

חומרי בריאות נוגדי חמצון בתוצרת החקלאית המקומית: כימות וניטור בזמן

הקטיף ובתקופת האחסון והעשרה על ידי בקרת תנאי הגידול.

חמוטל בורוכוב-נאורי, אידה מילנז, סילבי לוי – מו"פ ערבה דרומית

תקציר

כדאיות גידולי השדה בערבה עומדת בספק בשל התחרות הגדולה על היצוא למערב. המשך הרווחיות מגידול פירות וירקות בערבה מחייב הגדלת האטרקטיביות שלהם לצרכנים פוטנציאליים. אחת הדרכים לעשות זאת היא על ידי שימוש בערכה הבריאותי של התוצרת המקומית כמותג. בשנים האחרונות גדל הביקוש לתוצרת חקלאית עם תכולה גבוהה של חומרי טבע צמחיים בעלי תרומה ייחודית לבריאות, כגון, חומרים נוגדי חמצון. כמה מהגידולים המקומיים מוכרים כבעלי תכולה גבוהה יחסית של חומרים נוגדי חמצון ובתנאים האקלימיים הייחודיים של האזור ניתן להגיע אף לתכולות גבוהות מהרגיל. מטרת המחקר היא להעלות את ערכה של התוצרת החקלאית המקומית ואת הביקוש לה על ידי אפיון, כימות והעשרה של תכולת חומרי הבריאות הטבעיים. לשם השגת המטרה יזוהו זנים ותנאי גידול בהם מתקבלת תוצרת חקלאית עשירה בחומרים נוגדי חמצון, ותימדדנה פעילות ויציבות חומרים אלה במהלך אחסון ועיבוד מזערי.

שנת המחקר הראשונה הוקדשה לבדיקת מספר שיטות אנליטיות למדידת פעילות נוגדת חמצון במקטע ההידרופילי של רקמת הפרי וקביעה כמותית של ליקופן (קרוטנואיד, הידרופובי), ובחירת אלה המתאימות ביותר למוצרים המקומיים ולתשתיות המעבדתיות במו"פ. נעשתה התאמה של שיטות ספקטרופוטומטריות וב-HPLC לתכונות הספציפיות של עגבנייה ואבטיח מגידול מקומי.

מדידות כמותיות של פעילות נוגדת חמצון וליקופן בעגבניית "שריי" (זן 636, הזרע) ואבטיח (זן 313, הזרע) התבצעו ביום הקטיף. במוצרי פרי חתוך של עגבנייה נבדקו המדדים גם לאחר אחסון בקירור למשך 11 ימים. כמו-כן, נעשתה השוואה בין ערכי משקל הפרי, רמת ה-TSS במיץ, פעילות נוגדת חמצון ותכולת ליקופן במספר זני "שריי" (תרומה מאספו הפרטי של אהוד קופלסקי), ונלמדה השפעת ההשקיה במים מליחים על אותם מדדים. בהמשך יורחב המחקר לגידולים מקומיים נוספים, כגון, מילון ופלפל, בהקשר לפעילות נוגדת חמצון ותכולת β -קרופן במילון. תילמד השפעת משך ותנאי האחסון של הפרי השלם על תכולת ופעילות חומרי הבריאות הטבעיים. במקביל, תבחן רגישות החומרים לעיבוד מזערי (חיתוך וסחיטה) של הפרי, ואחסון הפרי המעובד בקירור. בשלב מאוחר יותר של המחקר תיבדק השפעת תנאי הגידול (עקות מלח ויובש, תוספת סידן, הצללה) על תכולת החומרים נוגדי החמצון בפירות מהזנים המועדפים.

