

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Antioxidant Activity of Apple (Red Delicious), Subjected to Pre-Harvest Foliar Spraying by Ferulic Acid and Nanochitosan

Mostafaei¹, S., Asghari^{2*}, M. R. and Ghoosta³, H.

1 and 2. PhD Student and Professor, Respectively, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

3. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

*: Corresponding Author

Email: m.asghari@urmia.ac.ir

Received: 2025/05/07

Accepted: 2025/07/29

Introduction

Apple (*Malus domestica*) are a crucial part of human nutrition because of their rich content of phenolic compounds and high antioxidant capacity. During the development stage, it accumulates various beneficial compounds like sugars, organic acids, vitamins, fibers, and antioxidants, all of which are highly valued by consumers. The concentration of these compounds can be influenced by several factors, including climate, genetic (variety), orchard management, harvesting methods, and storage and processing conditions. Given that high quality is a significant factor for consumers, extensive research has been dedicated to developing new techniques for preserving and maintaining the optimal organoleptic characteristics of fruits. Currently, consumers demand more natural and environmentally friendly food products, with high quality and longer shelf life, without any chemical preservatives. Achieving these goals together challenges scientists to develop new food preservation strategies. One promising strategy involves the application of edible layers made from polysaccharides and lipids, which can serve as edible coatings. Chitosan has emerged as a particularly popular biopolymer and a leading stimulatory molecule for plants over the past decade, owing to its diverse properties. Ferulic acid is one of the most abundant phenolic acids in plants that acts as a binding agent in the cell wall. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of pre-harvest application of ferulic acid (a phenolic compound with immune system induction properties) and nano-chitosan (a modified oligosaccharide with resistance induction and absorption enhancement effects) on the antioxidant properties of apple fruit.

Materials and Methods

This study was conducted on an apple orchard (*Malus domestica*) in Zarabad area of Khoy city located in the northwest of Iran, which has a moderate climate and mountainous in 2018-2019. The characteristics of the trees studied were as follows: trees with seed rootstock, modified leader, and approximately 12 years old. Also, the growth and management conditions were the same for all trees. The experiment was conducted as a factorial experiment in a randomized complete block design with 4 replications. The experimental factors included foliar spraying of fruit trees with nanochitosan at 3 concentrations (0, 5 and 10 ml L⁻¹) and ferulic acid at 3 concentrations (0, 0.5 and 1 mM). Foliar spraying was carried out at three times, the first stage at the time of fruit diameter becoming hazelnut-shaped, the second stage 20 days after the first stage and the third stage 20 days after the second stage foliar spraying, and in total, foliar spraying of treatments was carried out without Tween 80. The control treatment in this experiment was distilled water with Tween 80 (0.1/v/v). Finally, the fruits were harvested in October and with the color change index and fruit texture firmness. The harvested fruits were packaged and labeled and transferred to the Central Laboratory of Horticultural Sciences, Urmia University. After 24 hours of storage at laboratory temperature, the measurement of the studied traits on the fruits began. To prepare nanochitosan solutions, nanochitosan was prepared in ready form with a particle size of 100 nm. Nanoparticles Chitosan (1 g) was dissolved in 1% acetic acid. Then, 100 ml of distilled water was added to the above solution and stirred until complete dissolution. In the next step, the pH of the mixture was adjusted with 1 M NaOH solution. Then, different concentrations of chitosan nanoparticle suspensions were prepared for field testing.

Results and Discussion

In this study, the highest total phenolic and flavonoid contents were obtained at high concentrations of chitosan and ferulic acid. Therefore, the use of high concentrations of these compounds can increase the phenolic compounds of apple, which are strong antioxidants. In addition, these compounds act as anti-stress and anti-aging agents in the fruit by scavenging free radicals, which leads to an increase in post-harvest life and maintenance of fruit quality. The antioxidant capacity of fruits treated by nanochitosan and ferulic acid after fruit harvest showed a significant increase compared to the control treatment. It seems that field and pre-harvest applications of ferulic acid have not been studied for their antioxidant activity, however, it is expected that ferulic acid, due to its antioxidant properties, will increase the antioxidant activity of fruits. Although there is a clear relationship between antioxidant activity and total phenolic

Mostafaei *et al.*, Antioxidant activity of Apple (Red Delicious), ...

content in this study. The highest polyphenol oxidase activity was observed in the control treatment. Ferulic acid inhibits the polyphenol oxidase activity of the samples and this enzyme does not use the available O₂. In the present study, both nanochitosan and ferulic acid significantly inhibited the activity of polyphenol oxidase. Thus, the use of high concentrations of nanochitosan and ferulic acid effectively prevented the browning caused by polyphenol oxidase and reduced the activity of this enzyme, which oxidizes phenolic substrates. In this study, catalase enzyme activity decreased with increasing concentrations of nanochitosan and ferulic acid. Phenolic compounds, including ferulic acid, play an important role in inhibiting reactive oxygen species, inhibiting lipid peroxidation, stabilizing cell membranes, and reducing abiotic stresses. by increasing ferulic acid concentration, the amount of gallic acid decreased and chlorogenic acid increased, while nanochitosan caused an increase in gallic acid and various changes in caffeic acid. Also, the highest amount of apigenin was observed in the combination of 10 mL/L nanochitosan and 1 mM ferulic acid.

Conclusion

Therefore, the use of combined treatments of nanochitosan and ferulic acid is recommended, especially in organic orchards, to improve the nutritional quality of apples. Because it reduces crop losses, it can be an economical way to export apple fruits during the season and at good market prices.

Keywords: Polyphenol oxidase, Total phenol, Total flavonoid, Catalase

Citations: Mostafaei, S., Asghari, M. R. and Ghoosta, H. (2026). Antioxidant Activity Of Apple (Red Delicious), Subjected to Pre-Harvest Foliar Spraying by Ferulic Acid and Nanochitosan, *Plant Production Technology*, 25(2), 13-26. <https://doi.org/10.22084/ppt.2025.30941.2160>

© 2025 The Author(s). Bu- Ali Sina University Publication. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Online ISSN: 2476-5651

Print ISSN: 2476-6321

فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیب "رد دلیشز" تحت محلول‌پاشی قبل از برداشت اسیدفرولیک و

نانوکیتوسان

Antioxidant Activity of Apple (Red Delicious), Subjected to Pre-Harvest Foliar Spraying by Ferulic Acid and Nanochitosan

سجاد مصطفایی^۱، محمدرضا اصغری^{۲*} و یوبرت قوستا^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۷

(مقاله پژوهشی)

چکیده:

