

מה מצוי במיצוי?

בתאים חיים מתרחשים בו זמנית מספר רב של תהליכים, אשר את חלקם אפשר לחקור ב"תנאי מבחנה" (in vitro)⁽¹⁾. כאשר חוקרים את התהליכים ביצורים רב תאיים, עובדים במבחנה עם חלקים של אורגניזם שלם כגון תאים או מרכיבי תאים. במצב זה נוח לחקור את התהליך הנבחר ואפשר גם לשמור על תנאים מתאימים לקיומו. בניסויים המתבצעים במעבדות בבתי ספר על יסודיים, בדרך כלל, התלמידים חוקרים תהליכים במיצויים של רקמות⁽²⁾ שמקורן בצמחים. בכתבה נסקור היבטים שונים הקשורים במיצוי ובכלל זה נתייחס גם לתכנון ניסוי או לביצוע ניסוי בו בודקים פעילות של אנזים מסוים במיצוי.

א. מהו מיצוי ואיך מכינים אותו?

השלב הראשון בהכנת מיצוי הוא **ריסוק מכני** של הרקמה. קוצצים את הרקמה ומעבירים אותה למכתש, מוסיפים מים וכותשים באמצעות עלי. הריסוק המכני פוגע בשלמות הרקמה, תאיה ואברוניה. פגיעה משמעותית עוד יותר בתאים נגרמת על ידי הקפאת הרקמה או ריסוקה במעבד מזון. חלופה לריסוק מכני היא **פגיעה כימית** בקרום התא ובקרומי האברונים. לדוגמה, אם מוסיפים אתנול (אלכוהול)⁽³⁾ בזמן הכנת המיצוי תתרחש דנטורציה של חלבונים והמסה של שומנים וכתוצאה מכך יפגעו קרומי התאים המרוסקים. בכל אחת מאפשרויות אלה, ריסוק מכני או פגיעה כימית, תוכן התא משתחרר אל הנוזל שהוספנו. ככלל, אם מוסיפים מים בזמן ריסוק של רקמה, המיצוי שיתקבל יכיל חומרים המסיסים במים כגון חלבונים, אנתוציאנינים ובטנינים, ובהוספת ממס אורגני - המיצוי יכיל חומרים המסיסים בו כגון כלורופילים, קרוטנואידים, קסנטופילים. השלב השני בהכנת מיצוי הוא **סינון** (באמצעות גזה או נייר סינון), כך שהמרכיבים הגדולים יחסית (הגסים) שהתקבלו בריסוק יופרדו משאר מרכיבי הרסק (ראו בחינות בגרות 5 יח"ל: תשע"ה בעיות 1 - 3, תשע"ו בעיות 1 - 3). במקום סינון, אפשר לבצע **סרפוז** (צנטריפוגציה) באמצעות סרפוז (צנטריפוגה). בתחתית מבחנת הצנטריפוגה שוקעים המרכיבים הכבדים ובחלק העליון של המבחנה יצטבר נוזל ובו שאר מרכיבי הרסק. היום ישנן שיטות שבאמצעותן ניתן לפגוע במבנה התאי מבלי לפגוע במבנה או בפעילות של האברונים ובאמצעות סרכזת משוכללת אפשר להפריד בין אברונים שונים של תאים⁽⁴⁾. תוצר הסינון או הסרכזת הוא **מיצוי** שמכיל תאים שלמים, חלקי תאים, אברונים (שלמים ופגומים) וכן נוזלי התאים שנפגעו ובהם מגוון חומרים.

¹ *In vitro* (בלטינית): מחקר במבחנה. הכוונה לכל כלי מעבדה כגון, צלחת פטרי, כוס, מבחנה (בניגוד למחקר in vivo שמתקיים באורגניזם השלם).

² בשיטות מתקדמות אפשר למצות בנפרד מרכיבים של תאים כגון DNA, חלבונים.