מבוא

כדאיות גידולי השדה בערבה עומדת בספק בשל התחרות עם מדינות רבות על היצוא לשוקי המערב. על מנת להמשיך ולקיים גידול רווחי של פירות וירקות בערבה יש להגדיל את

האטרקטיביות שלהם לצרכנים פוטנציאלים. ניתן לרתום לצורך זה את הפופולריות הרבה לה זוכה כיום התפיסה של "אורח חיים בריא", בה יש לאכילת פירות וירקות טריים מקום מרכזי. תרומתם של הפירות והירקות הטריים לבריאות היא בעיקר בשני תחומים: א. תזונה - ירקות ופירות טריים מהווים מקור טבעי לויטמינים, סיבים ושומנים "טובים" (סטרולים צמחיים ונגזרותיהם המסיסות, חומצות שומן בלתי רוויות) בנוסף להיותם מקור חשוב לחלבונים ופחמימות. ב. רפואה מונעת - פירות וירקות מסוימים מכילים ריכוזים משמעותיים של חומרי טבע צמחיים (פיטוכימיקלים) בעלי תרומה ייחודית לבריאות. ערכן הבריאותי של קבוצות פיטוכימיקלים שונות זוכה לאחרונה לביסוס מדעי במחקרים רבים (Giovannucci et al, 1995, 2002; Arab and Steck, 2000; Rao and Agarwal, 2000; Dixon and Summer, 2003 (review)).

על סמך תוצאות המחקרים הכירו ה-FDA האמריקאי וה-ACSH (המועצה האמריקאית למדע ובריאות, The American Council on Science and Health) במספר חומרי טבע צמחיים כ"חומרי בריאות". הכרה זו הביאה להמלצות לציבור להרבות בצריכת פירות וירקות המכילים ריכוזים גבוהים יחסית של פיטוכימיקלים אלה. רשויות הבריאות האמריקאיות יצאו לאחרונה בהמלצה רשמית לאכול ירקות ופירות במגוון צבעים, כאשר הצבעים השונים מתייחסים לחומרי הטבע הצבעוניים הפעילים אשר תורמים להגנה בריאותית בסינרגיה עם מרכיבים נוספים (כגון, ויטמינים, סיבים, מינרלים) הנמצאים באותם ירקות ופירות. מועצת הירקות בישראל אימצה אף היא גישה זו, ולאחרונה החלה, בשיתוף עם האגודה למלחמה בסרטן, לעודד אכילת ירקות במבחר צבעים.

קיים גידול ניכר בעולם המערבי בצריכת תוצרת חקלאית במסגרת רפואה מונעת, כמו למשל, מוצרי שיבולת שועל מלאה וחלבון סויה שנמצאו יעילים בהורדת רמת הכולסטרול בדם והפחתת הסיכון להתקף לב, מיץ חמציציות המסייע בהפחתת הסיכון לדלקת בדרכי השתן וכן תה ירוק ועגבניות המסייעים בהפחתת הסיכון ללקות במספר סוגי סרטן. במקביל גוברת דרישת הצרכנים לציון תכולת הפיטוכימיקלים השונים על גבי אריזות של תוצרת חקלאית המקודמת בשוק כ"בריאה".

תכולה גבוהה יחסית של "חומרי בריאות" בתוצרת חקלאית מהערבה הדרומית יכולה לשמש לקידום המכירות של הירקות, הפירות ומוצריהם הטריים, ובכך לאפשר את המשך הכדאיות הכלכלית של גידולם באזור זה. כמה מן הגידולים המקומיים ידועים כמכילים ריכוזים משמעותיים של "חומרי בריאות" נוגדי חמצון: 1. ויטמין A, ליקופן וקרוטנואידים אחרים - עגבנייה, אבטיח, בטטה, מנגו, זני מילון כתומים, דלעת. 2. ויטמין C - פומלו, זני מילון שונים, פלפל, עגבנייה, תפוז. 3. פנולים - ענבים, תמרים.