سیب (*Malus domestica*) به دلیل محتوای بالای ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اهمیت تغذیه‌ای بالایی دارد. این پژوهش تأثیر کاربرد قبل از برداشت فرولیک‌اسید و نانوکیتوسان را بر کیفیت سیب بررسی کرد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها شامل نانوکیتوسان (۰، ۵، ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر) و فرولیک‌اسید (۰، ۰/۵، ۱ میلی‌مولار) بود. نتایج نشان داد که بالاترین غلظت‌های نانوکیتوسان (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر) و فرولیک‌اسید (یک میلی‌مولار) موجب افزایش معنی‌دار فنول‌کل، فلاونوئیدکل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس آزمون DPPH شدند. در مقابل، فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز با افزایش غلظت تیمارها کاهش یافت و کمترین مقدار در تیمار ترکیبی نانوکیتوسان (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر) و فرولیک‌اسید (۰/۵ میلی‌مولار) مشاهده شد. بیشترین فعالیت کاتالاز در تیمار فرولیک‌اسید (۰/۵ میلی‌مولار) بدون نانوکیتوسان ثبت شد، درحالی‌که کمترین فعالیت این آنزیم در تیمار ترکیبی نانوکیتوسان (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر) و فرولیک‌اسید (یک میلی‌مولار) مشاهده شد. با افزایش غلظت فرولیک‌اسید، مقدار گالیک‌اسید کاهش و کلروژنیک‌اسید افزایش یافت، درحالی‌که نانوکیتوسان باعث افزایش گالیک‌اسید و تغییرات مختلف در کافیک‌اسید شد. همچنین، بیشترین مقدار آپی‌ژنین در ترکیب نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر و فرولیک‌اسید یک میلی‌مولار مشاهده شد. استفاده همزمان از نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید، به‌ویژه در باغ‌های ارگانیک، روشی مؤثر برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای سیب و افزایش ارزش بازاری‌پسندی آن است.

واژه‌های کلیدی: پلی‌فنل‌کسیداز، فنول‌کل، فلاونوئیدکل، کاتالاز

ارجاع به مقاله: مصطفایی، س.، اصغری، م. ر. و قوستا، ی. (۱۴۰۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیب "رد دلیشز" تحت محلول‌پاشی قبل از برداشت اسیدفرولیک و نانوکیتوسان، مجله فناوری تولیدات گیاهی، ۲۵(۲)، ۱۳-۲۷. [https://doi.org/10.22084/ppt.2025.30941.2160/](https://doi.org/10.22084/ppt.2025.30941.2160)

حق نشر متعلق به نویسنده (گان) است و نویسنده تحت مجوز Commons Creative License Attribution (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) به مجله اجازه می‌دهد مقاله‌ی چاپ شده را در



سامانه به اشتراک بگذارد، منوط بر اینکه حقوق مؤلف اثر حفظ و به انتشار اولیه مقاله در این مجله اشاره شود.

شاپا چاپی: ۲۴۷۶-۶۳۲۱

شاپا الکترونیکی: ۲۴۷۶-۵۶۵۱

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران
۳. استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول Email m.asghari@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

سیب (*Malus domestica*) تأثیر اقتصادی مهمی در سراسر جهان دارد. براساس آمار فائو در سال ۲۰۱۲ چین و آمریکا به ترتیب با تولید ۳۶ و پنج میلیون تن در سال دو کشور عمده تولیدکننده سیب در جهان بودند و ایتالیا، فرانسه و ایران با تولید حدود دو میلیون تن رتبه‌های بعدی را به خود اختصاص داده‌اند (Na et al., 2016). سیب در طول نمو خود ترکیبات متعددی مانند قندها، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها، فیبرها و آنتی‌اکسیدان‌ها را انباشته می‌کند که مصرف‌کنندگان آن را ارزشمند می‌دانند (Musacchi and Serra, 2018). غلظت این ترکیبات ممکن است با توجه به عواملی مانند آب و هوا، ژنوتیپ (رقم)، مدیریت باغ، شرایط برداشت، نگهداری و فرآوری متغیر باشد (Napolitano et al., 2004). در حال حاضر، مصرف‌کنندگان خواستار تولید مواد غذایی طبیعی‌تر و سازگار با محیط‌زیست، با کیفیت بالا و ماندگاری طولانی‌تر و بدون هیچ گونه نگهدارنده شیمیایی هستند (Gol et al., 2013). دستیابی به این اهداف در کنار یکدیگر، در چالشی دانشمندان را برای توسعه استراتژی‌های جدید نگهدارنده مواد غذایی قرار می‌دهد. یکی از این استراتژی‌ها استفاده از لایه‌های خوراکی پلی‌ساکاریدها و لیپیدهایی است که به‌طور بالقوه می‌توانند به‌عنوان مواد پوشش خوراکی عمل کنند (et al., 2020). به‌دلیل خواص متعدد، کیتوسان^۱ از دهه گذشته به یکی از محبوب‌ترین پلیمرهای زیستی و مولکول محرک پیشرو برای گیاهان تبدیل شده است (Malerba and Cerana, 2015). از طریق استیل‌زدایی قلیایی کیتین حشرات، اسکلت بیرونی سخت‌پوستان و دیواره سلولی قارچ تولید می‌شود (Kaya et al., 2015). به‌عبارت‌دیگر، مواد خام برای تولید کیتوسان در طبیعت فراوان است و از نظر در دسترس بودن پس از سلولز در رتبه دوم قرار دارد. از این‌رو، استفاده از کیتوسان برای کاربردهای مختلف در کشاورزی از نظر اقتصادی امکان‌پذیر است (Malerba and Cerana, 2015). در این راستا تأثیر کاربردهای قبل از برداشت کیتوسان بر پوسیدگی، کیفیت و ویژگی‌های شیمیایی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی (*Fragaria chiloensis*) نشان داد که میوه‌های تیمارشده با کیتوسان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول‌کل

بالتری را نشان داده‌اند (Saavedra et al., 2016). مشابهاً، تیمار قبل از برداشت با کیتوسان تأثیر مثبتی بر آنتوسیانین، فنول‌کل، فلاونوئید، محتوای ویتامین‌ث و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد DPPH توت‌فرنگی داشت (et al., 2018). اسیدفرولیک^۲ یکی از فراوان‌ترین اسیدهای فنولیک در گیاهان است که به‌عنوان یک عامل اتصال‌دهنده در دیواره سلولی عمل می‌کند (Lam et al., 2001). اسیدفرولیک می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلفی با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها پیوند متقابل برقرار کند. در مورد پروتئین‌ها، اسیدفرولیک می‌تواند به کینون اکسید شود و سپس کینون با آمین‌های روی پروتئین واکنش نشان می‌دهد، یا می‌تواند از طریق مکانیسم رادیکال‌آزاد با تیروزین و سایر اسیدهای آمینه پیوند متقابل برقرار کند. احتمال سوم استری شدن آن با اسیدهای آمینه هیدروکسیل مانند سرین است (Ou et al., 2005). اسیدفرولیک علاوه بر سمیت کم و خواص پیوند متقابل آن با پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها، همچنین دارای عملکردهای فیزیولوژیکی بسیاری از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد سرطانی است (Ou et al., 2004). در مطالعه‌ای که توسط یانگ و همکاران (Yang et al., 2018) روی انبه (*Mangifera indica* L.) انجام گرفت. نتایج مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان داد و خواص آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل‌توجهی در تیمار کیتوسان پیوندی با فرولیک‌اسید بهبود یافته است. تاکنون در مورد تأثیر کاربرد قبل از برداشت اسیدفرولیک بر خواص بیوشیمیایی سیب گزارشی نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر کاربرد پیش از برداشت فرولیک‌اسید به‌عنوان ترکیب فنولی با خاصیت القای سیستم دفاعی و نانوکیتوسان به‌عنوان الیگوساکارید اصلاح‌شده با اثرات القای مقاومت و بهبود جذب مواد بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی میوه سیب بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد گیاهی و تیمارهای آزمایشی

این مطالعه طی سال‌های ۹۸-۹۹ بر روی باغ سیب (*Malus domestica*) در منطقه زراباد شهرستان خوی، واقع در شمال غربی ایران، که دارای آب و هوای معتدل و کوهستانی است،

ظرف حاوی نمونه‌های پودر شده اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوز و از کاغذ صافی عبور داده شدند. در نهایت عصاره صاف شده جهت اندازه‌گیری فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲-۲. فنول کل

جهت اندازه‌گیری میزان فنول کل، مقدار مشخصی از عصاره متانولی (۱۰۰ میکرولیتر از عصاره) با ۱۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد داخل لوله‌های شیشه‌ای ریخته و به آن ۹۶۰ میکرولیتر کربنات سدیم هفت درصد و در آخر ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس لوله‌های شیشه‌ای به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر Dynamica (HALODB-20) قرائت شد. مقدار جذب به دست آمده (Y) در معادله حاصل از کالیبراسیون جایگذاری و مقدار فنول کل (X) بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر گزارش شد (Slinkard and Singleton, 1977).

