

היבטים פיסיוולוגיים, רמות נוטריאנטים ופעילות אנטי-פרוליפראטיבית

כנגד תאי סרטן בפלפלים חריפים ומתוקים (השוואת דישון אורגני

לקונבנציונאלי)

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה על שם רוברט ה. סמית של

האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר

"מוסמך למדעי החקלאות"

מגיש

אוסיד גרה

דצמבר 2013

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

פרופ' אלעזר פליק ו**ד"ר ענת אלמן**

במכון לחקר אהסון ואיכות תוצרת חקלאית ומזון, מינהל המחקר החקלאי,

מרכז וולקני, בית דגן.

תודות

להורי למשפחתי וארוסתי היקרים שתמכו בי במהלך הלימודים
לענת אלמן ואלי פליק על הנחייתם ועזרתם הרבה בעבודת מחקר זו.
לצוות המעבדה שרון יעקב תמר ואלונה על הנכונות לעזור במהלך המחקר
תודה מקרב לב למירי רינדנר על העזרה והתמיכה במהלך העבודה
תודה רבה.

2	תקציר
5	קיצורי מילים
6	מבוא
6	גידול באגרוטכניקות שונות
7	אחסון פלפל והובלתו
8	פלפל חריף (Hot Pepper) וקפסאיצין
8	חומרים בעלי ערך בריאותי בפלפל
10	מחלת הסרטן
11	שורות תאי הסרטן ששימשו בעבודה זו
12	היפותזת המחקר
12	מטרות העבודה
12	שיטות וחומרים
14	מקורות הפלפל
14	טיפול ראשוני בפלפלים מתוקים
14	מדדי איכות
15	הכנת הפלפלים לבדיקות הביוכימיות
15	בדיקת פוליפנולים
16	קביעת חומצה אסקורבית (ויטמין C)
17	בדיקת פלבנואידים
17	בדיקת אנטי-אוקסידנטים
18	בדיקת קפסאיצין
19	הכנת מיצויים לבדיקת פעילות אנטי סרטנית
19	בדיקת פרוליפרציה בתאים סרטניים
20	בדיקת פרוליפרציה בתאים הומאניים (NHDF) שאינם סרטניים
21	ניתוח סטטיסטי של הנתונים
22	תוצאות
22	מרכיבים תזונתיים בפלפלים מתוקים שגודלו בבקעת הירדן
31	מרכיבים תזונתיים בפלפלים מתוקים שגודלו בשפלה
33	מרכיבים תזונתיים בזני פלפל חריף שונים
41	השפעת תמציות פלפל חריף על חלוקת תאי סרטן ממערכת העיכול
47	השפעת תמציות פלפלים מתוקים על חלוקת תאי סרטן ממערכת העיכול
51	דיון ומסקנות
58	ספרות

תקציר

פרי הפלפל, על צבעיו וזניו הרב גוניים, מהווה את אחד מירקות הפרי החשובים ביותר בתזונת האדם, בעיקר בארצות מפותחות, אך גם בארצות מתפתחות. הצריכה השנתית של פלפל בישראל בשנתיים האחרונות הסתכמה בכ-190 אלף טונות, כאשר פרי הפלפל הנו השני בחשיבותו כמוצר ייצוא לאחר תפוחי אדמה. בשנים אלו יוצאו כ-130,000 טונות לאירופה וצפון אמריקה, בעיקר בהובלה ימית (אחסנה ממושכת). סך כל הצריכה העולמית של פלפל מוערכת בכ-27 מיליון טונות.

צריכת הפלפל הינה גבוהה בארץ ובעולם מאחר והפלפלים עשירים במרכיבים תזונתיים שונים (פוליפנולים, פלבנואידים, ויטמינים, מינרלים וכו'). למרכיבים אלו תכונות משפרות בריאות והם מעורבים במנגנוני הגנה של גוף האדם מפני מחלות שונות. מחלת הסרטן הינה גורם התמותה השני בעולם המערבי. מידע מדעי מצטבר מצביע על כך שלתזונה עתירת נוגדי חמצון (אנטיאוקסידנטים) תפקיד חשוב במניעת מחלת הסרטן. בהשוואה לירקות אחרים, הפלפל, בעיקר האדום, מכיל רמה גבוהה של נוגדי חמצון, הנובעת, בין היתר, מנוכחותם של קפסאיטים והידרוקפסאיטים - חומרים שהראו אפקטים אנטי סרטניים, הן בתנאי מעבדה והן בבדיקות בבעלי חיים.

למיטב ידיעתנו, לא נערך עד כה- בארץ או בעולם - מחקר שהשווה את הפעילות האנטי-סרטנית בין זני פלפל שונים, התרבותיים והבר, הגדלים בשיטות אגרוטכניקה שונות (אורגני מול קונבנציונאלי), באזורי גידול שונים. כמו כן, לא נערך מחקר שבדק את השפעתם (הורדה/העלאה) של טיפולים שלאחר הקטיפה ואחסנה ממושכת על רמת הנוטריינטים והפעילות האנטי-סרטנית שבפרי.

מטרות המחקר הן להשוות את איכותם החיצונית ופנימית והמרכיבים התזונתיים של זני פלפל לפני ולאחר הקטיפה והאחסנה, הגדלים בשיטות אגרוטכניות שונות (רגיל ואורגני), ולבחון את רמת הפעילות האנטי-סרטנית של זנים תרבותיים וזני בר, מטיפוסים וצבעים שונים. מדדי האיכות שנבדקו היו תכולת סוכרים, חומצות, אנטיאוקסידנטים, פלבנואידים, פוליפנולים, ויטמין C, איבוד משקל, מוצקות, פגמים, וריקבון של הפירות לאחר תקופת אחסנה של שבועיים עד שלושה. במקביל, נבחן הפוטנציאל האנטי-סרטני של תמציות הפלפל, מיד לאחר הקטיפה, ובתום תקופת האחסנה ב-7 מ"צ וחיי מדף (20 מ"צ) על ידי מדידת פרוליפראיית תאי סרטן, האופיינית לתהליך הסרטני. בניסויים השתמשנו בתאי סרטן משני סוגים: תאי כבד הומאניים (HepG2), תאים בהם הודגם בעבר האפקט האנטי-סרטני של הפלפל האדום, ותאי מעי הומאניים (HCT116). השפעת המיצויים על חלוקת תאי הסרטן הושוותה להשפעתם על חלוקת תאי עור בריאים (NHDF) ששימשו במהלך המחקר כתאי ביקורת.

הפירות שנקטפו הובאו למחלקה לאחסון ובאותו יום נשטפו במים חמים ומברשות על פי ההמלצות. חלק מהפירות נלקחו למעבדה מיד לאחר הקטיפה והשטיפה לבדיקות איכות והכנת מיצויים, ושאר הפירות אוחסנו בקירור ב-7 מ"צ למשך 14 ימים ועוד 3 ימים ב-20 מ"צ (הדמיה של משלוח ימי וחיי מדף). איכותם החיצונית, הפנימית והביוכימית-בריאותית נבדקה כפי שצוין לעיל.

בעונת הגידול הראשונה (פלפל שנקטף מבקעת הירדן) שנבחנה בה השפעת הדישון האורגני, בהשוואה לקונבנציונאלי על הפלפלים המתוקים (אדום וצהוב), נמצא כי הדישון האורגני שמר על רמת

נוטריינטים דומה לגידול הקונבנציונאלי בשני הזנים: האדום והצהוב, במקביל עם שמירה על איכות הפרי וההופעה שלו. הזן האדום הראה רמת פלבונואידים גבוהה בכ-50% עד 80% מהזן הצהוב, בכל הטיפולים (טרי, מאוחסן, קונבנציונאלי ואורגני). מאידך, בפלפל הצהוב נצפתה רמת אנטי-אוקסידנטים גבוהה בכ- 15% יותר מרמת האנטי-אוקסידנטים בפלפל האדום, הן כפרי טרי והן כפרי מאוחסן. בבדיקות האחרות לא היה הבדל בין הזן האדום לצהוב.

בעונה השנייה נבדקה השפעת האחסון על איכות הפרי ותכולת הנוטריינטים בשלושה זני פלפל מתוק (אדום, צהוב וכתום) שנקטפו מחממה באזור השפלה. התוצאות שהתקבלו דומות במידה רבה לתוצאות של העונה הראשונה מבחינת רמת הנוטריינטים, כך שלא הייתה השפעה לאזור הגידול על איכות התוצרת.

בבדיקת הפעילות האנטי-סרטנית של פלפלים מתוקים נבחנה השפעת המיצויים מהזנים האדום והצהוב על חלוקת תאים סרטניים משני סוגים: סרטן הכבד (HepG2) וסרטן המעי (HCT116) ועל חלוקת תאי ביקורת נורמאליים (NHDF). מהתוצאות עולה כי מיצוי מפלפל אדום (שדושן אורגנית או קונבנציונאלית) מעכב ספציפית את חלוקת תאי סרטן המעי HCT116 (אך לא את תאי סרטן הכבד HepG2) באופן משמעותי יחסית לתאים נורמאליים NHDF. לעומת זאת מיצוי באותו ריכוז מהזן הצהוב האורגני פגע באופן לא ספציפי הן בחלוקת התאים הנורמאליים (NHDF), והן בחלוקת תאי סרטן הכבד (HepG2) והמעי (HCT116). מחקר זה הראה כי דישון אורגני מתאים לגידול פלפל צהוב מבחינת האיכות ורמת המרכיבים בפרי הטרי והמאוחסן. עם זאת, מיצוי מפלפלים אלו פגע בפרוליפרציה של שורת תאים נורמאליים, וכדי לברר את הנושא יש לבצע בדיקות חוזרות בעונות נוספות.

במטרה לבחון את השפעתם של זני פלפל חריף שונים על חלוקת תאי סרטן, נבחנו עשרה זני בר בעונת הגידול 2012. הזנים גודלו בחממה במכון וולקני בתנאים המיטביים. נבדקה איכות הפלפלים החריפים הטריים וגם המאוחסנים, ונמצא כי קיימת שונות מובהקת בין הזנים בכל המדדים (איבוד מים, רמת סוכר, ויטמין C, פוליפנולים וכו'). בכל זני הפלפל החריף שנבדקו, נמדדו רמות גבוהות של אנטיאוקסידנטים, פוליפנולים ופלבונואידים, בעוד שרמות הוויטמין C שנמדדו היו נמוכות בהשוואה לאלו שבפלפלים מתוקים. עם זאת, לא נמצאה קורלציה בין רמת הפעילות האנטי-פרוליפריטית של זני הפלפל החריף לבין רמותיהם של הנוטריינטים השונים. נמצאו שלושה זנים מובילים בעלי פוטנציאל אנטי-סרטני ספציפי – 1745 (טרי בלבד), 1232 (מאוחסן בלבד), וזן 1072 (טרי ומאוחסן). בהשוואה לשאר הזנים שנבדקו, הזן 1745 היה הבולט ביותר מבחינת איכותו ופעילותו האנטי-פרוליפריטית כלפי תאי סרטן המעי (HCT116) ותאי סרטן הכבד (HepG2). זן זה מאבד מים בכמות הנמוכה ביותר והוא בעל רמות האנטיאוקסידנטים, הפלבונואידים והקפסאצין הגבוהות ביותר. יש לציין כי רמת הוויטמין C בזן זה הייתה הנמוכה ביותר בהשוואה לכל זני הפלפל החריף. בנוסף לזן זה, בלטו זן 1072 (טרי ומאוחסן) שעכב את חלוקת תאי סרטן המעי (HCT116) ללא פגיעה בחלוקת התאים הבריאים (NHDF), וזן 1232 (מאוחסן בלבד) שעכב הן את חלוקת תאי סרטן המעי (HCT116) והן את חלוקת תאי סרטן הכבד (HepG2).

מתוצאות מחקר זה עולה כי מיצויים מפלפלים חריפים (זנים 1745, 1232, ו-1072) ומתוקים (אדום) מעכבים ספציפית את חלוקתם של תאי סרטן המעי (HCT116) והכבד (HepG2) וזאת - מבלי לפגוע בחלוקת תאים נורמאליים (NHDF). עם זאת, יש לציין כי הריכוז הנדרש להשגת אפקט אנטי-פרוליפטיבי גבוה בפלפלים אדומים מאשר בזנים המובילים של פלפלים חריפים.

התוצאות שהתקבלו, יוכלו להוביל למיתוגו של זן (זנים) פלפל מוביל המתאים לשמש כמזון פונקציונאלי ולהשתלב בתזונה המיועדת למניעה/טיפול במחלת הסרטן – מחלה המוכרת לרב הציבור. בנוסף, יוכלו זנים אלו לשמש כמקור לפיתוח תרופה חדשה לטיפול בסרטן. זנים אלה, ובעיקר זני הבר, בשילוב עם שיטות אגרוטכניקה שונות, יוכלו אף לשמש כחומר גנטי להשבחה עתידית לשם העלאת הפעילות האנטי-סרטנית. ניתן להניח כי הגברת המודעות הציבורית לתכונות האנטי-סרטניות של הפלפל תאפשר שיווקו כמותג, תביא להרחבת שטחי הגידול שלו ולעליה במכירותיו.

קיצורי מילים

ג' = גרם

מ"ג = מיליגרם

מיק"ג = מיקרוגרם

מיק"ל = מיקרוליטר

מ"צ = מעליות צלסיוס

סל"ד = סיבובים לדקה

ס"מ = סנטימטר

מבוא

פרי הפלפל (*Capsicum annuum* L) הינו ירק חד שנתי השייך למשפחת הסולנניים, מקורו מדרום אמריקה, והוא הגיע לספרד בסוף המאה ה-15. כיום ידועים כ-20-30 מינים בסוג זה הגדלים באזורים שונים בעולם בהתאם לתנאי האקלים (Pruthi, 1980), כאשר המין החשוב ביותר מבחינה כלכלית הנו *Capsicum annuum*, הכולל מגוון רחב של זנים חקלאיים, ומשמש לצריכה היומית שלנו. הפלפל הנו הפרי החשוב ביותר שמיוצא כיום לאירופה וארצות הברית, לאחר תפוחי אדמה. פרי הפלפל גדל בכל רחבי הארץ בממשקי גידול שונים. עקב חשיבותו המסחרית, שטחי הגידול מתרחבים, שיטות הגידול משתכללות והשימוש בזנים חדשים מתרחב לזנים יותר איכותיים ועמידים לתנאי גידול שונים.

גידול באגרוטכניקות שונות

איכות הפלפל ותכולת הפיטונוטריינטים שבו מושפעים מתנאי הגידול (דישון, השקיה וטיפולים בשדה) ומתנאי האחסון. החקלאות האורגנית צומחת בקצב מהיר במדינות מפותחות, מאחר ויש לה פוטנציאל לייצור מזון בריא ולהפחתת הנזק הסביבתי הנגרם על ידי שיטות גידול קונבנציונאליות (Woese et al., 1997). גידולים שונים בשדה דורשים כמויות שונות של מאקרו ומיקרו-אלמנטים שנמצאים בדשנים השונים (קונבנציונאלי ואורגני), כאשר לכל צורת דישון יתרונות משלה. לדישון קונבנציונאלי השפעה מיידית על הצמח, ולעומתו, הדשן האורגני נאגר באדמה, קצב התפרקותו איטי והשפעתו איטית לאורך העונה. הביקוש הגבוה לתוצרת אורגנית נובע בחלקו מהתפישה בקרב הצרכנים שגידול אורגני מביא לפרי איכותי יותר, ידידותי לסביבה, עשיר במרכיבים תזונתיים ובריא. כיום, יותר ויותר צרכנים מוכנים לשלם מחירים גבוהים עבור תוצרת אורגנית והוויכוח על איכותה ובטיחותה של תוצרת חקלאית אורגנית לעומת תוצרת קונבנציונאלית התעצם. כתוצאה מכך, מחקרים רבים ניסו לקבוע האם יש הבדלים משמעותיים בכמות היבול ואיכותו ובין גידול אורגני לקונבנציונאלי. מחקרים בודדים בלבד עסקו בהשוואה בין ההרכב התזונתי של פרי שגדל בשיטה האורגנית לעומת הקונבנציונאלית. מחקרים שונים הראו תוצאות לא עקביות לגבי תכולת המינרלים ומרכיבים נוספים בפירות שדושנו בממשקים שונים (אורגני מול קונבנציונאלי). לכן אין העדפה חד משמעית לאופן דישון אחד על האחר (Herencia et al., 2011). לדוגמא, לאופני דישון שונים לא הייתה השפעה משמעותית על ריכוז הקרוטנואידים בגזר לאורך עונת הגידול (Soltooft et al., 2011) ועל רמת החומצה האסקורבית באגס, אולם אופני דישון שונים הביאו לעליה נמוכה אך מובהקת סטטיסטית באפרסק (Carbonaro et al., 2002).

בחלק מהמחקרים נמצא כי גידולים אורגניים מכילים יותר מינרלים ופחות פיטונוטריינטים מאשר גידולים רגילים (Bourn et al., 2002). יתרה מזאת, מחקרים שבדקו רמות מינרלים הראו השפעות שונות של אופן הדישון על רמותיהם של מינרלים שונים. לדוגמא בגידולים אורגניים כמות הברזל, המגנזיום והזרחן גבוהה משמעותית בהשוואה לגידול קונבנציונאלי, לעומת כמות נמוכה משמעותית של ניטראט וויטמין C

יחסית לגידול קונבנציונאלי (Warman et al., 1997, 1998). בספרות המדעית ישנם גורמים המקשים על השוואת איכות הפרי המתקבל בשתי שיטות גידול. למשל, ביטוי משקל הפרי (על בסיס יבש או על בסיס טרי) מוביל לחישובים שונים של ערכו התזונתי של המזון מאחר וגידולים אורגניים מכילים יותר חומר יבש מגידולים קונבנציונאליים (Woesel et al., 1997). מכל הבדיקות שבוצעו, ולמרות השינויים המובהקים בכמה פרמטרים, הגיעו החוקרים למסקנה שההבדל בין שתי שיטות הגידול קטן, ואין יתרון לאחת השיטות מבחינת ההשפעה על רמות המרכיבים התזונתיים של הפרי. לעומתם, מחקרים אחרים טענו שכדי שהשוואה בין תוצאות שתי השיטות תהיה תקיפה יש צורך לגדל בתנאים דומים (אקלים, עיבוד קרקע, טמפ', לחות וכיו"ב) בשתי השיטות למשך כמה עונות בכדי שהיכול יחזור על עצמו (Kumpulainen, 2001).

אחסון פלפל והובלתו

פרי הפלפל מהווה כיום את גידול הירק החשוב ביותר שמייצאים חקלאי ישראל לאירופה וארצות הברית בהובלה ימית שנמשכת בין שבועיים לשלושה שבועות בהובלה ימית. זמן ההובלה הארוך דורש תנאים מיטביים במהלך ההובלה כדי לשמור על טריות ואיכות המוצר שמגיע לצרכן וגם כדי למנוע איבוד מים והתפתחות עובשים, שמשמעותם הפסד כלכלי. בתנאי אחסון אופטימאליים (7 מ"צ ולחות של כ-95%), הפרי שומר על כמות גבוהה של מרכיבים תזונתיים, ובמיוחד פוליפנולים, במשך תקופת האחסון, לעומת אחסון ב 4 מ"צ, המביא לירידה ולעיכוב בייצור אותם המרכיבים (Raffo et al., 2008). הפלפל שנשלח ברובו לאירופה וארה"ב דרך הים, מאוחסן לתקופה של שבועיים עד שלושה בתנאים המיטביים לפרי (Maalekuu et al., 2003, 2004). טמפ' זו מאיטה את התכלותו הפסיולוגית של הפרי, אך אינה מונעת אותה, בעיקר בגלל איבוד מים (Maalekuu et al., 2005). התכלות פתולוגית, כתוצאה מהתפתחות הפטריות במהלך האחסון מעוכבת גם כן אך אינה נמנעת וגורמת לנזקים והפסדים גבוהים (Ceponis et al., 1987).

על אף שתנאי האחסון אינם מעכבים לגמרי התפתחות ריקבון במהלך תקופת האחסון, עדיין נשמרת איכות ומבנה יציב המאפשר לשווק את התוצרת לאחר אחסון והובלה. לפרי הפלפל שטח פנים גדול יחסית, ולכן מצטברים על פניו מגוון נזקים שנחשבים לגורם המרכזי המגביל את תקופת האחסון. הריקבון הנגרם על ידי שתי פטריות עיקריות *Botrytis cinerea* ו-*Alternaria alternata* שצבען אפור ושחור, בהתאמה (Barkai-Golan, 1981), הריקבון גורם לפסילת הפרי שאינו עומד בדרישות לשיווק ויצוא, ולכן פותחה שיטת ניקוי המסלקת את המזיקים ומאפשרת פרי איכותי יותר שניתן לאחסנו לתקופה ממושכת כך שיהזיק מעמד בתקופת השיווק בלי שינוי בתכונותיו הפיסיקליות השונות. שיטה זו משלבת שטיפת הפרי במים חמים (55 מ"צ) תוך כדי ניקוי במברשות (Fallik et al., 1999). שיטה זו נחשבת כיעילה ומהירה מאחר, ובו זמנית, הפרי עובר ניקוי וחיטוי, תהליך המאפשר שמירה על איכות פרי גבוהה, בתנאי אחסון אופטימאליים למשך תקופת ההובלה. אבל באופן כללי גם תנאי אחסון אחרים גרמו לשיפורים ברמות שונות בזני פלפל שונים, והאטו התכלות פסיולוגית (Ceponis et al., 1987).

איבוד מים וירידה במוצקות הפרי מהווים את הגורם המגביל לאחסון ושיווק הפלפל לתקופה ממושכת (Maalekuu et al., 2005).

פלפל חריף (Hot Pepper) וקפסאיצין

פלפל חריף הינו צמח טרופי חד שנתי השייך לסוג *Capsicum spp* ממשפחת הסולניים, ומגדלים אותו בעיקר בדרום אמריקה, במקסיקו ובמדינות שונות במזרח אסיה. פלפל החריף יש מגוון רחב של זנים הנבדלים בצבעם, צורתם וחריפותם, ומשתמשים בהם בדרך כלל לייצור תבלינים ורטבים המשמשים במטבח האסייתי והמקסיקני. ההרכב הכימי של פלפל חריף נחקר ביסודיות, והוא מכיל ויטמינים (B, E, C), β -קרואטין, קרוטנואידים, פוליפנולים, פלבנואידים, קפסאיצינים ופיגמנטים שונים (Conforti et al., 2007).

חריפותו של פרי הפלפל החריף נובעת מ-12 תרכובות שונות, אך כ-90% מהחריפות נגרמת ע"י תרכובת פנולית הנקראת קפסאיצין. ריכוז הקפסאיצין ברוב זני הפלפל החריף נע בין 0.003-0.01%, כאשר בזנים של צ'ילי קל הריכוז מגיע עד 0.5% ובצ'ילי חזק מגיעים לריכוז של 1% (Perucka et al., 2000). רמת החריפות של פלפלים ומזונות חריפים נמדדת במבחן סקוויל (Scoville Test), כאשר הסקאלה במבחן זה נעה בין הערכים Scoville Heat Units (SHU) 0 – 15,000,000. לפלפל הגמבה המתוק ערך 0 SHU, לרוטב הטבסקו החריף ביותר ערך של 8000 SHU ואילו ערכו של קפסאיצין טהור הינו 15 SHU מיליון.

קפסאיצין ($C_{18}H_{27}NO_3$) הינה תרכובת אורגנית שומנית, שהופקה לראשונה מפלפל חריף בשנת 1816 ונחקרה רבות בשל מאפייניה הטוקסיקולוגיים והתרופתיים. קפסאיצין משמש את הצמחים ופירותיהם כאמצעי הגנה מפני אכילה טרם הבשלה. לקפסאיצין מספר פעילויות ביולוגיות כגון הגברת חדירת הנתרן והאשלגן לתאי עצב, המובילה להעברת אות זהה לזה המועבר בגירוי התא על ידי חום (Caterina et al., 1997). מחקרים הראו כי לקפסאיצין יכולת למניעת התפשטות תאי סרטן באמצעות עיכוב שגשוג התאים ותמותה מתוכננת (אפופטוזיס). פעילויות אלו נובעות מהגברת ביטוי גנים האחראיים למנגנון האפופטוזיס בתא ומהעלאת ריכוזי הסיידן וה- Reactive Oxygen Species (ROS) בתאים אלו (Lee et al., 2000).

חומרים בעלי ערך בריאותי בפלפל

הפלפלים זמינים בשווקים בצבעים שונים: ירוק (לא בשל), צהוב, כתום ואדום. הפלפל הירוק הינו פרי הבוסר אשר עם הבשלתו והתפרקות הכלורופיל שבו חל שינוי הדרגתי והוא מקבל את צבעו הבשל (צהוב, אדום, כתום וכיו"ב).

הצבעים השונים של פרי הפלפל נובעים ממגוון הפיגמנטים והשוני בכמות הפיטונוטריינטים. הקרוטנואידים והפלבנואידים מקנים לפרי את צבעו הכתום-אדום כתוצאה מסינתזה מוגברת של הקרוטנואידים קפסנטין, קפסורבין וקפסנטין 5,6- אפוקסיד בזמן הבשלת הפרי. לעומתם, הכלורופיל מקנה צבע ירוק לפלפל. צבעו של הפרי הצהוב נובע כתוצאה ממוטציית חסר באנזים קפסנטין

קפסורבין סינטאז (Lefebvre et al., 1998). עיקר הצבע נובע מנוכחות אנתראקסנטין וויאלקסנטין, אולם בנוסף, נוכחים מרכיבים נוספים כגון α -ו- β קרוטן, לוטאין ו- β קרפטוקסנטין (Howard et al., 2000). מלבד השוני בצבע, דווחו בספרות המדעית הבדלים בערכם התזונתי של פלפלים בצבעים שונים, דוגמת כמות הוויטמין C, הפוליפנולים והאנטיאוקסידנטים שונים (Frank et al., 2001). פרי הפלפל הוא מקור חשוב לחומצה אסקורבית (ויטמין C), נוגדי חמצון, פוליפנולים, פלבנואידים, קרוטנואידים ומרכיבים אחרים בעלי חשיבות שונה לפרי ולבריאות האדם (Faria et al., 2006; Howard et al., 2000). לפרי הפלפל תכולת ויטמינים ומינרלים עשירה המעניקה לו תכונות בריאותיות רבות (Frank et al., 2001). הקרוטנואידים, הפלבנואידים והפגמנטים שהוא מכיל מיוצרים במהלך הגידול וריכוזם מושפע מרמת ההבשלה, הזן ותנאי הגידול (Howard et al., 1994; Lacan et al., 1996). לפי המידע שהצטבר עד היום, לצריכת פירות וירקות עתירי נוגדי חמצון יש תפקיד חשוב במניעת או עיכוב עקה חמצונית – מצב בו הגורמים המחמצנים רבים ממה שהגוף מסוגל לנטרל (Youdim et al., 2002). עקה חמצונית עלולה להזיק ברמה תאית ומערכתית ולגרום אפילו לתמותת תאים בשל חמצון שומנים, חלבונים וחומצות גרעין (Dalle Donne et al., 2005).

גוף האדם מצויד במערכת הגנה נוגדת חמצון המנטרלת רדיקלים חופשיים פעילים. אנזימים נוגדי החמצון המיוצרים בגוף יחד עם נוגדי חמצון מהמזונות תפקידם לספוג את כל עודף הרדיקלים החופשיים בגוף, הפיכתם למולקולות לא מזיקות שניתן לפרק אותן במטבוליזם. נוגדי החמצון הינם רכיבים פונקציונליים של המזון שיש להם יתרונות בריאותיים בגוף (Obloh, 2005). פוליפנולים ופלבנואידים הינם נוגדי חמצון בעלי פוטנציאלי להגן על תאי גוף כנגד הנזק שנגרם על ידי רדיקלים חופשיים (ROS). חלק גדול מהפעילות הנוגדת החמצון של פירות וירקות קשורה לרמות הפוליפנולים בפרי ולא רק לתכולת ויטמין C שלהם, כיוון שמחקרים רבים הראו שלפוליפנולים פוטנציאל נוגדי חמצון גבוה יותר מויטמין C (Mimica-Dukic, 2005; Obloh, 2005; Obloh, et al., 2004). פוליפנולים טבעיים משפיעים בצורה מיטבית על הבריאות על ידי הפעילות האנטי אוקסידנטית שלהם. תרכובות אלה הן מסוגלות להסיר רדיקלים חופשיים, להפעיל אנזימי α -טוקופרול נוגדים חמצון להפחתת רדיקלים ומחמצנים אחרים (Amic et al., 2003; Obloh, 2006).

מגוון הפיטונוטריאנטים בפרי הפלפל כגון ויטמינים (C, E ופרו-ויטמין A), קרוטנואידים, פוליפנולים ופלבנואידים חשובים לקיום תהליכים ביולוגיים תקינים בגוף ולבריאות האדם. תרכובות אלו, המצויות בכמויות קטנות במזונות שונים יכולים להפחית תגובות חמצון מזיקות בגוף האדם. לכן צריכת פלפלים במינון קבוע מעלה את ריכוז נוגדי החמצון בגוף ועשויה למנוע מחלות ונזקי גוף הקשורים לחמצון של רדיקלים חופשיים, דוגמת מחלות סרטן, לב, כלי דם והפרעות נוירולוגיות (Harborne et al., 2000; Bramley, 2000).

ויטמין C (חומצה אסקורבית) מצוי בפירות וירקות טריים רבים. הקבוצות ההידרוקסיליות שלו מקנות לו הידרופיליות גבוהה כך שהוא נמס במים אך גם מתחמצן בקלות באוויר. ויטמין C ($C_6H_8O_6$), בודד לראשונה בשנת 1922 על ידי אלברט סנט גיירגי מפירות פפריקה ובלוטת יותרת הכליה. ויטמין C רגיש לאור ולתהליכי העיבוד השונים של המזון. קביעת ויטמין C מדויקת הינה משמעותית הן כדי

לאמוד את הערך התזונתי של המזון והן כאינדיקציה חשובה למידת התרחשותם של תהליכי חמצון והשחמה (Carr et al., 1999).