התכולה הטבעית של חומרים נוגדי חמצון בתוצרת החקלאית מושפעת מתנאי הגידול, כגון, משטר הגידול (Somers and Beeson, 1948; Lee and Kader, 2000), התנאים האקלימיים (בעיקר הקרינה והטמפרטורה הממוצעת) (Klein and Perry, 1982; Havaux et al, 2000) ועקות תזונה, יובש ומליחות (Mittler, 2002; Munne-Bosch and Alegre, 2002; Collakova and DellaPenna, 2003). תכולת נוגדי החמצון בירקות ופירות עולה עם העלייה ברמת הקרינה ובתגובה למספר עקות.

צפוי ששילוב של הניסיון המקצועי הרב של חקלאי האזור עם היתרון המקומי של עוצמת קרינה גבוהה וטמפרטורות נוחות במשך מרבית השנה יאפשר קבלת תוצרת חקלאית עם ריכוז גבוה יחסית של פיטוכימיקלים פעילים, תכונה שתעלה את הערך השיווקי של המוצרים.

מטרות המחקר

מטרת המחקר היא להעלות את ערכה של התוצרת החקלאית המקומית ואת הביקוש לה על ידי אפיון, כימות ושיפור תכולת חומרי הבריאות הטבעיים.

מטרות משניות :

1. זיהוי זנים ותנאי גידול בהם תכולת החומרים נוגדי החמצון בתוצרת החקלאית המקומית גבוהה, כך שתוכל לשמש כמותג שיווקי אטרקטיבי.
2. לימוד תנאי האחסון המיטביים של הירקות והפירות, בצורתם הגולמית או לאחר עיבוד מזערי, לשימור התרכובות הפעילות.

מהלך המחקר

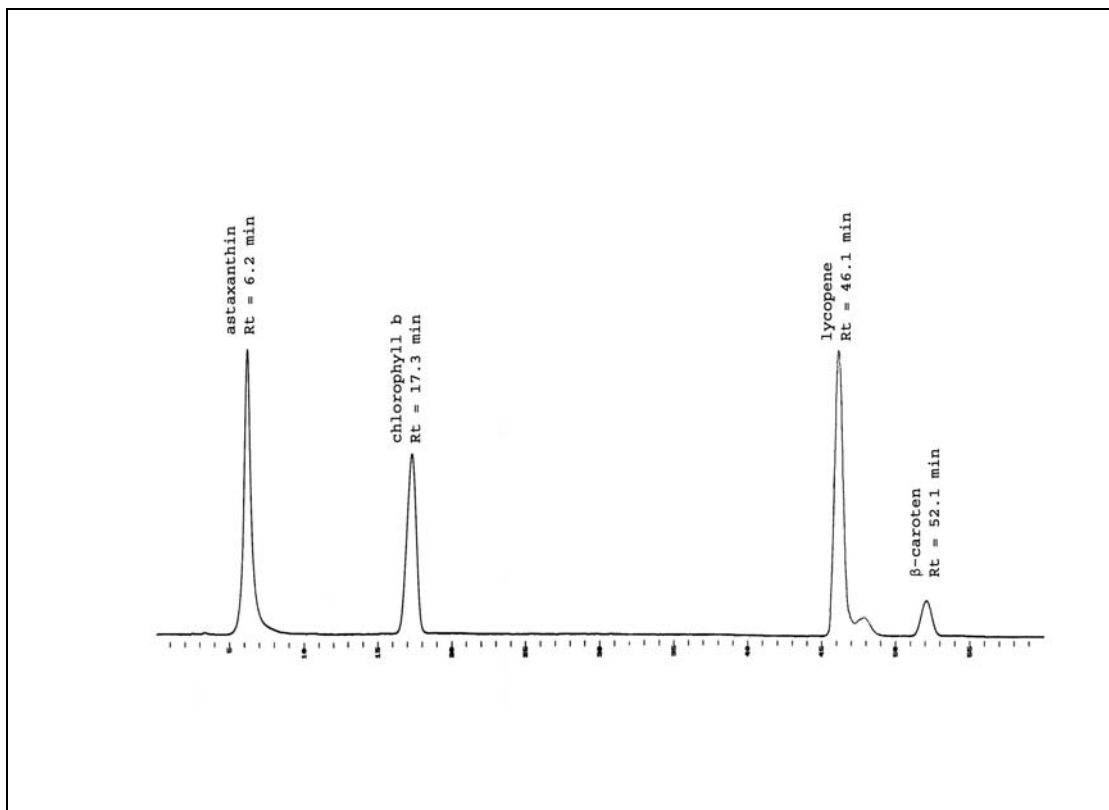
שנת המחקר הראשונה התמקדה בבחינה, בחירה והתאמה של שיטות לקביעה כמותית של פעילות נוגדת חמצון במקטע ההידרופילי של הרקמה ובמיץ ותכולת ליקופן במקטע ההידרופובי של רקמת הפרי. השיטות שנמצאו מתאימות ביותר (שיטות ספקטרוסקופיות ו-HPLC) שמשו למדידת פעילות נוגדת חמצון ותכולת ליקופן בעגבנייה ואבטיח.

