילי למתיל-כביקול, המקנה את טעמו המיוחד של האניס ואת זה של השומר. חומר המוצא במקרה זה הוא חומצה קומרית ההופך לאנול (anol) ברקמות צמחי האניס. מתילטרנספראז ספציפי זוהה לאחרונה ההופך את אנול לאנתול (Kemmerer and Reichling, 1996).

בבזיל מתוק לא זוהו אנזימים כאלה לפני תחילת עבודתו. עבודות גנטיות מראות שתכונת ה-*para* מתילציה באליל-פנולים בבזיל נשלטת כנראה על ידי גן דומיננטי אחד (Gupta 1994). גן זה כנראה מקודד לאנזים מתיל טרנספראז המקבל אאוגנול או כביקול כסובסטרט היכולים לעבור מתיל-אסטרפיקציה בעמדת *para* לשחרור מתיל אאוגנול ומתיל-כביקול בהתאם (איור 4). במסגרת עבודה זו פיתחנו שיטה פשוטה יחסית למדידת הפעילות האנזימתית. הוכחנו את קיומם של האנזימים המבצעים את הפעולה הזאת ולמדנו על הבקרה הביוכימית ופיזיולוגית של תהליך ייצור מתיל כביקול ומתיל אאוגנול בזנים שונים של בזיל מתוק. ידיעת אופן יצירת אליל-פנולים בבזיל תביא ליכולת להשפיע על רמת יצירתם של חומרים אלה בעזרת שיטות ביוטכנולוגיות. תוך שימוש הנדסה גנטית, נוכל בעתיד לקבל זנים בעלי רמה גבוהה או נמוכה של אאוגנול או מתיל-כביקול לפי דרישות השוק, מבלי לשנות תכונות אנטומיות ואגרוטכניות אחרות כגון גודל צבע עלים, צורה ואופי הצמח, עמידות למחלות, וכו' (Lewinsohn, 1996).



איור 3: הפיכתו האנזימתית של כביקול למתיל כביקול (אסטרפיקציה). ההפיכה מתבצעת ע"י מעבר קבוצה מתילית מ-SAM (*S*-adenosyl-methionine) לכביקול. הריאקציה מזוהה ע"י אנזימי מתיל טרנספראז (OMT). עד כה זוהו אנזימי מתילטרנספראז ספציפיים לכביקול רק בבזיל מתוק, ולא בשום אורגניזם אחר.

ד. פירוט הניסויים שבוצעו ותוצאות שהתקבלו

את הפרויקט חילקנו ל 4 חלקים עיקריים:

1. פיתוח שיטה מהימנה לבדיקת פעילות האנזים (מתילטרנספראז, המסוגלת להפוך את כביקול למתיל כביקול ו/או את אאוגנול למתיל אאוגנול).
2. אפיון ביוכימי של האנזים (ים).
3. אפיון הבקרה של אנזים זה תוך התפתחות הצמח.
4. השוואת הפעילות האנזימתית בין זנים שונים של בזיל.

1. פיתוח שיטה מהימנה לבדיקת פעילות האנזים (מתילטרנספראז, המסוגלת להפוך את כביקול למתיל כביקול ו/או את אאוגנול למתיל אאוגנול).

הכנת מיצויים לבדיקות אנזימתיות ובידוד האנזימים הרלבנטיים

מכיון שעד לפני ביצוע עבודה זו לא נבדקו מתילטרנספראזות בבזיל, היה צורך לפתח שיטה חדשה שבה ניתן יהיה לקבל מיצוי אנזימתי אל תאי בעל פעילות של מתילטרנספראז. הניסיונות הראשוניים לבצע מיצוי התבססו על תהליכים דומים שבוצעו על מנת להפיק אנזימים שונים בצמחים אחרים, Bar-Peled et al. 1993.

