دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال ششم، شماره‌ی ۲۴
پاییز ۱۳۹۴، صفحات ۱۸-۱

بررسی آنتوسیانین، فلاونوئید، فنولیک، غلظت اسید آسکوربیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت ضد تکثیری سلول‌های سرطانی کبد انسان، در گیاه Fragaria x ananassa تحت تاثیر عوامل پس از برداشت

حجت اقبال
دکتری تخصصی گیاهان دارویی، بخش تحقیق و توسعه، شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز، مشکین‌شهر، ایران
hojat.eg@gmail.com

مهدی احمدی‌سابق
عضو هیئت علمی گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

شهاب بهلولی
دانشیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده
هدف این تحقیق مطالعه و بررسی کیفیت فیزیکی، فعالیت و میزان آنتی‌اکسیدان و همچنین فعالیت ضد تکثیری میوه توت‌فرنگی است که در مراحل بلوغ سرسفید و قرمز رسیده برداشت شده و در رطوبت نسبی ۹۵ یا ۶۵ درصد به مدت ۱۲ روز در دمای ۳ و ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شده است. کیفیت کلی و سفتی میوه‌های برداشت‌شده در مرحله قرمز رسیده سریع‌تر از مرحله سرسفید دچار کاهش شد و همچنین این حالت‌ها در میوه‌های مربوط به هر دو مرحله در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر از ۳ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. در هر دو تیمار، رطوبت نسبی روی کیفیت میوه تاثیری نداشت. در میوه‌های سرسفید، کاهش شفافیت (L) و زاویه‌ی فام یا ته رنگ و هم‌چنین افزایش غلظت آنتوسیانین در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سریع‌تر از ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به وقوع پیوست. شفافیت میوه‌ی رسیده‌ی قرمز در روز سوم کاهش یافت و در طی دوره‌های بعدی ذخیره‌سازی نیز به همان منوال باقی ماند. غلظت اولیه‌ی آنتوسیانین میوه قرمز رسیده حدود پنج بار بیش‌تر از میوه سرسفید بود و این مقدار در طول دوره‌ی ذخیره‌سازی کاهش یافت. غلظت کلی فلاونوئید و فنولیک و فعالیت کلی آنتی‌اکسیدان

میوه‌هایی که در مرحله سرسفید برداشت‌شده بودند بیش‌تر از میوه‌هایی بود که در مرحله‌ی رسیده‌ی قرمز برداشت‌شده بودند. این تفاوت‌ها در طی دوره‌ی ذخیره‌سازی میوه‌ها نیز حفظ شدند، اما برای میوه‌های قرمز رسیده وضع به‌همین منوال نبود، غلظت و فعالیت در این میوه‌ها که در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و به‌ویژه رطوبت نسبی ۱۰ درصد ذخیره شده بودند به‌سرعت کاهش یافت. غلظت کلی اسید آسکوربیک میوه‌ی سرسفید در مرحله برداشت کم‌تر از میوه‌های نوع قرمز رسیده بود، اما با گذشت زمان به‌طور جزیی افزایش یافت، در حالی که این غلظت در میوه‌های قرمز رسیده نسبتاً ثابت بود تا اینکه در ۱۰ درجه سانتی‌گراد در روز دوازدهم کاهش یافت. تغییرات کلی فعالیت آنتی‌اکسیدان مشابه تغییرات غلظت فلاونوئید و فنولیک بودند ولی شباهتی به تغییرات غلظت اسید اسکوربیک یا آنتوسیاتین نداشتند. یک نوع همبستگی یا ارتباط بین کیفیت میوه با سفتی و ویژگی‌های مربوط به رنگ و همچنین بین کیفیت میوه و غلظت کلی فنولیک و فلاونوئید و یا فعالیت آنتی‌اکسیدان وجود داشت. ۵۰ گرم در لیتر عصاره توت‌فرنگی باعث بازداری از HepG2 (تکثیر سلولی در سرطان کبد انسانی) تا حدود ۸۰ درصد می‌شود. EC_{50} فعالیت ضد تکثیری توت‌فرنگی با مرحله بلوغ در زمان برداشت یا دمای ذخیره‌سازی تحت تاثیر قرار نگرفت.