פעילות נוגדת חמצון - בשיטה שנבחרה נמדד כושר רקמת הפרי או המיץ לחזר ברזל דו-ערכי (שיטת ה-FRAP Ferric Reducing Ability of Plasma) על פי (Benzie and Straino, 1996). השיטה מתבססת על יצירת הקומפלקס הצבעוני של ברזל תלת ערכי עם טריפירידילטריאזין (בליעה מקסימלית ב- 593 nm) לאחר חיזור הברזל הדו-ערכי ב-pH נמוך. הרקמה או המיץ מוצו ב-80% מתנול קר ותמיסת ויטמין C טרייה שימשה כסטנדרט. לכן, הפעילות הנוגדת חמצון (anti-oxidative capacity) שנמדדה בחומר הצמחי מבוטאת ביחידות של מ"ג ויטמין C ב-100 ג' חומר טרי.

ליקופן – הליקופן הוא קרוטנואיד אדום עם פעילות אנטי-אוקסידטיבית גבוהה ותרומה פוטנציאלית לבריאות (Gerster, 1997). למיצוי הפיגמנט נבחרה שיטה המשתמשת בכמויות מופחתות של ממסים אורגניים (Fish et al, 2002). הרכב תמיסת המיצוי היה הקסן/אצטון/אתנול/מים (0.25/4.75/5/10) בתוספת 0.01% BTH (butylated hydroxytoluene) כחומר משמר. שלבי הכנת הדגימה נעשו בטמפרטורת החדר, באור עמום ובכלים כהים. הפיגמנט התרכז בפאזה ההקסן, והמדידות בוצעו מיד עם הכנת המיצוי או לאחר שימורו ב-20°C. קביעה ספקטרוסקופית - נמדדה הבליעה של מיצוי הליקופן באורך גל של 503 nm (אמנם הבליעה המקסימלית של ליקופן בהקסן היא באורך גל של 471 nm, אך על מנת להימנע מתרומה אפשרית של β-קררוטן, נעשתה המדידה באורך גל יותר). לחישוב ריכוז הליקופן

נלקח ערך של $172,000 \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ כמקדם הבליעה ב- 503 nm של ליקופן בהקסן ומשקל מולקולרי של 536.9 .