³ אתנול הוא ממס אורגני

⁴ הפרדת מרכיבי תא באמצעות צנטריפוגה

כאשר מכינים מיצוי מימי מתאים שבחלוליות שלהם יש צבועים (פיגמנטים) הנמסים במים, כגון אנתוציאנינים שבתאי כרוב סגול, הצבענים משתחררים מהתאים ומתקבל מיצוי סגול.

הרתחה של העלים הקצוצים גורמת לפגיעה משמעותית בקרומי התאים והאברונים, והודות לכך מזוהזת יציאת חומרים אל המים ובכלל זה גם יציאת האנתוציאנינים שבחלולית.

בבחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ה, בעיות 1 - 3 התלמידים קיבלו מיצוי שהוכן על ידי הרתחה של עלי כרוב. בניסויים שבצעו, המיצוי שימש כאינדיקטור לחומצה בסיס. חשוב לציין כי הרתחה של רקמה צמחית גורמת גם למיצוי של חלק מהחומרים שאינם מסיסים במים.



מיצוי מעלים קצוצים ומורתחים של כרוב

תרחיף כלורופלסטידות: כאשר מרסקים עלים ירוקים למשל, עלי תרד, שבהם יש כמות רבה במיוחד של כלורופלסטידות, מתקבל רסק שצבעו ירוק כהה. ברסק זה יש אברונים שונים כגון כלורופלסטידות וגם שברי כלורופלסטידות וכן חומרים שהיו בנוזלי התאים והאברונים. בגלל הכמות הרבה של הכלורופלסטידות ה"מרחפות" במיצוי זה, מכנים אותו תרחיף כלורופלסטידות (ראו בחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ו בעיות 4 - 6). כאמור לעיל, כדי למצות את הכלורופיל מהעלים יש להשתמש בממס אורגני.



יהודי נודד

מיצוי מימי בתוספת ממס אורגני: כאשר מכינים מיצוי מימי מעלים צבעוניים (לדוגמה, עלים סגולים של הצמח יהודי נודד) ומוסיפים בזמן הריסוק גם אתנול המיצוי מכיל בין השאר אנתוציאנינים הנמסים היטב במים וגם כלורופיל הנמס באתנול. בגלל המסיסות השונה של צבענים אלה בשני הממסים אפשר לקבל הפרדה ברורה בשיטת הכרומטוגרפיה (הנחיות להכנת המיצוי הפרדת הפיגמנטים ראו בבחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ד בעיה 4).

ב. מהי משמעות הפגיעה במבנה התאי?

קרום התא הוא קרום בררני המפריד בין הסביבה החיצונית לתא לבין הנוזל התוך תאי. הודות לקרום נשמרים תנאי סביבה ייחודיים בתוך התאים, תנאים שהם שונים מהתנאים מחוץ לתאים. בתאים אאוקריוטיים האברונים מוקפים בקרום שהודות לו מתקיים מידור בתא, כלומר באברונים שונים נשמרים תנאים ייחודיים. לדוגמה, בציטופלסמה של רוב התאים דרגת ה-pH היא 7.2 בעוד שבחלל הליזוזומים דרגת ה-pH היא 5. הבדל זה והבדלים אחרים גורמים לכך שבו זמנית יכולים להתקיים בתא תהליכים שונים, לדוגמה, בליזוזומים מתקיימים תהליכים של הרס חלבונים ובריבוזומים - תהליכים של בניית חלבונים.

בתא חי יש תיאום בין התהליכים המתרחשים בכל חלקיו והוא מתפקד כיחידת פעולה. לעומת זאת, בזמן הכנת המיצוי, כאשר נפגעים קרומי התאים וקרומי האברונים, נפגע המידור שבין אברוני התא וגם זה שבתוך אברונים מסוימים (כמו במיטוכונדריון).