(Lewinsohn et al. 1991, 1992, Gijzen et al. 1991). ידוע שצמח הבזיל מכיל כמות גדולה של חומרים פנוליים המשתחררים עם הפגיעה בקרומי התאים וגורמים להשחמה ושקיעת חלבונים, לכן השתמשו בתוספות שמגונות בפני השחמה ושקיעת חלבונים.

מיצויים אל-תאיים הופקו ע"י הקפאה מהירה (בחנקן נוזלי) של 1-2 gr של 15 מ"מ (עד 15 מ"מ אורך) וכתישתם עם בופר מיצוי (EB) Extraction Buffer קר (5 נפחים למשקל עלים טרי) בתוספת חול להקלת הכתישה ו-PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) שתפקידו לספוח פנולים הגורמים לשקיעת החלבונים בעת חימצונם. מרכיבים נוספים בבופר המיצוי הם:

MOPS 100mM pH 6.5, Glycerol 10% (v/v), DTT 6.6 mM, PVP- 10 1% (w/v),
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 5mM.

ההמיצויים עוברים פעמיים סירקוז ב-20,000 g, ל-10 דקות ב 4°C . לאחר הסירקוז הנוזל העליון המכיל את הפעילות האנזימתית מכונה מיצוי אל-תאי גס (crude cell-free extract). כדי לסלק מעכבים וסובסטרטים אנדוגניים המיצויים הגסים מועברים דרך קולונות של Sephadex G25. האלוציה מהקולונה מבוצעת בעזרת הזרמת בופר הרצה (RB) Running Buffer שהרכבו: Glycerol, HEPES 50mM pH 7.5, DTT 3.3 mM, ו-5% (v/v).

פיתוח שיטה לבדיקת פעילות מתילטרנספראז

בהתאם להשערות לגבי דרך היווצרותו של מתיל כביקול, ובהתאם לנתוני הספרות המתארים פעילות מתילטרנספראז המערבות S-adenosyl-L-methionine (SAM) וסובסטרטים שונים, לקבלת תוצר מתילציה החלטנו לבצע אינקובציה של מיצוי אל-תאי עם כביקול ו-S-adenosyl-L-methionine (SAM) מסומן רדיואקטיבית ולבדוק היווצרותו של מתיל כביקול רדיואקטיבי (ראה איור 3).

היווצרותו של תוצר רדיואקטיבי מהווה סימן לקיום פעילות אנזימתית של מתילטרנספראז שהרי העברת קבוצת מתיל מסומנת רדיואקטיבית מ-SAM לסובסטרט כביקול ליצירת מתיל כביקול מסומן רדיואקטיבית התבצעה. התוצר ממוצה להקסן, הניתן לבדיקה במונה סינטילציה על מנת לקבוע את רמת הרדיואקטיביות שהיא פרופורציונית לרמת האנזים. בניסויים ראשוניים שבוצעו במיצוי אל תאי גס נוצר תוצר רדיואקטיבי המסיס בהקסן. מיצויים אל-תאיים מורתחים לא הראו פעילות, מה שמצביע על קיום פעילות אנזימתית במיצויי בזיל. מיצויי ההקסן נודפו הורצו בכרומטוגרפית ברובד דק (TLC) ונוכחותם של תוצרים רדיואקטיביים זוהתה בעזרת אוטורדיוגרפיה.

מניעת השחמה במיצוי

כדי למנוע השחמה של המיצוי הוספו לבופר המיצוי ובמיצוי עצמו מספר חומרים הידועים כמונעי ההשחמה וחימצון פנולים. השערותנו הייתה כי השחמה זו נובעת מהפנולים המשתחררים עם הפגיעה בקרומי התאים ומתחמצנים בעת הכנת מיצויים. הניסיונות למניעת השחמה בוצעו כמתואר בטבלה 1. אחד החומרים הבאים הוסף למיצוי, PVPP או XAD הוספו בכמות של כ-0.1 גרם ל-5 מיליליטר מיצוי, הקסן הוסף בכמות של 1 מיליליטר ל-5 מיליליטר מיצוי. לאחר הוספת החומרים המיצויים עברו בדיקה אנזימתית. גילינו שתוספת של PVPP נחוצה מאד הן למניעת השחמה והן לפעילות האנזים (טבלה 1).