קביעה ב- HPLC – הגישה שננקטה מבוססת על זו המתוארת על ידי Yuan and Chen (1998). נעשה שימוש במערכת HPLC (Merk Hitachi, LaChrom) עם קולונה ראשית וקולונה הקדמית מהסוג (Merk) Licosphere 100 RP-18. בליעת הפיגמנטים באורך גל של 470 nm נמדדה באמצעות גלאי UV (Merk Hitachi, LaChrom). הפרדת הפיגמנטים נעשתה על ידי הרצה בגרדיאנט שכלל את תמיסה A, שהרכבה דיכלורומתן/מתנול/אצטוניטריל/מים ביחסים נפחיים של 4.5: 5.5: 85: 5, ותמיסה B, שהרכבה דיכלורומתן/מתנול/אצטוניטריל/מים ביחסים נפחיים של 4.5: 45.5: 28: 22, בתנאים הבאים: 15 ד' תמיסה A, 20 ד' תערובת של תמיסות A ו-B בנפחים שווים ו- 25 ד' תמיסה B. טמפרטורת הקולונה הייתה 25°C וקצב הזרימה 1 מ"ל/ד' . באיור מס. 1 מוצגת כרומטוגרמה של תערובת שהוכנה מכמויות מדודות של β -קררוטן, ליקופן, כלורופיל b ואסטקסנטין ושימשה לזיהוי וכימות הליקופן במיצויים.



איור מס. 1: כרומטוגרמת HPLC של תערובת ידועה של פיגמנטים נקיים. הפאזה הניידת הייתה גרדיאנט של תמיסה A, דיכלורומתן/מתנול/אצטוניטריל/מים (4.5: 5.5: 85: 5, v/v), ותמיסה B, דיכלורומתן/מתנול/אצטוניטריל/מים (4.5: 45.5: 28: 22, v/v), כמפורט להלן: 15 ד' תמיסה A, 20 ד' תערובת של A ו-B בנפחים שווים ו- 25 ד' תמיסה B. טמפרטורת הקולונה הייתה 25°C וקצב הזרימה - 1 מ"ל/ד' .

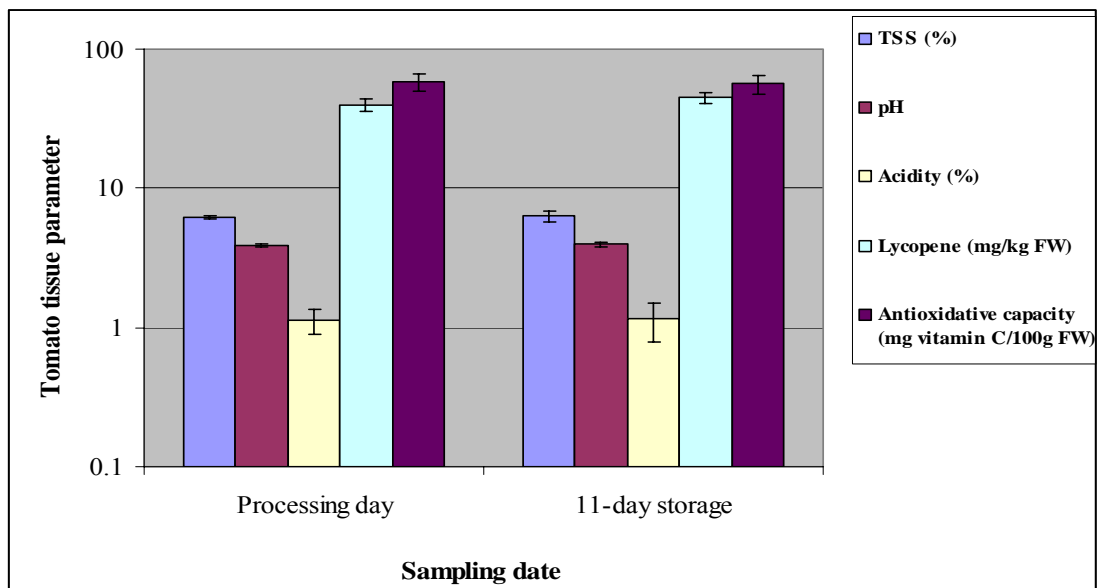
פעילות נוגדת חימצון ותכולת ליקופן בעגבניות "שריי"

פעילות נוגדת חימצון וליקופן נמדדו כמותית בעגבניית "שריי" (זן 636, הזרע) מגידול בהדלייה בחוות הניסיונות של המו"פ. כפי שניתן לראות מאיור 2, עם האדמת הפרי עולה תכולת הליקופן עד ערך מקסימלי של כ- 59 מ"ג לק"ג חומר טרי.