۲-۲-۳. فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل، مقدار مشخصی از عصاره متانولی (۱۰۰ میکرولیتر) به ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم پنج درصد اضافه و به مدت پنج الی ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی قرار داده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۱۰۰۰ میکرولیتر استات یک مولار اضافه نموده و جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرتستین استفاده شد و با استفاده از معادله حاصل از کالیبراسیون میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم کوئرتستین بر گرم وزن تر گزارش شد (Chang et al., 2002).

انجام شد. ویژگی‌های درختان مورد مطالعه به شرح زیر بود: درختان با پایه بذری، روش تربیت شلجمی و تقریباً ۱۲ ساله، همچنین شرایط رشدی و مدیریت برای همه درختان یکسان بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی درختان میوه با نانوکیتوسان در سه غلظت (۰، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر) و اسید فرولیک در سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بود. به دلیل اینکه زمان تقسیم سلولی و بزرگ شدن میوه‌ها در مراحل اولیه رشد انجام می‌گیرد؛ بنابراین، محلول‌پاشی در سه زمان، مرحله اول در زمان فندقی شدن قطر میوه، مرحله دوم ۲۰ روز پس از مرحله اول و مرحله سوم ۲۰ روز بعد از محلول‌پاشی مرحله دوم و در کل محلول‌پاشی تیمارها بدون Tween 80 صورت گرفت. تیمار شاهد در این آزمایش آب مقطر همراه با Tween 80 (۰/۱۷/۷) بود. در نهایت میوه‌ها در اواسط مهرماه و با شاخص تغییر رنگ و سفتی بافت میوه برداشت شدند. میوه‌های برداشت شده، بسته‌بندی و برچسب‌گذاری شدند و به آزمایشگاه مرکزی علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه، اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه روی میوه‌ها آغاز شد.

جهت تهیه محلول‌های نانوکیتوسان، نانوکیتوسان به صورت آماده و با اندازه ذرات ۱۰۰ نانومتر تهیه شد نانوذرات کیتوسان (یک گرم) در اسیداستیک یک درصد حل شد. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول فوق اضافه شد و با هم زدن مداوم تا حل شدن کامل، هم زده شد. در مرحله بعد، pH مخلوط با محلول ۱ مولار NaOH تنظیم شد. سپس غلظت‌های مختلف سوسپانسیون نانوذرات کیتوسان برای آزمایش میدانی تهیه شدند.

۲-۲-۲. اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌ها

۲-۲-۱. عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری میزان فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
عصاره‌گیری بر اساس روش حاجی مهدی پور و همکاران (Hajimahdipour et al., 2009) با کمی تغییر انجام گرفت ابتدا ۰/۵ گرم از بافت میوه در داخل هاون سرد با ازت مایع پودر گردید. سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به

۲-۲-۴. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد

DPPH¹

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH، دو میلی‌لیتر از محلول DPPH (۰/۰۰۴) گرم پودر DPPH در ۱۰۰ cc متانول ۸۰ درصد) به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی اضافه گردید. محلول حاصل را تکان داده و در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید و با استفاده از فرمول زیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تعیین گردید. جهت تهیه شاهد (Blank) نیز به روش بالا عمل و فقط به جای عصاره گیاهی، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد (Chiou et al., 2007).

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{[\text{AC-AS}]}{\text{AC}} \times 100$$

AC: میزان جذب بلنک و AS: میزان جذب نمونه.

۲-۳-۳. عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها

جهت تهیه عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم، ۰/۵ گرم از بافت میوه وزن شده و در دو میلی‌لیتر بافر استخراج (Tris-HCl ۰/۵ درصد و پلی وینیل پیرولیدون (PVP²) ۰/۰۵ درصد و pH=۸) بر روی یخ خرد شد تا یک عصاره‌ی کاملاً همگن به دست آید. عصاره حاصل با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ شد. محلول‌رویی جدا شده و عصاره‌ی حاصل به منظور بررسی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar et al., 2001).

۲-۳-۱. فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز^۳ (PPO)

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز ابتدا تعدادی لوله آزمایش در حمامی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶ و پیروگالل ۰/۰۲ مولار به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. پس از رسیدن دمای لوله‌ها دقیقاً به ۴۰ درجه سانتی‌گراد به هر لوله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره افزوده شد و تغییرات جذب در ۴۳۰ نانومتر خوانده شد (Raymond et al., 1993).

۲-۳-۲. فعالیت آنزیم کاتالاز^۴ (CAT)

محلول‌های موردنیاز و ترتیب اضافه کردن ترکیبات جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به شرح ذیل می‌باشد: ابتدا بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار در pH=۷ تهیه شد. سپس به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر و ۲۰ میکرولیتر H₂O₂ ۳ درصد برای هر نمونه اضافه گردید. این مواد با هم مخلوط و سپس ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به دست آمده از بافت میوه به آن افزوده و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در مدت زمان یک دقیقه بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی به ازای هر گرم وزن تر در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز، مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مولار H₂O₂ را در یک دقیقه تجزیه می‌کند (Aebi, 1984).

۲-۳-۳. استخراج ترکیبات پلی‌فنولی و آنالیز به روش

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC⁵)

به منظور استخراج پلی‌فنول‌ها ۵ گرم از نمونه همگن شده را برداشته و بعد از افزودن ۴ میلی‌لیتر حلال متانول حاوی یک درصد اسیداسیتیک، فرایند استخراج تحت امواج التراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و از محلول روئی به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شد.

جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار کمی اسیدهای فنولی مورد مطالعه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل سری ۱۱۰۰ ساخت کمپانی Agilent آمریکا، مجهز به یک لوپ تزریق به حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادیان چهار حلالی، سیستم گاززدا، آون ستون (تنظیم شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و آشکارساز آرایه دیودی، که در طول موج‌های ۲۵۰، ۲۷۲ و ۳۱۰ نانومتر تنظیم شده، صورت گرفت. جداسازی بر روی ستون اکتادسیل سیلان (به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات ۵ میکرومتر (ZORBAX Eclipse XDB) ساخت کمپانی Dr. Mainsch آلمان انجام شد. از نرم‌افزار Chemstation جهت پردازش داده‌ها استفاده شد.