טבלה 1: בדיקת חומרים למניעת השחמה ולהגנה על הפעילות האנזימתית במיצויים אל-תאיים של בזיל מתוך

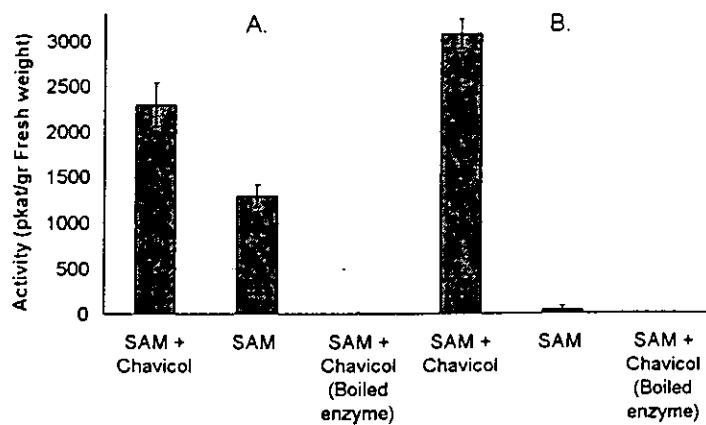
החומר המוסף ^א	רמת השחמה ^ב (+=השחמה)	פעילות ^ג (nkat/FW(gr.))	פעילות לאחר הקפאה והפשרה חוזרת ^ג (nkat/FW(gr.))	% מפעילות התחלתית
מיצוי גס (ללא תוספות)	++++	15	4	27%
Hexane	++++	12	7	60%
XAD	++	7	4	53%
PVPP	-	16	12	75%

^א למיצוי אנזימתי הוספו החומרים המתוארים.
^ב מידת ההשחמה נקבעה על פי הסתכלות בגוון המיצוי.
^ג הפעילות נקבעה על פי ראקציה אנזימתית סטנדרטית.

ניקוי ראשוני של האנזימים בעזרת כרומטוגרפיה דרך קולונות של Sephadex G25

במהלך העבודה נצפתה פעילות מתילטרנספראז למרות שלא הוסף אחד הסובסטרטים לבדיקה האנזימתית (איור 4). על מנת שהבדיקה האנזימתית תהיה מדויקת ובהנחה שקיימים סובסטרטים פנימיים במיצויים האל-תאיים היה צורך לבצע ניקוי ראשוני של המיצוי האנזימתי מסובסטרטים אלו, כך שנקבל פעילות אך ורק לאחר הוספת שני הסובסטרטים. ניקוי ראשוני של המיצוי האנזימתי בוצע באמצעות גיל פילטרציה על ספדקס G-25. באיור 4 מתוארת פעילות כביקול מתילטרנספראז במיצוי הגס, לפני הניקוי על קולונת ספדקס G-25 (A), ואחרי ניקוי על קולונת ספדקס G-25 (B).