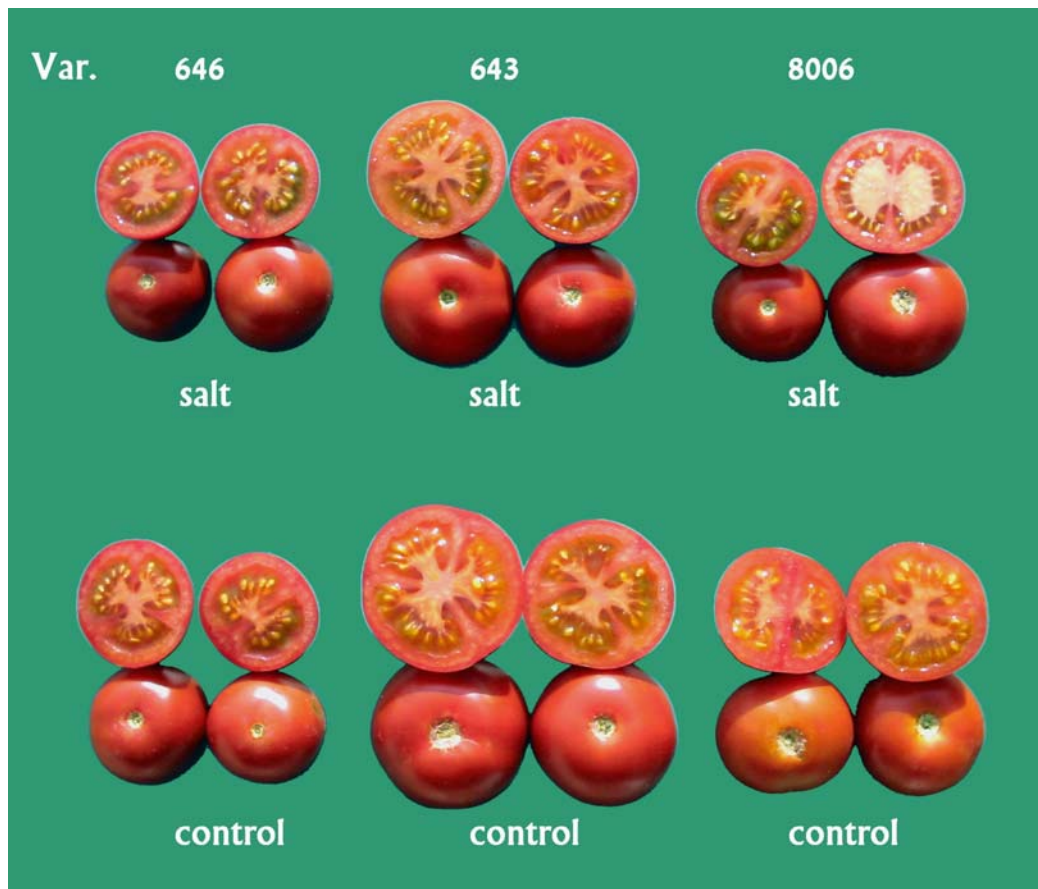
איור מס. 2: תכולת הליקופן בעגבניות "שריי" (זן 636, הזרע) בשלבי הבשלה שונים.

עגבניות בשלות אדומות (דרגת צבע 12) שמשו לבחינת השפעת עיבוד מינימלי ואחסון בקירור על מדדים כימיים. ערכי TSS, pH, חומציות, תכולת ליקופן ופעילות נוגדת חימצון נמדדו בעגבנייה חתוכה לרבעים ביום החיתוך ולאחר 11 ימי אחסון ב- 2°C -4. התוצאות מ-5 חזרות בלתי תלויות (5 קטיפים) מוצגות באיור מס. 3.