פוליפנולים הינם תרכובות אורגניות ארומטיות, המורכבות מטבעת ארומטית (בנזן), קבוצה הידרוקסילית (OH), וקבוצות אטומים שונים הקשורים לטבעת הבנזן. הפוליפנולים העיקריים בפלפלים הם הפלבנואידים ונגזרות של חומצה הידרוקסיצינאמית (Howard et al., 2000; Marín et al., 2004; Jeong et al., 2011). פוליפנולים אינם מסונתזים בגוף, ולכן יש לספק אותם לגוף דרך המזון. הם נוצרים על ידי עצים וצמחים, ומשמשים כאמצעי הגנה מפני אכילת עליהם בידי בעלי החיים ומזהמים מיקרו-ביולוגיים. הפוליפנולים נחשבו בתחילה ל"אנטי-נוטריאנטים" כיוון שצריכתם במינונים גבוהים מונעת ספיגה של ברזל והם גורמים עקה חמצונית. עם השנים, גילו במחקרים, שכאשר הפוליפנולים נצרכים בכמויות סבירות, הם מחזקים את פעילות מערכת החיסון של הגוף (Bravo, 1998). צריכת פוליפנולים במינון נמוך מאד מקנה לגוף עמידות מפני קרינה מסרטנת, וזאת כתוצאה מייעילותם הגבוהה בנוגדי חמצון שיכולים להגן על גוף האדם מפני רדיקלים חופשיים (Halliwell, 1996). בנוסף, לפוליפנולים פעילות אנטי סרטנית, אנטי דלקתית ואנטי-פרוליפריטיבית (Matito et al., 2003), שעשויה להיות אסטרטגיה יעילה לטיפול במחלת הסרטן (Lopaczynski et al., 2001).

פלבנואידים הם נוגדי חמצון בעלי ערך גבוה בפלפל ובמיוחד בזן האדום, אולם הם נקלטים במעי ביעילות נמוכה ולכן יש לצרוך כמות גבוהה של פלפל בכדי לספק את הכמות הדרושה לגוף (Peter et al., 1997). השיבותם היא ביכולת להורדת הסיכון ללקות במחלות לב, אירוע מוחי ולחץ דם גבוה (Kaur et al., 2002). בפלפלים ישנם שני פלבנואידים עיקריים, לוטאין וקוורצטין ולהם מגוון רחב של פעילויות ביולוגיות, הכולל עיכוב של חמצון שומנים בדם והפעלת מערכות אנזימיות אנטי-אוקסידנטים בגוף (Russo et al., 2000, Lee et al., 1995).

מחלת הסרטן

מחלת הסרטן כוללת קבוצת מחלות המאופיינות בחלוקה לא מבוקרת של תאים המתפשטים בגוף, גורמים לקריסת המערכות השונות ולמות האורגניזם. עקב העלייה המתמדת במקרי הסרטן ברחבי העולם, הפכה מחלת הסרטן לגורם המוות מספר אחד בעולם ומספר הנפטרים ממחלה זו עלה על מספר הנפטרים ממחלות לב וכלי דם. בשנת 2010 פרסם ארגון הבריאות העולמי דו"ח ובו תחזית קודרת האומרת כי עד 2030 יוכפל מספר חולי הסרטן ברחבי העולם. הסיבה המרכזית לעלייה במקרי הסרטן נובעת מעלייה במספר המעשנים בארצות מתפתחות, ובמיוחד בסין ובהודו שם חיים כיום כ-40 אחוז מכלל המעשנים ברחבי העולם. בישראל חיים כ-120 אלף חולי סרטן, ומידי שנה מתווספים לרשימה עוד כ-26 אלף ישראלים חדשים (משרד הבריאות, 2010).

תאי הגידול הסרטני הממאיר מתחלקים ללא פיקוח וללא סדר, משתלטים על האיברים הסמוכים להם ומפריעים לתפקודם. הם עלולים לחזור ולהתרבות גם לאחר הסרת הגידול, לפלוש לרקמות מרוחקות באמצעות זרם הדם או הלימפה וליצור גרורות. היווצרות תא סרטני הינו תהליך רב שלבי הכולל שינויים גנטיים המובילים לחלוקה בלתי מבוקרת בתאים (Manson et al., 2003).

מחקרים רבים ונתונים אפידמיולוגיים הראו שצריכה קבועה של פירות וירקות מצוייה בקורלציה עם סיכון מופחת ללקות במחלת הסרטן (Bravo, 1998) ומביאה לשיפור במצב בריאותם של החולים (Harborne et al., 2000). תופעה זו נובעת כנראה מכך שפירות וירקות מכילים נוטריינטים שונים כמו פוליפנולים, פלבנוואידים ואנטיאוקסידנטים הנספגים לדם ומעכבים שגשוג תאים סרטניים בגוף (Ramos et al., 2005).

שורות תאי הסרטן ששימשו בעבודה זו

תרבויות תאי סרטן הומני משמשות בדרך כלל למחקרים הקשורים למחלות הסרטן בבני אדם, והיכולת לעכב התרבות תאי סרטן נחשבת בדרך כלל כאינדיקציה לפוטנציאל אנטי סרטני (Wang et al., 2011).

במחקר הנוכחי נבדקו שני סוגים של תאי סרטן הומני ממערכת העיכול. הסוג הראשון הינו תאי HepG2 (Hepatocellular carcinoma, HCC) שמקורו בתאי כבד סרטניים הומניים. סרטן הכבד מדורג כיום כחמישי בשכיחותו ברחבי העולם וכשלישי מבין גורמי המוות בחולי סרטן. הוא נפוץ יותר באזור אפריקה ומזרח אסיה, אך בעשורים האחרונים נצפית עליה בשכיחות המחלה בעולם המערבי. סרטן הכבד מתפתח לרוב על רקע של מחלת כבד כרונית, חשיפה לרעלנים או שינויים גנטיים. בשנים האחרונות בוצעו מחקרים רבים במאמץ להבהיר את המנגנון המולקולארי שגורם למחלה. ממחקרים אלה עולה שמוטציות במספר רב של גנים בתאי הכבד גורמות לשינויים בהפרשת החלבונים, ביטוי יתר של גנים אחרים ושיבוש תפקוד התאים שמוביל להתפתחות המחלה. עד היום ניתן לרפא רק אחוז קטן מהחולים, ולכן אבחנה מוקדמת וטיפול מקדים מורידים את התחלואה והתמותה ממחלה זו (Sherr, 2000).

שורת התאים השנייה שנבדקה הייתה Human Colorectal Carcinoma (HCT-116), תאי סרטן הגדלים בעיקר במעי הגס אך גם בתוספתן ובחלחולת. שכיחות סרטן המעי הגס מדורגת כשלישית בעולם והיא מהווה את גורם המוות השני בין חולי הסרטן בעולם המערבי (Jemal et al., 2005). התפתחות סרטן המעי הגס הינה תוצאה של הצטברות מוטציות גנטיות או שינויים ברצף הקידוד של מספר גנים מדכאי סרטן ואונקוגנים האחראיים על תהליכים חשובים בתא כגון גידול וחלוקה יחד עם פעילות חריגה של מולקולות וחלבונים המעורבים בתהליך קידוד גנים (Vogelstein et al., 2004). חולי סרטן המעי הגס סובלים בעיקר ממוטציה בגן *adenomatous polyposis coil (APC)*, מוטציה המעוררת שרשרת סיגנלים הגורמים להתחלקות תאי המעי הגס בצורה לא מבוקרת ולהתפתחות הסרטן (Castellone et al., 2005).

לצורך הביקורת ולהשוואת התוצאות עם התאים הסרטניים. השתמשנו במהלך העבודה, בתאי עור אנושי בריאים (Normal Human Dermal Fibroblasts) NHDF.

היפותזת המחקר:

מאחר וקיים שוני גנטי בין זני הפלפל התרבותיים לזני הבר (Paran et al., 1998; Maalekuu et al., 2003; 2004), ומאחר ולגבי גידולים אחרים תועדו בספרות המדעית רמות שונות של פיטונוטריינטים בזנים שונים, במצבי הבשלה שונים ובתנאי אחסנה שונים, אנו מניחים כי זני פלפל שונים המצויים במצבי הבשלה שונים, יהיו גם שונים ברמת פעילותם האנטי סרטנית, ברמות הפיטונוטריינטים שלהם ובתגובתם לממשקי הגידול (אורגני וכד') ולתנאי האחסון.

מטרות העבודה:

- (1) בדיקת השפעת אופני הדישון (אורגני לעומת קונבנציונאלי) על איכות חיצונית, פנימית ורמות הפיטונוטריינטים (חומצה אסקורבית – ויטמין C, פוליפנולים, פלבנואידים ואנטיאוקסידנטים) בזני פלפל תרבותיים באחסנה ממושכת.
- (2) השוואת הפעילות האנטי סרטנית של מגוון פלפל מטיפוסים שונים (זנים תרבותיים ומיני בר) הגדלים בממשק דישון אורגני לעומת ממשק דישון קונבנציונאלי, לפני ואחרי האחסון.

שיטות וחומרים

כימיקלים

AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany: DMSO- Dimethyl sulfoxide.

BIO-LAB Ltd., Jerusalem, Israel: Double-distilled water (DDW)

Biological Industries., Beit haemek, Israel: Eagles's Minimum Essential Medium (EMEM), Fetsl calf Serum- heat inactivated (FCS), Fibroblast Growth Supplement, Glutamine, McCoy`s 5A Medium (Modified), PEN-STREP-solution- 10,000 units/ml penicillin; 10 mg/ml streptomycin, Phosphate Buffer Saline (PBS), Sodium Pyruvate, Trypsin 0.25% (w/v) – 0.53 mM EDTA solution.

Hanna Instruments Inc., Nusfalau, Romania: Ascorbic Acid Test Kit (HI3850)

Sigma- Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA: Aluminum chloride hexahydrate, Folin - ciocalteu`s Phenol, Gallic Acid, Potassium acetate, Quercetin, 2,2- Diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH), 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide (Capsaicin).

Promega Corporation., Madison, WI, USA: CellTiter 96® AQueous One Solution
Cell Proliferation Assay (MTS).

תאים

Biological Industries., Beit haemek, Israel: Hepatocellular Carcinoma (HepG2),
Human Colorectal Carcinoma (HCT-116), Normal Human Dermal Fibroblasts
(NHDF).

ציוד

Alvin R. Hamson, cornell university Ithaca New York: Pressure test with devices

ATAGO CO., LTD, Japan: Digital Refractometer PR-101α

Beckman Coulter: Centrifuge Allegra X -15R, centrifuge Avanti J-E.

BioTek: Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader

Buchi: Rotor evaporator R- 210.

Hettich: Centrifuge Mikro 200R

Kinematica: MICROTRONBatch Laboratory Mixer CH-6010.

Labconco: Centrifugal Vacuum Concentrator LB-7810011 (Speed Vac)

MRC: Water bath shaker BT- 150

Pharmacia Biotech: Ultraspec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer.

ILSHIN Lab: Benchtop Lyophilizer TFD5503.

מקורות הפלפל

במחקר הנוכחי נבחנו שלושה גידולי פלפלים: פלפלים מתוקים שגודלו כמו"פ בקעת הירדן בבתי צמיחה, פלפל אדום מזן 7182 ופלפל צהוב מזן 7849, בשתי שיטות דישון אורגני וקונבנציונאלי. בעונה אחרת גודלו פלפלים מתוקים מזנים שונים (אדום, צהוב וכתום) בבתי צמיחה בשפלה. פלפלים חריפים מעשרה זנים שונים גודלו בחממת גידול במכון וולקני ע"י ד"ר אילן פראן.

טיפול ראשוני בפלפלים מתוקים

הניסויים נעשו בשני זני פלפל מתוק: אדום וצהוב, כאשר מכל זן נבדקו שני טיפולים: דישון קונבנציונאלי ודישון אורגני. הפרי נקטף בכ-85% צבע, עם או ללא עוקץ (תלוי במועד הקטיף ובית הגידול). עם קבלתם עברו הפלפלים שטיפה וניקוי במכונה לשטיפת פלפלים במים חמים ומברשת (Fallik et al., 1999) להרחקת מזהמים, לכלוך ואבק. אחר כך יובשו והועברו לקרטונים. חלקם הועבר למעבדה לבדיקות איכות נוספות וחלקם הועבר לחדר אחסון למשך 14 יום בטמ' 7 מ"צ ו-3 ימים נוספים ב-20 מ"צ להדמיית חיי מדף. במהלך העונה נערכו 6 קטיפים, במהלכם נבדקה איכות הפלפל מיד אחרי הקטיף ולאחר אחסון והדמיה של משלוח ימי.

מדדי איכות

פלפלים מתוקים: מכל טיפול נלקחו 4-5 קרטונים של פירות במשקל של 5 ק"ג לקרטון.
פלפלים חריפים: מכל זן נקטפו כל הפירות הבשלים (מספר הפירות השתנה בין הזנים) הפירות שהתקבלו נלקחו לבדיקות איכות שונות. הפירות נבדקו ביום הגעתם ובתום שלב האחסון לשינויים שהתרחשו במהלך האחסנה.
איבוד משקל: לאחר השטיפה סומנו 5 פירות מכל טיפול ונשקלו. פירות אלו נלקחו לאחסון למשך 14 יום בטמ' 7 מ"צ ולמשך 3 ימים נוספים ב 20 מ"צ (דימוי חיי מדף). בתום תקופת האחסון נשקלו הפלפלים שוב ואחוז איבוד המשקל חושב לפי הנוסחה:
(משקל פרי לפני אחסון – משקל פרי אחרי אחסון) / 100 X / משקל פרי לפני אחסון = אחוז איבוד משקל
בדיקת מוצקות: מכל טיפול נבדקו 5 פירות במכשיר "מד לחץ". משקולת של 2 קילוגרם הונחה על צד הפרי למשך 10 שניות ועם הסרת המשקולת נרשמה סטיית המחט מהערך 0. הערך שהתקבל מבטא את גמישות הפרי במ"מ. בדיקה זו הרסנית לפרי מפני שהלחץ על הפרי מפוצץ תאים לכן לא ניתן לאחסן את הפרי אחרי הבדיקה. מסיבה זו, לבדיקת השפעת האחסון לוקחים פירות אחרים מאותו קרטון לאחר אחסון ומשווים את התוצאות הממוצעות של שתי הבדיקות.
כלל מוצקים מומסים - סוכר (TSS): מכל טיפול נבדקו 5 פירות על ידי רפרקטומטר המודד את שבירת האור בנוזל שנסחט מהפרי. פני הפרי גורדו בסכין וצפיפות הנוזל נמדדה במיץ שהתקבל על עינית הרפרקטומטר. התוצאה עצמה מבטאת את אחוז המוצקים המומסים בפרי, המורכב ברובו מסוכר. בדיקה זו גם היא הרסנית מאחר וחותכים חלק מהפרי ולכן לא ניתן לאחסן אותו שוב. לכן לבדיקה לאחר אחסון

לוקחים פירות אחרים מאותו הקרטון, בודקים אותם ומשווים את התוצאות לבדיקת השינוי ברמת המוצקים בפלפל לאחר אחסון.

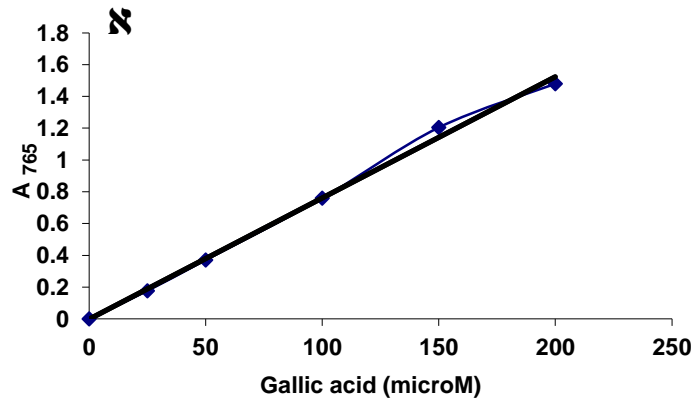
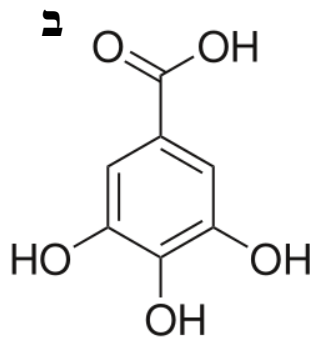
הכנת הפלפלים לבדיקות הביוכימיות

מיד לאחר הקטיף (T_0) ובתום תקופת אחסון וחיי מדף (T_{14+3}) נלקחו מכל טיפול ששה פירות, ונחתכו בסכין לחתיכות קטנות להכנת מיץ, הוכנסו חתיכות הפלפל למיקסר במשך כדקה אחת והמיץ חולק לשתי מבחנות של 50 מ"ל והוקפא ב-20 מ"צ. בנוסף, מכל טיפול נשקלו 25 גרם פלפל, הוקפאו ב-20 מ"צ, ולמחרת הועברו לייבוש בהקפאה (ליאופיליזציה) למשך 72 שעות. בתום הייבוש נאספו הדוגמאות ונשקלו שוב, בכדי לחשב את ההפרש בין המשקל היבש למשקל הטרי (כמות המים בכל דוגמא). הדוגמאות המיובשות (שתי חזרות) נכתשו במכתש ועלי בנוכחות חנקן נוזלי. האבקה שהתקבלה הועברה למבחנת 15 מ"ל, ומכל דוגמא נשקלו 0.1 גרם לשלוש מבחנות 15 מ"ל, שנשמרו ב-20 מ"צ מוכנות לכל בדיקה שתבצע בהמשך.

בדיקת פוליפנולים

רמות הפוליפנולים בפלפלים נבדקו בשיטת Folin-Ciocalteu. ל-4 מבחנות 15 מ"ל שכל אחת הכילה 0.1 גרם אבקת פלפל מיובשת וטחונה, הוספו 1 מ"ל מים מזוקקים פעמיים. הדוגמאות הועברו לטלטול ב-37 מ"צ במהירות 220 סל"ד למשך שעה אחת. בתום שלב זה הועברו הדוגמאות למבחנות אפנדורף של 2 מ"ל ועברו סרכוז ראשון (4 מ"צ, 14,000 סל"ד, 10 דקות). הנוזל העליון שהופרד הועבר למבחנת אפנדורף 1.5 מ"ל לסרכוז שני (4 מ"צ, 14,000 סל"ד, 15 דקות). השכבה העליונה נאספה והועברה למבחנת אפנדורף 1.5 מ"ל והדוגמאות נשמרו בקרח עטופות בנייר כסף להגנה מפני האור. 15 מיק"ל מכל דוגמה הועברו לאפנדורף 1.5 מ"ל והוספו להם 85 מיק"ל מים מזוקקים פעמיים, 25 מיק"ל ריאגנט פולין ו-775 מיק"ל מים מזוקקים פעמיים. הנפח הושלם ל 1 מ"ל על ידי הוספת 100 מיק"ל תמיסת סודיום קרבונאט 20%. לאחר הוספת כל החומרים נעשה וורטקס למבחנות, הן נעטפו בנייר כסף והודגרו למשך שעה בטמפ' החדר.

במקביל, הוכנה סדרת מבחנות לשם קבלת עקומת כיוול שלחומצה הגאלית בין הריכוזים 0-200 microM. הן עקומת הסטנדרט והן דוגמאות הפלפל נבדקו בדופליקט. כבלנק שמשו מבחנות שהכילו את כל מרכיבי הריאקציה מלבד החומצה הגאלית, או אבקת הפלפל. לאחר הדגרה בחושך למשך שעה נמדדה בליעת האור ב plate reader באורך גל 760 nm.

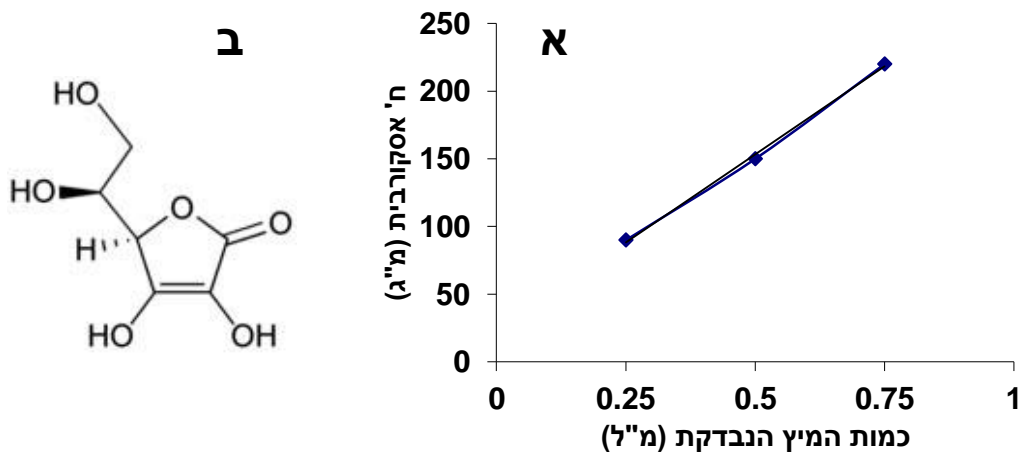


איור 1. א. עקומת כיוול לקביעת רמת חומצה גאלית. ב. חומצה גאלית

קביעת חומצה אסקורבית (ויטמין C)

לצורך הבדיקה הופשרה מבחנה שהכילה מיץ פלפל בטמפ' החדר, במשך שעה, בחושך (למניעת חמצון החומצה אסקורבית ע"י האור) ועברה סרכוז (40 דקות, 4 מ"צ, 8000 סל"ד). כ- 6 מ"ל מהנוזל העליון נאספו וסרכוז (15 דקות, 4 מ"צ, 14000 סל"ד), שכבת הנוזל העליונה נאספה והועברה למבחנות 15 מ"ל שנשמרו בקרח עטופות בנייר כסף. כמויות החומצה האסקורבית במיץ נבדקו בעזרת קיט מסחרי לקביעת חומצה אסקורבית המבוסס על טיטרציה ועמילן כמדד לזיהוי סף תגובת החמצון של החומצה, שמאופיין בהופעת צבע כחול.

כמויות שונות (0.25-0.75 מ"ל) של דוגמאות מיץ מסורכז הועברו לכוס פלסטיק והנפח הושלם ל- 50 מ"ל עם מים מזוקקים. לכל דוגמה הוספו תוך כדי ערבול בסטירר ומגנט 1 מ"ל ריאגנט HI 3850A-O ו- 3 טיפות עמילן. לאחר מכן טוטררה התמיסה ע"י הוספת טיפות של 22 מיק"ל ריאגנט HI 3850C-O עד לשינוי צבע התמיסה לכחול, שינוי המבטא חמצון כל החומצה האסקורבית.



איור 2. א. עקומת כיוול לקביעת רמת החומצה אסקורבית. ב. חומצה אסקורבית

לפי התוצאות שהתקבלו מעקומת הכיוול (איור 2א), הכמות המתאימה לבדיקת רמת ויטמין C בפלפלים הינה 0.5 מ"ל מיץ מסורכז. חישוב כמות החומצה האסקורבית בדוגמא נעשה על פי הנוסחה:

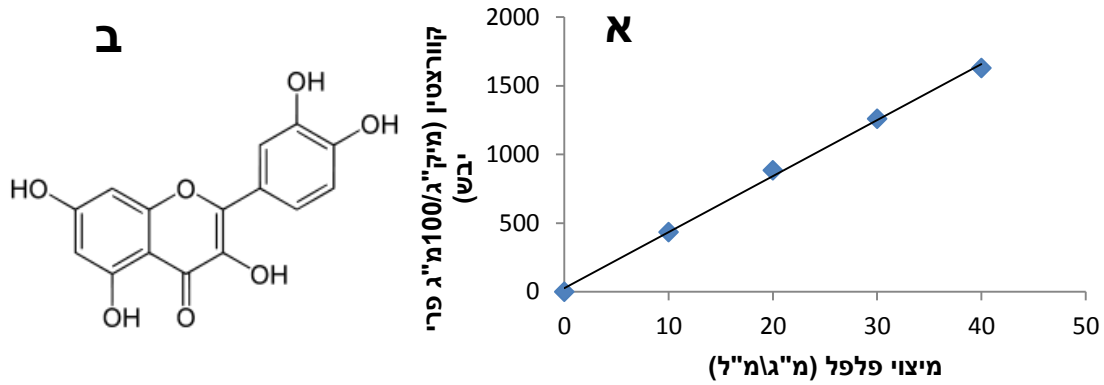
$$\text{Ascorbic acid (mg/L)} = 10 \times 10 / \text{tested ml} \times (\# \text{ of drops})$$

בדיקת פלבונואידים

קביעת פלבונואידים נעשתה בעזרת התמיסות הבאות:

1- 0.1gr/ml אלומיניום כלוריד ($AlCl_3$) במים מזוקקים.

2- 98mg/ml גרם פוטסיום אצטאט (CH_3COOK) במים מזוקקים.

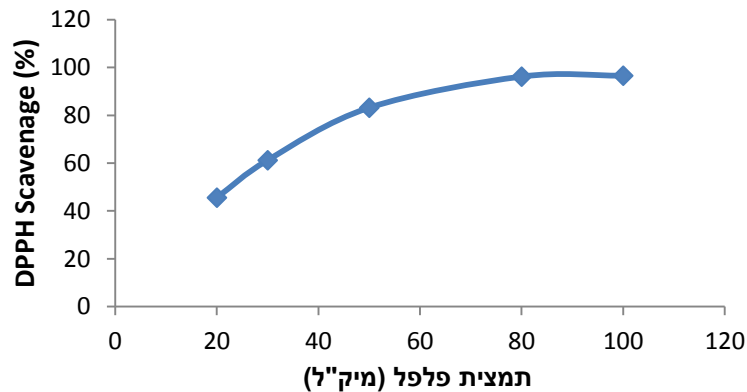


איור 3. א: עקומת כיוול לקביעת ריכוז מיצוי הפלפל. ב: קורצטין

30 מ"ג אבקת פלפל הומסו ב- 250 מיק"ל מים מזוקקים. לאחר מכן נמהלו כל הדוגמאות (סטוק הקורצטין + דוגמאות הפלפל) ב- 1.4 מ"ל מים, עורבבו בוורטקס והועברו לטלטול בטמפ' החדר במשך כ- 30 דקות אחרי הטלטול הוספו לכל מבחנה 0.75 מ"ל 95% מתנול, 0.05 מ"ל אלומיניום כלוריד ($AlCl_3$) לריכוז סופי של 10%, ו- 0.05 מ"ל פוטסיום אצטאט לריכוז סופי של 10%. הדוגמאות עורבבו בוורטקס וסורכזו בצנטריפוגה (15 דקות, 3500 סל"ד, 4 מ"צ). כל דוגמא נבדקה בטריפליקט בספקטרופוטומטר באורך גל 415 nm, ורמת הפלבונואידים בדוגמאות הפלפל נקבעו בעזרת עקומת ריכוזים של קורצטין (סטוק: 0.5 מ"ג/מ"ל ב DMSO) ששימש כסטנדרט, דוגמאות ללא קורצטין שמשו כרקע.

בדיקת אנטי-אוקסידנטים

קביעת רמות האנטיאוקסידנטים בפלפלים נעשתה באמצעות הרדיקל החופשי diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) המאבד מצבעו הסגול כשהוא מתחזר בנוכחות אנטיאוקסידנטים.



איור 4. עקומת כיוול לבדיקת רמת האנטיאוקסידנטים בפלפלים.

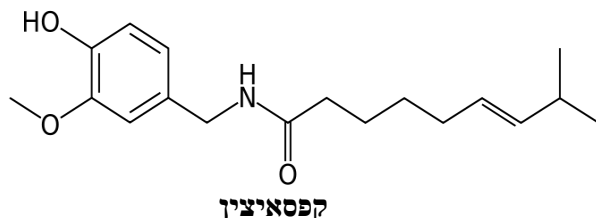
לקביעת כמות תמצית הפלפל האופטימאלית לבדיקת רמת האנטיאוקסידנטים, הוכנה עקומת כיוול עם כמויות שונות של תמצית. לתמצית הוספו 1 מ"ל DPPH ונמדדה הבליעה לכל אחת מהדוגמאות. נפח התמצית והמצוי בטווח הליניארי שנבחר לביצוע הבדיקות הינו 50 מיק"ל.

לביצוע הניסוי נשקלו מכל דוגמא 100 מ"ג אבקת פלפל למבחנת 15 מ"ל. לדוגמאות השונות הוספו 2 מ"ל מתנול אבסולוטי, ולאחר ערבוב בוורטקס הן הודגרו בחושך למשך 48 שעות. ביום ביצוע הניסוי נשקלו 19.7 מ"ג מאבקת ה DPPH למבחנה שנעטפה בנייר כסף והוסו ב 50 מ"ל מתנול אבסולוטי (100%). מתמיסה זו נלקחו 2 מ"ל ונמהלו עם 18 מ"ל מתנול 100%. תמיסה זו נשמרה בקירור 3 שבועות לכל היותר. ביום הניסוי הוכנה סדרת מבחנות 15 מ"ל, ובהן 1 מ"ל מתמיסת ה-DPPH (מהול 1:9) ו-20 או 40 מיק"ל מהמיצוי המתנולי של הפלפל. מבחנת הביקורת הכילה תמיסת DPPH בלבד. לאחר אינקובציה של 10 דקות בחושך מוחלט, נמדדה בליעת האור בספקטרופוטומטר באורך גל של 517 nm. חישוב רמת האנטיאוקסידנטים ביחידות (O.D) לפי הנוסחה:

$$\{(DPPH\ O.D - Sample\ O.D) / DPPH\ O.D\} \times 100$$

בדיקת קפסאיצין

לבדיקת רמת הקפסאיצין בפלפל נשקל 1 גרם של אבקת פלפל מכל טיפול למבחנת 15 מ"ל מזכוכית. למבחנה הוספו 10 מ"ל מתנול, ולאחר ערבוב בוורטקס, הועברו המבחנות לאמבט סוניקציה



לפירוק הגושים בטמפ' של 25 מ"צ למשך שעה. לאחר מכן סורכזו הדוגמאות (10 דקות, 1 מ"צ, 10300 סל"ד), והנוזל העליון נאסף וסונן בעזרת מזרק וסביבון (0.45 מיקרו"מ)

להרחקת גושים לא מסיסים. המבחנות הוקפאו ב -20 מ"צ. הדוגמאות נלקחו לצב"מ של האוניברסיטה העברית ונבדקו במכשיר High-performance liquid chromatography (HPLC) בקולונת Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6×150 mm, 3.5 μm, באורך גל 280 nm. רמת הקפסאיצין נקבעה לפי סטנדרט מסחרי של קפסאיצין טהור.

עשרת זני הפלפל החריף שנבדקו במחקר זה:

CA-4: פלפל חריף שייך למין *Capsicum chinense*, מאורך בצבע אדום כהה; אורכו כ 8 ס"מ; נראה יבש מבחוץ; מקורו במקסיקו.

177: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, קטן מאד (3-5 ס"מ); צבע כתום; פרי מאחר; קל במשקל יחסית לזנים אחרים; מקורו בארצות הברית והוא ידוע בשם Grif 9285.

811: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, ארוך בצבע כתום; זן בעל יבול קטן; מרקם רך; משקל כבד יחסית לזנים אחרים; מקורו מניו-מקסיקו ברצות הברית. שמו המקורי SUNSET.