הפגיעה גורמת לכך שתהליכים מרובי שלבים כמו אלה המתקיימים בנשימה תאית, שחלקם מתקיימים בציטופלסמה (גליקוליזה) וחלקם במדורים שונים במיטוכונדריון, לא מתקיימים במיצוי. בתרחיף כלורופלסטים כמו זה שהוכן בבחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ו בעיות 4 - 6 (ראו סעיף א לעיל), יש פגיעה בכלורופלסטידות ולכן תהליך הפוטוסינתזה בשלמותו לא מתקיים בתרחיף זה. בתנאי מעבדה משוכללים יותר, ניתן לבדוד כלורופלסטידות שלמות ולבדוק בהן את תהליך הפוטוסינתזה על כל שלביו.

ג. איזו פעילות ביולוגית יכולה להתקיים במיצוי?

מיצוי מימי מכיל חומרים שונים וביניהם גם חלבונים שהיו בתאים בזמן הכנת המיצוי. בין החלבונים האלה צפוי שיהיו גם אנזימים שכל אחד מהם מזרז תהליך ייחודי. בתנאים מתאימים יהיו פעילים במיצוי רק אותם אנזימים שפעילותם אינה תלויה בשלמות המבנה התאי. תנאי נוסף לקיום פעילות זו הוא שבתהליך הכנת המיצוי לא הייתה פגיעה בשלמות מולקולות האנזימים או במבנה המרחבי שלהם (למשל הרקמה לא הורתחה או לא נחשפה לריכוז גבוה של אתנול או מלחים).

אף כי התנאים במבחנה אינם זהים לאלה שבתאים, צפוי שחלק מהאנזימים יהיו פעילים במבחנה באופן דומה לפעילותם בתאים. זאת ועוד, צפוי שבמיצוי שהוכן מרקמות שבהם הייתה פעילות של אנזים כלשהו, יהיה גם הסובסטרט של אותו אנזים.

במעבדות שלהן מכשור מתקדם אפשר לקבל תכשיר אנזימטי מנוקה על ידי הפרדה בין האנזים לבין שאר מרכיבי המיצוי. האם נוכל במעבדת בית ספר להרחיק ממיצוי את הסובסטרט של אנזים מסוים או את התוצר של אותו אנזים? התשובה היא, שבדרך כלל לא ניתן לבצע פעולות אלה. הדוגמה המוכרת ביותר של הפרדה כזו, היא הפרדת עמילן ממיצוי שהוכן מזרעים נובטים או מתפוח אדמה. ההפרדה מבוססת על כך שעמילן אינו נמס במים שבהם הוכן המיצוי, אלא שוקע בהם. אם מסננים מיצוי שמכיל עמילן באמצעות נייר סינון או מסרנדים אותו, אפשר לקבל תסנין ללא עמילן. חשוב לוודא שהתסנין אינו מכיל עמילן על ידי טפטוף טיפת יוד ובדיקת הצבע שמתקבל. אם עדיין יש עמילן בתסנין נדרש סינון נוסף.

ברוב המקרים במעבדת בית ספר אין אפשרות לבצע הפרדה בין הסובסטרט למיצוי.

ד. איך בודקים פעילות של אנזים מסוים במבחנה?

כאמור, צפוי שבמיצוי שמכיל אנזים יהיה גם סובסטרט של אותו אנזים. לכאורה, אם המיצוי נשמר בטמפרטורה אופטימלית ובדרגת pH מתאימה, אפשר יהיה לבדוק את השינויים שיחולו במשך זמן בריכוז תוצר התהליך האנזימטי בו מעורבים האנזים והסובסטרט (לדוגמה, בדיקת שינוי בריכוז חמצן שנוצר בתהליך שבו האנזים קטלאז מזרז פירוק מי חמצן). אך מכיוון שריכוז הסובסטרט במיצוי נמוך

מאד, פעילות האנזים גם היא נמוכה ואינה ניתנת למדידה באמצעים העומדים לרשותנו במעבדה. לכן, ברוב הניסויים, בתחילת הניסוי מוסיפים למיצוי כמות גדולה ומדודה של סובסטרט, והודות לכך מואץ קצב התהליך האנזימטי והוא ניתן למדידה. אפשר לעקוב אחרי קצב התהליך על פי קצב הופעת התוצרים או על פי קצב היעלמות המגיבים.