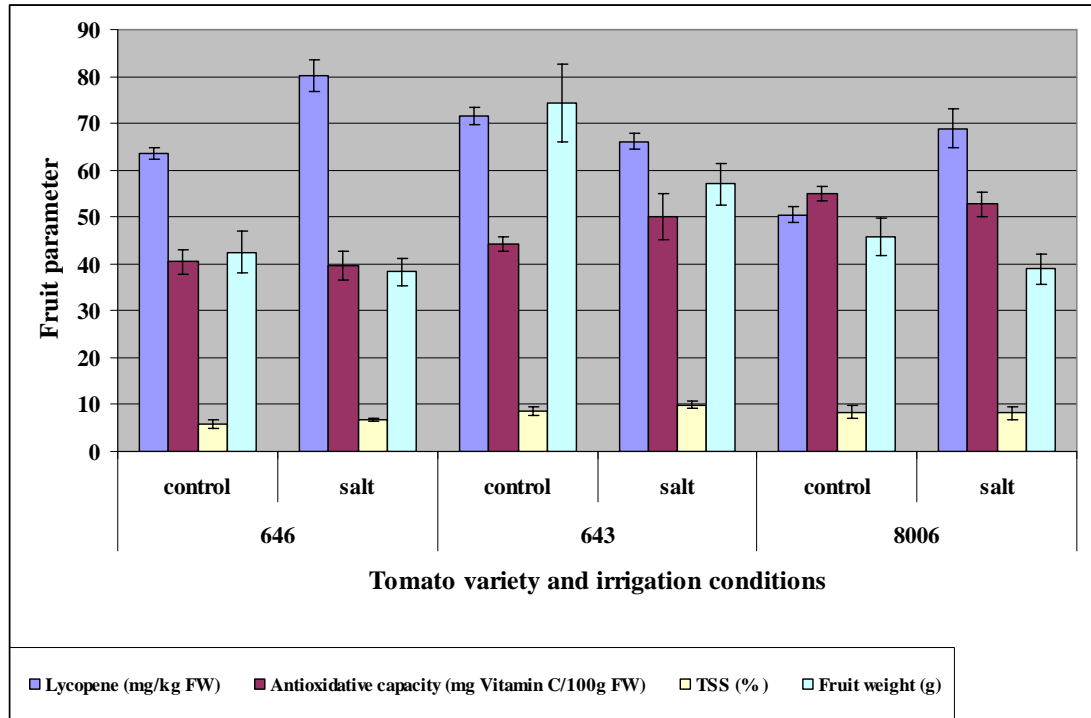
איור מס. 3: מדדים כימיים של עגבניות "שריי" (זן 636, הזרע) חתוכות לרבעים ביום החיתוך ולאחר 11 ימים ב- $4-2^{\circ}\text{C}$. התקבל שלאחר עיבוד מינימלי בתנאים סטריליים נשתמרו כל המדדים הכימיים למשך 11 ימים ב- $4-2^{\circ}\text{C}$.

נעשתה השוואה של משקל הפרי, TSS, תכולת הליקופן והפעילות האנטי-מחמצנת בין מספר זנים של עגבניות "שריי" (תרומתו הנדיבה של דר' אהוד קופלביץ) ונבחנה השפעת הגידול במים מליחים על מדדים אלה (המוליכות החשמלית בביקורת הייתה 3.5 ובטיפול ההמלחה-5.0). באיור 4 מוצגים פירות בשלים מייצגים של שלושת הזנים. ניתן להתרשם שבשלושת הזנים היה הפרי קטן יותר בטיפול ההמלחה.



איור מס. 4: פירות בשלים של שלושה זני עגבנייה מסוג "שריי" מהשקיה במי קו (control, EC3.5) ובמים מליחים (salt, EC5.0).