1043: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, ארוך; בצבע אדום; מרקם קשה; זן עם כמות היבול הגבוהה ביותר יחסית לזנים האחרים בחממה; פותח בצרפת ע"י המכון הלאומי למחקר אגרונומי. שמו PM 217.

1044: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, בצורת פלפל גמבה; צבע אדום בהיר; פרי מאחר; מרקם מאד רך; מכיל הרבה מים; פותח בצרפת ע"י המכון הלאומי למחקר אגרונומי ושמו המקורי הינו PM 687.

1072: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, בצבע אדום בהיר; בצורת כדור הדומה לעגבניית שרי. מרקם חלק; מכיל הרבה מים; מקורו אינו ידוע.

1154: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, קטן הדומה לפלפל גמבה; זן בעל יבול קטן ומאחר; מרקם קשה; טיפוס פובלנו; מקורו במקסיקו.

1232: פלפל חריף שייך למין *Capsicum annuum*, צבע אדום בהיר; קטן; אורכו כ- 5 ס"מ; משקל נמוך ורוב חללו הפנימי מלא בגרעינים; מקורו מושללת בר מקסיקנית ששמה CM-334, הזן מוכר במקסיקו בעמידות הגבוהה נגד חיידקים ומזיקים אחרים. מזן CM-334 ניתן להנדס ולפתח זנים חדשים עם תכונות חדשות דרך שילוב תכונות מזנים אחרים.

1475: פלפל מתוק שייך למין *Capsicum annuum*, צבע אדום-אדום כהה; אורכו כ- 14 ס"מ; מרקם רך. הזן פותח בישראל על ידי פרופ' אריה לוי.

1745: פלפל חריף שייך למין *Capsicum chinense*, בצבע כתום-צהוב; פרי קטן מאד שאורכו עד 4 ס"מ; פרי מאחר; מרקם קשה במיוחד שמקנה לפלפל איכות גבוהה לאורך זמן; מקורו במקסיקו.

הכנת מיצויים לבדיקת פעילות אנטי סרטנית

50 גרם פלפלים חריפים נחתכו, הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו בהקפאה (-20 מ"צ). הפלפל עבר מיצוי (5 דקות) בבלנדר בתמיסת אצטון 80% ביחסי נפח של 1:2 אצטון: פלפל. לאחר מכן הועברו המיצויים למבחנות 50 מ"ל שנשמרו בקרח ורוסקו (כ- 3 דקות) בעזרת ה-Polytron homogenizer. הדוגמאות סוננו במשפך ביכנר בוואקום דרך נייר סינון ווטמן מספר 2. הדוגמאות המסוננות הועברו למאייד רוטורי למשך כ- 40 דקות בטמפ' 45 מ"צ עד לאיבוד האצטון (כ 90% מהתמיסה). לכל דוגמת פלפל הוספה תמיסת PBS*10 סטרילית לקבלת ריכוז סופי של PBS*1. הדוגמאות עורבבו בוורטקס והוכנסו לאמבט סוניקציה למשך 15 דקות בטמפ' החדר בכדי לפרק את משקעי הפלפל שנותרו בתמיסה. בתום התהליך הועברו הדוגמאות לקרח וכל אחת מהדוגמאות סוננה במזרק וסביבון במנדף סטרילי וחולקה למנות של 1 מ"ל שהוקפאו במבחנות אפנדורף סטריליות ב-80 מ"צ.

בדיקת פרוליפרציה בתאים סרטניים

השפעת תמציות הפלפל השונות על חלוקת (פרוליפרציה) תאי סרטן נבדקה על שורת תאים משני סוגים: HEPG2 שהם תאי סרטן הכבד ו-HCT116 שהם תאי סרטן המעי. התאים גודלו באינקובטור 37 מ"צ ו-5% CO₂. תאי HEPG2 גודלו במדיום EMEM שהכיל 10% FCS, 2

מילימולר גלוטמין, 100 יח/מ"ל פניצלין, 100 מיק"ג/מ"ל סטרפטומיצין ו- 1 מילימולר סודיום פירובאט. תאי HCT116 גודלו במדיום McCoy's 5A המכיל 10% FCS, 100 יח/מ"ל פניצלין ו- 100 מיק"ג/מ"ל סטרפטומיצין.

העבודה עם התאים בוצעה במנדף ביולוגי סטרילי תוך שימוש במבחנות, טיפים ופיפטות סטריליות. תאי הסרטן גודלו בפלאסקים שהכילו 15 מ"ל מדיום והתאים פוצלו פעמיים בשבוע בעזרת טריפסיניזציה. 1.5 מ"ל טריפסין הוספו לתאי HEPG2 או לתאי HCT116, והתאים הועברו לאינקובטור למשך 5 דקות. בתום האינקובציה נעצרה פעילות הטרופסין ע"י תוספת מדיום לפלאסק, ותכולתו הועברה למבחנת 15 מ"ל. הפלאסק נשטף ב- 5 מ"ל מדיום ותכולתו הוספה למבחנת ה- 15 מ"ל. המבחנה סורכזה בצנטריפוגה (7 דקות, בטמפ' החדר, 1200 סל"ד), המדיום נשאב, ולתאים הוספו 5 מ"ל מדיום. לאחר הרחפת התאים נלקחה דגימה לספירת תאים. חישוב מספר התאים נעשה לפי הנוסחה: ממוצע התאים שנספרו $\times 10$ (מיהול בטרופן בלו) $\times 10000$ (נפח תא הספירה) = מספר התאים במ"ל אחד.

לבדיקת פעילות מיצוי הפלפל על תאים סרטניים נזרעו 25000 תאים בכל בארית בפלטת 96 סטרילית. כרקע שמשו באריות שהכילו מדיום בלבד, ובאריות שהכילו מדיום ותאים בלבד היוו ביקורת לטיפולים עם פלפל. לאחר זריעת התאים הועברה הפלטה לאינקובטור למשך 4 שעות (תאי HEPG2), או 24 שעות (תאי HCT116). בשלב זה טופלו התאים בתמיסה שהכילה מצוי פלפל, PBS ומדיום. לאחר מכן הוחזרה הפלטה לאינקובטור ל- 96 שעות. בתום האינקובציה נקראה הפלטה ב Plate Reader באורך גל 490 nm. קריאות אלו שמשו כבליעת רקע. לאחר מכן הוספו לכל באר בפלטה 30 מיק"ל של 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium (MTS) inner salt שנותן אינדיקציה לגבי מספר התאים החיים, והפלטה הוחזרה לאינקובטור למשך שעה. בתום האינקובציה נלקחה הפלטה לקריאה ב Plate Reader באורך גל 490 nm.

בדיקת פרוליפרציה בתאים הומאניים (NHDF) שאינם סרטניים

תרביות תאים הומאניים Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) גודלו באינקובטור במדיום הגידול Fibroblast Medium (FM) המכיל 2% FCS, אינסולין 5 מיק"ג/מ"ל ופקטורי גידול הנחוצים לגדילה ולתפקוד התאים. תנאי הגידול האופטימאליים לתאים באינקובטור היו 37 מ"צ ו- 5% CO₂.

תאי NHDF גודלו בפלאסק המכיל 10 מ"ל מדיום ופוצלו מדי שבוע ע"י שאיבת המדיום ושטיפת התאים בעזרת תמיסת Hepes-BSS. להורדת התאים מדופן הפלאסק הוסף טריפסין ולאחר מכן נוטרל הטרופסין בכדי לא לפרק את התאים. תרחיף התאים הועבר למבחנה, והמבחנה סורכזה בצנטריפוגה (10 דקות, בטמפ' החדר, 1200 סל"ד). הנוזל העליון נשאב והתאים הורחפו ב- 1.5 מ"ל מדיום. מתרחיף תאים זה נלקחו 10 מיק"ל והוספו ל 40 מיק"ל טריפן בלו לספירת התאים. בפלטת 96 בארות נזרעו בכל באר כ- 10,000 תאים והודגרו באינקובטור במשך 24 שעות. לאחר מכן טופלו התאים במיצויי הפלפל השונים

והוחזרו לאינקובאטור. לאחר 96 שעות הדגרה הוספו לבארות 39 מיק"ל MTS והפלטות נקראו ב Plate Reader באורך גל 490 nm.

ניתוח סטטיסטי של הנתונים

הנתונים נותחו במבחנים שונים בעזרת התוכנה JMP גרסה 7 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA). בחלק מהמבחנים נבדקו זני הפלפל החריף כגורם אחד המשפיע על רמת הפיטונוטריינטיים. במודלים אחרים בוצע ניתוח נתונים דו ותלת גורמי, כל הנתונים עמדו בהנחות ה ANOVA. המודלים הלינארים אשר נבחנו בעבודה זו הם:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (1)$$

כאשר α = זן, β = סוג דישון ו- $\alpha\beta$ = אינטראקציה בין זן וסוג דישון.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \quad (2)$$

$\alpha\beta$ = אינטראקציה בין זן וסוג דישון, $\alpha\gamma$ = אינטראקציה בין זן ותקופת אחסון, $\beta\gamma$ = אינטראקציה בין סוג דישון ותקופת אחסון, $\alpha\beta\gamma$ = אינטראקציה בין זן, סוג דישון ותקופת אחסון.

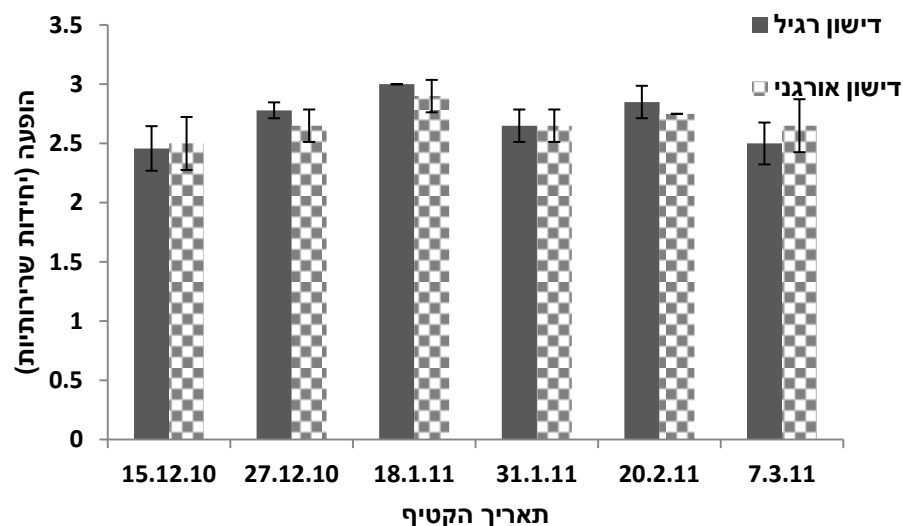
תוצאות

א. מרכיבים תזונתיים בפלפלים מתוקים שגודלו בבקעת הירדן

בניסויים שנערכו בבקעה הושווה איכותם של פלפלים אדומים וצהובים שדוּשנו באופן הרגיל לעומת פלפלים שדוּשנו בדישון אורגני. מדדי האיכות כללו אחוז איבוד מים, אחוז ריקבון פרי, צורה והופעת הפרי. הבדיקות בוצעו בעונת גידול אחת שנמשכה כ- 4 חודשים (מדצמבר 2010 עד מרץ 2011) בהם בוצעו 6 קטיפים בלתי תלויים.

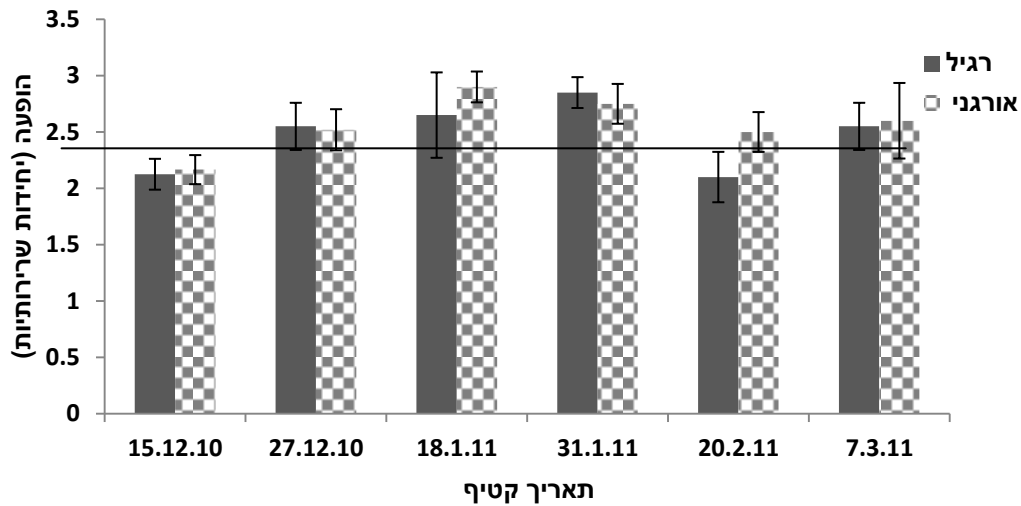
א.1 השפעת הדישון על הופעת הפלפל המתוק המאוּחסן ואיכותו

הופעת הפרי היא אחד המדדים החשובים ביותר בבדיקות איכות כיוון שהיא הגורם העיקרי שמשפיע על החלטת הצרכן לקניית התוצרת. פלפל מכיר הינו פלפל מוצק ללא פגיעות פיזיות או ריקבון, נראה טוב ומקבל לפחות ציון 2.5 בהופעה המתאימה לשווק הפרי. לכל פרי שנבדק בניסוי ניתן ציון מ 0 – 5, כאשר 0 הוא פרי גוּם (סדוק/ רקוב) ו- 5 פרי מעולה.



איור 1. הופעת פלפל אדום אחרי אחסון. 14 ימי אחסון ב- 7 מ"צ + 3 ימים ב- 20 מ"צ (ממוצע ± סטיית תקן לכל טיפול שכלל 5 חזרות. הקו האופקי בגרף מציין את סף המכירות של הפרי [2.5])

באיור 1 רואים כי בגידול פלפל אדום לא הייתה השפעה לאופן הדישון על הופעת הפרי המאוּחסן במשך כל עונת הגידול. בכל הקטיפים שמר הפרי על הופעה טובה וקיבל ציון מעל 2.5 לאחר אחסון וחיי מדף שנמשכו 17 יום. ההופעה הממוצעת של כל הקטיפים בעונה דומה בשני הטיפולים ועומדת על כ- 2.7. בשתי צורות הדישון הפרי היה מכיר, ומאחר ובמשך העונה לא היו שינויים דרסטיים בין קטיפ למשנהו, ניתן לומר כי לאורך כל העונה הגידול מראה יציבות בהופעת הפלפל האדום בשני הטיפולים.

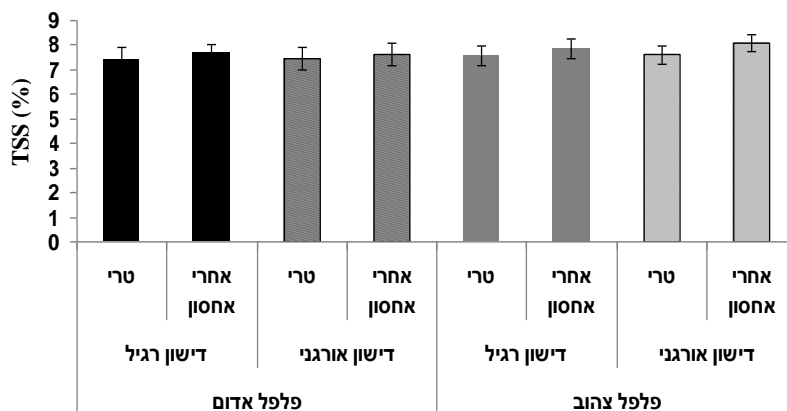


איור 2. הופעת פלפל צהוב אחרי אחסון. 14 ימי אחסון ב- 7 מ"צ + 3 ימים ב- 20 מ"צ (ממוצע \pm סטיית תקן לכל טיפול שכלל 5 חזרות. הקו באופקי בגרף מציין את סף המכירות של הפרי [2.5]).

לאופן הדישון לא הייתה גם השפעה על הופעת הפלפל הצהוב לאורך כל העונה (איור 2). ההופעה הממוצעת של כל הקטיפים בעונה בדישון האורגני הינה 2.6 לעומת ממוצע הופעת פרי בדישון הרגיל שהיה 2.5. מבחינת סף המכירות הפלפל האורגני הינו מכיר עם ממוצע מעל 2.5 לעומת הפלפל הרגיל שאינו מכיר כיוון שהממוצע הינו קטן מ 2.5. בנוסף, רואים באיור כי הפרי שדושן אורגנית היה מכיר בכל העונה מלבד הקטיף הראשון. לעומתו פלפל המדושן בצורה רגילה לא היה מכיר בשני קטיפים. בזן האדום ובזן הצהוב נראית מגמת עליה בהופעת הפרי ככל שהעונה מתקדמת עד הקטיף השלישי והרביעי, בהתאמה, ומשם חלה ירידה קלה בהופעה ככל הנראה בשל הזדקנות הצמח.

2.א. השפעת הדישון והאחסון על כלל המוצקים המומסים (TSS, רמת הסוכר) בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים

במהלך העונה נבחנה השפעת הדישון והאחסון על כלל המוצקים המומסים (TSS, רמת הסוכר) בפלפלים מיד לאחר הקטיף ולאחר תקופת אחסנה וחיי מדף. בכל טיפול נבדקו מספר פירות וחושב ממוצע אחוז ה-TSS בהם. באיור 3 מוצג אחוז ה-TSS הממוצע שנמדד לאורך כל העונה.

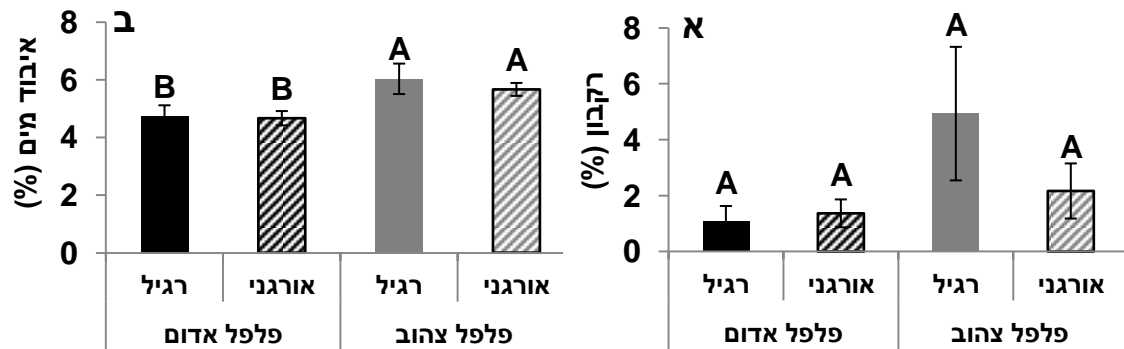


איור 3. השפעת הדישון והאחסון על ה-TSS (רמת הסוכר). ממוצע \pm שגיאת תקן משישה קטיפים שכללו 46 פירות מכל טיפול.

בדיקת ה-TSS שבוצעה במהלך העונה מראה שרמת הסוכר בפלפלים השונים הינה 7-8% בכל הטיפולים (איור 3). באיור זה גם ניתן לראות כי לא נצפו שינויים ברמת הסוכר בזנים האדום והצהוב בדישון אורגני יחסית לדישון רגיל וכי האחסון לא הביא לשינוי משמעותי ברמת הסוכר באף אחד מהטיפולים.

א.3. השפעת הדישון והאחסון על הרקבונות ואיבוד המים בפלפלים מתוקים אדומים וצהובים

גורם הריקבון העיקרי שהתפתח במהלך האחסנה וחיי המדף לאורך העונה הינו פטריית *Alternaria alternata*, המתפתחת בעוקץ הפרי לאחר הקטיף. פטרייה זו פוגעת בפרי רגיש לאחר הקטיף בתקופת האחסון הממושכת וגורמת לירידה באיכות הפרי. בנוסף נשקלו הפירות מיד לאחר הקטיף ואחרי האחסון בכדי לחשב את אחוז איבוד המים במהלך האחסון, הגורם אף הוא לירידה באיכות הפרי.

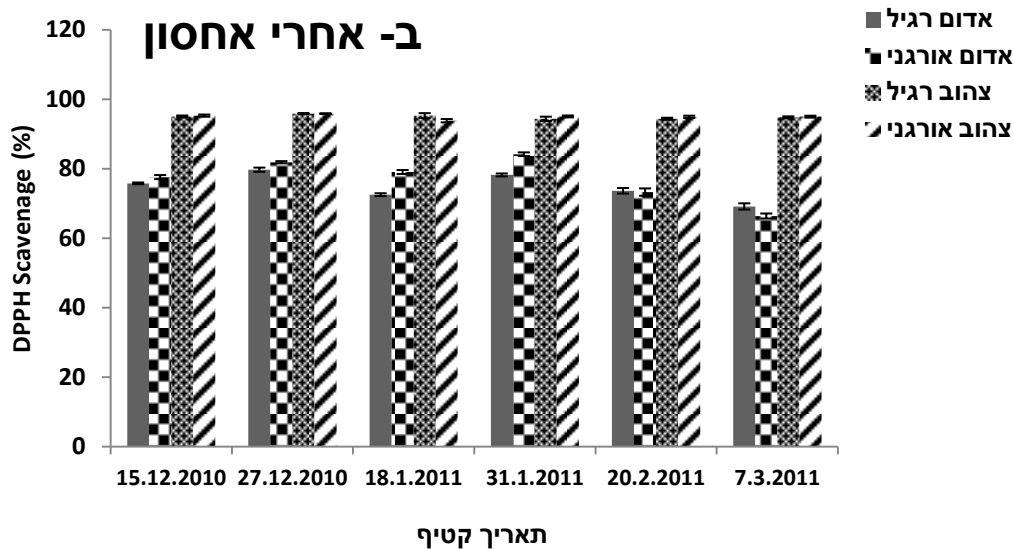
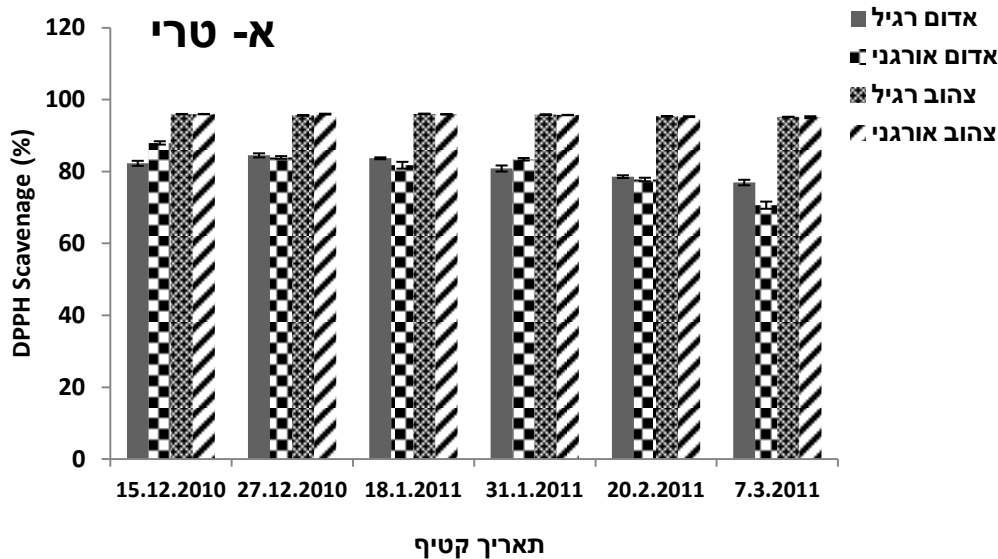


איור 4. (א) השפעת הדישון על הרקבון. ממוצע \pm שגיאת תקן משישה קטיפים שכללו 46 פרות מכל סוג. (ב) השפעת הדישון על איבוד המים. ממוצע \pm שגיאת תקן משישה קטיפים שכללו 60 פרות מכל סוג.

בדיקת ריקבון הפרי (איור 4 א), מראה שאין השפעה לדישון על איכות פרי הפלפל לאחר אחסון. בזן האדום לאחר אחסון, אחוז הרקבון בדישון הרגיל והאורגני היה כ- 1% בכל אחד מהם, לעומתם בפלפל הצהוב אחוז הרקבונות היה גבוה יותר, כ- 5% רקבון בפלפל הצהוב הרגיל וכ- 3% בפלפל צהוב אורגני. עם זאת גם בפלפל הצהוב אין הבדל מובהק סטטיסטית בין אופני הדישון השונים. בהשוואה בין הזנים עולה כי יש עליה ברמת הרקבונות בפלפל צהוב לעומת האדום, אך הבדל זה אינו מובהק סטטיסטית. מדד נוסף לאיכות הפלפל הינו איבוד מים לאחר אחסון (איור 4 ב). מבדיקה זו עולה כי % איבוד המים בפלפל הצהוב גבוה במעט לעומת איבוד המים בפלפל האדום (6% לעומת 5% בהתאמה), אולם אין השפעה לאופן הדישון על איבוד מים בפרי לאחר אחסון.

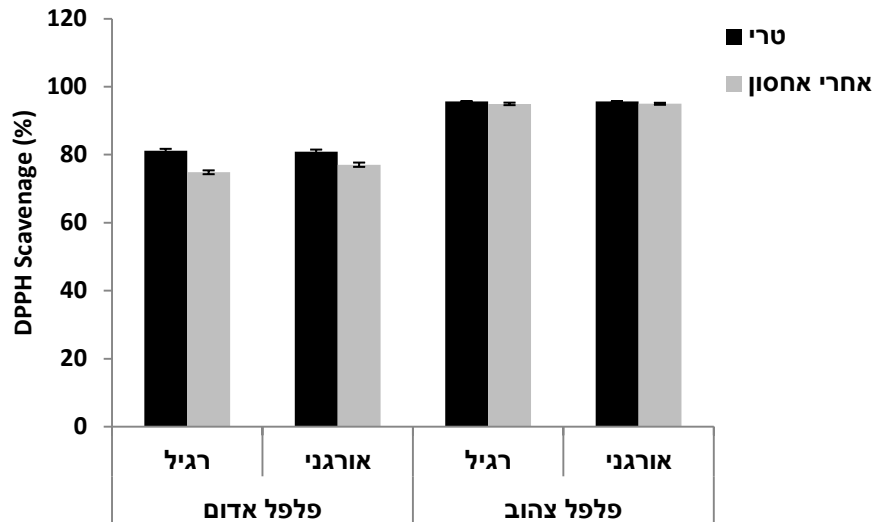
א.4. השפעת הדישון על רמות האנטי-אוקסידנטים בפלפלים מתוקים

בניסויים הבאים, נבדקה הפעילות הכוללת של נוגדי החמצון בזני פלפל אדום וצהוב ב 6 קטיפים שונים שנערכו בין 15.12.2010 ל- 7.3.2011.



איור 5. השפעת אופן הדישון על רמת האנטיאוקסידנטים בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים. התוצאות מבטאות כמוצע \pm סטיית תקן, n=4.

בבדיקת רמת האנטיאוקסידנטים בפלפלים (איור 5) בטיפולים השונים במהלך עונת הגידול עולה כי יש הבדל משמעותי ברמת האנטיאוקסידנטים בין הזן האדום לזן הצהוב. זן הפלפל הצהוב מכיל אנטיאוקסידנטים בכמות גבוהה משמעותית מהזן האדום (95% ו-80% בהתאמה), ויתרון זה נשמר לאורך כל העונה בששת הקטיפים. בהשוואה בין רמת האנטיאוקסידנטים לאורך כל העונה בפלפלים טריים (איור 5א) לבין פלפלים אחרי אחסון (איור 5ב), עולה כי אחסון בתנאי הובלה ימית לא פגם ברמת האנטיאוקסידנטים הגבוהה בפלפלים. בנוסף, נבחנה השפעת אופן הדישון, אורגני מול קונבנציונאלי על רמת האנטיאוקסידנטים בזני הפלפלים. מהתוצאות עולה כי בכל הקטיפים לא נמצא הבדל משמעותי בין שני הטיפולים בפירות הטריים (איור 5א) ולאחר אחסון (איור 5ב).



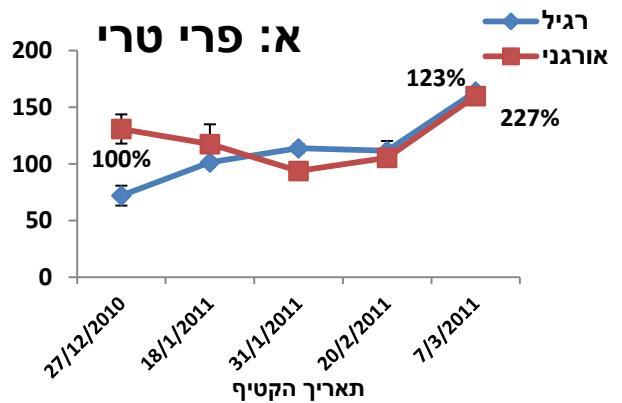
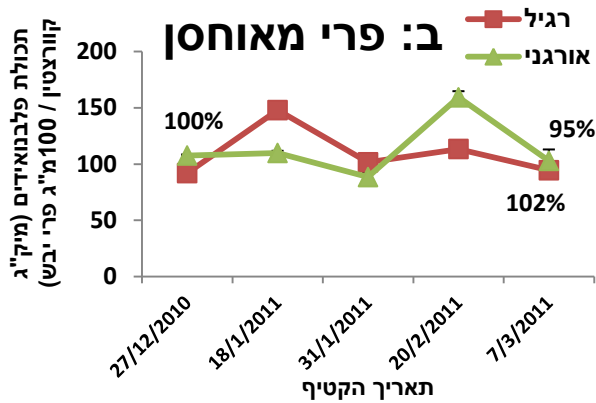
איור 6. השפעת האחסון על רמת האנטיאוקסידנטים בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים. התוצאות מייצגות ששה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, $n=24$.

באיור 6 מוצגת רמת האנטיאוקסידנטים הממוצעת מכל הקטיפים לאורך העונה, וגם כאן מתקבלות תוצאות זהות לאיורים הקודמים. רמת האנטיאוקסידנטים הייתה גבוהה באופן משמעותי בפלפל הצהוב לעומת האדום, ומהשוואת תנאי הדישון עולה כי אין השפעה לאופן הדישון על ממוצע רמת האנטיאוקסידנטים בכל העונה. אחסון הפלפל לא השפיע על רמת האנטיאוקסידנטים בפלפלים צהובים בשתי צורות הדישון רגיל וקונבנציונאלי, לעומתם נצפית בפלפל האדום ירידה קלה (4-6%) ברמת האנטיאוקסידנטים לאחר אחסון.