כדי למצוא מהם התנאים המיטביים לקיום תהליך אנזימטי ספציפי במיצוי, לדוגמה מהי הטמפרטורה המיטבית או מהי דרגת ה-pH האופטימלית, חשוב לבצע ניסוי מקדים ומומלץ גם להיעזר במידע מהספרות.

כאמור, צפוי שבמיצוי של רקמה כלשהי יש אנזימים רבים ונשאלת השאלה **האם אפשר לבדוק במיצוי מסוים פעילות של כמה וכמה אנזימים?** כן, אפשר לבדוק פעילות של אנזימים שונים באותו מיצוי. ואיך עושים זאת? מבצעים ניסויים אחדים שבכל אחד מהם מוסיפים סובסטרט אחר, ובהתאם לכך בכל ניסוי נכנס לפעולה האנזים הייחודי שמצוי במיצוי.

ה. **הערות עקרוניות לגבי תכנון ניסוי או ביצוע ניסוי בו בודקים פעילות של אנזים מסוים במיצוי** בשגרת ההוראה, רצוי לבצע גם ניסויים שהיו חלק מבחינות הבגרות. בכל הזדמנות אפשרית, חשוב לעודד את התלמידים לחשיבה ביקורתית לגבי הניסוי (שבוצע בתנאי בחינה) ולהתמודדות עם שאלות שלא נכללו בבחינה באותה שנה. מהלכים כאלה ישפרו את יכולתם של התלמידים להבין את מהות המדע וכישירו אותם לבצע בעצמם חקר אמפירי (במסגרת ביוחקר).

1. כאמור, בדרך כלל ריכוז הסובסטרט במיצוי הוא נמוך וזניח (יתכן גם שהתהליך האנזימטי ממשיך במיצוי), לכן בניסוי בו בודקים את השפעת **ריכוז הסובסטרט** על קצב תהליך אנזימטי, בתחילת הניסוי מוסיפים סובסטרט למיצוי כך שמתקבלת סדרה של טיפולים שבכל אחד יש ריכוז שונה של סובסטרט. חשוב שהניסוי יכלול בקרה, מיצוי ללא תוספת סובסטרט. ברוב המקרים, לא יתקבל תוצר מפני שהתהליך לא יתקיים או שיהיה איטי מאד וכמות התוצר שתתקבל לא תהיה מדידה. **אם** יתקבל תוצר הוא תוצאה של תגובת הסובסטרט האנדוגני עם האנזים שבמיצוי.

2. בניסוי בו בודקים את השפעת **ריכוז האנזים** במיצוי על קצב התהליך האנזימטי, מכינים מהמיצוי סדרה של מיהולים שבכל אחד מהם ריכוז שונה של מיצוי (לדוגמה, בחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ה בעיה 2).

כאן המקום לפתח דיון עם התלמידים, **האם המשתנה הבלתי תלוי הוא אכן ריכוז אנזים?** **אולי חל שינוי במרכיב נוסף?** לכאורה, זו התייחסות טכנית להוראות העבודה בניסוי, אך למעשה נדרשת כאן חשיבה ביקורתית על מערך הניסוי שבוצע.

אם התלמידים מתקשים לזהות נקודה כזו, אפשר לתת להם רמז, לדוגמה: מהם שני המרכיבים החשובים ביותר שמכיל המיצוי? צפוי ששיבו שהמיצוי מכיל אנזים ספציפי