4. Catalase

5. High Performance Liquid Chromatography

1. 2,2, DiPhenyl.1.Picrylhydrazyl

2. Poly Vinyl Pyrrolidone

3. Polyphenol oxidase

استیک اسید با فلوی یک میلی لیتر بر دقیقه رسید همچنین زمان جداسازی ۱۵ دقیقه بود (Seal, 2016). کروماتوگرام پیک‌های استاندارد حاصل ترکیبات پلی فنولی به همراه طول موج‌ها در (شکل ۱) آورده شده است. آنالیز HPLC وجود نه ماده تشکیل دهنده، یعنی شش اسید فنولیک (اسیدهای گالیک، کافئیک، کلروژنیک، سینامیک، رزماریک و کوماریک) و سه فلاونوئید (روتین، کوئرستین و آپیژنین) را شناسایی کرد.

به منظور جداسازی بهتر ترکیبات از برنامه شویس استفاده شد که برای این منظور ابتدا فاز متحرک با نسبت ۱۰ درصد استونیتریل و ۹۰ درصد محلول یک درصد استیک اسید با فلوی یک میلی لیتر بر دقیقه شروع و در طی ۵ دقیقه به نسبت ۲۵ درصد استونیتریل و ۷۵ درصد محلول یک درصد استیک اسید با فلوی یک میلی لیتر بر دقیقه رسید، سپس در طی ۱۰ دقیقه به نسبت ۶۵ درصد استونیتریل و ۳۵ درصد محلول یک درصد

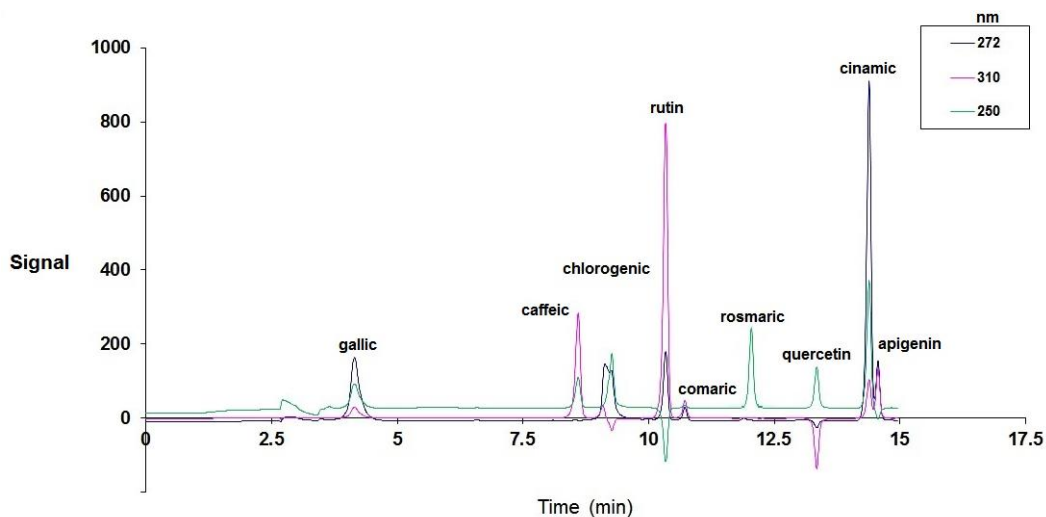


Fig. 1: Chromatogram of standard peaks obtained from HPLC of polyphenolic compounds

۲-۳. محتوای فلاونوئید کل

طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها، مقدار فلاونوئید کل میوه‌های تیمار شده با نانوکیتوسان و فرولیک اسید نسبت به شاهد افزایش یافت به طوری که با افزایش غلظت نانوکیتوسان و فرولیک اسید محتوای فلاونوئید کل افزایش یافته است. بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۳/۰۸ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در تیمار با نانوکیتوسان در غلظت ۱۰ میلی لیتر در لیتر مشاهده شد که اختلاف معنی داری با غلظت پنج میلی لیتر در لیتر نداشت. در رابطه با میوه‌های تیمار شده با فرولیک اسید نیز بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۳/۱۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در غلظت یک میلی مولار به دست آمد که اختلاف معنی داری با غلظت ۰/۵ میلی مولار نداشت (جدول ۲).

ترکیبات فنولی یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه هستند و از نظر شیمیایی بسیار متنوع هستند. بیوستز آنها از طریق اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان آغاز می‌شود (Edwards et al., 2012). ترکیبات فنولی آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (Sreenivas et al., 2011). در این میان فلاونوئیدها گروه

۴-۲. آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده از سنجش پارامترهای مختلف با چهار تکرار، به صورت آزمایش فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک‌های کاملاً کامل تصادفی، توسط نرم‌افزار SAS, version (9.2) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شدند. تجزیه واریانس‌ها نیز با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد (جدول ۱) و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

۳. نتایج و بحث

۳-۱. محتوای فنول کل

تغییرات در محتوای فنول کل میوه‌های تیمار شده با نانوکیتوسان و اسید فرولیک نشان داده شده است (جدول ۲). با افزایش غلظت نانوکیتوسان و فرولیک اسید محتوای فنول کل افزایش نشان داد. بیشترین مقدار فنول کل (۹/۳۳ و ۹/۲۵ میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر) در تیمارهای نانوکیتوسان ۱۰ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید یک میلی مولار به ترتیب به دست آمد. کمترین محتوای فنول کل در گروه شاهد هر دو تیمار مشاهده گردید.

عمده‌ای از خانواده ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و (2012).

بیولوژیکی هستند که در میوه‌ها شناسایی شده‌اند (Guo *et al.*,)

Table 1: Analysis for the enzymatic and non-enzymatic antioxidants affected by nanochitosan and ferulic acid treatment in apple cv. "Red Delicious"

S.O.V	df	Mean squares				
		Total phenol	Total Flavonoid	DPPH scavenging activity	Polyphenol oxidase activity	Catalase activity
Block	3	0.24 ^{ns}	0.12 ^{ns}	108.25 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.30 ^{ns}
Nano chitosan (A)	2	8.81 [*]	2.84 [*]	422.92 [*]	12.67 [*]	478.38 [*]
Ferulic Acid (B)	2	8.49 [*]	3.08 [*]	150.81 [*]	2.29 [*]	112.05 [*]
A×B	4	1.01 ^{ns}	0.42 ^{ns}	14.39 ^{ns}	0.75 [*]	99.03 [*]
Error	24	0.52	0.75	4.96	0.02	0.85
C.V (%)		8.39	30.34	3.23	8.06	6.00

^{ns}, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively

Table 2: Comparison of mean the effect of nano-chitosan and ferulic acid on non-enzymatic antioxidants of apple cv. "Red Delicious".

Treatment	Concentration	Total phenol (mg GAE g ⁻¹ fw)	Total flavnoid (mg QE g ⁻¹ fw)	DPPH scavenging activity (%)
	0	7.67 ^b	2.11 ^b	57.5 ^{6b}
Ferulic acid (mM)	0.5	8.88 ^a	2.59 ^{ab}	62.00 ^{ab}
	1	9.29 ^a	3.12 ^a	62.57 ^a
	0	7.66 ^b	2.11 ^b	55.42 ^c
Nano-chitosan (ml L ⁻¹)	5	8.49 ^a	2.63 ^{ab}	61.42 ^b
	10	9.33 ^a	3.08 ^a	67.29 ^a

The means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different using Duncan's test ($p < 0.05$)

است که اسپری کیتوسان قبل از برداشت، محتوای فنول کل را در انگور (Meng *et al.*, 2008) و توت فرنگی (Saavedra *et al.*, 2016) در طول دوره نگهداری افزایش داد. همچنین در توت فرنگی محتوای فلاونوئید در میوه‌های شاهد و تیمار شده با کیتوسان به ترتیب ۲۱/۳۴ و ۲۹/۵۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. مقدار فلاونوئید میوه‌های تیمار شده با کیتوسان نسبت به شاهد ۳۸ درصد افزایش یافت که نشان می‌دهد تیمار کیتوسان قبل از برداشت به‌طور قابل‌توجهی بر محتوای فلاونوئید تأثیر می‌گذارد (Bursac Kovačević *et al.*, 2015).