כדי לבחון אם קיימים הבדלים ברמותיהם של אנטיאוקסידנטים ספציפיים (פלבנוואידים, פוליפנולים וכד') בין פלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים שדושנו אורגנית או קונבנציונאלית, בדקנו את רמותיהם של המרכיבים השונים באופן ספציפי.

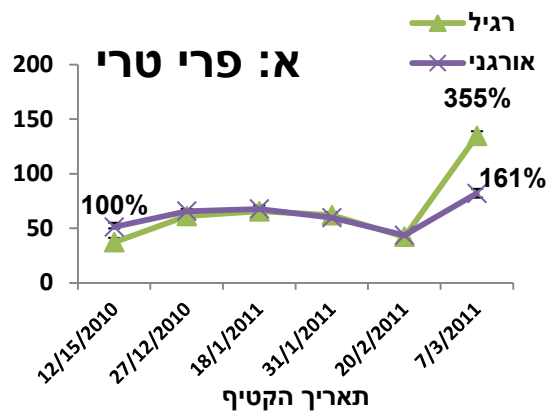
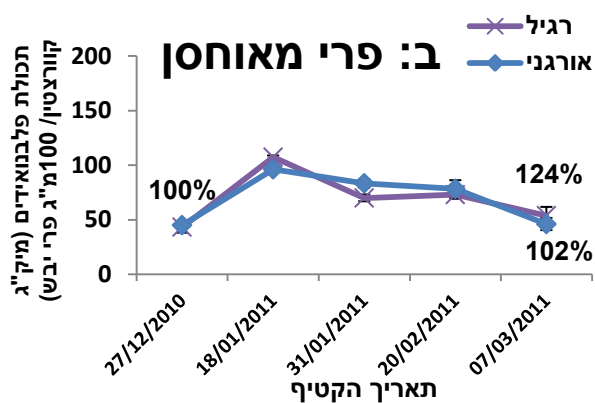
5.א. השפעת הדישון על רמת הפלבנוואידים בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים

בניסוי זה נבחנה השפעתן של שיטות דישון שונות, רגיל (קונבנציונאלי) או אורגני על רמות הפלבנוואידים בפלפל במהלך עונת הגידול. הבדיקות בוצעו מיד לאחר הקטיפ (פרי טרי) או על פרי מאוחסן. באיור 7 מוצגות התוצאות שהתקבלו לגבי פלפל אדום. בכל קטיפ ניתן לראות כי אופן הדישון אינו משפיע משמעותית על רמות הפלבנוואידים בפלפלים.



איור 7. רמות הפלבנוואידים בפלפל האדום בשתי צורות הדישון (רגיל + אורגני) לאורך עונת הגידול. התוצאות מבוטאות כמוצע \pm סטיית תקן, $n=3$.

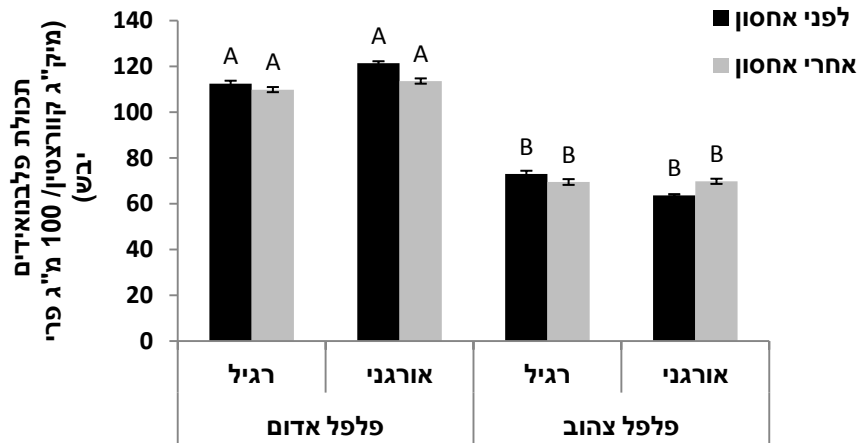
איור 7 א מראה כי בסיום העונה רמות הפלבנוואידים שנמצאו בפרי הטרי גבוהים ב 23% ו- 127% בפלפל רגיל ואורגני בהתאמה לעומת אלו שנמדדו בתחילת העונה. באיור 7 ניתן לראות כי אחסון הפלפלים בתנאים המדמים הובלה ימית אינו פוגע בתכולת הפלבנוואידים בפלפלים שנקטפו עד פברואר, בעוד שרמת הפלבנוואידים שנמדדו לאחר אחסון בפלפלים שנקטפו בסוף העונה (קטיף 7.3.11) ירדה משמעותית כ- 100 מיק"ג, לעומת הרמות שנמצאו בפלפלים טריים כ- 150 מיק"ג (איור 7א).



איור 8. רמות הפלבנוואידים בפלפל הצהוב בשתי צורות הדישון (רגיל + אורגני) לאורך עונת הגידול. התוצאות מבוטאות כמוצע \pm סטיית תקן, $n=3$.

בבדיקת השפעת הדישון על רמת הפלבנוואידים בפלפל הצהוב במהלך עונת הגידול עולה שרמת הפלבנוואידים דומה בין צורות הדישון השונות ואין הבדל משמעותי בין הדישון הרגיל לאורגני הן בפרי טרי והן לגבי פרי מאוחסן (איור 8). בפלפל צהוב טרי הייתה יציבות יחסית לאורך העונה ברמת הפלבנוואידים ולא היו שינויים דרסטיים בין קטיף למשנהו מלבד בקטיף האחרון בו רואים עלייה ניכרת (פי 2) בכמות הפלבנוואידים בפלפל טרי (איור 8א). בבדיקת רמת הפלבנוואידים לאחר אחסון התקבלה רמת פלבנוואידים שונה מאד (עד פי 2) בין פלפלים שנקטפו במועדים שונים (איור 8ב). לעומת זאת לאופן הדישון לא היה השפעה כלשהי על רמת הפלבנוואידים בפלפלים שנבדקו לאורך כל העונה. באיור 9 מוצגות התוצאות הממוצעות של כל הקטיפים. ניתן לראות כי ממוצע כמות הפלבנוואידים במהלך

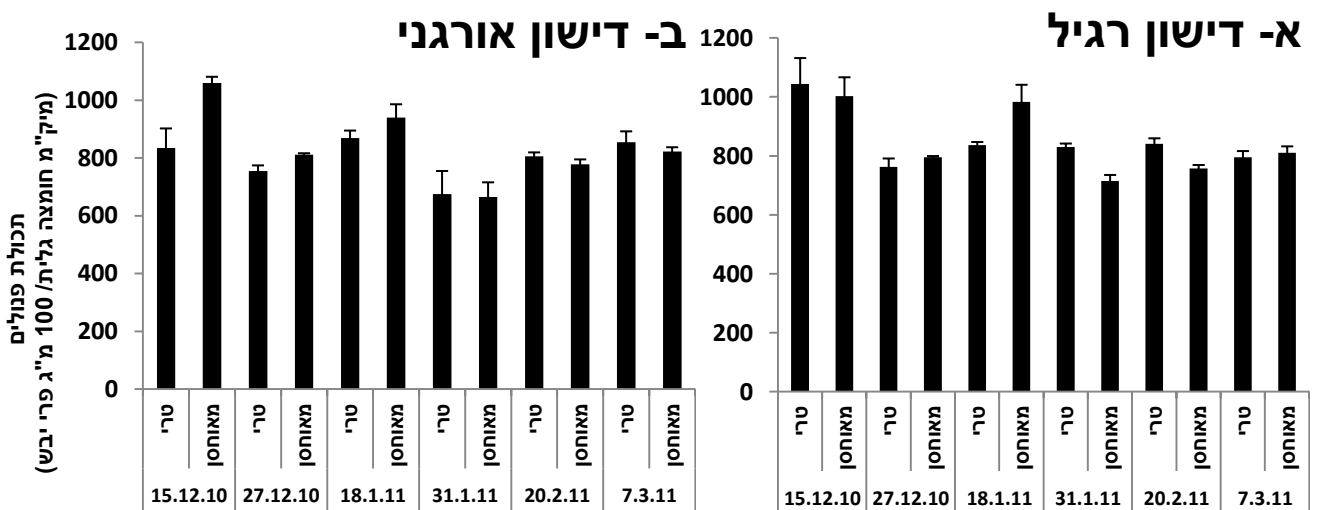
העונה בזן האדום (רגיל ואורגני) היה גבוה משמעותית (ב- 60-90%) מרמות הפלבנוואידיים בזן הצהוב. באיור זה ניתן גם לראות כי אופני הדישון השונים (רגיל ואורגני) לא גרמו לשינויים משמעותיים ברמות הפלבנוואידיים, בשני הזנים, וכי תכולת הפלבנוואידיים אינה מושפעת מתהליך האחסון והדמיית חיי מדף בשני הזנים.



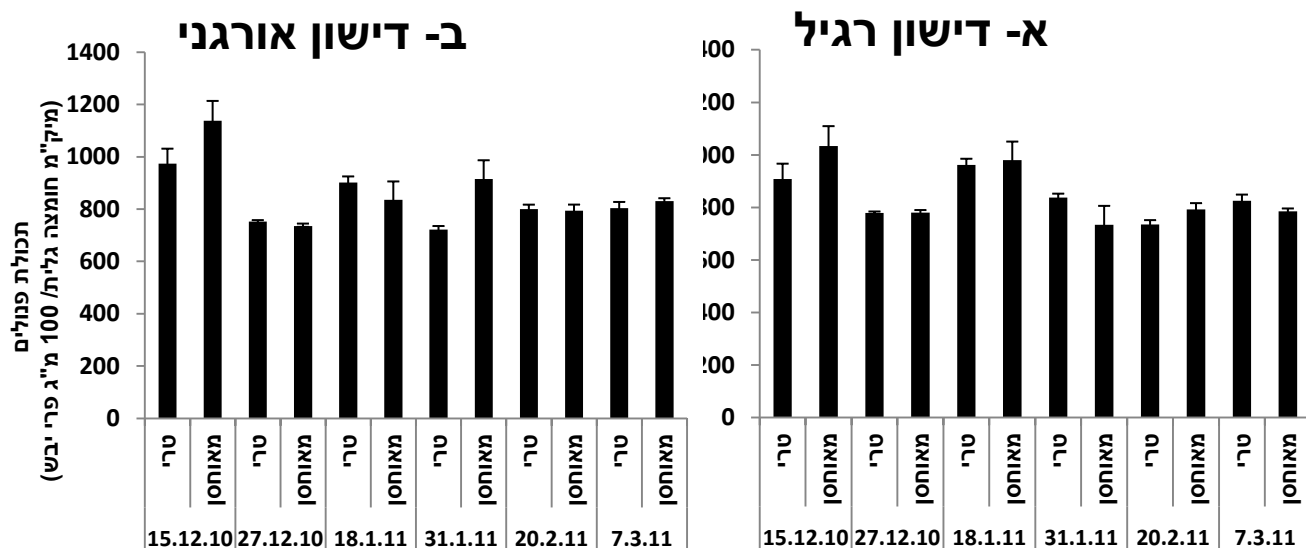
איור 9. תכולת הפלבנוואידיים בפלפלים אדומים וצהובים, טריים ומאוחסנים, שדושנו באופן רגיל או אורגני. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, n=15.

א.6. השפעת הדישון על רמות הפוליפנולים בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים

בניסויים המוצגים באיור 10 השונו את רמת הפוליפנולים בפלפלים אדומים שדושנו באופן רגיל לעומת כאלו שדושנו בדישון אורגני. הפלפלים נקטפו ב- 6 מועדים שונים שבמהלכם לא נצפתה מגמה אחידה (עליה/ירידה) בתכולת הפוליפנולים, ולא ניתן להסיק מסקנות חד משמעיות.

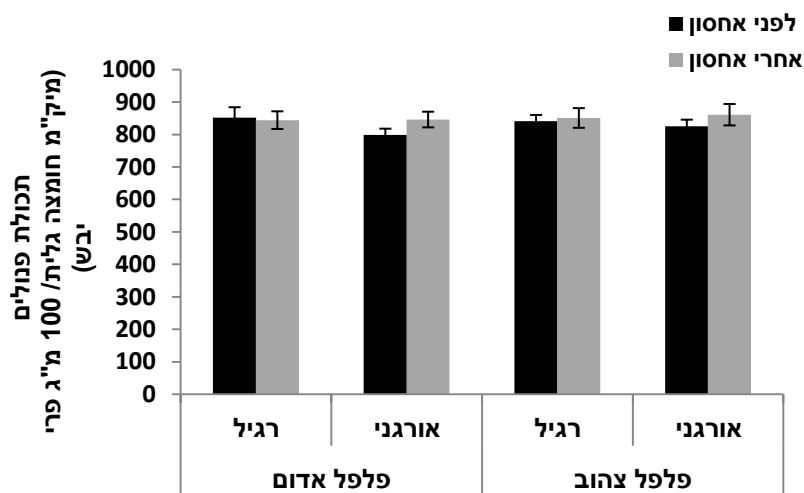


איור 10. שינויים בתכולת הפוליפנולים לאורך העונה בפלפל האדום לפני ואחרי אחסון (ממוצע \pm שגיאת תקן ו-4 חזרות לכל טיפול).



איור 11. שינויים בתכולת הפוליפנולים לאורך העונה בפלפל הצהוב לפני ואחרי אחסון. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, $n=4$.

בנוסף, נבדקו השפעות הדישון והאחסון על רמות הפוליפנולים בפלפלים האדומים והצהובים. באיורים 10 ו-11 ניתן לראות כי לאופן הדישון לא הייתה השפעה על רמות הפוליפנולים וכי תנאי האחסון לא הורידו את תכולת הפוליפנולים בפירות.

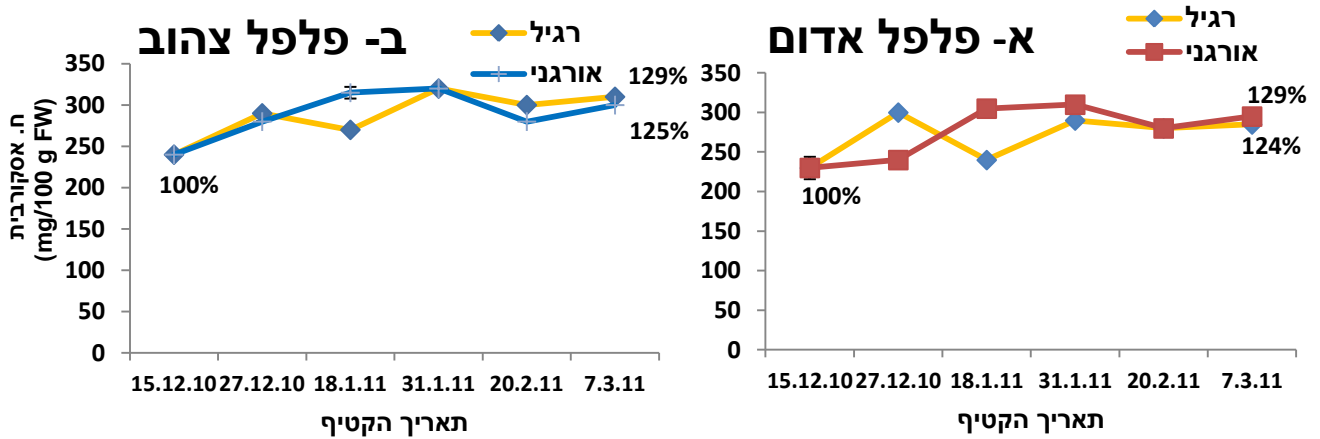


איור 12. רמת הפוליפנולים הממוצעת בכל העונה בפלפל אדום וצהוב. ששה קטיפים, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, $n=24$.

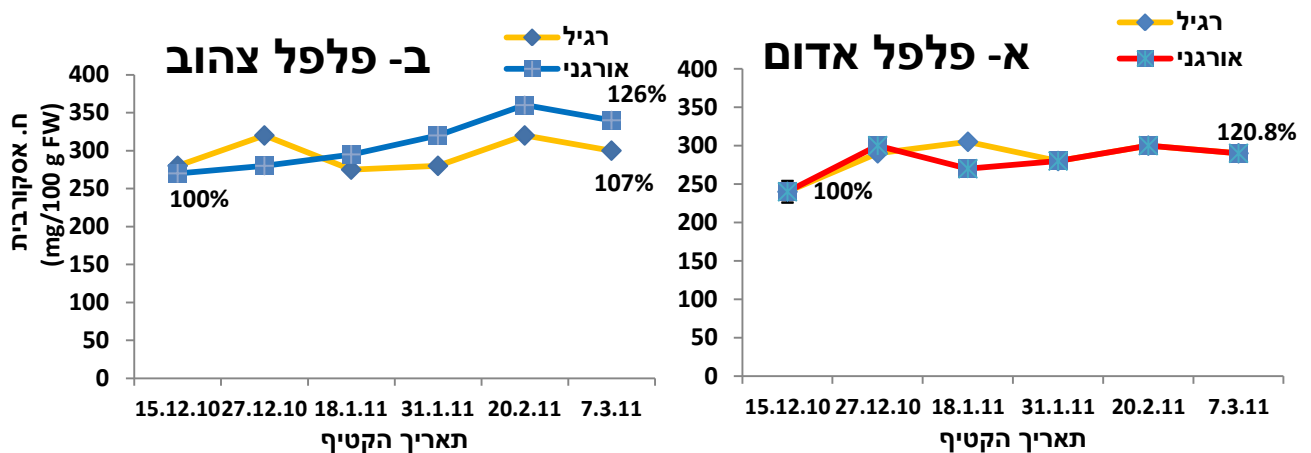
כדי להגיע למסקנה, שאינה תלויה במועד הקטיפ, באיור 12 מוצג ממוצע תוצאות הבדיקות שבוצעו לאורך כל העונה במשך 6 קטיפים. מתוצאות אלו עולה כי רמת הפוליפנולים הממוצעת בפלפלים דומה בין הזנים אדום וצהוב (כ- 800-900 מיקרו"מ חומצה גלית ל- 100 מ"ג פלפל יבש) שדוּשנו אורגנית או קונבנציונאלית. בנוסף, ניתן לראות באיור 12 כי האחסון המדמה הובלה ימית אינו פוגע בתכולת הפוליפנולים ובחלק מטיפולי הפלפל אף נצפית מגמת עליה קלה ברמת הפוליפנולים לאחר האחסון.

7.א. השפעת הדישון על רמת ויטמין C בפלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים

בניסוי זה נבדקה השפעת דישון אורגני מול קונבנציונאלי על רמת החומצה האסקורבית בפלפלים אדומים וצהובים לאחר הקטיף. איור 13 מראה כי בסוף העונה (קטיף 7.3.11) נמצאו רמות ויטמין C גבוהות ב- 24%-29% מאשר בתחילת העונה (קטיף 15.12.10) בשני הזנים הנבדקים (אדום וצהוב) ובשני אופני הדישון (אורגני וקונבנציונאלי).

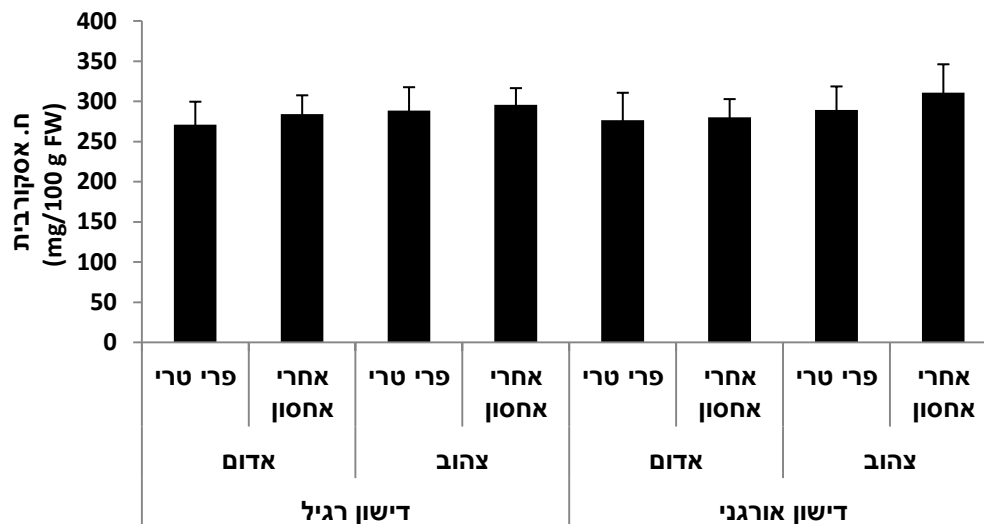


איור 13. רמות ת. אסקורבית (ויטמין C) לאורך העונה בפלפל טרי רגיל לעומת אורגני. התוצאות מייצגות ששה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, n=2.



איור 14. שינויים ברמות ת. אסקורבית (ויטמין C) לאורך העונה בפלפל אחרי אחסון רגיל לעומת אורגני. התוצאות מייצגות ששה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, n=2.

לאחר אחסון למשך שבועים בתנאים המדמים הובלה ימית נבחנה שוב (איור 14) רמת החומצה האסקורבית (ויטמין C). לא נמצאו הבדלים גדולים בין הטיפולים השונים, אולם ניתן לראות כי בסוף העונה (קטיף 7.3.11) חלה עליה של כ- 20%-26% ברמות החומצה האסקורבית בפלפלים אדומים וצהובים שדושנו אורגנית.

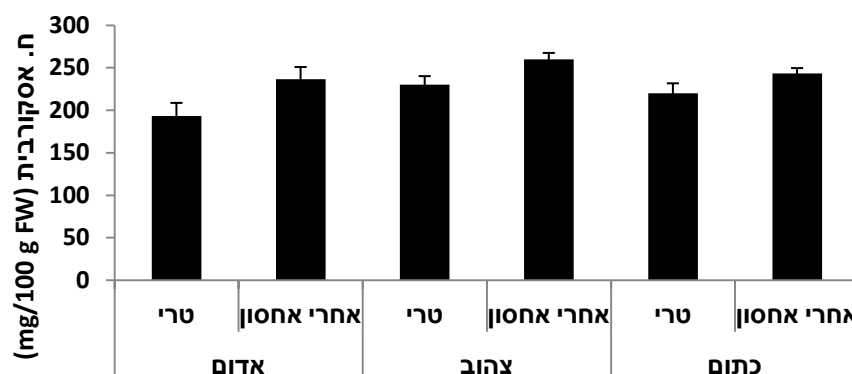


איור 15. השפעת האחסון, הזן ואופן הדישון על כמות ויטמין C בפלפלים לאורך כל העונה. התוצאות מייצגות ששה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, $n=12$.

איור 15 מסכם את התוצאות הממוצעות שהתקבלו מששת הקטיפים ברמות ויטמין C, ומראה כי אין הבדלים בין פלפלים אדומים לצהובים, טריים ומאוחסנים, ובין צורת דישון אחת לשנייה. מהתוצאות עולה כי אין הבדל מובהק סטטיסטית ברמת ויטמין C בפלפלים (אדומים וצהובים) בכל הטיפולים.

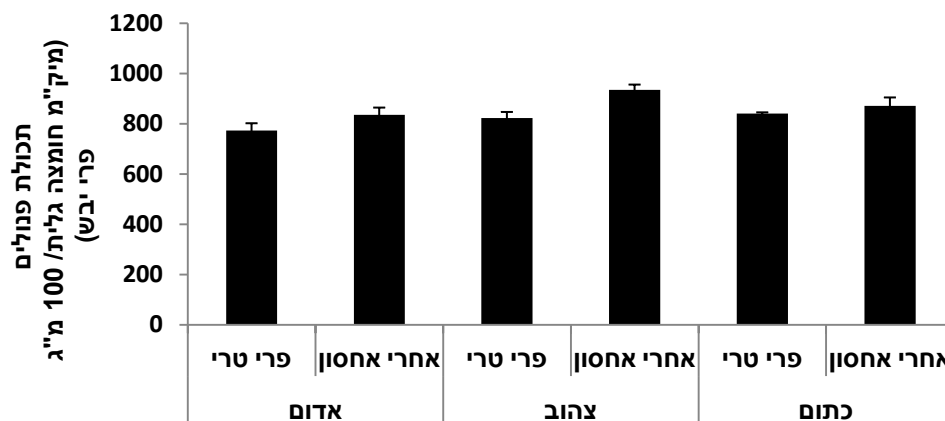
ב. מרכיבים תזונתיים בפלפלים מתוקים שגודלו בשפלה

בקיץ 2012 גודלו פלפלים מתוקים בשפלה לצורך ההשוואה עם התוצאות שהתקבלו מגידול פלפל בשנה קודמת באזור הבקעה. נבדקו פלפלים משלושה זנים: רומנס, פיונה ואלגריה בצבע אדום, צהוב וכתום, בהתאמה. במהלך עונת הגידול היו 3 קטיפים שטופלו ואוחסנו באותם תנאים בהם טופלו הפלפלים מהבקעה. גם בפלפלים אלו נבדקו רמות ויטמין C, פוליפנולים, פלבנואידים ואנטי-אוקסידנטים הן בפירות טריים והן לאחר אחסון.



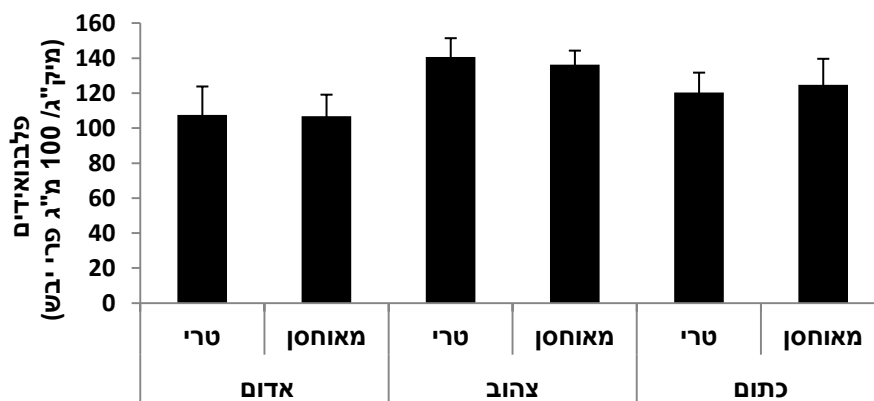
איור 16. רמת ויטמין C בפלפל מתוק מזנים שונים לפני ואחרי אחסון. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים (12/8/2012, 21/10/2012 ו-25/11/2012) ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, $n=6$.

איור 16 מראה כי האחסון מביא לעלייה של כ- 15% ברמות ויטמין C לעומת הפלפל הטרי. הרמה הגבוהה ביותר שנרשמה במהלך העונה הייתה בפלפל צהוב, בעוד שממוצע רמת הויטמין C בפלפל האדום הייתה הנמוכה ביותר. תוצאות אלו דומות לתוצאות שהתקבלו בפלפלים מהבקעה שם גם כן התקבלה בפלפל הצהוב רמת ויטמין C גבוהה יותר מאשר בפלפל האדום.



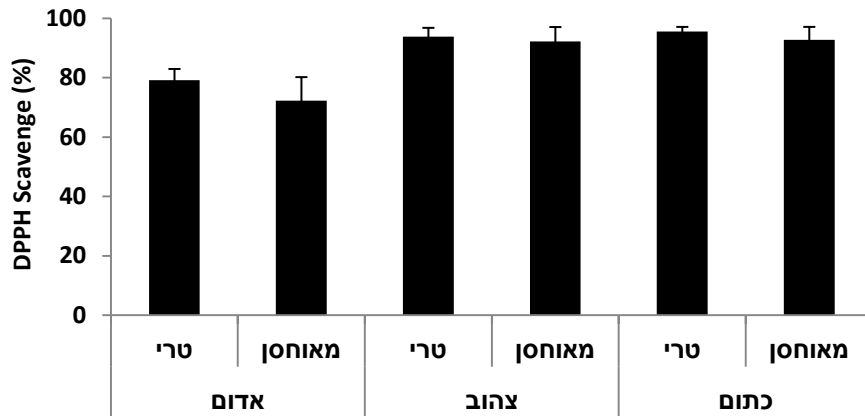
איור 17. רמת הפוליפנולים בפלפל מתוק טרי ואחרי אחסון מזנים שונים. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים (12/8/2012, 21/10/2012 ו-25/11/2012) ומבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, ($n \geq 8$).

בנוסף נבדקו גם רמות הפוליפנולים בזנים אלו (איור 17). בפרי טרי התקבלה רמה דומה בשלושת הזנים 770-840 מיק"מ חומצה גלית ל 100 מ"ג פלפל יבש. אחסון הפלפל למשך שבועיים בקירור ו 3 ימים חיי מדף הביאו לעלייה קלה ברמת הפוליפנולים בשלושת הזנים, כאשר בזן הצהוב אף נראית עלייה של 12%.



איור 18. תכולת הפלבונואידים לאורך כל העונה בפלפל מתוק טרי ואחרי אחסון מזנים שונים. שלושה קטיפים, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, ($n \geq 4$).

איור 18 מראה כי בדומה לפיטונוטריינטים האחרים רמות הפלבונואידים בפלפלים צהובים היו הגבוהים ביותר יחסית לזנים הכתום והאדום, וכי תכולת הפלבונואידים שנבדקה בפלפלים מהשפלה במהלך עונת הגידול לא הושפעה מתהליך האחסון.

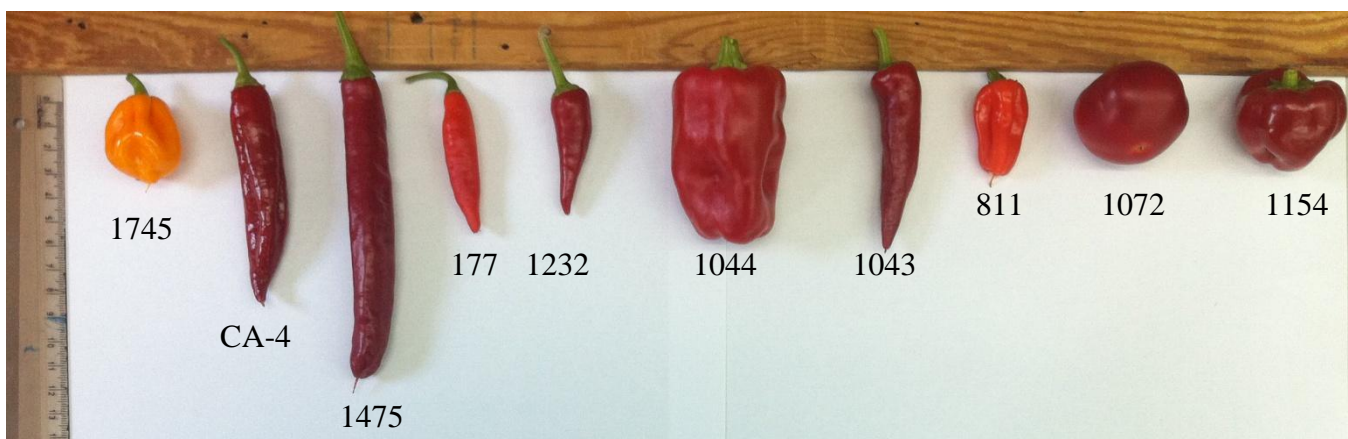


איור 19. ממוצע רמת האנטיאוקסידנטים לאורך כל העונה בפלפלים מתוקים טריים ולאחר אחסון. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן ($12 \geq n \geq 7$).