אינקובציה של מיצויים אל-תאיים של עלי בזיל עם S-adenosyl-L-methionine (SAM) מסומן רדיואקטיבית וכביקול יוצרת תוצר רדיואקטיבי המסיס בהקסן (איור 4A עמודה שמאלית). הרתחת המיצויים ל-5 דקות ב-100°C הביאה לאובדן הפעילות האנזימתית (איור 4A עמודה ימנית). התוצאות מצביעות על כך שפעילות מתילטרנספראז קיימת והיא אנזימתית. אי הוספה של כביקול מצביעה על יצירה נמוכה יותר אולם עדיין משמעותית של תוצרים רדיואקטיביים (איור 4A עמודה מרכזית). כדי לאשר האם הפעילות שנצפתה כאשר כביקול אקסוגני היה חסר היא תוצאה של מתילציה בסובסטרט אנדוגני, בוצעה כרומטוגרפיה ניקוי חלקי של המיצוי האל-תאי על גבי ספדקס G-25 קודם לביצוע הבדיקה הרדיואקטיבית. בדיקה רדיואקטיבית שלמה המכילה SAM וכביקול תוך שימוש באנזים מנוקה חלקית על גבי ספדקס G-25 הראתה פעילות אנזימתית גבוהה יותר בהשוואה למיצוי הגס, גם כלפי משקל רקמה טרי (איור 4B) וגם על בסיס חלבון (not shown). בנוסף, בבדיקה אנזימתית רדיואקטיבית בנוכחות הסובסטרט SAM בלבד לא התקבלה יצירה של תוצר רדיואקטיבי מסיס בהקסאן (איור 4B עמודה מרכזית).



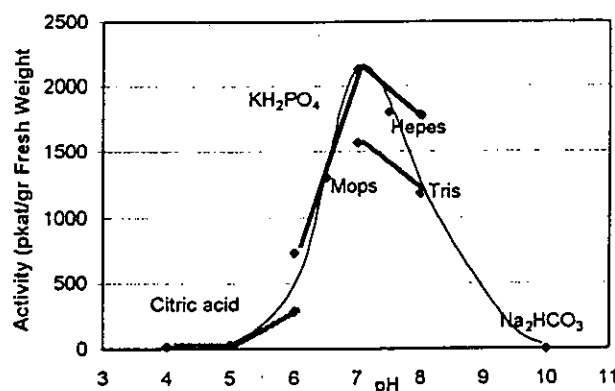
איור 4: פעילות כביקול מתילטרנספראז על מיצויי עלי בזיל מתוך זן R3. שלוש העמודות הראשונות (A) מתארות פעילות כביקול מתילטרנספראז במיצויים אל תאיים. ב-B מתוארת פעילות כביקול מתילטרנספראז כאשר הבדיקה נעשתה על מיצויים שעברו ניקוי ב-Sephadex G-25.

2. אפיון ביוכימי של האנזים

הראנו שהפעילות האנזימטית המעבירה קבוצת מתיל מ-SAM לכביקול ניצפתה לינארית עם הזמן וגם עם כמות החלבון שבבדיקות. כצפוי, הרתחה ב-100 מעלות למשך כמה דקות של המיצויים האל-תאים, גורמת לאובדן הפעילות, כנראה כתוצאה של דנטורציה של האנזים.

קביעת pH אופטימלי.

על מנת לקבוע את טווח ה-pH האופטימלי עבור פעילות כביקול מתילטרנספראז, נבדקה הפעילות ברמות pH שונות, שנוצרו על ידי הבופרים שונים. בדיקה אנזימטית רדיואקטיבית זהה בשאר תנאיה הועמדה במשך שעותיים לאינקובציה ונבדקה פעילות כביקול מתילטרנספראז במערכות השונות, התוצאות שהתקבלו מתוארות באיור 5.



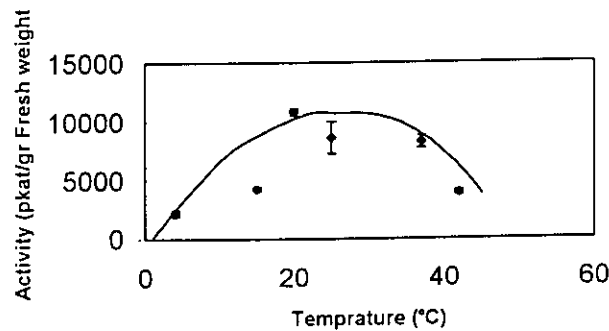
איור 5: השפעת ה-pH ובופרים שונים על פעילות כביקול מתילטרנספראז.