۳-۳. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

همان‌طور که در (جدول ۲) نشان داده شده است، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌های تیمار شده با نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید پس از برداشت میوه در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. به‌طوری‌که درصد افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به شاهد، در میوه‌های تیمار شده با نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید به ترتیب ۲۱/۴۱ و ۸/۸۱ درصد بود. در میوه‌های تیمار شده با فرولیک‌اسید بین غلظت یک و ۰/۵ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

در این مطالعه بیشترین مقدار فنول و فلاونوئید کل در غلظت‌های بالای کیتوسان و فرولیک‌اسید بدست آمد. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالای این ترکیبات می‌تواند باعث افزایش ترکیبات فنولی میوه سیب گردد که آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند علاوه‌براین، این ترکیبات با سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد، به‌عنوان عوامل ضد استرس و ضد پیری در میوه عمل می‌کنند که منجر به افزایش عمر پس از برداشت و حفظ کیفیت میوه نیز می‌شود. در سیب‌های فرش‌کات، افزایش محتوای فنول کل را بعد از کاربرد فرولیک‌اسید به‌عنوان یک اسیدفنولیک به فعال شدن PAL و در نتیجه تشکیل فنول‌ها به‌عنوان مکانیزم دفاعی در برابر پاتوژن‌ها یا از دست دادن آب نسبت داده‌اند (Guo *et al.*, 2012). کیتوسان علاوه‌بر خواص ضدقارچی، پتانسیل فعال کردن آنزیم‌های مرتبط با دفاع مانند فعالیت PAL و ترکیبات فنولی در گیاهان را دارد (Bautista-Baños *et al.*, 2006). پوشش کیتوسان با کاهش مقدار اکسیژن، فرایندهای فیزیولوژیکی را کند و دسترسی آنزیم‌های پلی‌فنول اکسیداز و پراکسیداز را به اکسیژن محدود کرده و از کاهش فنول‌ها در طول دوره نگهداری جلوگیری می‌کند (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008). در مورد تأثیر تیمارهای کیتوسان، گزارش شده

متعددی مانند pH، دما، ترکیبات فنولی، غلظت اسیدآسکوربیک و مرحله رشد میوه قرار می‌گیرد. پیشنهاد شده است فرولیک اسید ممکن است به‌عنوان یک بازدارنده رقابتی پلی‌فنول‌اکسیداز در میوه سیب عمل کند و از اتصال بین سوبسترا و آنزیم جلوگیری کند (Shannon and Pratt, 1967). همچنین گزارش شده است که پوشش‌های خوراکی به‌عنوان یک موانع نیمه تراوا برای گازها عمل می‌کنند، مقدار O_2 و CO_2 که بین محصول و محیط رد و بدل می‌شود را کاهش می‌دهند و یک اتمسفر تغییر یافته در پوشش ایجاد می‌کنند (Dhall, 2013)؛ بنابراین مطالب ذکر شده توجیه‌کننده این است که فرولیک‌اسید از فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز نمونه‌ها جلوگیری می‌کند و این آنزیم از O_2 موجود استفاده نمی‌کند (Qi et al., 2011). در مطالعه حاضر، نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید هر دو به‌طور قابل‌توجهی فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز را مهار کردند. به‌طوری‌که استفاده از غلظت‌های بالای کیتوسان و فرولیک‌اسید به‌طور مؤثری از قهوه‌ای شدن ناشی از پلی‌فنول‌اکسیداز جلوگیری کرد و فعالیت این آنزیم را که سوبستراهای فنولی را اکسید می‌کند، کاهش داد. کاهش فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز از قهوه‌ای شدن آنزیمی میوه‌ها جلوگیری می‌کند. نتایج مطالعه حاضر اثر مفید تیمار فرولیک‌اسید+نانو کیتوسان را بر کاهش اکسیداسیون ترکیبات فنولی در سیب نشان داد.

۳-۵. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید نشان داد با افزایش غلظت نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. به‌طوری‌که حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز (۳۰/۵۴) واحد بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار فرولیک‌اسید ۰/۵ میلی‌مولار بدون کیتوسان مشاهده شد، درحالی‌که کمترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز (۱۰/۵۴) واحد بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار نانوکیتوسان با غلظت ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر و فرولیک‌اسید یک میلی‌مولار مشاهده گردید (جدول ۳).

فرولیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی گزارش شده است (Kumar and Pruthi, 2014) و برای این منظور به‌عنوان پوشش خوراکی استفاده می‌شود (Fabra and Chiralt, 2011)؛ بنابراین نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد، مهار پراکسیداسیون لیپیدی، تثبیت غشای سلولی و کاهش تنش‌های غیر زنده ایفا می‌کنند (Idrees et al., 2011; Zhang et al., 2012; Li et al., 2013). می‌رسد کاربردهای مزرعه‌ای و قبل از برداشت فرولیک‌اسید، در مورد بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی انجام نگرفته است با این حال انتظار می‌رود به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی فرولیک‌اسید باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها گردد. گرچه ارتباط واضحی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول کل در این مطالعه وجود دارد. علاوه بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وضعیت فیزیولوژیکی میوه بستگی دارد و در طول پیری کاهش می‌یابد (Shah and Hashmi, 2020). در مطالعه‌ای، تیمار کیتوسان فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه انبه را در طول نگهداری پس از برداشت به‌طور چشمگیری حفظ کرد (Palafox-Carlos et al., 2012). همکاران (Ehtesham Nia et al., 2021) گزارش کردند ترکیب تیمارهای کیتوسان و ژل آلوئه‌ورا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌های انگور را بعد از برداشت افزایش داد.

۳-۴. فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز (PPO)

یکی از آنزیم‌های کلیدی برای ارزیابی فیزیولوژی میوه‌ها در پس از برداشت پلی‌فنول‌اکسیداز می‌باشد. بیشترین میزان فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز (۳/۴۳ ΔOD بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار شاهد مشاهده گردید. با این حال، در میوه‌های تیمار شده با کیتوسان و فرولیک‌اسید، فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز با افزایش غلظت تیمارها کاهش یافت و کمترین (۰/۶۷ ΔOD بر گرم وزن تر در دقیقه) مقدار فعالیت آن در تیمار ترکیبی نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر و اسیدفرولیک ۰/۵ میلی‌مولار مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ترکیب نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر + اسید فرولیک ۰ میلی‌مولار و نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر + اسیدفرولیک یک میلی‌مولار نداشت (جدول ۳). فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز تحت تأثیر عوامل

Table 3: Comparison of mean the effect of nano-chitosan and ferulic acid on enzymatic antioxidants of apple cv. "Red Delicious"

Ferulic acid (mM)	Nano-chitosan (ml L ⁻¹)	polyphenol oxidase activity ($\Delta OD \text{ g}^{-1} \text{ FW/min}$)	Catalase activity ($U \text{ g}^{-1} \text{ FW/min}$)
-------------------	-------------------------------------	---	---

0	0	3.43 ^a	23.45 ^b
	5	2.54 ^b	12.30 ^{de}
	10	0.88 ^d	11.58 ^{ef}
0.5	0	2.55 ^b	30.54 ^a
	5	1.70 ^c	13.46 ^{cd}
	10	0.67 ^d	10.85 ^f
1	0	2.60 ^b	13.46 ^{cd}
	5	0.88 ^d	14.62 ^c
	10	0.87 ^d	8.54 ^e

The means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different using Duncan's test ($p < 0.05$).