کلید واژه‌ها: Fragaria x ananassa، اسید اسکوربیک، فلاونوئید، آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد تکثیری.

مقدمه

توت‌فرنگی با داشتن تقاضای زیاد و طعم مطلوب میوه‌ی پرطرفداری به‌شمار می‌رود، اما به‌خاطر آسیب‌پذیر بودن از لحاظ مکانیکی از دست دادن آب، پوسیدگی و زوال فیزیولوژیکی زود فاسد می‌شود. کیفیت توت‌فرنگی در زمینه‌ی فروش روی کیفیت فیزیکی این میوه مثل اندازه، رنگ، سفتی، اسیدیته شیرینی و عطر آن متمرکز است (آزودانلو و همکاران، ۲۰۰۳؛ میچام، ۲۰۰۴)، هم‌چنین اخیراً منافع سلامتی این میوه به‌طور روز افزونی مورد توجه قرار گرفته‌اند (کائو و همکاران، ۱۹۹۸؛ هاینونن و همکاران، ۱۹۹۸؛ اسمیت و همکاران، ۲۰۰۴؛ سان و همکاران، ۲۰۰۲؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۵). اسیداسکوربیک بخش نسبتا کوچکی از ظرفیت آنتی اکسیداتیو توت‌فرنگی را تشکیل می‌دهد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ وانگ و همکاران، ۱۹۹۶). با این حال، آنتوسیانین‌ها که در رنگ این میوه نقش اساسی را بر عهده دارند، دارای خواص ذاتی آنتی-اکسیدانی نیز هستند (وانگ و همکاران، ۱۹۹۷) و مسمومیت عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (هئو و لی، ۲۰۰۵).

غلظت کل فنولیک با فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی رابطه مثبتی دارد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ ریکیکا و همکاران، ۲۰۰۵؛ سان و همکاران، ۲۰۰۲)، اگر چه روابط بین فعالیت‌های کل آنتی‌اکسیدان و فعالیت‌های ضد تکثیری می‌تواند در میوه‌ها (سان و همکاران، ۲۰۰۲) از جمله توت‌فرنگی کم و ناچیز باشد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳). توت‌فرنگی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی تکثیری بالایی است (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ وانگ و همکاران، ۱۹۹۶) و بسیاری از مواد شیمیایی گیاهی موجود در آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (لیو و همکاران، ۲۰۰۴؛ سان و همکاران، ۲۰۰۲). ممکن است واکنش‌های صورت گرفته بین آنتی‌اکسیدان‌ها افزایشی و یا هم افزایی باشند و بنابراین اندازه‌گیری مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدان کل به‌طور بالقوه برآورد بهتری از نقش کلی اجزای آنتی‌اکسیدان ارائه می‌کنند (لیو، ۲۰۰۳، ۲۰۰۴). ترکیبات ویژه‌ی فنولیک که مسئولیت فعالیت ضد تکثیری توت‌فرنگی را بر عهده دارند، هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته‌اند.