הפעילות האופטימלית התקבלה בטווח שבין pH 7-8. הפעילות האנזימטית מעבר לטווח זה לשני הכוונים יורדת במהירות. הבופר שבבדיקה פחות משמעותי. בתנאי $\text{pH} \geq 10$ ו- $\text{pH} \leq 5$ אין כלל פעילות אנזימטית. מכיוון שהשונות בטווח שבין pH 7-8 לא הייתה משמעותית הוחלט לשמור על ה-pH בזמן בדיקתו ב-pH 7.5

תלות פעילות כביקול מתילטרנספראז בטמפרטורה.

באופן כללי, ככל שהטמפרטורה גבוהה יותר, קצב פעולתו של אנזים יהיה יותר גבוה. יחד עם זאת, טמפרטורות גבוהות מידי יגרמו לתהליכי דנטורציה ואבדן הפעילות האנזימתית. לכן הפעילות האנזימתית תהיה מקסימלית כאשר הטמפרטורה תהיה כזו שתשמור על יציבות האנזים ועדיין תגרום לקצב פעולה מהיר.

השפעת הטמפרטורה על פעילות כביקול מתילטרנספראז נבחנה בטווח הטמפרטורות שבין $5-45^{\circ}\text{C}$. הבדיקות האנזימתיות הרדיואקטיבית בוצעו בתנאים זהים במשך שתיים, בלבד שהועמדו בטמפרטורות השונות. בסוף האינקובציה נבדקה הפעילות של כביקול מתילטרנספראז. איור 6 מתאר את התוצאות שהתקבלו.



איור 6: פעילות כביקול מתילטרנספראז כתלות בטמפרטורה.

באיור 7 ניתן להבחין כי הפעילות האנזימתית עולה עם עלית הטמפרטורה עד לטמפרטורה 20°C . לאחריה חלה שוב ירידה בפעילות האנזימתית. הרתחה של האנזים למשך 2 דקות הביאה לאובדן מוחלט של הפעילות, כצפוי לתהליך אנזימטי. מתוצאות אלו הסקנו שטמפרטורה של 20°C היא אופטימלית לפעילות.

תלות הפעילות האנזימתית בקופקטורים מתכתיים ואחרים

אנזימים מסוימים דורשים קופקטורים מתכתיים שונים לפעילותם התקינה. כדי לבדוק האם הכביקול מתילטרנספראז של עלי הבזיל זקוק לקופקטור מתכתי כלשהו נבדקה פעילות מתילטרנספראז בהשפעתם של קופקטורים שונים בשני ריכוזים כפי שמתואר בטבלה 2.

טבלה 2. השפעת קופקטורים שונים על פעילות האנזים כביקול מתילטראנספראז מעלי בזיל מתוק.

תוספת	ריכוז (mM)	פעילות %
ביקורת (ללא תוספות)	0	100.0
KCl	10	82.4
KCl	100	49.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	67.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	47.8
MgCl ₂	1	58.9
MgCl ₂	10	48.9
MnCl ₂	1	48.1
MnCl ₂	10	14.7
CuSO ₄	1	53.0
CuSO ₄	10	0.1
CaCl ₂	1	49.5
CaCl ₂	10	35.2
ZnSO ₄	1	31.3
ZnSO ₄	10	0.0
FeSO ₄	1	16.7
FeSO ₄	10	0.9
CoCl ₂	1	14.8
CoCl ₂	10	0.0
אנזים מורתח	0	0.0