רמת האנטיאוקסידנטים הנמוכה ביותר (פחות מ- 80% DPPH Scavenge) נצפתה בפלפל אדום. לעומת זאת בזנים הצהוב והכתום התקבלה רמת אנטי אוקסידנטים גבוהה יותר- מעל 92% DPPH Scavenge (איור 19). בבדיקת האנטי אוקסידנטים בפלפלים מתוקים לא נצפה שינוי לאחר האחסון.

ג. מרכיבים תזונתיים בזני פלפל חריף שונים

עשרה זני פלפל חריף השונים בצבעם ובצורתם, התקבלו וגודלו בתנאי גידול מבוקרים בחממה במכון וולקני ע"י ד"ר אילן פארן. מכל זן גודלו 10 צמחים במצעים מנותקים (עציצים). הפלפלים נשתלו בסוף קיץ 2011 והקטיפה התחיל בסוף נובמבר 2011 ונמשך עד פברואר 2012. בתחילת העונה נקטפו פלפלים בודדים ולכן לא בוצעה בדיקת איכות, והם יובשו ונשמרו כאבקה בהקפאה לבדיקות הביוכימיות. במשך העונה בוצעו כ- 9 קטיפים וברובם היה מספר הפלפלים שנקטף גדול והספיק לבדיקת איכות, לייבוש ולהקפאה כפרי טרי.



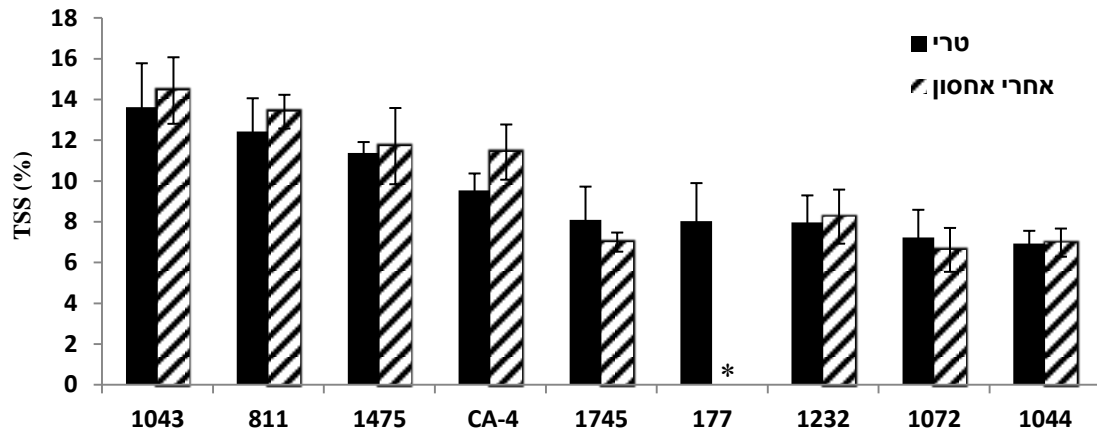
תמונה 1. עשרת זני הפלפל שנבדקו במהלך העונה.

1.ג. השוואת הופעתם של פלפלים חריפים מזנים שונים

בפלפלים חריפים לא בוצעה בדיקת מוצקות משום שבדיקה זו הינה הרסנית ולא הייתה כמות מספקת של פלפלים לביצוע כל הבדיקות. מבדיקת הופעת הפרי אחרי אחסון של 14 יום ב 7 מ"צ ו- 3 ימים חיי מדף ב 20 מ"צ, עולה כי כל זני הפלפל החריף לא נרקבו במהלך האחסון, וכל הפירות שאוחסנו במהלך העונה נראו ללא פצעים, נזקי צינה או ריקבון. הפירות שמרו על מרקם וצורה זהה לפרי טרי.

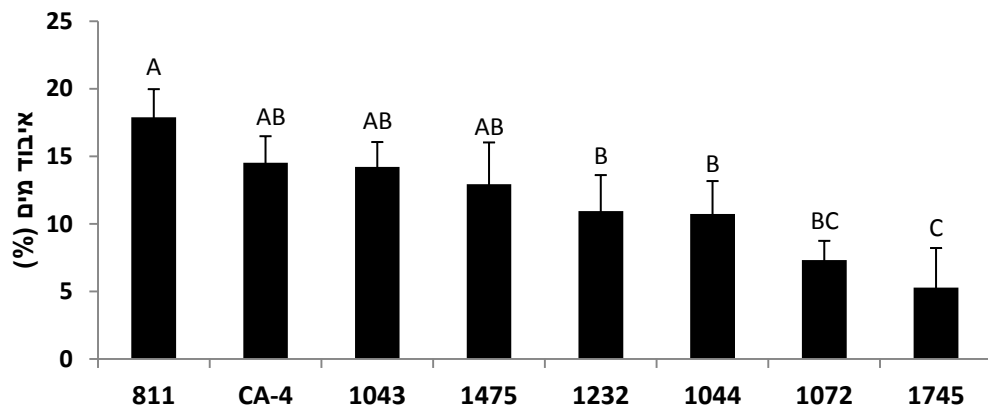
2.ג. השוואת איכותם של פלפלים חריפים מזנים שונים

בדיקות האיכות שבוצעו כללו אחוז Total Soluble Solids (TSS) בפלפל לפני ואחרי אחסון ואיבוד מים לאחר אחסון. בדיקת Total Soluble Solids (TSS) - הינה בדיקת המצביעה על רמת הסוכר בפרי. הבדיקה בוצעה על פלפלים חריפים מיד לאחר הקטיף ולאחר אחסון בתנאים המדמים הובלה ימית.



איור 20. אחוז ה-TSS (סוכר) בפלפל חריף טרי ואחרי אחסון. 14 ימי אחסון ב- 7 מ"צ + 3 ימים ב- 20 מ"צ. התוצאות מבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן של חמישה קטיפים, 5 פירות לקטיף (n=25). *לא נבדק כיוון שלא היו מספיק פירות.

באיור 20 ניתן לראות כי אין לאחסון השפעה משמעותית על רמת הסוכר באותו זן. לעומת זאת היה הבדל משמעותי בין הזנים השונים. רמת הסוכר הנמוכה ביותר בפרי טרי ומאוחסן נצפתה בזן 1044 בעוד שפלפלים טריים ומאוחסנים מזן 1043 מכילים את רמת הסוכר הגבוהה ביותר.

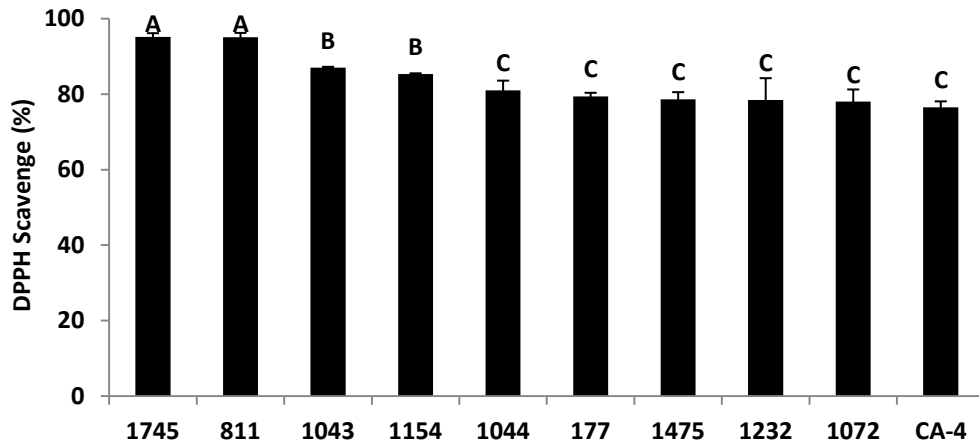


איור 21. איבוד המים בפלפלים חריפים. 14 ימי אחסון ב- 7 מ"צ + 3 ימים ב- 20 מ"צ. התוצאות מבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן של חמישה קטיפים (n>20), מספר הפירות מכל קטיפ (n≥3). (10≥n)

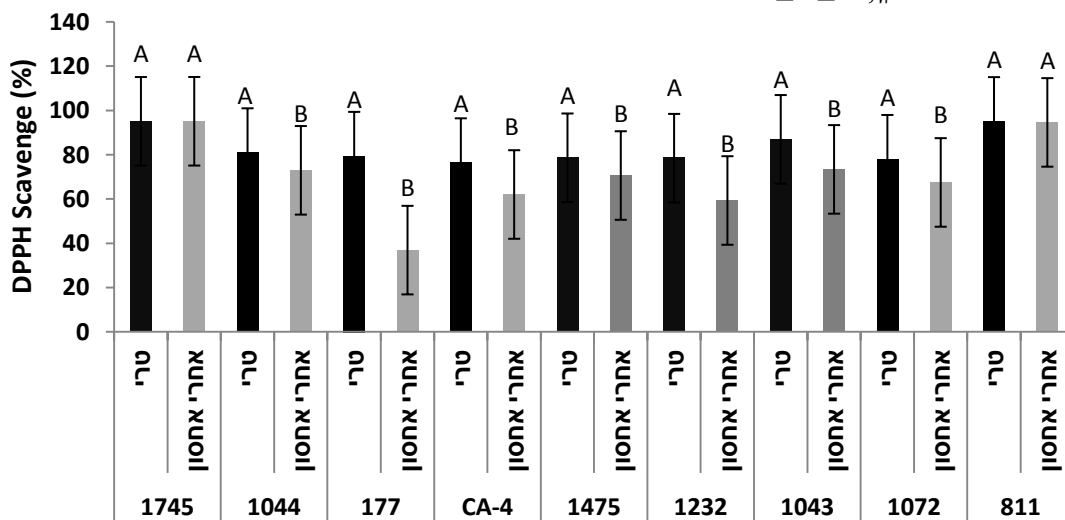
בדיקת איבוד מים בוצעה על שמונה מבין עשרת הזנים, כיוון שיש צורך בהרבה פירות לשקילה (טריים ומאוחסנים) כדי שהתוצאה שתתקבל תהיה מייצגת, ומהזנים 177 ו-1154 לא הספיק מספר הפירות למטרה זו. באיור 21 ניתן לראות כי קיימים הבדלים משמעותיים באחוז איבוד המים בין הזנים השונים. זן 1745 הינו הזן ששמר על משקלו לאורך האחסון ומוצע איבוד המים לאורך כל העונה היה הנמוך ביותר (כ-5%). לעומת זאת, פירות מזן 811 איבדו עד 20% ממשקלם בעקבות האחסון. ניתן לראות שהזנים האחרים איבדו בין 10-15% ממשקלם.

ג.3. רמות האנטי-אוקסידנטים בזני פלפל חריף טריים ומאוחסנים

בניסויים הבאים, נבדקה הפעילות הכוללת של נוגדי החימצון בזני הפלפל החריף השונים. רמת האנטיאוקסידנטים שנצפתה בפלפלים חריפים טריים הינה שונה מזן לאחר אך כל הזנים הראו פעילות גבוהה מעל 76% (איור 22). הרמה הגבוהה ביותר נצפתה בפירות מהזנים 1745 ו-811 (כ-95%) בעוד שהרמה הנמוכה ביותר נצפתה בפירות מהזנים CA-4 ו-1072 (כ-76%).



איור 22. רמת האנטיאוקסידנטים בפלפל חריף טרי. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן, $n \geq 4$.



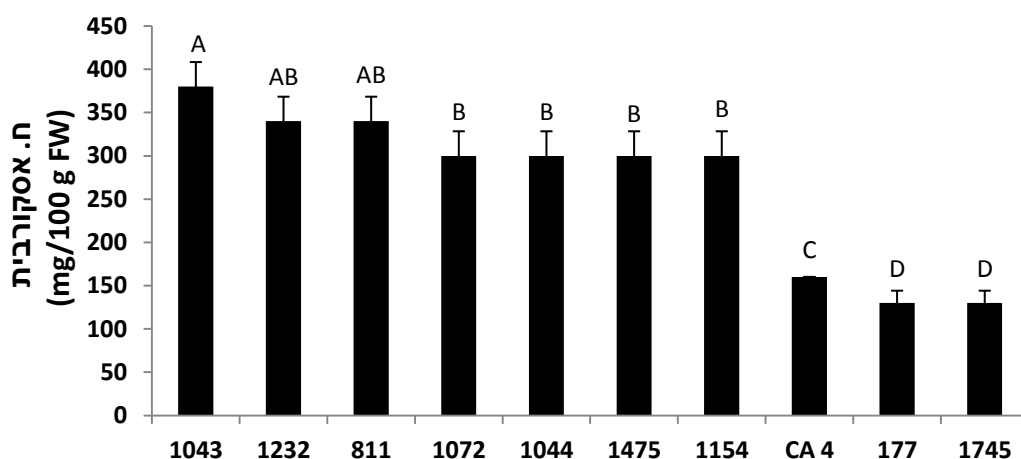
איור 23. רמת האנטיאוקסידנטים בפלפל חריף טרי ואחרי אחסון. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים ומבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן. $n \geq 2$.

בבדיקת השפעת האחסון על רמת נוגדי החמצון בפלפל חריף ניתן לראות כי ברוב הזנים קיימת מגמת ירידה קלה אך מובהקת סטטיסטית ברמת האנטי-אוקסידנטים לאחר אחסון מלבד בזנים 1745 ו-811 בהם לא היה שינוי ברמות האנטי-אוקסידנטים לאחר האחסון (איור 23). זן 177 הושפע מאד מהאחסון, ורמת האנטי-אוקסידנטים שבו ירדה פי שתיים בעקבות האחסון. בפרות מאוחסנים מזן 177 נמדדו רמות אנטיאוקסידנטים פי שתיים וחצי פחות מאשר בזנים המובילים, דבר המשקף את השונות הרבה בין הזנים. בששת הזנים האחרים נעו רמות האנטיאוקסידנטים בין 59%-73%.

כדי לבחון אם קיימים הבדלים ברמותיהם של אנטיאוקסידנטים ספציפיים (פלבנואידים, פוליפנולים וכד') בין הזנים השונים, נבדקו רמותיהם של המרכיבים השונים באופן ספציפי.

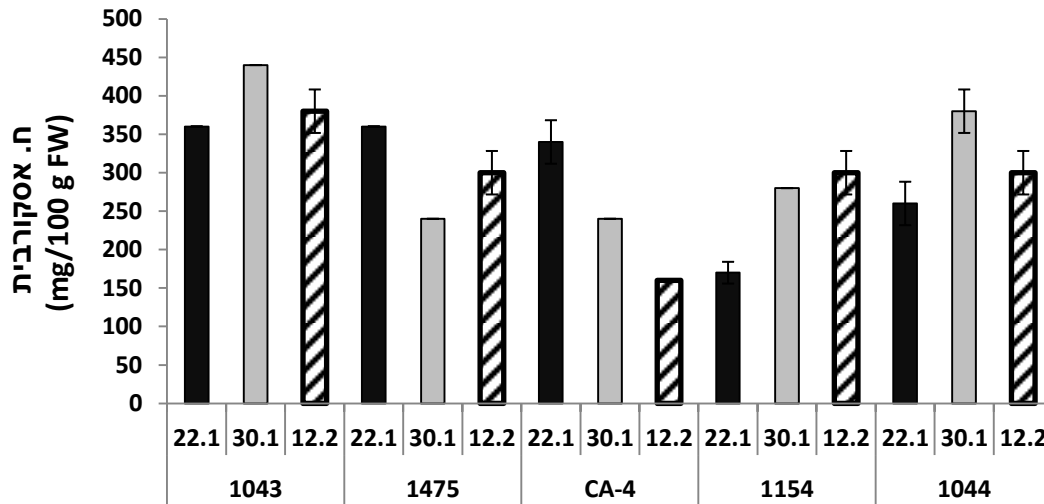
ג.4. רמות ויטמין C (חומצה אסקורבית) בזני פלפל חריף שונים טריים ומאוחסנים

רמת ויטמין C נבחנה בעשרת זני הפלפלים החריפים- טריים ומאוחסנים.



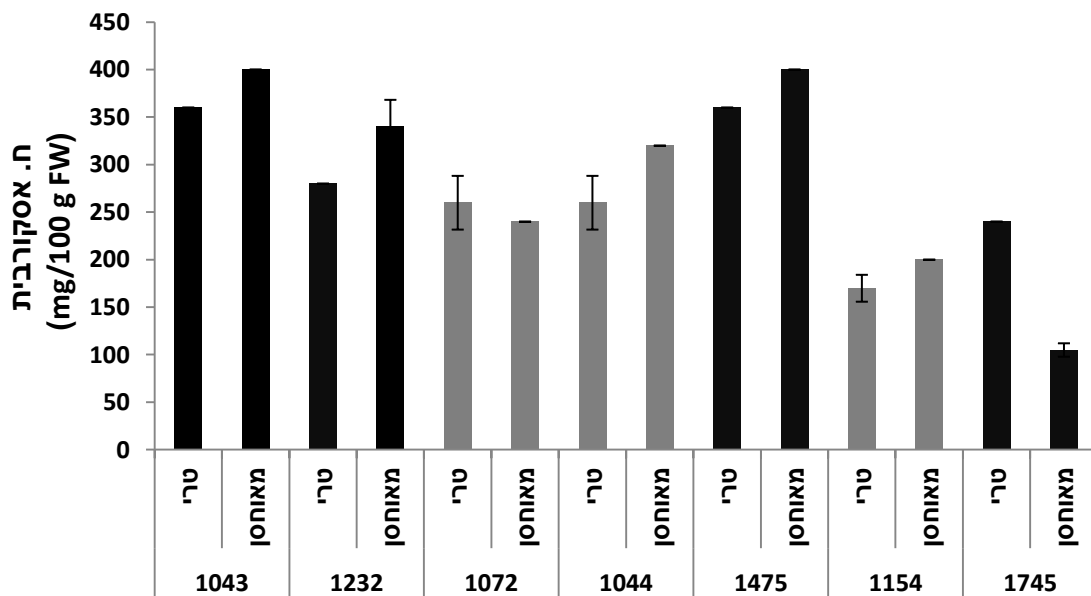
איור 24. רמת ויטמין C בזני פלפל חריף טרי. הפלפלים נקטפו ב 12-2-2012, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן (n = 2).

באיור 24 ניתן לראות כי הזן המכיל את רמת הויטמין C הגבוהה ביותר הוא זן 1043. שישה זנים נוספים מכילים רמות ביניים של ויטמין C (300-340 מ"ג/100 גרם פרי טרי) בעוד ששלושת הזנים CA-4, 177 ו-1745 מכילים רמת ויטמין C נמוכה פי שתיים.



איור 25. השפעת מועד הקטיף על רמת ויטמין C בפלפל חריף טרי מזנים שונים. התוצאות מבוטאות כממוצע שלושה קטיפים (22-1-2012, 30-1-2012 ו-12-2-2012), (ממוצע \pm סטיית תקן) ($n = 2$).

באיור 25 ניתן לראות שפלפלים חריפים שנקטפו בשלושה מועדים שונים מכילים רמת ויטמין C שונה מקטיף לאחר באותו הזן. זן 1043 שמר על רמת ויטמין C הגבוהה ביותר ביחס לזנים האחרים בשלושת הקטיפים בעוד שבזן CA-4 נצפתה מגמת ירידה, ובזן 1154 נצפתה מגמת עליה ברמת ויטמין C במהלך העונה.

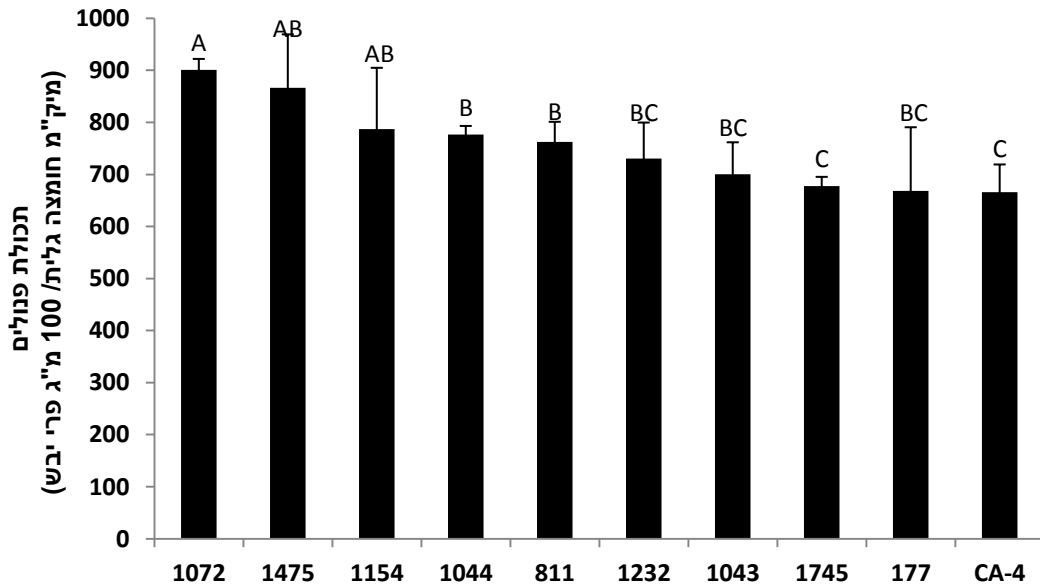


איור 26. השפעת האחסון על רמת ויטמין C בפלפלים חריפים. הפלפלים נקטפו ב-22-1-2012 התוצאות מבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן ($n = 2$).

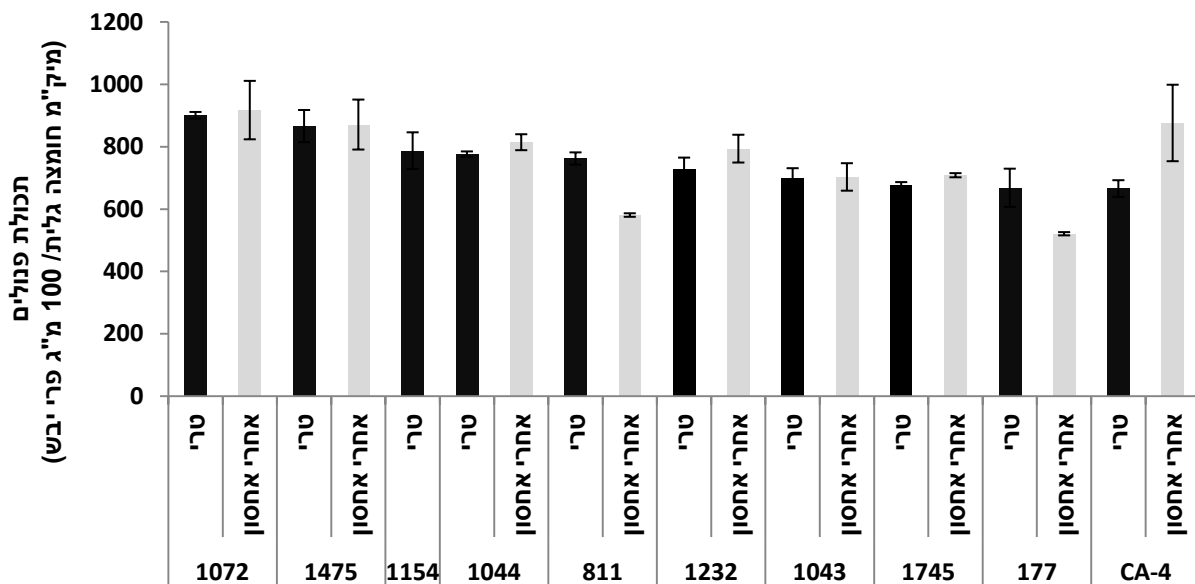
בנוסף, נבדקה השפעת האחסון על רמת ויטמין C בזני הפלפל החריף השונים. מהתוצאות עולה כי בדומה לפלפלים מתוקים, בחמישה מבין שבעה זנים שנבדקו ישנה עליה בתכולת ויטמין C לאחר האחסון, בעוד שבזן 1745 נצפתה ירידה של יותר מ-50% בתכולת ויטמין C בעקבות האחסון (איור 26). מבין הזנים המאוחסנים, זן זה מכיל את הרמה הנמוכה ביותר של ויטמין C.

ג.5. רמת הפוליפנולים בזני פלפל חריף שונים טריים ומאוחסנים

רמת הפוליפנולים נבחנה בעשרה זני פלפל חריף טריים מיד לאחר הקטיף ולאחר אחסון וחיי המדף. באיור 27 ניתן לראות כי רמות הפוליפנולים בפלפלים חריפים טריים נעו בין 900 (מיק"מ חומצה גלית/100 מ"ג פרי יבש) לגלית/100 מ"ג פרי יבש) בזן 1072 שהכיל את הכמות הגבוהה ביותר של פוליפנולים, לבין 666 (מיק"מ חומצה גלית/100 מ"ג פרי יבש) בזן CA-4 שהכיל את הרמות הנמוכות ביותר.



איור 27. רמת הפוליפנולים בפלפל חריף טרי מזנים שונים. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים שונים ומבוטאות כממוצע ± סטיית תקן ($n \geq 4$).



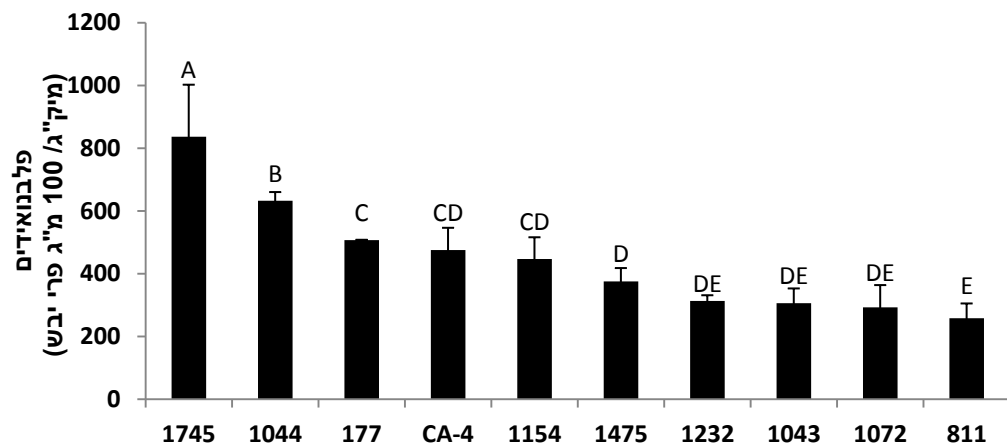
איור 28. השפעת האחסון על רמת הפוליפנולים בפלפל חריף מזנים שונים. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים שונים ומבוטאות כממוצע ± סטיית תקן ($n \geq 4$).

בהמשך נבדקו כל הזנים שמהם נקטפו פירות בכמות שהספיקה גם לבדיקות השפעת האחסון על רמת הפוליפנולים. באיור 28 ניתן לראות כי ברוב הזנים, אחסון בתנאי הובלה ימית לא פגע בתכולת

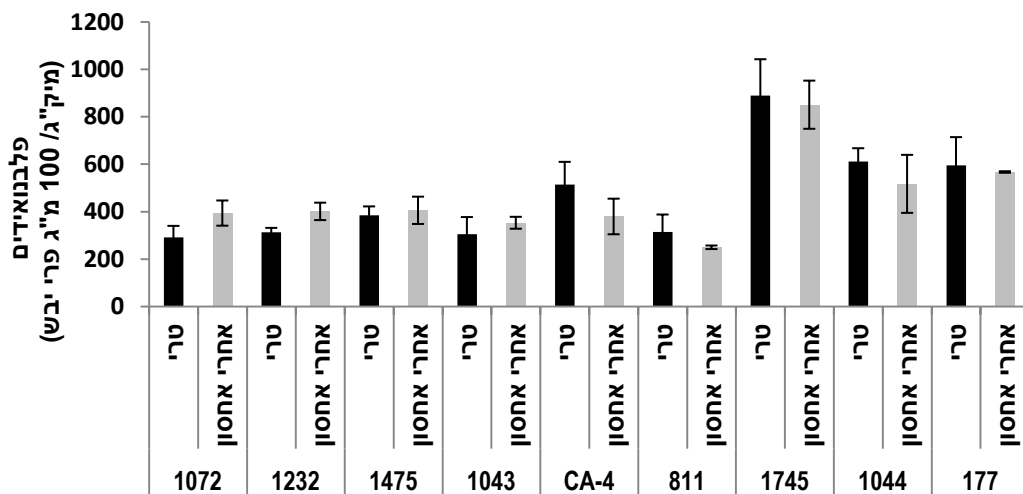
הפוליפנולים של הפלפל החריף, מלבד הזנים 811 ו-177 בהם נצפתה ירידה משמעותית בתכולת הפוליפנולים. זן CA-4 הינו הזן היחיד בו גרם האחסון לעליה ברמת הפוליפנולים. בזן 1072 מאוחסן נצפתה רמת הפוליפנולים הגבוהה ביותר (כ- 917 מיק"מ חומצה גלית/100 מ"ג פרי יבש) לעומת רמת הפוליפנולים הנמוכה ביותר שנצפתה בזן 177 אחרי אחסון ועמדה על כ- 520 מיק"מ חומצה גלית/100 מ"ג פרי יבש.

ג.6. תכולת הפלבנואידים בפלפלים חריפים טריים ומאוחסנים

רמות הפלבנואידים נבדקו בעשרת זני הפלפל החריף הטריים. בהשוואה שנערכה בין הזנים עולה שיש שונות מובהקת בתכולת הפלבנואידים הממוצעת בין עשרת הזנים. תכולת הפלבנואידים הגבוה ביותר נצפתה בזן 1745 בעוד שתכולת הפלבנואידים הנמוכה ביותר נמדדה בזן 811 שהכיל פחות מ 30% מכמות הפלבנואידים בזן 1745 (איור 29).



איור 29. תכולת הפלבנואידים (מיק"מ/100 ג' פרי יבש) בפלפל חריף טרי. התוצאות מייצגות ארבעה קטיפים, ומבוטאות כממוצע ± סטיית תקן (n ≥ 2).