در این مطالعه فعالیت کاتالاز با افزایش غلظت نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید کاهش یافت. یانگ و همکاران (Yang et al., 2018) گزارش کردند، فعالیت کاتالاز در انبه‌های تیمار شده با مشتقات کیتوسان بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین نویسندگان اظهار کرده‌اند که در اوایل نگهداری (در روز ۴)، فعالیت کاتالاز نمونه‌های پوشش داده شده با کیتوسان حدود ۱۳۰ واحد در گرم وزن تر بود، درحالی‌که نمونه‌های پوشش داده شده با فرولیک‌اسید-کیتوسان فعالیت کاتالاز در حدود ۱۵۰ واحد در گرم وزن تر داشتند. در روز ۱۶، فعالیت کاتالاز گروه‌های پوشش داده شده با کیتوسان حدوداً ۸۰ واحد بر گرم وزن تر بود، درحالی‌که هر دو گروه پوشش داده شده با کیتوسان-فرولیک‌اسید فعالیت آنزیمی بالای ۱۰۰ واحد بر گرم وزن تر داشتند. این نتایج نشان داد فرولیک‌اسید-نانوکیتوسان برای تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش عمر مفید در انبه مفیدتر هستند.

۳-۶. تأثیر نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید بر تولید ترکیبات پلی‌فنولی

براساس نتایج (جدول ۴)، تغییرات گالیک‌اسید با افزایش غلظت فرولیک‌اسید کاهش نشان داد درحالی‌که با افزایش غلظت کیتوسان افزایش نشان داد. همچنین در مقایسه با کل تیمارها بالاترین مقدار (۱۹/۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) این ترکیب در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار فرولیک‌اسید مشاهده گردید. تغییرات کافیک‌اسید مثل گالیک‌اسید روند مشخصی نداشت و بالاترین مقدار این ترکیب در تیمار ترکیبی نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر و فرولیک‌اسید ۰/۵ میلی‌مولار مشاهده گردید و کمترین مقدار آن در نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر به دست آمد. روند تغییرات کلروژنیک‌اسید با افزایش غلظت فرولیک‌اسید افزایش نشان داد. در بین تیمارها بیشترین و

رسیدن و پیری میوه را می‌توان یک پدیده اکسیداسیون در نظر گرفت. تولید گونه‌های اکسیژن فعال افزایش یافته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول رسیدن میوه کاهش می‌یابد. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مختلف سلاح سلول‌ها در برابر اکسیداسیون مولکول‌های بیولوژیکی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و دی‌اکسی‌ریبونوکلیک اسید توسط رادیکال‌های آزاد هستند (Dar et al., 2015). رادیکال‌های آزاد در طول متابولیسم طبیعی سلولی تولید می‌شوند و مولکول‌های زیستی سلول‌ها را به آسیب اکسیداتیو متصل می‌کنند. برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو، سلول‌های گیاهی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی خود را فعال می‌کنند و از طریق فعال‌سازی سیستم‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی به آسیب اکسیداتیو پاسخ می‌دهند (Gill and Tuteja, 2010). رادیکال‌های آزاد معمولاً توسط آنزیم‌های محافظ مانند سوپراکسید دیسموتاز^۱ (SOD)، پراکسیداز^۲ (POD) و کاتالاز^۳ (CAT) از بین می‌روند. سوپراکسید دیسموتاز به‌طور انحصاری رادیکال $O_2^{\cdot -}$ را به O_2 غیر سمی و H_2O_2 با سمیت پایین کاتالیز می‌کند. بعد از این مرحله، H_2O_2 توسط کاتالاز یا پراکسیداز به H_2O و O_2 کاتالیز می‌شود (Pirker et al., 2002). علاوه بر این، ماده آنتی‌اکسیدانی نیز به حذف اکسیژن‌فعال کمک می‌کند. ترکیبات فنولی، از جمله فرولیک‌اسید نقش مهمی در مهار گونه‌های اکسیژن‌واکنشی، مهار پراکسیداسیون لیپیدی، تثبیت غشای سلولی و کاهش تنش‌های غیرزنده ایفا می‌کنند (Idrees et al., 2011; Zhang et al., 2012; Li et al., 2013). کیتوسان می‌تواند ظرفیت مهار گونه‌های اکسیژن‌فعال را در میوه‌ها افزایش دهد (Gonzalez-Aguilar et al., 2010).

1. Superoxide dismutase
2. Peroxidase
3. Catalase

فرولیک اسید ۰/۵ میلی مولار با نانوکیتوسان ۵ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید یک میلی مولار و نانوکیتوسان ۱۰ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید ۰/۵ میلی مولار اختلافی مشاهده نشد. همچنین بین هر دو غلظت نانوکیتوسان با نانوکیتوسان ۵ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید ۰/۵ میلی مولار تفاوتی ملاحظه نشد. علاوه بر اینها بین تیمار فرولیک اسید یک میلی مولار با نانوکیتوسان ۱۰ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید یک میلی مولار و تیمار شاهد اختلافی مشاهده نشد. در هر دو تیمار نانوکیتوسان و فرولیک اسید با افزایش غلظت تغییرات میزان کوئرستین افزایش نشان داد ولی باین حال بالاترین میزان این ترکیب در تیمار شاهد مشاهده گردید. تغییرات میزان آپی ژنین نیز از با افزایش غلظت ترکیب نانوکیتوسان و فرولیک اسید افزایش نشان داد و بالاترین مقدار این ترکیب در تیمار ترکیب ۱۰ میلی لیتر در لیتر نانوکیتوسان و یک میلی مولار فرولیک اسید به- دست آمد.