איור מס. 5 מסכם את מדדי הפרי בזנים השונים. בטיפול הביקורת תכולת הליקופן ליחידת משקל טרי של הפרי הייתה הגבוהה ביותר בזן 643. בזנים 646 ו-8006 נמדדה עלייה ניכרת בתכולת הליקופן בטיפול ההמלחה, במיוחד בזן 646. להמלחה לא הייתה השפעה משמעותית על הפעילות נוגדת חימצון של הפרי.



איור מס. 5: מדדים של פרי עגבניה מזני "שריי" שונים מהשקיה במי קו (control, EC3.5) ובמים מליחים (salt, EC5.0).

פעילות נוגדת חימצון ותכולת ליקופן באבטיח

באבטיח נעשו בדיקות הקדמיות בלבד. בבשר הפרי של אבטיח מזן 313 (הזרע) נמדדה פעילות נוגדת חימצון נמוכה, האקוויולנטית ל- 9.8 ± 1.6 מ"ג ויטמין C ל-100 ג' חומר טרי. תכולת הליקופן הייתה 40.8 ± 0.2 מ"ג לק"ג חומר טרי. שני המדדים פחתו בכ- 25% לאחר אחסון הפרי החתוך למשך 8 ימים ב- $4-2^{\circ}\text{C}$. טיפול במעכב האתילן (1-MCP (1-methylcyclopropene) (בריכוזים של 0.5 ו-1 ppm) למספר שעות לפני העיבוד לא השפיע על יציבות מדדי הפרי במשך האחסון.

בהמשך יורחב המחקר גם לגידולים מקומיים נוספים, כגון, מילון ופלפל, בהקשר לפעילות נוגדת חימצון ותכולת β -קרופן במילון. תילמד השפעת משך ותנאי האחסון של הפרי השלם על תכולת ופעילות חומרי הבריאות הטבעיים. במקביל, תבחן רגישות החומרים לעיבוד מזערי (חיתוך וסחיטה) של הפרי, ואחסון הפרי המעובד בקירור. בשלב מאוחר יותר של המחקר תיבדק השפעת תנאי הגידול (עקות מלח ויובש, תוספת סידן, הצללה) על תכולת החומרים נוגדי החמצון בפירות מהזנים המועדפים.

References

- Arab, R and Steck, S (2000) Lycopene and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1691S-1695S.
- Benzie, IFF and Straino, JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Collakova, E and DellaPenna, D (2003) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol.* 133: 930-940.
- Dixon, RA and Sumner, LY (2003) Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* 131: 878-885.
- Fish, WW, Perkins-Veazie, P and Collins, JK (2002) A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *J. Food Comp. Anal.* 15:309-317.
- Gerster, H (1997) The potential role of lycopene for human health. *J. Am. College Nutr.* 16: 109-126.
- Giovannucci, E, Ascherio, A., Rimm, EB, Stampfer MJ and Willett, WC (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 87: 1767-1776.
- Giovannucci, E, Rimm, EB, Liu, Y and Stampfer MJ (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J. Natl Cancer Inst.* 94: 391-398.
- Havaux, M, Bonfils, J, Lutz, C and Niyogi, K (2000) Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf development stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* 124: 273-284.
- Klein, BP and Perry, AK (1982) Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *J. Food Sci.* 47: 941-945.
- Lee, SK and Kader, AA (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Tech.* 20: 207-220.
- Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TIPS* 7: 405-410.
- Munne-Bosch, S and Alegre, L (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31-57.
- Rao, AVR and Agrawal, S (2000) Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 563-569.
- Somers, GF and Beeson, KC (1948) The influence of climate and fertilizer practices upon the vitamin and mineral content of vegetables. *Adv. Food Res.* 1: 291-324.
- Yuan, J-P and Chen, F (1998) Chromatographic separation and purification of *trans*-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3371-3375.