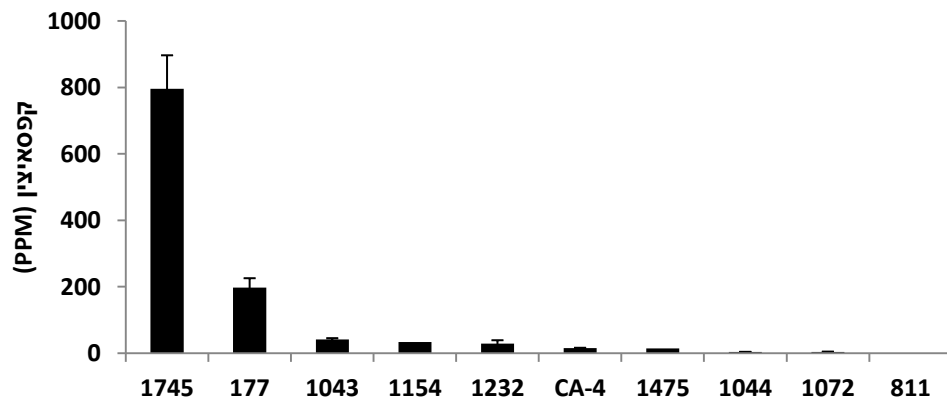


איור 30. תכולת הפלבנואידים לאורך כל העונה בפלפל חריף טרי ואחרי אחסון מזנים שונים. התוצאות מייצגות ארבעה קטיפים, ומבוטאות כממוצע ± סטיית תקן (n ≥ 2).

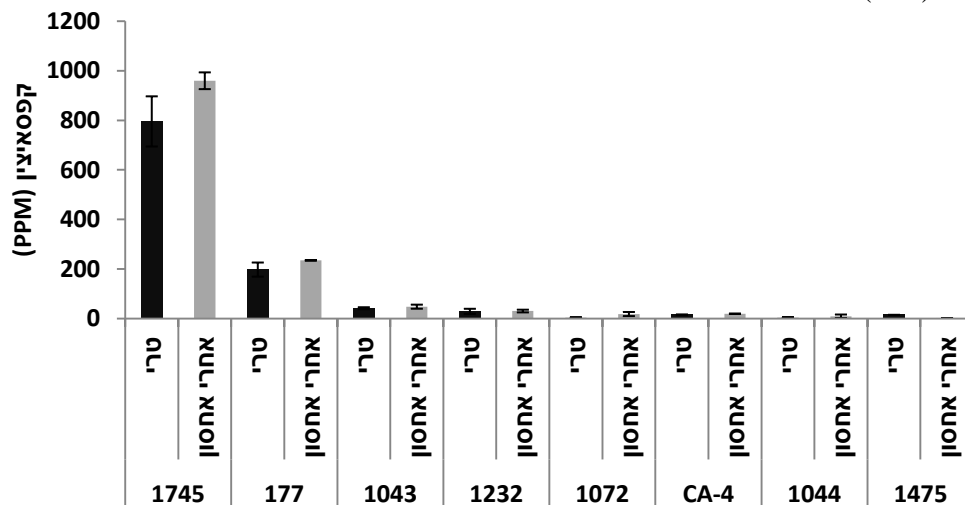
בנוסף, נבדקו השפעות האחסון וחיי המדף על רמות הפלבנואידים. כפי שניתן לראות באיור 30, לתהליך האחסון אין השפעה על רמת הפלבנואידים. מניסויים אלו עולה כי גם לאחר האחסון הזן 1745 הינו העשיר ביותר בפלבנואידים (כ- 800 מיק"ג ל 100 מ"ג פרי יבש) לעומת שאר הזנים שנצפתה בהם רמת פלבנואידים נמוכה יחסית (כ- 200-600 מיק"ג ל 100 מ"ג פרי יבש) בכל העונה הן בפרי טרי והן בפרי מאוחסן.

7.ג. רמות הקפסאיצין בפלפלים חריפים טריים ומאוחסנים

רמות הקפסאיצין נבדקו בזני הפלפל החריף השונים. מהבדיקה עולה שיש שוני רב ברמות הקפסאיצין בין פלפלים טריים מזנים שונים (איור 31). פלפלים טריים מזן 1745 מכילים את הכמות הגבוהה ביותר (כ- 800 PPM), ולעומתם פלפלים טריים מזן 811 מכילים את הכמות הנמוכה ביותר של קפסאיצין (0 PPM). בשאר הזנים נמצאו רמות ביניים, כאשר זן 177 מכיל כ- 200 PPM קפסאיצין בעוד שהזנים האחרים מכילים רמות קפסאיצין הנעות בטווח 0-42 PPM. בכל הזנים האחרים לא נמדדו שינויים משמעותיים ברמות הקפסאיצין בעקבות האחסון (איור 32).



איור 31. רמות הקפסאיצין בפלפל חריף טרי. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן משני ניסויים שונים (n=2).



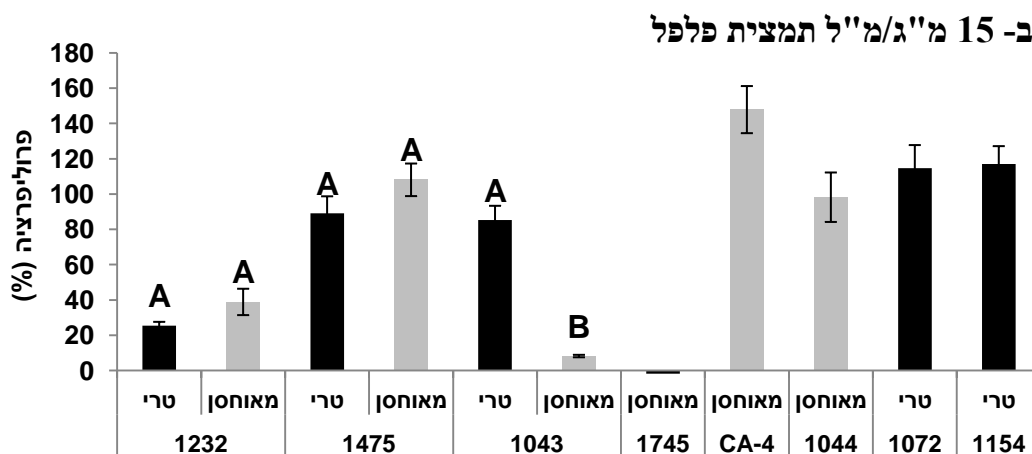
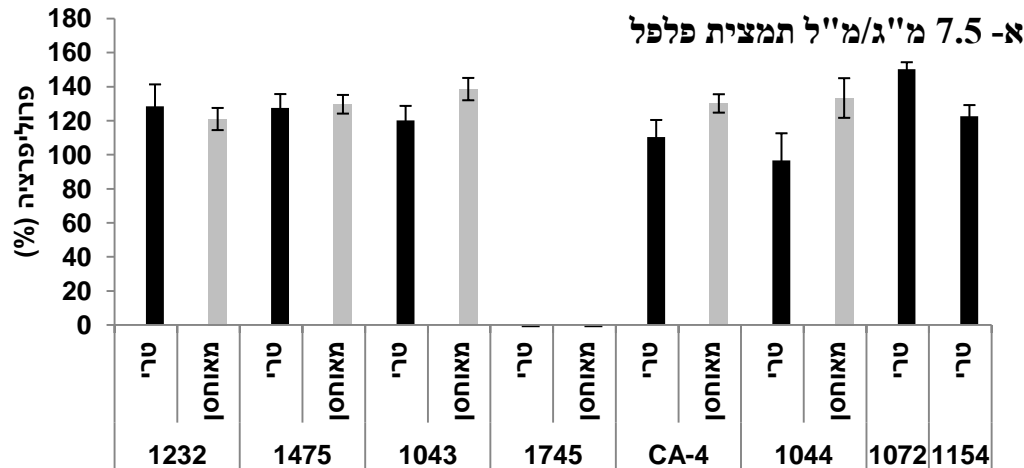
איור 32. השפעת האחסון על רמות הקפסאיצין בפלפל חריף. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm סטיית תקן משני ניסויים שונים (n=2).

ד. השפעת תמציות פלפל חריף על חלוקת תאי סרטן ממערכת העיכול

1.7. השפעת תמציות פלפל חריף על חלוקת תאי HepG2

הפעילות האנטי סרטנית של הזנים השונים נבחנה בשורת תאי סרטן הכבד HepG2 ע"י הוספת

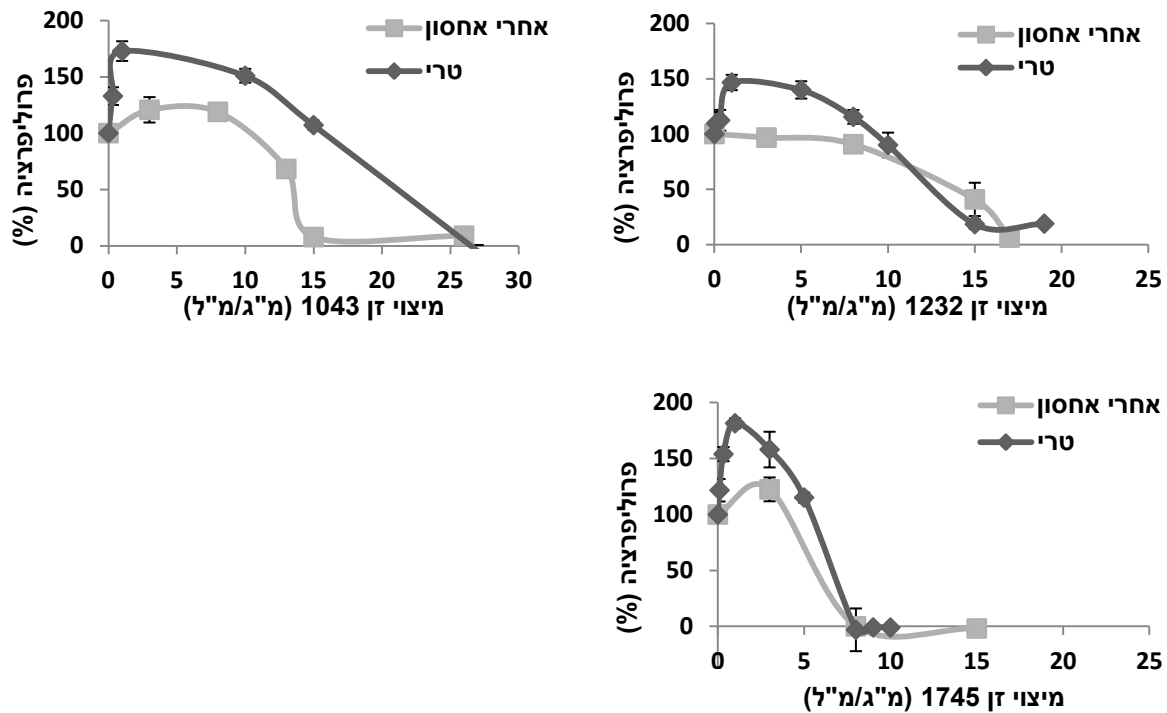
תמציות פלפל חריף מזנים שונים בריכוזים שונים.



איור 33. השפעת זני הפלפל החריף על פרוליפרציית תאי HepG2 בשני ריכוזים שונים. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן של 2-3 ניסויים שונים עבור כל זן (n=12-20).

בשלב הראשון נבחנה הפעילות האנטי-סרטנית בריכוז של 7.5 מ"ג/מ"ל (איור 33א). הזן 1745 היה הזן היחיד שעכב לחלוטין את פרוליפרציית התאים. לזנים האחרים לא הייתה פעילות מעכבת בריכוז זה. לאחסון אין השפעה על הפעילות המעכבת של זן זה. באיור 33ב נבחנו חלק מהזנים בריכוז 15 מ"ג/מ"ל כדי לזהות זנים נוספים בעלי פעילות אנטי פרוליפריטיבית. חלק מהזנים שנבדקו בריכוז 7.5 מ"ג/מ"ל לא נבדקו בריכוז 15 מ"ג/מ"ל מאחר וריכוז המינצוי שהתקבל מהפרי היה נמוך ולא היה ניתן לטפל בתאים בריכוז גבוה בשל מגבלות הנפה בפלטות (96 בארות) בהן נזרעו התאים. ניתן לראות כי בריכוז הנבדק (15 מ"ג/מ"ל), שני זנים נוספים בלטו בפעילותם האנטי-פרוליפריטיבית: 1232 ו-1043. כשנבדקה השפעת האחסון על הפעילות האנטי סרטנית נמצא כי בזן 1043 נצפתה עליה משמעותית

בפעילות האנטי-פרוליפרטיבית לאחר האחסון, בעוד שהפעילות האנטי-פרוליפרטיבית בזן 1232 ירדה מעט בעקבות האחסון.



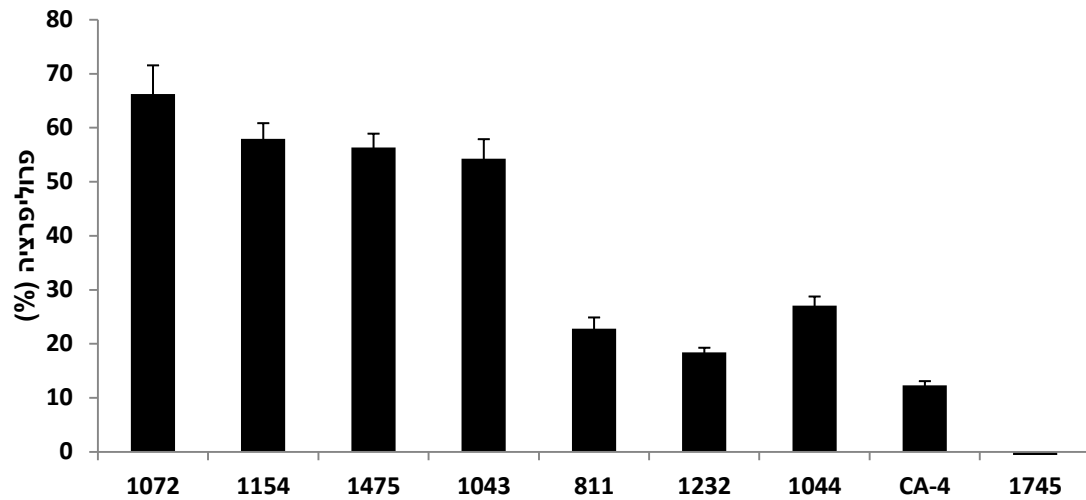
איור 34. פעילותם האנטי-פרוליפרטיבית של מיצויי הפלפלים החריפים על תאי HepG2. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן של 3-5 ניסויים שונים עבור כל זן.

שלושת זני הפלפל החריף שהראו פעילות אנטי פרוליפרטיבית גבוהה נבדקו בריכוזים שונים. איור 34 מראה כי הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית תלויה בריכוז תמצית הפלפל וככל שריכוז התמצית עולה רמת הפרוליפרציה יורדת עד לעיכוב מלא. ניתן לראות כי מבין הזנים הטריים, הזן האפקטיבי ביותר הינו זן 1745 שמראה עיכוב מוחלט כבר בריכוז 7.5 $\mu\text{g/ml}$. זנים 1232 ו-1043 במצבם הטרי פעילים פחות ומביאים לעיכוב מקסימלי בריכוז 17.5 $\mu\text{g/ml}$ ו-25 $\mu\text{g/ml}$ בהתאמה. הזנים השונים הגיבו באופן שונה לאחסון. בעוד שהריכוז האפקטיבי האנטי-פרוליפרטיבי של זנים 1745 ו-1232 היה דומה הן בפרי הטרי והן בפרי המאוחסן, בזן 1043 האחסון הגביר את הפעילות, ונדרש ריכוז גבוה יותר (25 $\mu\text{g/ml}$) של פרי טרי מאשר של פרי מאוחסן (15 $\mu\text{g/ml}$) כדי להשיג עיכוב מוחלט של הפרוליפרציה.

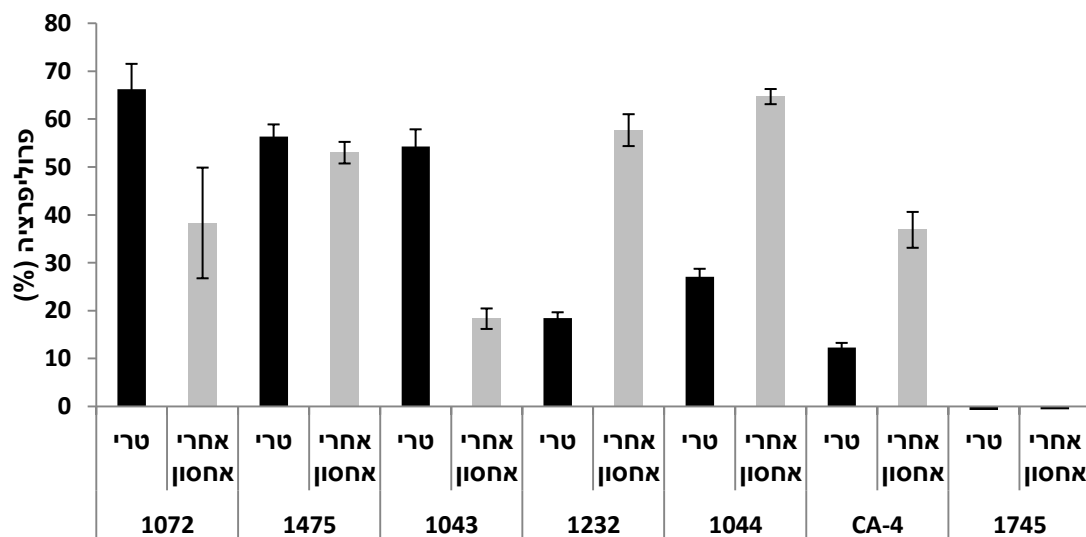
ד. השפעת תמציות פלפל חריף על חלוקת תאי סרטן המעי HCT-116.

הפעילות האנטי פרוליפרטיבית של תמציות פלפל חריף נבחנה גם על שורת תאי סרטן המעי הגס HCT-116. תמציות הפלפל החריף נבדקו בריכוז 10 $\mu\text{g/ml}$. מהתוצאות באיור 35 עולה כי בריכוז הנבדק כל הזנים החריפים מעכבים לפחות ב-35% את חלוקת התאים הסרטניים. בדומה לתוצאות שהתקבלו לגבי עיכוב פרוליפרציית תאי סרטן הכבד HepG2, הזן הבולט מבחינת עיכוב הינו הזן 1745. הזן האפקטיבי השני הינו זן CA-4 שעכב 88% מפרוליפרציה של תאי סרטן המעי HCT-116 אולם,

לא השפיע על פרוליפרציית תאי סרטן הכבד HepG2. גם לזנים 1044, 1232 ו- 811 היה אפקט אנטי-פרוליפרטיבי בולט והם עיכבו 80%-90% מהפרוליפרציה של תאים אלו.

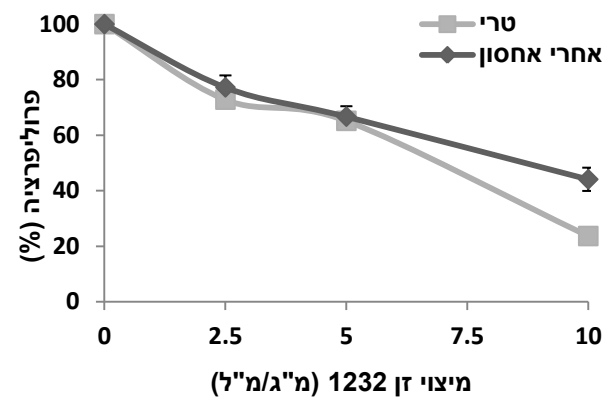
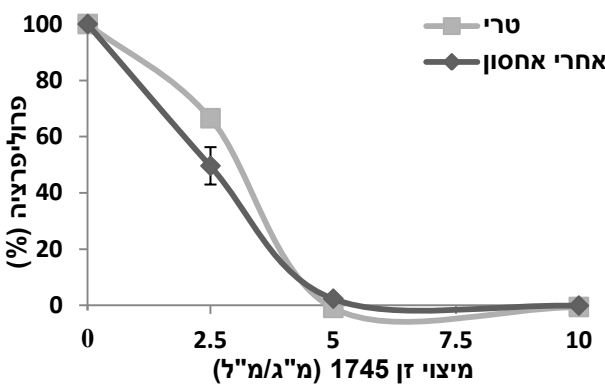
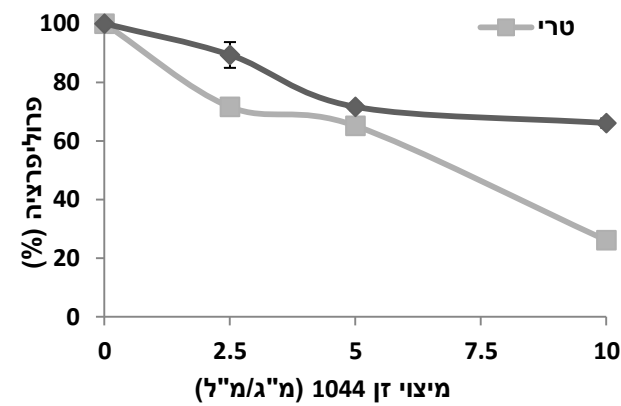
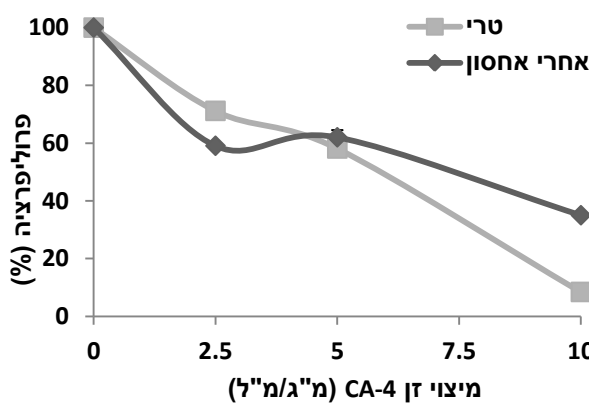
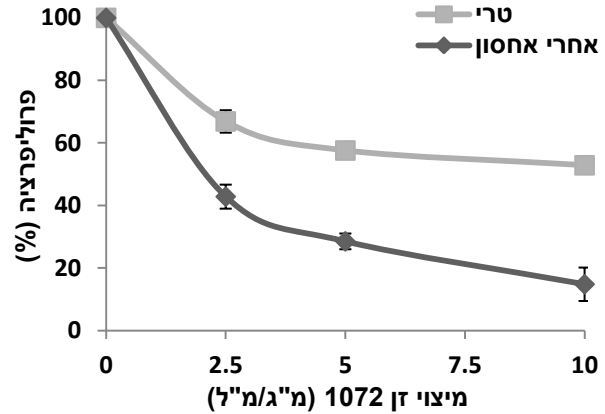
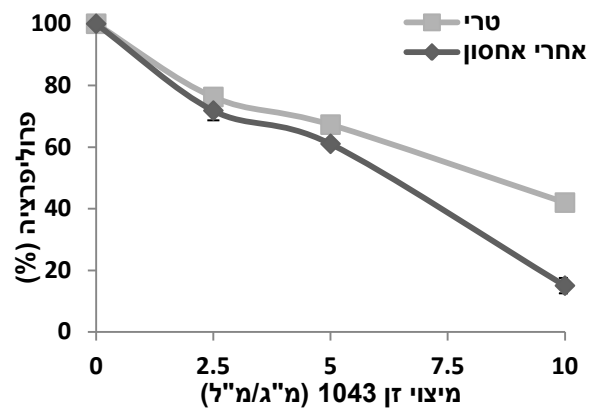


איור 35. השפעת זני פלפל חריף טרי על פרוליפרציית תאי HCT116. המיצויים נבדקו בריכוז 10 מ"ג/מ"ל. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן של 3-4 ניסויים שונים עבור כל זן (n=14-30).



איור 36. השפעת אחסונם של זני פלפל חריף על פרוליפרציית תאי HCT116. המיצויים נבדקו בריכוז 10 מ"ג/מ"ל. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן של 3-4 ניסויים שונים עבור כל זן (n=14-30).

בנוסף נבחנה השפעת אחסון הפלפלים על האפקט האנטי פרוליפרטיבי. התוצאות באיור 36 מראות כי בזנים 1072 ו- 1043 חלה ירידה באחוז הפרוליפרציה לאחר אחסון כלומר הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית עולה. לעומת זאת, בזנים 1232, 1044 ו- CA-4 נפגע האפקט האנטי-פרוליפרטיבי בעקבות האחסון. זן 1745 שמר על פעילותו הגבוהה לאחר אחסון ועיכב פרוליפרציית התאים באופן מוחלט. הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית כתלות בריכוז של הזנים מוצגת באיור 37.

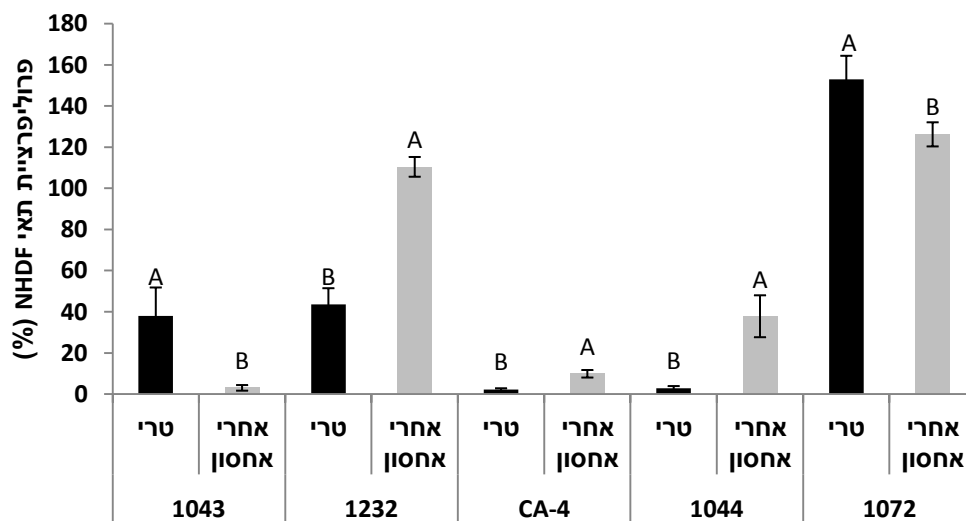


איור 37. עיכוב פרוליפרציה של תאי HCT-116 ע"י מיצויי פלפל חריף טרי ומאוחסן. התוצאות מבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן של 3-5 ניסויים שונים עבור כל זן.

ד.3. השפעת תמציות פלפל חריף על חלוקת תאים נורמאליים

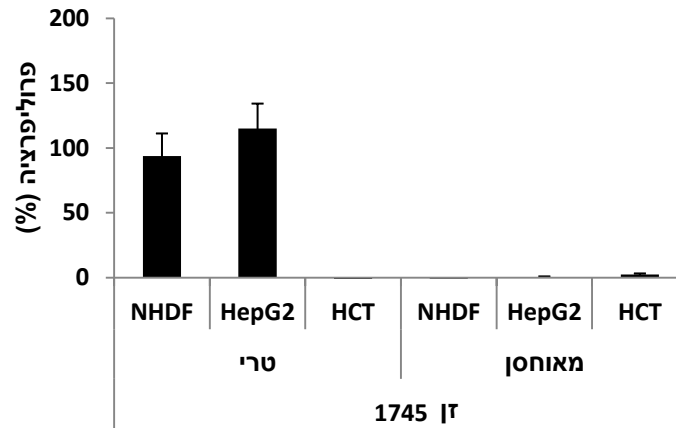
כדי לבחון האם הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית היא ספציפית כנגד תאי סרטן או נובעת מרעילות לא ספציפית של מיצויי הפלפל גם לתאים נורמליים, נבדק האפקט של המיצויים השונים על חלוקת שורת תאים פיברובלסטים הומניים נורמליים (Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)). הריכוז בו נבדקה השפעת המיצויים על תאים נורמליים היה הריכוז בו נצפה האפקט האנטי-פרוליפרטיבי המקסימלי (10 מ"ג/מ"ל). באיור 38 ניתן לראות כי זנים 1043, CA-4, ו-1044, 1232 טרי מונעים את הפרוליפרציה גם בתאים נורמליים, כך שאינם יכולים לפגוע ספציפית רק בתאי סרטן. לעומתם זן 1232 מאוחסן מעכב ספציפית רק את התאים הסרטניים מסוג HepG2 ו-HCT116. כמו כן, זן 1072 מעכב ספציפית את פרוליפרציית תאי סרטן המעי HCT116 אך לא את תאי סרטן הכבד HepG2 ואינו פוגע בתאים נורמליים.

זן 1745 נבדק בריכוז האפקטיבי עבורו- 5 מ"ג/מ"ל (ע"פ תוצאות הניסויים המוצגים באיורים 34 ו-37). באיור 39 ניתן לראות כי מיצוי שהופק מזן זה (פירות טריים בלבד) מונע פרוליפרציית תאי סרטן המעי HCT116 ואינו פוגע בחלוקת התאים הנורמליים NHDF. זן זה אינו מונע פרוליפרציית תאי סרטן הכבד מסוג HepG2. באיור 39 ניתן גם לראות כי לאחר אחסון מיצוי מזן 1745 פוגע באופן לא ספציפי הן בתאים הנורמליים והן בתאים הסרטניים (משני הסוגים).



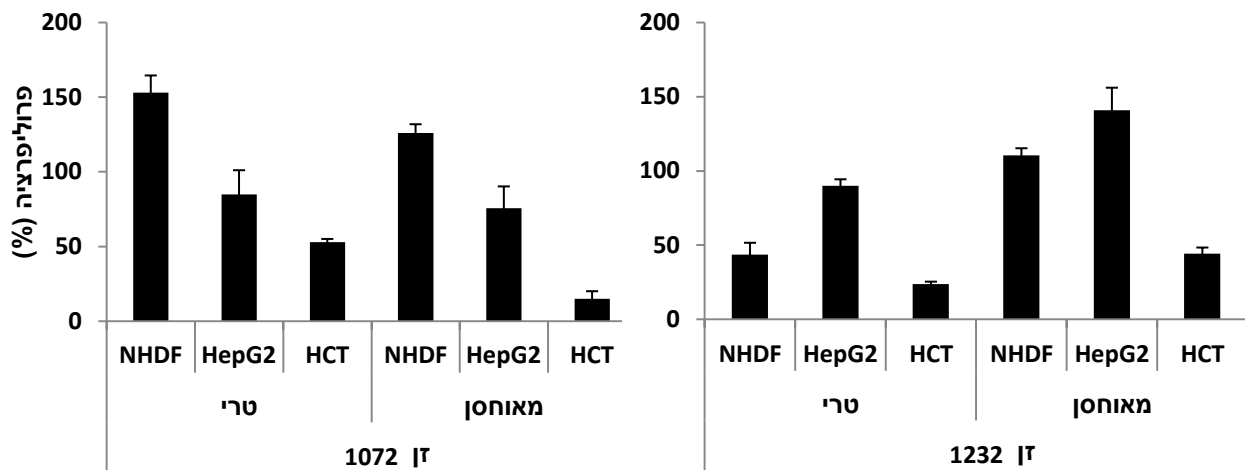
איור 38. השפעת זני הפלפל החריף על פרוליפרציית תאי NHDF. התמציות נבדקו בריכוז 10 מ"ג/מ"ל. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, 2-4 קטיפים עבור כל זן (n=7-29).