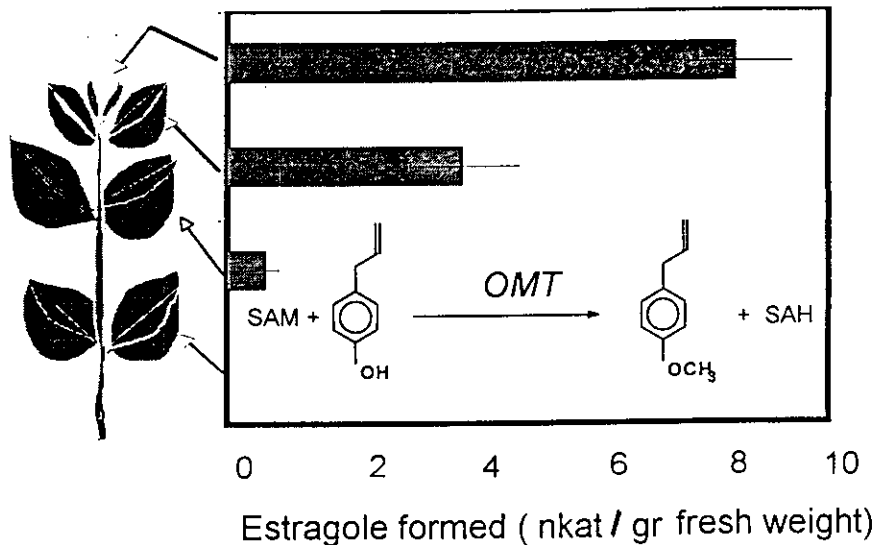
התוצאות שהתקבלו מניסויים אלו נמתוארים בטבלה 2 מראים שלכאורה אין צורך להמצאות קופקטור כלשהו כדי שהפעילות האנזימית תהיה גבוהה. יתר על כן, אף קופקטור לא הגדיל את קצב הפעולה בצורה משמעותית. מהניסויים הללו, אנו למדים גם שתוספת של 100 mM KCl או (NH₄)₂SO₄, מעכבת את הפעילות האנזימית בכ-50%. בריכוזים של 10 mM, מלחים אלו עכבו הרבה פחות (רק כ-20 עד 30% לעומת זאת, כלוריד המגנזיום, מנגן, נחושת ואבץ, עיכבו את הפעילות האנזימית ב-50% עד 70% ברמה של 1mM. ברמה של 10mM, העיכוב היה הרבה יותר משמעותי. מלחי הברזל, אבץ וקובלט עיכבו את הפעילות באופן כמעט מוחלט ברמה של 10mM. מתילטראנספראזות אחרות הידועות מהספרות הן שונות בתלותם בקופקטורים. ישנם מתילטראנספראזות הדורשות מגנזיום או מנגן באופן מוחלט לפעילות, וישנם כאלה אשר אין להן כל צורך בקופטורים מתכתיים ומלחים שונים על מנת לפעול, בדומה לאנזים מבזיל.

תלות פעילות כביקול מתילטראנספראז בריכוז הסובסטרט כביקול

פעילות כביקול מתילטראנספראז נמדדה בריכוזים עולים של הסובסטרט כביקול על מנת לקבוע את הקבוע הקינטי עבור כביקול. על פי משוואת Michaelis-Menten בוצעו טרנספורמציות לתוצאות שהתקבלו לפי עקום Lineweaver-Burk ו-Eadie-Hofstee. מהעקומים התקבלו ערכי Km דומים $K_m = 3.032 \mu M$ ו- $K_m = 3.1518 \mu M$ בהתאמה.

3. השתנות פעילות כביקול מתילטרנספראזעם גיל העלים.

ידוע שאסטרגול ומרכיבים אחרים של השמן האתרי מצטברים בעלים של בזיל, אך לא ידוע בברור מתי במשך התפתחות הצמח התהליכים של יצירת האסטרגול מתקיימים. עם פיתוח הבדיקה האנזימתית למתילטרנספראז, ניתן לעקוב אחרי השלב הביוסינתטי האחרון של יצירת אסטרגול, ולנטר את המערכת הביוסינתטית תוך התפתחות העלה. לשם בדיקה זו, בדקנו את הפעילות של כביקול מתילטרנספראז בזוגות עלים שונים באותו הצמח של בזיל מתוק. התוצאות של ניסויים אלה מוצגים באיור 7.



איור 7: פעילות כביקול מתילטרנספראז עם התפתחות העלים בבזיל מתוק.