کمترین مقدار کلروژنیک اسید به ترتیب در فرولیک اسید یک میلی مولار و تیمار ترکیبی نانوکیتوسان ۱۰ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید ۰/۵ میلی مولار مشاهده گردید. بیشترین مقدار کوماریک اسید (۹/۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) در شرایط تیمار با نانوکیتوسان ۵ میلی لیتر در لیتر مشاهده شد، درحالی که کمترین مقدار (۱/۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) این ترکیب در تیمار یک میلی مولار فرولیک اسید مشاهده گردید. تغییرات رزماریک اسید با افزایش غلظت فرولیک اسید افزایش نشان داد و بیشترین مقدار آن در ترکیب تیمار نانوکیتوسان ۵ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید یک میلی مولار مشاهده شد. بیشترین مقدار سینامیک اسید در تیمار ترکیب نانوکیتوسان ۱۰ میلی لیتر در لیتر و فرولیک اسید یک میلی مولار به دست آمد و بعد از آن در میوه های بدون تیمار مشاهده گردید. غلظت فلاونوئیدهای روتین، کوئرستین و آپی ژنین نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. در رابطه با روتین بین تیمارهای

Table 4: The effect of nano-chitosan and ferulic acid on polyphenolic compounds measured in the apple cv. "Red Delicious" under different treatment conditions

Treatment	Polyphenolic compounds ($\mu\text{g g}^{-1}$ fw)								
	Gallic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid	Coumaric acid	Rosmarinic acid	Cinnamic acid	Rutin	Quercetin	Apigenin
N1F1	1.60	0.40	29.70	1.80	0.70	0.50	0.10	4.70	4.10
N2F1	0.60	0.20	18.80	9.80	0.30	0.20	0.20	1.30	1.20
N3F1	3.60	1.00	19.20	8.00	0.20	0.10	0.20	3.70	0.50
F2N1	19.9	0.40	32.70	4.40	0.50	0.20	0.30	3.00	1.90
F3N1	11.40	0.80	56.20	1.40	0.80	0.10	0.10	3.70	1.00
N2F2	9.40	0.90	26.60	2.00	0.50	0.10	0.20	1.50	1.20
N2F3	8.50	1.20	17.10	3.30	0.90	0.10	0.30	4.10	1.80
N3F2	5.50	0.60	17.00	5.80	0.80	0.20	0.30	4.10	3.40
N3F3	10.40	0.40	5.40	3.00	0.20	0.90	0.10	1.00	5.80

N1F1: Non-treatment

N2F1: Nanochitosan 5 ml/L and Non-ferulic acid

N3F1: Nanochitosan 10 ml/L and Non-ferulic acid

F2N1: Ferulic acid 0.5 mM and Non-nanochitosan

F3N1: Ferulic acid 1 mM and Non-nanochitosan

N2F2: Nanochitosan 5 ml/L and ferulic acid 0.5 mM

N2F3: Nanochitosan 5 ml/L and ferulic acid 1 mM

N3F2: Nanochitosan 10 ml/L and ferulic acid 0.5 mM

N3F3: Nanochitosan 10 ml/L and ferulic acid 1 mM

کمک می کنند تا در برابر بیماری های مزمن اثر محافظتی داشته باشند (Cosme et al., 2018). اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها در جدول ۴ نشان داده شده است. برخی از این ترکیبات مانند اسیدگالیک، اسیدکافئیک، کوئرستین و غیره به طور گسترده در داروسازی استفاده می شوند؛ بنابراین حفظ آنها در زمان نگهداری اهمیت دارد (Eshghi et al., 2022). مطالعات نشان داده است که محتوای فنول سیب به دلیل تیمارهای قبل یا پس از برداشت، شرایط اکولوژیکی و تنوع ژنوتیپی تفاوت زیادی

ترکیبات فنولی متابولیت های ثانویه مهم گیاهی هستند که توانایی بسیار خوبی برای کاهش و از بین بردن رادیکال های آزاد را از خود نشان می دهند و در نتیجه خواص آنتی اکسیدانی و ضدپراکسیداسیون لیپیدی را ارائه می دهند (Hagiwara et al., 2011). سیب یکی از منابع اصلی ترکیبات فنولی است که با خنثی کردن رادیکال های آزاد اثرات خوبی بر سلامت انسان دارد (Vojodi et al., 2012). اسیدهای فنولیک با توانایی جداسازی گونه های فعال اکسیژن به سلامت انسان

میلی‌لیتر در لیتر نانوکیتوسان و یک میلی‌مولار فرولیک‌اسید به‌دست آمد. مطالعه ما نشان می‌دهد که تیمار مبتنی بر نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید، به‌ویژه ترکیب نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید، روشی مناسب برای حفظ ترکیبات پلی‌فنولی در طول دوره نگهداری است. این مشاهدات با سایر مطالعات همخوانی دارد به‌طوری‌که، در میوه توت‌فرنگی، پوشش ژل آلوئه‌ورا غنی شده با اسیدآسکوربیک، لاکتات کلسیم و اسانس دارچین از ترکیب فنولی محافظت می‌کند (Esmaeili et al., 2021).

۴. نتیجه‌گیری کلی

بالاترین محتوای آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در بالاترین غلظت‌های نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید مشاهده شد. با این حال، در درختان تیمار شده با نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید، فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز با افزایش غلظت تیمارها کاهش نشان داد. حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار فرولیک‌اسید ۰/۵ میلی‌مولار بدون کیتوسان مشاهده شد؛ بنابراین استفاده از تیمارهای ترکیبی نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید به‌ویژه در باغ‌های ارگانیک برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای سیب توصیه می‌شود. زیرا تلفات محصول را به حداقل می‌رساند، به‌طوری‌که می‌تواند یک روش اقتصادی برای صادرات میوه‌های سیب در طول فصل و با قیمت‌های خوب در بازار باشد.

دارد (Li et al., 2021). یکی از مهم‌ترین مواد استخراج شده از ترکیبات فنولی، کلروژنیک‌اسید است که بیشترین مقدار این ترکیب در تیمار با فرولیک‌اسید ۱ میلی‌مولار مشاهده گردید. اسید کلروژنیک یکی از اسیدهای فنولیک فراوان در سیب است و پتانسیل ضدسرطانی آن گزارش شده است (Nezbedova et al., 2021). بنابراین، این ترکیب و سایر اسیدهای فنولیک مورد مطالعه با استفاده از تیمارهایی مانند نانوکیتوسان و یا فرولیک‌اسید به‌ویژه در ترکیب با نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید محافظت می‌شوند. با توجه به اهمیت غذایی سیب به‌عنوان محصول بالقوه سالم، محافظت از اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدهای آن با استفاده از تیمارهای نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید (به‌ویژه نانوکیتوسان+ فرولیک‌اسید) یکی از مزایای عمده این تیمارها می‌تواند باشد. فلاونوئیدهایی مانند فلاونول‌ها و فلاون ۳-اول‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بدن هستند. مهم‌ترین ترکیبات فلاون ۳-اول‌ها و فلاونول‌ها (کاتکین، آپیزین و کوئرستین) به‌عنوان منبع اصلی در جیره غذایی می‌باشند (Panche et al., 2016). علاوه بر ارزش غذایی فلاونوئیدها، حفظ بیشتر این ترکیبات در نمونه‌های انگور تیمار شده با کیتوسان+صمغ از سلول‌ها در برابر نفوذ *Botrytis cinerea* محافظت کرده است (Wahedi et al., 2021). در این مطالعه تغییرات میزان آپیزین به‌عنوان یک فلاونوئید با افزایش غلظت ترکیبات نانوکیتوسان و فرولیک‌اسید افزایش نشان داد و بالاترین مقدار این ترکیب در تیمار ترکیبی ۱۰