לאחסון לא הייתה השפעה עקבית. בעוד שבזנים 1043 ו-1072 האחסון גרם לירידה סטטיסטית מובהקת בפרוליפרציה ולפגיעה בתאים הנורמאליים, בזנים 1232, CA-4, ו-1044 רמת העיכוב ירדה אחרי אחסון. כלומר בזנים אלה הפלפלים המאוחסנים פחות רעילים לתאים נורמליים.



איור 39. השפעת מיצוי מזון 1745 על פרוליפרציית תאים סרטניים (HepG2 ו- HCT116) ונורמליים (NHDF). ריכוז המיצויים בתרבית היה 5 מ"ג/מ"ל. התוצאות מבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן, 2-4 קטיפים עבור כל זן (n=7-29).

לסיכום, הושוותה הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית של שלושת זני הפלפל החרירי הפעילים על שלושת סוגי התאים שנבחנו. בזן 1745 נבחנה פעילות זו בריכוז 5 מ"ג/מ"ל.



איור 40. הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית של מיצויים מזנים 1232 ו- 1072 כלפי תאים סרטניים (HepG2 ו- HCT116) ביחס לתאים הבריאים (NHDF). ריכוז המיצויים היה 10 מ"ג/מ"ל. התוצאות מבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן, 2-4 קטיפים עבור כל זן (n=7-29).

באיור 40 הושוותה הפעילות האנטי-פרוליפרטיבית של הזן 1232 על התאים השונים. מהתוצאות עולה כי בפרי טרי יש פגיעה של כ- 50% בתאים בריאים NHDF ולכן לא ניתן להתייחס לאפקט האנטי-פרוליפרטיבי שלו על תאי HCT כאפקט אנטי סרטני ספציפי. מאידך מיצוי שהופק מפרי מאוחסן לא פגע בפרוליפרציית תאים נורמליים אולם עיכב ספציפית ב- 50% את פרוליפרציית תאי HCT. באיור 40 נבדק המיצוי מזן 1072 על אותם התאים. ניתן לראות כי חלוקת תאי HepG2 עוכבה בצורה קלה בלבד לעומת תאי HCT שגדילתם עוכבה בכ- 50% ע"י פרי טרי, ו- 85% ע"י מיצוי שהופק מפרי מאוחסן. לעומת זאת התוצאות מראות שהפעילות הפרוליפרטיבית נותרה גבוהה בתאים הנורמליים

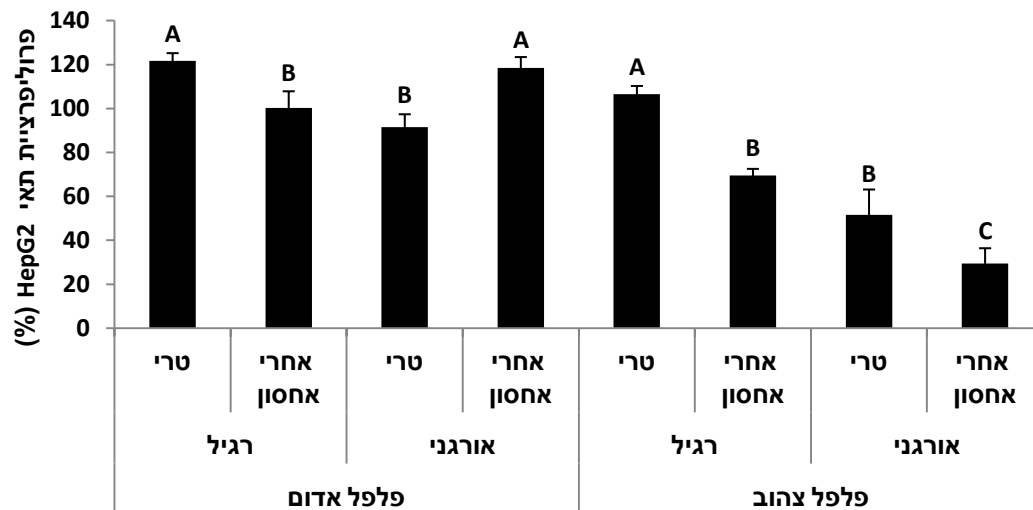
NHDF, כלומר, הם לא ניזוקו מטיפול במיצוי הטרי, או המאוחסן כך שהאפקט האנטי-פרוליפראטיבי הוא ספציפי לתאי הסרטן.

ה. השפעת תמציות פלפלים מתוקים על חלוקת תאי סרטן ממערכת העיכול

כדי לבדוק את השפעתם של חומרים המצויים בפלפלים אדומים וצהובים על פרוליפראציית תאי סרטן ממערכת העיכול, טופלו תאי HepG2 במיצויים שהוכנו מפלפלים מתוקים בריכוז 30 מ"ג/מ"ל. ריכוז זה היה המקסימלי שניתן היה לבדוק בשל מיגבלות הנפח בניסוי (פלטות 96 באריות). התמציות נבדקו על שורות תאי סרטן הכבד (HepG2) וסרטן המעי (HCT-116).

ה.1. השפעת זני פלפל מתוק על פרוליפראציית תאי HepG2

מבדיקת תמציות שהוכנו מפלפל אדום מתוק עולה שהן אינן מעכבות פרוליפראציה של תאי HepG2 בין אם דושנו אורגנית או קונבנציונאלית וכי האחסון אינו משנה תוצאות אלו (איור 41).



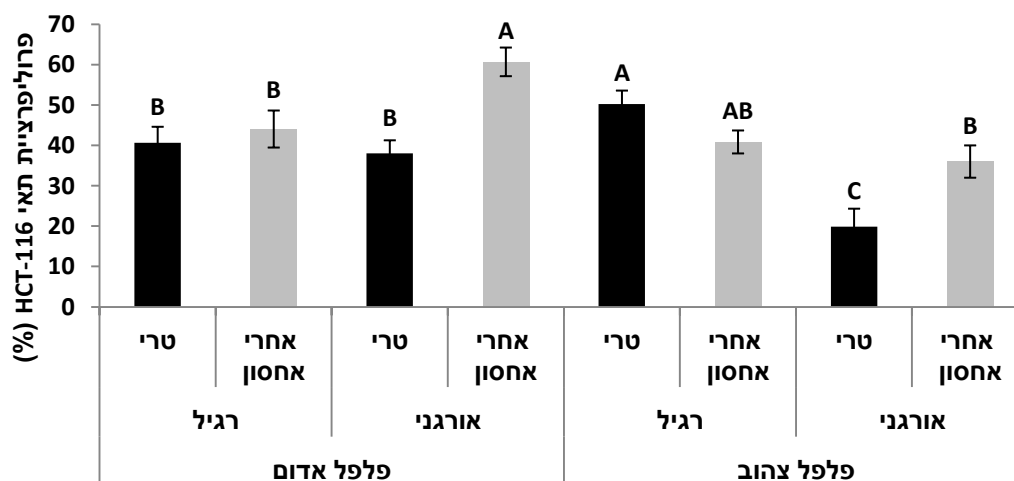
איור 41. השפעת זני הפלפל המתוק על פרוליפראציית תאי HepG2. התוצאות מייצגות שלושה קטיפים ומבוטאות כממוצע ± שגיאת תקן. 3-4 ניסויים, עבור כל זן (n=45-54).

לעומת זאת ניתן לראות כי מיצוי שהוכן מפלפל צהוב טרי שדושן באופן אורגני עיכב 48% מפרוליפראציית תאי HepG2 (איור 41). עיכוב זה לא נצפה בפלפל צהוב טרי שדושן קונבנציונאלית. בשני המקרים, תקופת האחסנה הגבירה את הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית, כאשר פלפל צהוב אורגני, לאחר אחסון, מעכב 70% מהפרוליפראציה בעוד שהתמצית שהופקה מפלפל צהוב שדושן באופן הרגיל ואוחסן בתנאים דומים עיכב רק 30% מהפרוליפראציה.

ה.2. השפעת מיצויים מזני פלפל מתוק על פרוליפראציית תאי סרטן המעי HCT-116

השפעתן של תמציות הפלפלים המתוקים נבדקה גם על תאי סרטן המעי HCT-116. כל סוגי המיצויים שהוכנו מפלפל מתוק הראו פעילות אנטי פרוליפראטיבית, כאשר מיצוי שהוכן מפלפל צהוב טרי

שדושן אורגנית היה הפעיל ביותר (איור 42). ניתן גם לראות כי לאחסון אין השפעה משמעותית על הפעילות האנטי-פרוליפריטיבית של פלפלים אדומים וצהובים שדושנו באופן קונבנציונאלי. לעומת זאת, בפלפלים שדושנו אורגנית, עולה הפעילות האנטי-פרוליפריטיבית באופן משמעותי בפלפלים מאוחסנים לעומת פלפלים טריים (אדומים וצהובים).

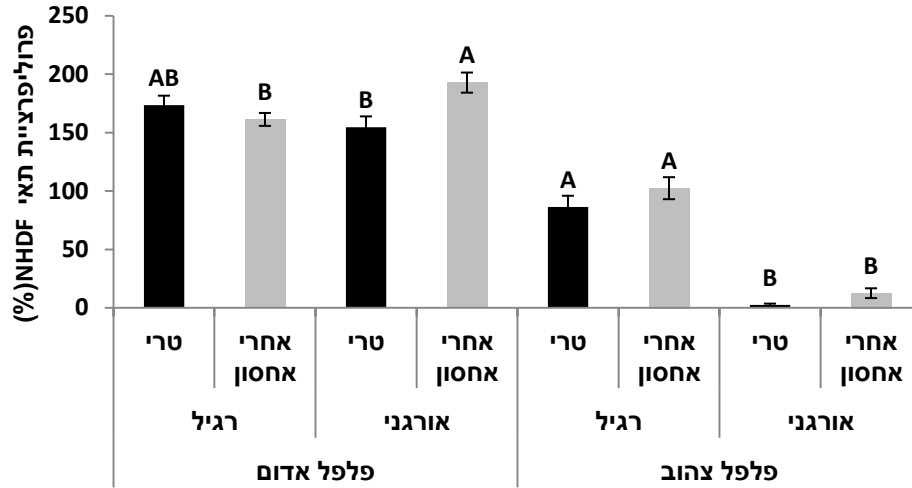


איור 42. השפעת זני הפלפל המתוק על פרוליפריציית תאי HCT116. התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן מ-4 קטיפים שונים שבוצעו ב-2-3 ניסויים עבור כל זן (n=16-24).

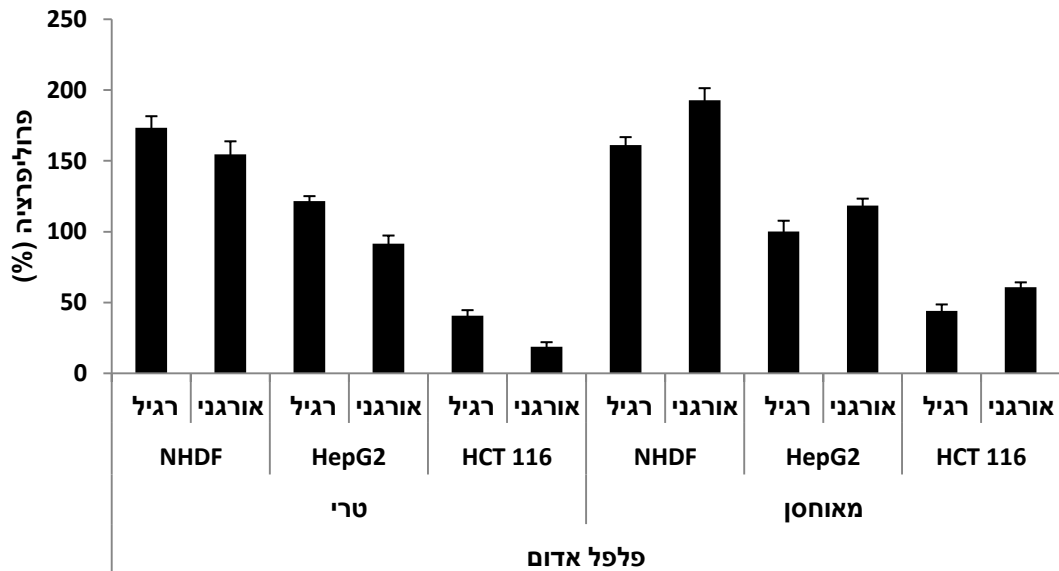
כדי לברר אם האפקט האנטי-פרוליפריטיבי של תמציות פלפלים מתוקים נובע מנוכחות קפסאיצין נבדקה רמת הקפסאיצין בפלפל מתוק (מקטיף 23.3.11). הבדיקה בוצעה בצב"מ האוניברסיטה העברית. לבדיקה הוכנו מיצויים מפלפל אדום וצהוב משתי צורות הדישון - אורגני וקונבנציונאלי. מהתוצאות שהתקבלו לאחר הבדיקה עולה שאין קפסאיצין בשני זני הפלפל המתוק (אדום וצהוב) בשתי צורות הדישון.

ה.3. השפעת המיצויים על פרוליפריציית תאים נורמאליים (NHDF)

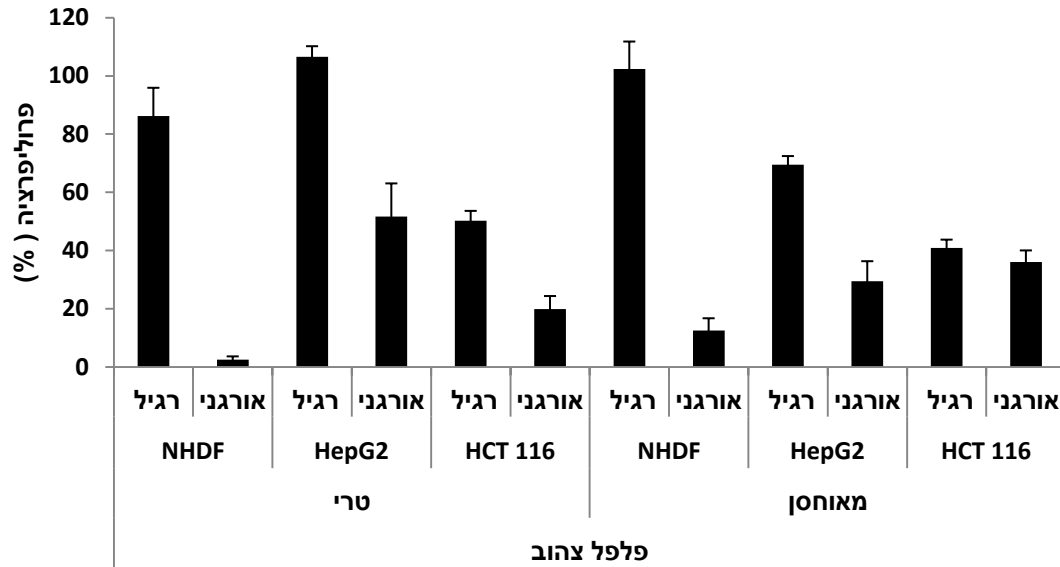
כדי לבדוק האם למיצויים הפעילים פעילות אנטי-פרוליפריטיבית ספציפית לתאי הסרטן, נבדק האפקט של התמציות גם על חלוקת תאים נורמאליים מסוג NHDF. מבדיקת השפעת מיצויי הפלפל האדום על פרוליפריציית תאי NHDF עולה כי בריכוזים בהם עיכבו מיצויים אלו פרוליפריציית תאי סרטן (30 מ"ג/מ"ל), הם לא פגעו בחלוקת תאים נורמאליים (תאי NHDF). תוצאות אלו נכונות לגבי פירות טריים ומאוחסנים שדושנו באופן אורגני או קונבנציונאלי. איור 44 מסכם את האפקט של מיצויי פלפל מתוק אדום על תאי סרטן ועל תאים נורמאליים. ניתן לראות כי בריכוז הנבדק המיצויים אינם פוגעים בפרוליפריציית תאים נורמאליים, אולם פוגעים בפרוליפריציית תאי סרטן המעי HCT116. אפקט זה ספציפי לתאי HCT116, כיוון שלא נצפו שינויים בפרוליפריציית תאי סרטן הכבד (HepG2). תאי HepG2 הראו עמידות בפני המיצוי ורמת הפרוליפריציה שלהם נותרה גבוהה מעל 90% בכל הטיפולים (רגיל אורגני טרי ומאוחסן). תהליך האחסון לא השפיע באופן מובהק על רמות הפרוליפריציה של המיצויים השונים ולא נצפתה מגמה (עליה או ירידה) אחידה.



איור 43. השפעת זני הפלפל המתוק על פרוליפרציה תאי NHDF. המיצויים נבדקו בריכוז 30 מ"ג/מ"ל, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, הפלפלים מקטיף 23/3/2011, 3-4 ניסויים עבור כל זן (n=20-24).



איור 44. הפעילות האנטי סרטנית של מיצוי מפלפל אדום כלפי תאים סרטניים (HepG2 ו-HCT116) ביחס לתאים הבריאים (NHDF). המיצויים נבדקו בריכוז 30 מ"ג/מ"ל, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, הפלפלים מקטיף 30/1/2011 ו-23/3/2011, 3-4 ניסויים עבור כל זן (n=19-24).



איור 45. השוואת הפעילות האנטי סרטנית של מיצוי מפלפל צהוב כלפי תאים הסרטניים (HepG2 ו-HCT) ביחס לתאים הבריאים (NHDF). המיצויים נבדקו בריכוז 30 מ"ג/מ"ל, התוצאות מבוטאות כממוצע \pm שגיאת תקן, הפלפלים מקטיף 30/1/2011 ו-23/3/2011, 3-4 ניסויים עבור כל זן (n=19). (24)

איור 45 מסכם את האפקט של מיצוי פלפל צהוב מתוק על תאי סרטן ועל תאים נורמאליים. ניתן לראות כי פלפל צהוב טרי או מאוחסן שדושן באופן הרגיל לא פגע בפרוליפרציית תאים נורמאליים (NHDF). לעומת זאת, מיצויים שהופקו מפלפלים צהובים (טריים ומאוחסנים) שדושנו אורגנית היו רעילים לתאי NHDF, ולכן האפקט האנטי-פרוליפטיבי שלהם כלפי תאי HCT116 ו-HepG2 אינו ספציפי. התוצאות המתוארות באיורים 44 ו-45 מצביעות על כך שתאי HCT116 רגישים יותר למיצויי פלפל מתוק והפרוליפרציה שלהם נפגעת בשיעור גבוה יותר, בהשוואה לתאי HepG2.

דיון ומסקנות

בעבודת מחקר זו נבחנה, לראשונה, השפעת הדישון האורגני (ללא הגנת הצומח) לעומת הקונבנציונאלי על כושר ההשתמרות של פרי הפלפל לאורך תקופת האחסון ועל תכולת הנוטריינטים (אנטיאוקסידנטים, ויטמין C, פוליפנולים ופלבנואידים). בנוסף, באופן ייחודי נבחנה במחקר זה השפעת הדישון על הפעילות האנטי פרוליפטיבית של פלפלים מתוקים: אדומים (זן 7182) וצהובים (זן 7849), שגודלו במו"פ בקעת הירדן, והזנים רומנס (אדום), פיונה (צהוב) ואלגריה (כתום) שגודלו בשפלה. במקביל, נבחנה רמת הפיטונוטריינטים והשוותה הפעילות האנטי-סרטנית במגוון של זני פלפל חריף מטיפוסים שונים שגודלו בחממה במכון וולקני.

השפעת הדישון האורגני על איכותם של פלפלים מתוקים טריים ומאוחסנים ועל רמת המרכיבים התזונתיים בהם

במהלך עונת 2011 נקטפו פלפלים מתוקים משני הזנים, הצהוב והאדום, בששה קטיפים ונבחנה השפעת הדישון על האיכות והמרכיבים התזונתיים בפלפל והשפעת תנאי האחסון המדמים משלוח ימי וחי מדף. מבדיקות האיכות ותכולת הנוטריינטים שבוצעו במחקר זה נמצא כי דישון אורגני אינו משפיע על המרכיבים התזונתיים בפלפלים המתוקים משני הזנים (אדום וצהוב) הן בפרי הטרי והן בפרי המאוחסן. במחקרים שערכו השוואות באותו נושא התקבלו תוצאות דומות המעידות על רמות שוות של פיטונוטריינטים שונים בפירות. Soltoft et al. (2010) דווחו על רמות דומות של פלבנואידים בבצל ורמות פוליפנולים דומות בגזר ותפוחי אדמה בדישון אורגני, בהשוואה לדישון קונבנציונאלי, בשתי עונות גידול, ובשלושה אזורי גידול שונים. בנוסף לכך, בעגבניות שגודלו בשתי שיטות הדישון, אמנם לא נצפו הבדלים מובהקים סטטיסטית ברמת הפיטונוטריינטים במשך שתי עונות, אך נצפו הבדלים ברמות המינרלים כמו זרחן וחנקן (Juroszek et al., 2009). ממצאים אלו מראים כי לדישון אורגני אין העדפה על פני דישון קונבנציונאלי ברמת הפיטונוטריינטים, אבל הוא תורם ע"פ מחקרים שפורסמו להורדת רמת המתכות הכבדות ומזהמים בקרקע שיכולים לשבש את תהליך קליטת הדשן ולעכב את קצב התפתחות הצמח (Soltoft et al. 2010 ו-Juroszek et al. 2009).

לגבי רמת החומצה האסקורבית (ויטמין C) נצפתה במהלך העונה מגמת עליה ברמת ויטמין C בכל הטיפולים (אורגני וקונבנציונאלי) ולא נראו הבדלים מובהקים סטטיסטית בהשוואה בין הטיפולים השונים. גם בבדיקת רמות האנטיאוקסידנטים, הפוליפנולים והפלבנואידים לא נמצאו שינויים מהותיים בין הדישון הקונבנציונאלי לדישון האורגני. במהלך העונה נצפתה יציבות ברמת הפיטונוטריינטים האלה. במחקר דומה שבדק השפעת הדישון האורגני על רמת הנוטריינטים בפלפלים, דווח, כי למרות ההשפעה החיובית של הדישון האורגני על הצמיחה, נצפתה עליה קלה ברמת האנטי-אוקסידנטים והמוצקות, וירידה קלה ברמת הסוכר בדישון אורגני לעומת הקונבנציונאלי (Amor, 2007). הבדלים אלה לא היו משמעותיים ביחס לשיטת הגידול הקונבנציונאלי, אם כי גידול המשלב שתי צורות הדישון (אורגני

וקונבנציונאלי), הכולל כמות דשן נמוכה בשלבי גידול מתקדמים, הראה עליה גבוהה ומשמעותית בתכולת הנוטריונטים.

בקיץ 2012, נבחנה איכות שלשה זני פלפל (אדום, צהוב וכתום) שגודלו בשפלה לשם השוואת השפעת אזור הגידול ותקופת האחסנה על תכולת הפיטונוטריינטים. מהממצאים עולה כי רמת הנוטריונטים שנמדדה במהלך העונה, בשלושת הזנים, דומה במידה רבה לרמות שנמדדו בזני הפלפל הגדלים בבקעה ולא נצפו הבדלים חריגים או מובהקים סטטיסטית ברמות הפיטונוטריינטים. חשוב להדגיש כי תנאי אחסנת הפלפל שנקטף מאזור השפלה היו זהים לתנאי אחסנת הפרי שנקטף בעונה הקודמת מהבקעה, ולמרות אזורי הגידול השונים, איכות הפרי משני אזורים אלה הייתה דומה וטובה. ממצאים אלו שוללים את הטענה על שוני באיכות האדמה, או אזור הגידול שיכול להשפיע על איכות הפרי מאותם הזנים. (Soltoft et al. (2011) בחנו במחקר דומה את השפעת הדישון האורגני לעומת הקונבנציונאלי על תכולת הקרוטנואידים בגזר, ובדומה לתוצאות במחקר הנוכחי, לא נמצאה השפעה לדישון על תכולת הקרוטנואידים באזורי גידול שונים גיאוגרפית.

במהלך הבשלתו חל שינוי בהרכב הכימי של הפרי ורמתם של מרכיבים שונים גם משתנה במהלך העונה. בדיקות המרכיבים התזונתיים שבוצעו במחקר זה בפלפלים מתוקים וחריפים הראו כי במהלך העונה, היו שינויים ברמותיהם של חלק מהפיטונוטריינטים, בעוד שבחלקם לא נצפתה שונות במהלך עונות הקטיף. ממחקריהם של Materska et al. (2005) עולה כי רמת הפלבנואידים המתקבלים מפרי אדום בשל גבוהה משמעותית מפרי ירוק. במחקרים שבוצעו לאחרונה ועקבו אחרי השינויים בשלב הבשלת הפלפל נצפו מגמות הפוכות בין המרכיבים השונים, לדוגמה, ירידה ברמת הפוליפנולים במהלך העונה לעומת עליה חדה באנטיאוקסידנטים בבשלות מלאה (Conforti et al., תוצאות דומות התקבלו גם במחקרנו, ובבדיקות שביצענו בפלפלים מתוקים נצפתה ירידה ברמת הפוליפנולים במהלך העונה לעומת מגמת עליה ברמת הוויטמין C במהלך אותה העונה.

בדיקת המדדים הפסיולוגיים בפלפלים שכללה רמת סוכר, איבוד מים והופעת הפרי, הראתה שדישון אורגני אינו משפיע על הערכים האלה בפרי. מבדיקת רמת הסוכר נמצא כי דישון אורגני אינו משנה את רמת הסוכר בפרי, אלא שומר על אותה הרמה יחסית לדישון הקונבנציונאלי. בדיקת איבוד המים גם כן הראתה תוצאות דומות בהשוואה בין דישון קונבנציונאלי לדישון אורגני, במהלך העונה לא נצפו הבדלים משמעותיים בין שתי צורות הדישון. תוצאות דומות הוצגו ע"י Dangour et al. (2009), שהראה כי גידול אורגני וקונבנציונאלי הינם דומים מבחינת המדדים הפסיולוגיים. ב-10 מתוך 13 מרכיבים שהוצגו לא היו הבדלים משמעותיים בין שיטות הגידול, והבדלים שהתגלו בגידולים ניתן ליחס להבדלים בשימוש וקליטת הדשן, בשלות או שונות גנטית באותו הזן. מסקנה חשובה היא שגידול אורגני מניב פירות איכותיים בדומה לפירות הנקטפים מגידול קונבנציונאלי. ההשוואה בין השפעות של מערכות חקלאות אורגניות וקונבנציונליות על איכות פרי היא קשה מטבעה בשל המגוון הרחב של גורמים העשויים להשפיע על איכות הפרי כגון אקלים, תנאי קרקע, זן, סוג קרקע, מועד שתילה, עונת הגידול ומועד הקטיף (Goldman et al., 1999; Adam, 2001; Magkos et al., 2003).

השוואה בין הזנים (אדום מול צהוב) הראתה שפלפל צהוב נוטה לאבד מים יותר מפלפל אדום לאחר האחסון, ולכן לפלפל הצהוב יכולת שימור נמוכה בהובלה אשר גורמת לחיי מדף קצרים יותר בהשוואה לפלפל האדום, דבר שמגביל את יצוא הפלפלים מזנים צהובים. ע"פ המחקר של Maalekuu et al., (2003) הזנים האדומים היו, בדרך כלל, בעלי כושר אחסנה טוב יותר ויציב לאורך תקופת האחסון, בהשוואה לזנים הצהובים והכתומים שהתאפיינו בדופן דק יותר אשר מעלה את קצב איבוד המים מהפרי ומוביל להתרוככות הפרי והתפתחות ריקבון. גם במחקר זה נמצאו תוצאות דומות בתום תקופת האחסנה ב-7 מ"צ ו-3 ימים נוספים ב-20 מ"צ. נמצא כי אחסון הזן האדום ב-7 מ"צ שמר על איכות הפרי לכל תקופת האחסון וחי מדף, ורמת הריקבון הייתה נמוכה. לעומת זאת, בפלפל הצהוב נמדדה רמת ריקבון גבוהה יותר, אך הבדל זה לא היה מובהק סטטיסטית ולא עמד בצפיות שלנו ובתוצאות של עבודות קודמות. הדבר יכול לנבוע מזנים אחרים שנבדקו במחקרים הקודמים. לכן, יש לבצע בעתיד בדיקת ריקבון עם זנים נוספים שיכול לתת תוצאות מהימנות המראות הבדל ברור באיכות הזנים השונים. פלפל אדום הינו עמיד יותר ויציב לאורך תקופת האחסון בהשוואה לפלפל הצהוב והכתום הרגישים להתכלות פיסיולוגית ופתולוגית ובעלי דופן דק יותר אשר מעלה את קצב איבוד המים מהפרי ומוביל להתרוככות הפרי והתפתחות ריקבון (Mallekuu et al., 2003).

במחקר הנוכחי בוצעו ניסויים ייחודיים שהשוו בפעם הראשונה את יכולת ההשתמרות ורמת הפיטונוטריינטים של פלפלים אורגנים מול קונבנציונאליים. ניתן ליחס לפלפלים מתוקים שדושו אורגנית, יכולת השתמרות מעולה ותכולת נוטריינטים שלא יורדת מזו של פלפלים שדושו קונבנציונאליים. לכן אנו ממליצים על המשך המחקר בכיוון פיתוח זנים ושיטות לגידול אורגני איכותי במחיר תחרותי מול הגידול הקונבנציונאלי.