ניתן לראות כי פעילות מתילטרנספראז בעלים צעירים היא גבוהה והולכת ויורדת עם העלייה בגיל העלה. כך שבעלים צעירים הנמצאים בקודקוד הצמח הפעילות האנזימתית הנה הגבוהה ביותר, ועם הירידה לאורך הגבעול, הווה אומר עם התבגרות העלה, הפעילות האנזימתית הולכת ויורדת.

השוואת הפעילות האנזימתית בין זנים שונים של בזיל

השוואת פעילות אנזימתית בזני בזיל שונים לתכולת השמן האתרי שלהם.

בזנים שונים של בזיל, הרכב השמן האתרי הוא שונה (טבלה 3). זנים R3, ו-145, ו-147/97 מכילים בשמן האתרי שלהם כמות גדולה של מתיל כביקול, כאשר זן 147/97 מכיל גם מתיל אאוגנול, ואילו הזן SW מכיל אאוגנול וכלל לא מכיל מתיל כביקול או מתיל אאוגנול. לפיכך ציפינו כי זנים R3 ו-145, המכילים רמה גבוהה של מתיל-כביקול יראו פעילות אנזימתית כלפי הסובסטרט כביקול. התוצאות מאשרות את ההיפותזה אך באופן בלתי צפוי, לא הייתה פעילות כלפי אאוגנול, השונה מכביקול רק בהתמרה מתוקסית בעמדה 3 (איור 2). לעומת זאת בזן 147/97 אשר מכיל גם מתיל-אאוגנול, הפעילות האנזימתית שנצפתה הייתה מסוגלת גם להעביר את הקבוצה המתילית לאאוגנול (טבלה 3). בזן SW אשר לא מכיל מתיל כביקול או מתיל אאוגנול, לא הייתה כלל פעילות אנזימתית.

טבלה 3. הרכב השמן האתרי ופעילות מתילטרנספראזות בזני בזיל שונים

Chemotype	Essential oil composition (% in oil) ¹				OMT activity (nkat / gr FW)	
	Linalool	Eugenol	Methyl chavicol	Methyl eugenol	Substrate: chavicol	Substrate: eugenol
R3	29.9		56.1		7 ± 0.5	0.4 ± 0.1
145			91.5		12 ± 1.4	0.2 ± 0.1
147/97			45.3	43.2	12 ± 0.1	12 ± 0.1
SW	40.9	41.3			0	0

1) Data from Grayer et al 1996

ה. מסקנות והשלכות

1. בעזרת הבדיקה הרדיואקטיבית שאנו פתחנו, זיהינו פעילות אנזימטית ייחודית במיצויים אנזימטיים מעלי בזיל. פעילות של מתילטרנספראז המזרז את המעבר של קבוצת מתיל מהפרקורסור התורם SAM, לפרקורסור המקבל, כביקול. אנזים זה לא זוהה עד כה משום מקור אחר, למרות שמתילטרנספראזות אחרות ידועות ממסלולים ביוסינתטיים אחרים למטבוליטים מישניים, וגם כאלה שפועלים על נוקלאוטידים ו-DNA.

2. הממצאים שלנו מצביעים על כך שעיקר היצירה של אסטרגול מתבצע בעלים צעירים, וככל שהעלה מתבגר, הפעילות הביוסינתטית פוחתת. מכאן שאם ברצוננו להשפיע על התכולה של האסטרגול בעלים, הדבר חייב להיעשות בשלב מוקדם בהתפתחות העלה.

3. מצאנו שנוכחותם ורמתם של אנזימים אלו בזני בזיל שונים הנבדלים בהרכב הכימי, קובעים את הרכב השמן האתרי בזנים שונים של בזיל ברמה הביוכימית.