۵. منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Baraiya, N. S., Ramana Rao, T. V. and Thakkar, V. R. (2016). Composite Coating as a Carrier of Antioxidants Improves the Postharvest Shelf Life and Quality of Table Grapes (*Vitis vinifera* L. var. Thompson Seedless). *Mdrsjrns*, 18(1), 93-107.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
- Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Vahčić, N., Babojelić, M. S. and Levaj, B. (2015). Influences of organically and conventionally grown strawberry cultivars on anthocyanins content and color in purees and low-sugar jams. *Food Chemistry*, 181, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.063>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3).
- Chiou, A., Karathanos, V. T., Mylona, A., Salta, F. N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N. K. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 102(2), 516-522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.009>
- Cosme, F., Pinto, T. and Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/beverages4010022>
- Dar, T. A., Uddin, M., Khan, M. M. A., Hakeem, K. R. and Jaleel, H. (2015). Jasmonates counter plant stress: a review. *Environmental and experimental Botany*, 115, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.02.010>

- Dhall R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435-450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>
- Edwards, J. E., Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A. and Shipley, P. R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>
- Ehtesham Nia, A., Taghipour, S. and Siahmansour, S. (2021). Pre-harvest application of chitosan and postharvest Aloe vera gel coating enhances quality of table grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Yaghouti') during postharvest period. *Food Chemistry*, 347, 129012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129012>
- Eshghi, S., Karimi, R., Shiri, A., Karami, M. and Moradi, M. (2022). Effects of polysaccharide-based coatings on postharvest storage life of grape: Measuring the changes in nutritional, antioxidant and phenolic compounds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(2), 1159-1170. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01275-0>
- Esmaili, Y., Zamindar, N., Paidari, S., Ibrahim, S. A. and Mohammadi Nafchi, A. (2021). The synergistic effects of aloe vera gel and modified atmosphere packaging on the quality of strawberry fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16003. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16003>
- Fabra, M. J., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F. and Chiralt, A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1441-1447. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.012>
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M. and Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649-671. <https://doi.org/10.1080/10408390701761845>
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gol, N. B., Patel, P. R. and Rao, T. V. R. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.008>
- Gonzalez-Aguilar, G. A., Villa-Rodriguez, J. A., Ayala-Zavala, J. F. and Yahia, E. M. (2010). Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. *Trends in Food Science Technology*, 21(10), 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.004>
- Guo, X., Li, T., Tang, K. and Liu, R. H. (2012). Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 11050-11055. <https://doi.org/10.1021/jf304443u>
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H. and Hagiwara, H. (2011). Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European Journal of Pharmacology*, 662(1-3), 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.023>
- Hajimehdipoor, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M. (2009). Investigation of the Best Method for Extraction of Phenolic Compounds from *Echinaceae purpurea* L. (Moench). [Research]. *Journal of Medicinal Plants*, 8(32), 145-152.
- He, Y., Bose, S. K., Wang, W., Jia, X., Lu, H. and Yin, H. (2018). Pre-Harvest Treatment of Chitosan Oligosaccharides Improved Strawberry Fruit Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2194. <https://doi.org/10.3390/ijms19082194>
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T. and Khan, M. M. A. (2011). Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 987-999. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0631-6>
- Kaya, M., Mujtaba, M., Bulut, E., Akyuz, B., Zelencova, L. and Sofi, K. (2015). Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee. *Carbohydrate Polymers*, 132, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.008>
- Kritchenkov, A. S., Egorov, A. R., Volkova, O. V., Zabodalova, L. A., Suchkova, E. P., Yagafarov, N. Z. and Khrustalev, V. N. (2020). Active antibacterial food coatings based on blends of succinyl chitosan and triazole betaine chitosan derivatives. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100534. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100534>
- Kumar, N. and Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Lam, T. B. T., Kadoya, K. and Iiyama, K. (2001). Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57(6), 987-992. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00052-8)
- Li, D. M., Nie, Y. X., Zhang, J., Yin, J. S., Li, Q., Wang, X. J. and Bai, J. G. (2013). Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings. *Biologia Plantarum*, 57(4), 711-717. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0772-9>
- Li, H., Subbiah, V., Barrow, C. J., Dunshea, F. R. and Suleria, H. A. (2021). Phenolic profiling of five different Australian grown apples. *Applied Sciences*, 11(5), 2421. <https://doi.org/10.3390/app11052421>
- Malerba, M. and Cerana, R. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species in defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3019-3034. <https://doi.org/10.3390/ijms16023019>

- Meng, X., Li, B., Liu, J. and Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106(2), 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.012>
- Musacchi, S. and Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409-430. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.057>
- Na, W., Wolf, J. and Zhang, F. S. (2016). Towards sustainable intensification of apple production in China—Yield gaps and nutrient use efficiency in apple farming systems. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(4), 716-725. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61099-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61099-1)
- Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A. and Fogliano, V. (2004). Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6526-6531. <https://doi.org/10.1021/jf049822w>
- Nezbedova, L., McGhie, T., Christensen, M., Heyes, J., Nasef, N. A. and Mehta, S. (2021). Onco-preventive and chemo-protective effects of apple bioactive compounds. *Nutrients*, 13(11), 4025. <https://doi.org/10.3390/nu13114025>
- Ou, S. and Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. and Jackson, M. G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 205-210. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.025>
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M. and González-Aguilar, G. A. (2012). Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135(1), 105-111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.103>
- Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pirker, K., Goodman, B., Pascual, E., Kiefer, S., Soja, G. and Reichenauer, T. (2002). Free radicals in the fruit of three strawberry cultivars exposed to drought stress in the field. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 709-717.
- Qi, H., Wenzhong, h., Jiang, A., Tian, M. and Li, Y. (2011). Extending shelf-life of Fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 62-66. doi: [10.1016/j.ifset.2010.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.11.001)
- Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J. L. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 34(4), 927-931. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90689-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90689-7)
- Saavedra, G. M., Figueroa, N. E., Poblete, L. A., Cherian, S. and Figueroa, C. R. (2016). Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. *Food Chemistry*, 190, 448-453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.107>
- Seal, T. (2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2): 157-166. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60225>
- Shah, S. and Hashmi, M. S. (2020). Chitosan-aloe vera gel coating delays postharvest decay of mango fruit. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 61, 279-289. <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00224-7>
- Shannon, C. T. and Pratt, D. E. (1967). Apple Polyphenol Oxidase Activity in Relation to Various Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*, 32(5), 479-483. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1967.TB00815.X>
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28, 49-55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1974.28.1.49>
- Sreenivas, K. M., Singhal, R. S. and Lele, S. S. (2011). Chemical pretreatments and partial dehydration of ash gourd (*Benincasa hispida*) pieces for preservation of its quality attributes. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2281-2284. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.009>
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3), 613-619. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00450-2)
- Vojodi, L., Hassanpouraghdam, M. B. and Dadpour, M. R. (2012). HPLC assisted determination of phenolic compounds in two apple cultivars from Iran. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 233-235.
- Wahedi, H. M., Ahmad, S. and Abbasi, S. W. (2021). Stilbene-based natural compounds as promising drug candidates against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3225-3234. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1762743>
- Yang, J., Sun, J., An, X., Zheng, M., Lu, Z., Lu, F. and Zhang, C. (2018). Preparation of ferulic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial lactase and its application in mango preservation. *RSC Advances*, 8(13), 6759-6767. <https://doi.org/10.1039/C7RA12696D>
- Zhang, W. B., Jiang, H. W., Qiu, P. C., Liu, C. Y., Chen, F. L., Xin, D. W. and Chen, Q. S. (2012). Genetic overlap of QTL associated with low-temperature tolerance at germination and seedling stage using BILs in soybean. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(7), 1381-1388. <https://doi.org/10.4141/cjps2011-098>