השפעת הדישון האורגני על הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית של תמציות פלפלים מתוקים כנגד תאי סרטן הכבד והמעי

ניסוי מיוחד נוסף שהועמד במחקר זה הינו בדיקת הפעילות האנטי פרוליפראטיבית (כמדד לפעילות אנטי סרטנית) במספר זני פלפל מתוק. במהלך עבודה זו נבדקו מיצויי הפלפלים המתוקים על שני סוגי תאים סרטניים, שורת תאי סרטן הכבד (HepG2) ושורת תאי סרטן המעי (HCT-116). כתאי ביקורת נבחנה שורת תאי NHDF, שהם תאי עור הומאניים נורמאליים שנועדו בכדי לבחון את השפעת הפלפל על תאים בריאים. הייחודיות בניסוי זה היא בדיקת השפעת הדישון האורגני על הפעילות האנטי סרטנית, השוואה שכלל לא תועדה בספרות המדעית. לכן עבודה זו פותחת אופק חדש לחקר הפעילות האנטי-סרטנית של פלפלים ולפיתוח שיטות וזנים חדשים בעלי תכונות אנטי-סרטניות דומיננטיות מבחינה גנטית. מהשוואה בין הזן האדום לצהוב עולה כי מיצויים שהוכנו מהזן האדום (שדושו אורגנית או קונבנציונאליים) הראו פגיעה ספציפית בתאים סרטניים יחסית לתאים נורמאליים. לעומת זאת, מיצוי באותו הריכוז מהזן הצהוב האורגני פגע באופן לא ספציפי הן בחלוקת התאים הנורמאליים (NHDF), והן בחלוקת תאי סרטן הכבד (HepG2) והמעי (HCT-116). בזן זה נבדקו אך לא נמצאו רמות קפסאצין, וכדי לברר את הסיבה לפגיעה בחלוקת התאים הנורמאליים, יש לבצע בדיקות חוזרות בעונות נוספות.

לסיכום, גידול אורגני הינה שיטת גידול המתרחבת והשפעותיה על תכולת הנוטריינטים בפלפלים נמדדה בעבר ותבחן גם בעתיד. עם זאת בעבודה זו נבדקה באופן ייחודי השפעת הדישון האורגני על הפעילות האנטי-פרולימטיבית ועל רמות הנוטריינטים בפלפלים הטריים מול פלפלים המאוחסנים בתנאים מבוקרים במשך 3 שבועות הכוללים חיי מדף. בדיקות אלו הראו תוצאות המעידות על יכולת השתמרות הפרי האורגני במשך תקופת האחסון ושמירתו על מרכיבים ואיכות ברמה גבוהה במיוחד בפלפלים מתוקים בצבע אדום. פירות אורגניים אכן הצליחו לשרוד את תנאי האחסון ולשמור עליהם, יחד עם זאת יש צורך בלטיפה מהזנים הטובים והבולטים במיוחד, זנים חדשים שיכולים במהלך האחסון בטמפ' נמוכות להמשיך ולצבור נוטריינטים בפרי, כך שיוכלו להוסיף רבות לערכו בפן התזונתי והבריאותי.

רמת המרכיבים התזונתיים ואיכותם של זני פלפל חריף טריים ומאוחסנים

במחקר זה נבחנו גם עשרה זני פלפל חריפים לאורך עונה שלמה ונבדקו המדדים הפסיולוגיים שלהם. ממצאי הבדיקות מראים עמידות מוחלטת להתפתחות ריקבון לאחר הקטיף ובמהלך האחסון במשך שלושה שבועות. מחקרים קודמים שחקרו התפתחות פתוגנים על זני פלפל חריף הוכיחו כי קפסאיצין, וואנילין ועוד חומרים השייכים לאותה משפחה הראו יכולת עיכוב גדילת עובשים, חיידקים ופטריות על פני הפירות (Kim, et al., 1979; Serruti, et al., 1996; Lopez-Malo, et al., 1998). בנוסף לכך, מחקר אחר שבדק זני פלפל חריף ממקור מקסיקני הראה שזנים המכילים חומצה צינמית, בעלת אפקט אנטי-בקטריאלי, היו עמידים נגד מזיקים באופן משמעותי יותר מזנים שהכילו רק קפסאיצין (Dorantes, et al., 2000). רמת החומצה צינמית לא נבדקה במחקר זה אך תוצאות המחקרים הקודמים יכולים להעיד על כך שנוכחות חומצה זו בפלפלים החריפים שנבדקו במהלך העונה יכולה לתרום לעמידות הפלפלים מול המזיקים. לעומת זאת, בזנים המתוקים, האדומים והצהובים התפתחו מחלות עובש (בעיקר *Botrytis cinerea*) בתום תקופת האחסון וחיי המדף.

מבדיקות המדדים הפסיולוגיים נמצא כי רמת המוצקים בפלפל חריף הינה גבוהה יחסית לזנים המתוקים, מהבדיקות שבוצעו במהלך העונה נרשמה רמת מוצקים שנעה בין 7% ל-15% מוצקים מומסים (רמת סוכר), לעומת כ-8% בפלפלים מתוקים. Akbudak et al. (2006) הראו בניסוי דומה הכולל תנאי אחסון דומים, כי בתנאי הגידול והאחסון המיטביים מתקבלת רמת סוכר דומה לתוצאה שלנו. מחקרים שבחנו רמת הסוכר במהלך הגידול והאחסון מראים כי כמות הסוכר תלויה במספר פרמטרים שונים כמו טמפ' האחסון, רמת בשלות הפרי ותכולת החומצות. מעקב אחרי רמת הסוכר בפלפל מתוק הראתה עליה ברמת הסוכר גם במהלך האחסון עד שלב מסוים בו חלה ירידה ברמת הסוכר עקב פעילות אנזימטית בפרי (Gonzalez, et al., 1993; Ozden, et al., 2002). המעקב אחרי התפתחות עובשים ורקבונות בפלפל חריף במהלך האחסון הראה עמידות מוחלטת נגד התפתחות ריקבון כך שלא נצפו במהלך כל העונה רקבונות בפירות החריפים. ניתן להניח שרמת מוצקים נמוכה ונוכחות נוזל חופשי בדופן הפרי הינם הגורמים המעודדים פתוגניות. לכן בפלפלים מתוקים הפתוגניות וריקבונות פירות הינם גבוהים יחסית לפלפל החריף העמיד בפני המזיקים בגלל המרקם היבש של כל הזנים החריפים (מלבד זן 1044).

מבדיקת רמת איבוד המים עולה שרמת האיבוד בפלפלים חריפים הינה גבוהה מאד יחסית לזנים המתוקים. הפלפל המתוק מאבד כ-4% עד 6% מים במהלך האחסון, ולעומתו' לפלפל החריף נטייה לאבד מים באחוזים הרבה יותר גבוהים הנעים בין 5-18%. השוני ברמות איבוד המים נובע, ככול הנראה, משוני בהרכב דופן הפרי ומהיחס בין הנפח לשטח הפנים "ממאגר" המים הגבוה בציפת הפרי המתוק. ממצאים דומים התקבלו בעבר במחקר שביצעו Lownds et al. (1994) בזני פלפלים מתוקים וחריפים והראו באופן מובהק כי איבוד המשקל (מים) בזני פלפל חריף היה גבוה מאיבוד המשקל בזנים מתוקים. כפי שצוין בעבודה זו, איכות הפרי, ובמיוחד המוצקות, הינה גורם חשוב אצל הצרכן. העיקרון הבסיסי ביותר באחסנת פירות וירקות לאחר הקטיף הינו שימור התוצרת בטמפרטורה נמוכה ככול האפשר מבלי לגרום לנזקי צינה. שכן, בטמפרטורות נמוכות ישנה האטה של תהליכי ההבשלה וההזדקנות, הפחתה במידת איבוד המים והפסד המשקל, ועיכוב התפתחותם של ריקבון (Kader, 2002). במחקרים קודמים אכן נמצאו הבדלים באיכותם של הזנים, בצבעים השונים, לאחר האחסון, בטמפרטורה נמוכה.

מרכיבים שונים בפירות וירקות נמצאו כבעלי פעילות אנטי סרטנית וצריכת מזונות אלו הראתה במחקרים שונים קשר הפוך עם מחלות סרטן (Chen et al., 2005). בספרות המדעית מיוחסת פונקציה זו של פירות וירקות לרמות גבוהות של פוליפנולים. מרכיבים אלה נמצאים בפירות וירקות, במיוחד אלו בצבעים עזים וכהים אשר מהווים מקור טוב לפוליפנולים, המופיעים רובם ככלבונואידים, ומיעוטם כאנטוציאנינים וקרוטנואידים (Cieslik et al., 2006).

במחקר זה גם נמדדו בפלפלים החריפים רמות גבוהות (אם כי לא בהכרח דומות) של אנטי-אוקסידנטים, פוליפנולים, פלבונואידים וויטמין C. מבדיקת המרכיבים התזונתיים בזנים החריפים עולה שיש הבדל משמעותי בין הזנים. מבדיקת וויטמין C, ניתן לראות כי ישנם הבדלים משמעותיים בין הזנים השונים באותו קטיף ובנוסף נצפתה עלייה קלה ברמת הוויטמינים במהלך האחסון כתוצאה מהבשלת הפרי. השוני הבולט ביותר בין הזנים נצפה בבדיקת רמת הפלבונואידים ובבדיקת רמת הקפסאיצין המאפיינת פלפלים חריפים (Perucka et al., 2000). הבדלים פחות בולטים ועדיין מובהקים סטטיסטית נצפו ברמות האנטי-אוקסידנטים והפוליפנולים.

הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית של תמציות פלפלים חריפים טריים ומאוחסנים כנגד תאי סרטן הכבד והמעיים

מאחר שמולקולת הקפסאיצין ידועה כמולקולה אנטי סרטנית, נבדקו רמות הקפסאיצין בזני הפלפלים המתוקים והחריפים. בפלפל המתוק לא הייתה נוכחות קפסאיצין בכל הזנים, לעומת זאת הפלפל החריף הכיל קפסאיצין בכמויות שונות. הבדיקות הראו כי אמנם זן 1745 שהוא הזן בעל הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית הגבוהה ביותר מכיל גם את רמות הקפסאיצין הגבוהות ביותר, אולם לגבי הזנים האחרים לא נמצאה קורלציה בין רמת הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית לבין רמת הקפסאיצין. לדוגמא, לזן 177 המדורג שני ברמות הקפסאיצין והמכיל רמת קפסאיצין גבוהה יחסית לרוב הזנים, אין כלל פעילות אנטי-פרוליפראטיבית, בעוד שלזנים 1043 ו-1232 המכילים רמות נמוכות של קפסאיצין פעילות אנטי-פרוליפראטיבית יחסית גבוהה.

בכל זני הפלפל החריף שנבדקו נמדדו רמות גבוהות של אנטי-אוקסידנטים, פוליפנולים, פלבנוואידים וחומצה אסקורבית. עם זאת, בדומה לתוצאות שהתקבלו לגבי קפסאיצין, לא נמצאה קורלציה בין רמת הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית של זני הפלפל החריף לבין רמותיהם של פיטונוטריינטים אלו. מתוצאות אלו ניתן להסיק כי הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית כנראה נובעת מנוכחותם של חומרים אחרים, אשר לא נבדקו בעבודה זו.

מעבודה זו עולה כי בבדיקות שבוצעו על עשרה זנים חריפים בלט באופן מובהק הזן 1745 החריף הן ברמת הנוטריינטים והן בפעילות האנטי-פרוליפראטיבית. מבדיקות איכות הפרי וכושר השתמרותו לאורך אחסנה וחיי מדף הצטיין הזן הזה ברמת איבוד המים הנמוכה ביותר ובכך שמר על משקלו לאורך תקופת האחסון. כתוצאה מכך הפרי שמר גם על מוצקות טובה יותר משאר הזנים. כמו כן, הצטיין הזן 1745 ברמות קפסאיצין, פלבנוואידים ונוגדי חמצון גבוהות באופן משמעותי מהזנים האחרים. לעומת זאת רמת החומצה אסקורבית שנמדדה בזן הזה הייתה מהנמוכות בין הזנים הן בפרי טרי והן לאחר אחסון ורמת הפוליפנולים שנמדדה הייתה דומה לשאר הזנים. בבדיקת מיצוי מזן 1745 על תאי סרטן מסוגים שונים הניבה תוצאות המעידות על יכולתו לעכב לחלוטין את הפרוליפראציה של תאי סרטן המעי בריכוזים נמוכים, מבלי לפגוע בתאים בריאים. עם זאת, מיצוי זה לא פגע בתאי סרטן הכבד ובכך הראה פגיעה סלקטיבית בתאים מסוגים שונים.

סיכום

במחקר הנוכחי נמצא כי תנאי האחסון השפיעו על רמות הפעילות האנטי-פרוליפראטיבית של פלפלים חריפים. בזן 1745 ניתן להשתמש במיצוי טרי בלבד, בזן 1232 יש להשתמש במיצוי המאוחסן בלבד, ולעומת זאת בזן 1072 ניתן להשתמש הן בפרי הטרי והן בפרי המאוחסן. תנאי האחסון גם השפיעו על רמות הפיטונוטריינטים בזנים השונים של הפלפלים החריפים באופן שונה ולא עקבי, כך שלא ניתן להסיק מסקנה ברורה לגבי התנהגות מרכיבי הפרי במהלך האחסון.

זני הפלפלים החריפים שנבדקו בעבודה זו הראו יכולת השתמרות מעולה במשך תקופת האחסון וחיי המדף, אם כי לזנים 1745, 1232 ו-1072 יש בנוסף לכך פוטנציאל להתפתח כזנים אנטי-סרטניים מאחר והראו פעילות גבוהה בעיכוב חלוקת תאי סרטן. תכונות אלו מעידות על זנים בעלי רקע גנטי "איכותי", שיכולים לתרום לפיתוח זנים חדשים איכותיים יותר היכולים לעכב ספציפית תאי סרטן בלבד ללא פגיעה בתאים בריאים. על אף שגם לפלפלים מתוקים וגם לפלפלים חריפים יש פעילות אנטי-פרוליפראטיבית, יש לציין כי הריכוז האפקטיבי של מיצויי פלפל אדום לקבלת אפקט אנטי-פרוליפראטיבי גבוה מהריכוז האפקטיבי של מיצויי פלפל חריף. לכן אנו ממליצים להמשיך במחקר ע"י הכלאת זנים מתוקים עם זני בר חריפים להחזרת התכונות הייחודיות המקנות לפלפל חריף יכולת אנטי סרטנית לפלפלים מתוקים. מאחר והזנים המתוקים בעלי נתח שוק גדול יותר ונצרכים בכמויות גדולות, ניתן יהיה לחשוף מספר רב של צרכנים לפירות המשפרים את המצב הבריאותי ומעכבים את התפתחות מחלות סרטן.

מהזנים המובילים של פלפל חריף שהראו יכולת לעכב פרוליפראיית תאי סרטן יש פוטנציאל להפיק (מהם או מהכלאות עם זנים מובחרים אחרים) תמציות לפיתוח תרופות למחלת הסרטן בכלל ולסרטן הכבד והמעיי בפרט. מאחר ולא נמצאה קורלציה בין רמות הפיטונוטריינטים שנבדקו לבין הפעילות האנטי-סרטנית יש להמשיך ולחקור את השפעת הפלפל החריף ותרכובות חדשות שיופקו ממנו על תאי סרטן, ובכך לפתוח אפשרויות חדשות בחקר הסרטן והטיפול במחלה.

משרד הבריאות (2010). מצב הבריאות בישראל.

- Adam, D. (2001). Nutritionists question study of organic food. *Nature* 16, 412–666.
- Akbudak, N., Akbudak, B., Seniz, V., and Eris, A. (2006). Preharvest application of harpin on the cool storage life of pepper. In IV International Conference on Managing Quality in Chains-The Integrated View on Fruits and Vegetables Quality 712 (pp. 517-522).
- Amic, D., Beslo, D. and Trinajstic, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatia Chemical Acta*, 76: 55–61.
- Amor, F.M. (2007). Yield and fruit quality response of sweet pepper to organic and mineral fertilization. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 22: 233-238.
- Barkai-Golan, R. (1981). An annotated check-list of fungi causing postharvest diseases of fruits and vegetables in Israel. Special Publications No. 194. 34 pp. Division of Scientific Publications, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel.
- Bourn, D. and Prescott, J. (2002). A comparison of the nutritional value, sensory qualities and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42: 1-34.
- Bramley, P., Elmadfa, I., Kafatos A., Kelly, F., Manios, Y., Schuch, W., sheehy, P. and Wagner, K. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 913-938.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.
- Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P. and Cappelloni, M., (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5458-5462.
- Carr, A. and Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Society for Clinical Nutrition*, 69: 1086–1107.
- Castellone, M.D. Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M. and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a Gs-Axin-β-Catenin Signaling Axis. *Science*, 310: 1504-1510.

- Caterina, M. J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T., Levine, J. and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.
- Ceponis, M.T., Cappellini, R.A. and Lightner, G.W. (1987). Disorder in fresh pepper shipment to New York market, 1972-1984. *Plant Disease*. 71: 380-382.
- Chen, C., Liu, L., Hsu, J., Huang, H., Yang, M. and Wang, C. (2005). Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*, 91: 601–607.
- Cieslik, E., Greda, A. and Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94: 135–142.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani A. (2006). Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease *Clinical Chemistry* 52: 601–623.
- Dangour, A. D., Dodhia, S. K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., & Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, 90(3), 680-685.
- Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernandez, E. and Solano, C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 57: 125-128.
- Fallik, E., Grinberg, S., Alkalai, S., Yekutieli, O., Wiseblum, A., Regev, R., Beres, H. and Bar-Lev, E. (1999). A unique and fast postharvest method to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biology and Technology*. 15: 25-32.
- Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V. and Mateus, N. (2006). Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2392–2397.
- Frank, C.A., Nelson, R.G., Simonne, E.H., Behe, B.K. and Simmonne, A.H. (2001). Consumer preferences for color, price and vitamin C content of bell peppers. *Hortscience*. 36: 795-800.
- Goldman, I.L., Kader, A.A. and Heintz, C. (1999). Influence of production handling, and storage on phytonutrient content of foods. *Nutrition Reviews*. 57, 46–52.

- Gonzalez-Aguilar, G. and Tiznado, M. 1993. Postharvest physiology of bell peppers stored in low density polyethylene bags. *LWT- Food Science and Technology*, 26: 450-455.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16:33-50.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Herencia, J.F., García-Galavís, P.A., Ruiz Dorado, J.R. and Maqueda, C. (2011). Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil. *Scientia Horticulturae*, 129: 882–888.
- Howard, L.R., Smith, R.T., Wanger, A.B., Villalon, B. and Burns, E. (1994). Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed Jalapenos. *Journal of Food Science* 59: 362-365.
- Howard, L.R., Talcott S.T., Brenes, C.H. and Villalon B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 1713-1720.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J. and Thun, M.J. (2005). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 55:10–30.
- Jeong, W. Y., Jin, J. S., Cho, Y. A., Lee, J. H., Park, S., Jeong, S. W., Kim, Y. H., Lim, C. S., Abd El-Aty, A. M., Kim, G. S., Lee, S. J., Shim, J. H. and Shin, S. C. (2011). Determination of polyphenols in three *Capsicum annuum* L. (bell pepper) varieties using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Their contribution to overall antioxidant and anticancer activity. *Journal of Separation Science*, 34, 2967–2974.
- Juroszek, P., Lumpkin, H.M., Yang, R. Ledesma, D.R. and Ma, C. (2009). Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: comparison of organic and conventional management systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 1188–1194.
- Kader, A.A. (2002). Postharvest Biology and Technology - an Overview. *Agriculture and Natural Resources*, 3529: 39-48.

- Kaur, C. and Kapoor, H.C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 153-161.
- Kim, K. and Ryeom, K. (1979). A study on content and antibacterial effects of capsaicin from Korean hot pepper. *Report of The National Institute of Health*, 16: 241–251.
- Kumpulainen, J. (2001). Organic and conventional grown foodstuffs: Nutritional and toxicological quality comparisons. *The International Fertiliser Society*, 472: 1-20.
- Lacan, D. and Baccou, J.C. (1996). Changes in lipids and electrolyte leakage during the ripening of nonnetted muskmelon fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 554-558.
- Lee, Y.S., Nam D.H. and Kim J.A. (2000). Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Letters journal*, 161:121–130.
- Lee, Y., Howard, L. R., & Villalon, B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal of Food Science*, 60(3), 473-476.
- Lefebvre, V., Kunyz, M., Camara, B. and Palloix, A. (1998). The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the Y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Molecular Biology*, 36: 785-789.
- Lin, J. Y., & Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147.
- Lopaczynski, W. and Zeisel, S. H. (2001). Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, 21: 295–307.
- Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M. and Argais, A. (1998). Vanillin and pH synergistic effects on mould growth. *Journal of Food Science*. 63: 143-146.
- Lopez, A., Fenoll, J., Hellín, P., & Flores, P. (2013). Physical characteristics and mineral composition of two pepper cultivars under organic, conventional and soilless cultivation. *Scientia Horticulturae*, 150, 259-266.
- Lownds, N.K., Banaras, M. and Bosland, P.W. (1994). Postharvest Water Loss and Storage Quality of Nine Pepper (*Capsicum*) Cultivars. *Horticultural Science* 29:191-193.

- Maalekuu, K., Elkind, Y., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y. and Fallik, E. (2003). Quality evaluation of three sweet pepper cultivars after prolonged storage. *Advances in Horticultural Science* 17: 187-191.
- Maalekuu, K., Elkind, Y., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y. and Fallik, E. (2004). The influence of harvest season and cultivar type on several quality traits and quality stability of three commercial sweet bell pepper during the harvest period. *Advances in Horticultural Science* 18: 21-25.
- Maalekuu, K., Tuvia-Alkalai, S., Shalom, Y., Fallik, E., Elkind, Y., Jenks, M. A. and Goodwin, M. S. (2005). Characterization of physiological and biochemical factors associated with postharvest water loss in ripe pepper fruits during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 735-741.
- Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A., 2003. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 54: 357–371.
- Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. and Remesy, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* 409: 12-16.
- Manson, M.M. (2003). Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signaling. *Trends in Molecular Medicine*, 9: 11-18.
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3861-3869.
- Materska, M. and Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 1750-1756
- Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J., Torres, J. and Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *European Journal of Nutrition*, 42: 43–49.
- Mimica-Dukic, N. (2005). Antioxidants in health and diseases. Available from http://www.iama.gr/ethno/eie/neda_en.htm.
- Oboh, G. (2005) Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical greenleafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 38: 513–517.

- Oboh, G. (2006). Nutritive value, antioxidant and antimicrobial properties of *Struchium sparganophora* leaves. *Journal of Medicinal Food*, 9: 276–280.
- Oboh, G. and Akindahunsi, A. A. (2004). Change in the ascorbic acid, total phenol and antioxidant activity of sun-dried commonly consumed green leafy vegetables in Nigeria. *Nutrition and Health*, 18: 29–36.
- Ozden, C. and Bayindirli, L. 2002. Effects of combinational use of controlled atmosphere, cold storage and edible coating applications on shelf life and quality attributes of green peppers. *European Food Research Technology*. 214: 320-326.
- Paran, I., Aftergoot, E. and Shifriss, C. (1998). Variations in (*Capsicum annuum*) revealed by RAPD and AFLP markets. *Euphytica*, 99: 167-173.
- Perucka, I. and Oleszek, W. L. (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 71: 287-291.
- Peter, C.H., John, M.P., van, T. and Michel, N.C.P., (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418: 152-156.
- Pruthi, J. S. (1980). Spices and Condiments : Chemistry, Microbiology and Technology. *Advances in Food Research*. 4: 32–68.
- Raffo, A., Baiamonte, I. and Paoletti, F. (2008). Changes in antioxidants and taste-related compounds content during cold storage of fresh-cut red sweet peppers. *European Food Research and Technology*, 226: 1167-1174.
- Ramos, S., Aliaa, M., Bravo L. and Goya L. (2005). Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *Jouranal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 1271-1280.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L. and Vanella A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*. 16: 91-98.
- Serruti, P. and Alzamora, S.M. (1996). Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeast in laboratory media and fruit purees. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 379–386.
- Soltoft, M., Bysted, A., Madsen, K.H., Mark, A.B., Bügel, S.G., Nielsen, J. and Knuthsen, P. (2011). Effects of organic and conventional growth systems on

- the content of carotenoids in carrot roots, and on intake and plasma status of carotenoids in humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 767–775.
- Soltoft, M., Nielsen, J., Laursen, K.H, Husted, S., Halekoh, U. And Knuthsen, P. (2010). Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 10323–10329.
- Wang, S., Meckling , K.A., Marcone, M.F. Kakuda, Y. and Tsao, R. (2011). Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? *Food Research International*, 44: 2545–2554.
- Warman, P.R. and Havard, K.A. (1997). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown carrots and cabbage. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 61:155–162.
- Warman, P.R. and Havard, K.A. (1998). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 68: 207-216.
- Woese, K., Lange, D., Boess, C.H., Werner, K. (1997). A comparison of organically and conventionally grown foods: results of a review of the relevant literature. *Journal of Food science and agriculture*, 74: 281–293
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10: 789-799.
- Youdima, k., McDonald, J., Kalt, W. and Josepha, J. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 282–288.

Abstract:

Pepper, in all its colors and varieties, constitutes one of the most important vegetables in human nutrition, especially in developed countries, but also in developing countries. The annual consumption of peppers in Israel in the last two years sums up in about 190 thousand tons, whilst the pepper fruit is second only to potatoes as the most exported product. In those years, around 130,000 tons were exported to Europe and North America, mainly by sea (extended storage). The total consumption of peppers around the globe is estimated to be 27 million tons.

Pepper consumption is high locally and around the globe since peppers are rich in different health promoting ingredients such as polyphenols, flavonoids, vitamins, minerals, etc. These ingredients are of health attributes that are involved in the human body's defense mechanism against various diseases as well as aiding in preventing cancers. Cancer is the second most common cause of death in the western world. Accumulating scientific data suggest that a diet rich in antioxidants has a role in preventing cancer. In comparison to other vegetables, pepper, especially red peppers, contain a high amount of antioxidants. In addition, peppers contain high levels of capsaicin and hydrocapsaicin - components that showed anti-cancer effects *in vitro* as well as *in vivo*. To the best of our knowledge, up until now, neither in Israel nor in the rest of the world has been a research conducted comparing the anti-cancer activity between different strains of sweet and hot peppers, cultivated or wild which are grown in different agricultural methods (organic versus conventional) in different locations. In addition, no research was ever conducted examining the effects (decrease/increase) of postharvest treatments and of the extended storage on the phytonutrients level and on the anti-cancer activity in these fruits.

The aims of this study are to compare the exterior and interior quality and the nutrients content of pepper strains grown in different agricultural methods (organic and conventional) before and after picking and storage, and to examine the level of anti-proliferative activity of these types of sweet peppers to wild strains of hot peppers. The quality measures used were sugars content, acids, antioxidants, polyphenols, flavonoids, vitamin C, weight loss, solidity, defects, decomposition of fruits after a storage period of two to three weeks. Pepper extracts were also tested for anti-proliferative activity, as an indication for anti-cancer potential. In these experiments we used two types of cancer cells: HepG2 cells, which represent liver cancer, and HCT-116 cells, which represent human colon cancer. The results of the

anti-proliferative effect were compared with the effect of the same pepper extracts on the proliferation of normal human dermal fibroblasts (NHDF) which were used throughout the research as control cells.

The fruits picked were brought to the department for storage, and were washed with hot water and brushed according to the recommendations at the same day. The quality of the fruit was examined immediately after picking and washing, some of the fruits were taken from the laboratory for testing while the rest were stored at 7⁰ C for 14 days and three days more at 20⁰ C (simulation of sea shipping and shelf life). Exterior, interior, and biochemical-health promoting quality were tested as mentioned above.

In the first growing season (peppers picked from Jordan rift valley) the effect of organic growing was examined, and was compared to the conventionally grown Bell peppers (red and yellow). It was found that organic fertilization kept similar levels of phytonutrients both conventionally grown strains; red and yellow, while preserving the quality and appearance of the fruit. The red strain showed a level of flavonoids that was about 50% to 80% higher than the yellow strain, in all treatments (fresh, stored, conventional and organic). On the other hand, yellow peppers showed 15% higher levels of antioxidants than red peppers, in fresh and stored organic. Regarding other parameters that were tested there were no remarkable differences between the two strains.

In the second season, the effects of storage on the quality of the fruits and their nutrient contents were tested in three sweet pepper strains (red, yellow and orange) that were picked from the *Shfela* region. The results obtained were similar to a high degree to those obtained from the nutrient tests of the first season; hence the growing location had no effect on the quality of the product.

In order to find leading wild hot pepper lines with anti-proliferative activity, ten wild strains were tested in the season of 2012. The strains were grown in a greenhouse under optimal conditions at the Volcani Institute. The quality of fresh as well as stored hot peppers was examined, and it was found that there is a clear distinction between the strains in most of the measured parameters (water loss, sugar levels, vitamin C, polyphenols etc.) Strain 1745 was the most remarkable in all regards to nutrient levels, quality and anti-cancer activity compared to the other strains that were tested. It has the lowest water loss level and the highest anti-

oxidants level (almost 95% DPPH Scavenage). In addition, this strain contains two times higher levels of flavonoids and capsaicin than the rest of the strains. In the examination of anti-cancer activity, the 1745 strain showed the highest activity. This strain slowed down HCT116 cells growth even in smaller concentration than the rest of the strains, but did not affect the proliferation of liver cancer cells (HepG2) in a distinct level. Also, the 1072 strain showed relatively a high anti-cancer activity, without affecting the proliferation of normal human dermal fibroblasts (NHDF), compared to slowing the growth of HepG2 cancer cells and even greater growth slowing of HCT116 cancer cells.

In the examination of anti-proliferative activity of sweet peppers, the effect of extracts prepared of red and yellow strains was compared to their effect on the proliferation of normal cells (NHDF) and two types of cancer cells HepG2 and HCT116. The results show that a high concentration of red pepper extract slows down the growth of HCT116 cancer cells considerably and distinctly compared to normal cells (NHDF), in regular fertilizer as well as in organic fertilizer. However, a similar essence concentration of the organic yellow strain harmed horribly the growth of normal cells (NHDF), but did slow down the growth of both types of cancer cells (HepG2 and HCT116).

In this research I have shown that the hot pepper strains 1745, 1232 and 1072 and sweet red pepper have a potential to be developed as anti-cancer functional food. Extracts prepared of these strains inhibited specifically the proliferation of colon cancer (HCT116) cells without affecting the proliferation of normal (NHDF) cells. It should be noted that the extracts inhibited the proliferation of colon cancer cells more efficiently than that of liver cancer cells (HepG2). However, it should be noted that the effective concentration needed to gain an anti-proliferative activity is higher in sweet peppers than in hot peppers.

The results obtained, can lead to branding a strain/s of leading pepper which (1) is suitable as functional food, and can be integrated in a diet designated for prevention/treatment of cancer (2) might be a source for a new drug for the treatment of cancer. These strains, especially wild hot pepper strains, can be utilized as a genetic material for future improvement of anti-cancer activity. It can be assumed that increasing the awareness of the public to the anti-cancerous qualities of pepper will allow its marketing as a product, and will lead to expanding its growing fields as well as its sales.

**Physiological aspects, nutrient levels and anti-proliferative
activities in hot and sweet peppers (organic Vs. conventional
fertilization)**

Master Thesis

**Thesis submitted to the Hebrew University of Jerusalem,
The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and
Environment For the degree of
“Master of Science in Agriculture”**

By

Ousayd Gharra

2013 December