בהמשך מחקר זה אנו:

1. נמשיך ללמוד ולאפיין את התכונות הביוכימיות של המתילטרנספראזות המעורבות בסינתזת מתיל כביקול ומתיל אאוגנול בבזיל, ואת התנאים ההתפתחותיים וסביבתיים המשפיעים על פעילותם והופעתם של אנזימי מפתח אלו בריקמות שונות בצמח.

2. אנו גם נפעל לבידוד הגנים המקודדים לאנזימים אלו ע"י ניקוי האנזים ואיפיונו.

לימוד תהליכי הווצרותם של טעמים וריחות בתבלינים תסייע לנו לקבל מוצרי חקלאות בעלי איכות מעולה. הנושא חשוב לא רק בגידולי תבלין, שליטתנו בגורמים הביוכימיים ופיזיולוגים הגורמים ליצירת חומרי טעם וריח תשפר גם את איכותם וטעמם של פירות וירקות רבים. המשך מחקר המולקולרי על הווצרות ריחו של בזיל, תוך כדי בידוד הגנים המקודדים לאנזימי המפתח, יאפשרו את השימוש בהנדסה גנטית לשפור זני בזיל וצמחים אחרים.

המידע שהשגנו מפרוייקט זה ושנשיג בהמשכו יאפשר שליטה טובה יותר על איכות הבזיל ורמת השמן האתרי, תוך כדי הבנת הגורמים האחראיים ליצירת החומרים אשר קובעים את איכותו ומחירו. כמו-כן ידע זה חיוני לבידוד הגנים האחראים לתכונות אלו ולשילוב יעיל של שיטות ההנדסה הגנטית בתוכניות ההשבחה. וזאת על

מנת לקבל זנים מיוחדים של צמחי בזיל מתוק בעלי הרכב כימי משופר ולאפשר לחקלאות ישראל להמשיך ולהוביל בנושא איכות זני בזיל מתוק בעולם.

ו. פירוט מלא של הפרסומים המדעים בכתב ובע"פ

א. מאמרים:

1. I. Ziv-Raz, I., E. Lewinsohn, N. Dudai, U. Ravid, E. Putievsky, and Y. Shoham, (1997).
Methyltransferases involved in the biosynthesis of methyl-chavicol and methyl-eugenol in sweet basil.
Proceedings of the 28th International Symposium on Essential Oils, Eskisehir, Turkey
2. E. Lewinsohn, I. Ziv-Raz, N. Dudai, Y. Tadmor, E. Lastochkin, O. Larkov, D. Chaimovitsh,
U. Ravid, E. Putievsky, E. Pichersky and Y. Shoham
Chemotypic association and developmental regulation of enzymatic allylphenol *O*-methylation
in sweet basil.
Submitted for publication in Phytochemistry, Dec 1999.

ב. תיזה:

זיו-רז א. (1999) מתילטרנספראזות המעורבות ביצירת מתיל כביקול ומתיל אאוגנול בבזיל מתוק
(*Ocimum basilicum* L.)
חיבור על מחקר לשם מלוי חלקי של הדרישות לקבלת תואר מגיסטר למדעים בהנדסת מזון וביוטכנולוגיה.
הטכניון - מכון טכנולוגי לישראל. הודרכה ע"י ד"ר אפרים לוינסון ופרופ' יובל שוהם.

הצגה בע"פ בכינוס בין-לאומי:

Ziv-Raz, I., Lewinsohn, E., Dudai, N., Ravid, U., Putievsky, E., and Shoham, Y. (1997).
Methyltransferases involved in the biosynthesis of methyl-chavicol and methyl-eugenol in sweet basil.
The 28th International Symposium on Essential Oils, Eskisehir, Turkey

הידע מופץ גם בסמינרים שהוזמנתי להעביר במחלקות שונות במנהל המחקר החקלאי, אוניברסיטת
תל-אביב, ובמסגרת כינוסים אחרים בחו"ל.

העתקים מהמאמרים והתיזה של א. זיו-רז ניתן לקבל מדר' אפרים לוינסון על פי בקשה.