וסובסטרט עליו הוא פועל. מכאן הדרך קצרה כדי להבין שכתוצאה ממהיול המיצוי (שזו דרך השינוי של המשתנה הבלתי תלוי) משתנה גם ריכוז הסובסטרט האנדוגני במיהולים השונים. כלומר, לכאורה, יש בניסוי כזה שני משתנים בלתי תלויים (ריכוז אנזים, וריכוז התחלתי של סובסטרט). אם במיצוי ריכוז הסובסטרט נמוך מאד ואפילו זניח, אפשר להניח⁽⁵⁾ שהוא שווה בכל המיהולים ואין צורך לנקוט פעולה כלשהי. אם ריכוז הסובסטרט האנדוגני הוא גבוה ויש דרך נוחה להפרדתו מהמיצוי, חשוב להפרידו ולהרחיקו לפני תחילת הניסוי (ראו סעיף ג), ולהוסיף סובסטרט כך שהריכוז ההתחלתי של הסובסטרט יהיו שווה בכל הטיפולים (בחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ד, בעיה 2 סעיפים א - ח, י - יא, שאלה 21).

3. יש ניסויים בהם בודקים את השפעת ריכוז האנזים במיצוי על קצב תהליך אנזימטי על פי

כמות התוצר בתהליך. יתכן שבמיצוי, עוד לפני שהחל הניסוי, קיים ריכוז משמעותי של התוצר, ובסוף הניסוי הריכוז של אותו תוצר יהיה גבוה יותר. כאשר שיטת המדידה בה משתמשים בניסוי מאפשרת למדוד כמויות גדולות של תוצר (או כשהשיטה מאפשרת להבדיל בין התוצר שהיה קיים בתחילה לבין התוצר החדש), אפשר למדוד בכל אחד מהטיפולים את כמות התוצר ההתחלתי ואת כמות התוצר הסופי ולחשב את כמות התוצר שנוצר בניסוי.

אם השיטה אינה מאפשרת את כל אלה, חשוב להפריד את התוצר מהמיצוי ולהרחיקו לפני תחילת הניסוי (ראו סעיף ג). לדוגמה, בניסוי נבדקה השפעת ריכוז האנזים המזרז יצירת עמילן בתסנין תפוח אדמה על קצב יצירת עמילן (בחינת בגרות 5 יח"ל תשע"ד, בעיה 1). הודות להרחקת העמילן לפני תחילת הניסוי, ניתן היה לבדוק רק את כמות העמילן שנוצר במשך הניסוי. (בעיה 1 תשע"ד שאלה 7).

ובהתייחס להערה 2 לעיל, אנו מניחים בניסוי זה שכמות הסובסטרט (גלוקוז 1 פוספט) במיצוי היא קטנה מאד וזניחה ולכן אין משמעות להבדל בריכוזו בטיפולים השונים.

4. מדוע בביוחקר חייבים להשתמש במיצוי ולא בתכשיר מנוקה של אנזים (כמו זה שמסופק

מהמרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות בתי הספר בבר אילן)?

בביולוגיה, שלא כמו בתחומי דעת אחרים (ביוכימיה או ביוטכנולוגיה), אנו מעוניינים ללמוד ולחקור תהליכים המתרחשים באורגניזמים חיים, ברקמות שלהם או במיצוי שהופק מהם. ברוח זו נוסחה ההנחיה: "בשאלת החקר ייבדק אורגניזם או חלק ממנו. דוגמה: ניתן למצות אנזים מרקמה ולבדוק את הפעילות. אך לא ניתן להסתפק בבדיקת פעילות של אנזים מנוקה" (מתוך המסמך "ביוחקר – תלמידים חוקרים ביולוגיה" לתלמידי יא תשע"ו ואילך, הנחיות

⁵ זו הזדמנות להדגיש את משמעות המושג "הנחה" ולחדד את ההבדל בין הנחה לבין השערה



לביצוע עבודה סעיף ג עמ' 15)

מקורות מידע:

- i. גרוס ח', עתידיה י', התא – יחידת החיים, המרכז להוראת המדעים האוניברסיטה העברית בירושלים תשס"א 2000, עמ' 23 – 58.
- ii. נוימן י., תהליכים ביואנרגטיים בצמח: פוטוסינתזה ונשימה, מפעלים אוניברסיטאיים הוצאה לאור (ללא ציון שנה), עמ' 164, 171, 172.