مدیریت دما تنها فاکتور مهم به حداقل رسانی فاسد شدن توت‌فرنگی به‌شمار می‌رود، دمای ذخیره‌ی بالاتر منجر به‌سرعت تنفس بالا و دوره‌های ذخیره‌سازی کوتاه می‌شود که به‌نوبه‌ی خود با از دست رفتن کیفیت میوه مربوط است (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۵؛ نونز و همکاران، ۱۹۹۸؛ شین و همکاران، ۲۰۰۷). اثرات دمای ذخیره‌سازی روی کیفیت توت‌فرنگی (از جمله جوانب تغذیه‌ای) مورد توصیف قرار گرفته‌اند (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۵؛ کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۳؛ شین و همکاران، ۲۰۰۷)، اما داده‌های مربوطه به کیفیت تغذیه‌ای و کیفیت فیزیکی اغلب همراه یکدیگر ارائه نمی‌شوند. میوه‌های ذخیره شده در دماهای بالاتر نسبت به میوه‌های ذخیره شده در دماهای پایین‌تر دارای غلظت بالاتری از آنتوسیانین، فلاونوئید و فنولین و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کالت و همکاران، ۱۹۹۹؛ شین و همکاران، ۲۰۰۷). غلظت اسید اسکوربیک موجود در میوه می‌تواند در دماهای مختلف ثابت بماند (کالت و همکاران، ۱۹۹۹)، اگرچه کوردوننسی و همکارانش طی ذخیره‌سازی هوایی پنج رقم زراعی در دمای ۰ ۶ سانتی‌گراد به مدت ۶ روز به کاهش غلظت این اسید پی بردند؛ اما هیچ‌کدام از این تحقیقات رطوبت نسبی را مورد کنترل قرار نداده‌اند، بنابراین هنوز هم میزان تاثیر متغیر اتلاف آب روی نتایج نامعلوم باقی مانده است.

غلظت کل آنتوسیاتین توت‌فرنگی‌هایی که در مرحله‌ی سبز برداشت‌شده بودند کم بود، ولی غلظت کل فنولیک و فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی با رسیدن میوه افزایش نشان می‌داد (وانگ و لین، ۲۰۰۰). نونز و همکارانش (۲۰۰۶) به این نکته پی بردند که غلظت کل آنتوسیاتین توت‌فرنگی طی مرحله‌ی رسیدن آن بعد یا قبل از برداشت افزایش می‌یابد، اما طی ذخیره‌سازی غلظت کل فنولیک می‌تواند بسته به نوع کشت و مراحل بلوغ در هنگام برداشت ثابت یا متغیر باشد. تحقیقات نشان داده که کیفیت فیزیکی توت‌فرنگی‌های رسیده‌ی قرمز و به رنگ روشن در دمای معتدلی مثل ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در رطوبت نسبی ۷۵-۹۵ درصد برای یک دوره‌ی کوتاه چهار روزه حفظ می‌شود. در این صورت رسیدن میوه‌ها در ۱۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۲۰ درجه سانتی‌گراد به تأخیر می‌افتد. فعالیت کل آنتی‌اکسیدانی در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر بود در حالی‌که غلظت آنتوسیانین کل در ۲۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر بوده است (شین و همکاران، ۲۰۰۷). در این تحقیق، میوه‌های برداشت‌شده در مرحله‌ی سرسفید و در مرحله‌ی رسیده‌ی قرمز (که به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی برداشت آن‌ها برای ذخیره‌سازی بلندمدت و کوتاه‌مدت هستند) برای مقایسه اثرات دو دمای مختلف (۱۰ و ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد) و دو رطوبت نسبی مختلف (۹۵ و ۶۵ درصد) در طول بیش‌تر از ۱۲ روز بر روی وضعیت تغذیه‌ای و فیزیکی میوه‌ی توت‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

میوه‌های توت‌فرنگی در مراحل سرسفید و رسیده قرمز از مزرعه‌ی تحقیقاتی شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز برداشت‌شده و پس از برداشت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس به‌منظور حذف میوه‌های آسیب دیده، مورد دسته‌بندی قرار گرفته و موارد هم رنگ و اندازه همسان انتخاب شدند. حدود ۳۵ توت‌فرنگی (با وزن متوسط میوه ۹/۵ گرم) در مجموعه‌ای ۱/۹ لیتری شیشه‌های مسیون (که وزن آن‌ها قبل و بعد از اضافه کردن میوه‌ها اندازه‌گیری

شده بود) قرار داده شدند. بعد از اینکه میوه‌ها در عرض ۲ ساعت در دمای ذخیره متناسب (۱۰ و ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد) به تعادل رسیدند، به صفحات گردشی متصل شدند جایی‌که هوا به‌منظور حذف رطوبت نسبی تا ۶۵ یا ۹۵ درصد از محلول آب و گلسرول عبور می‌کرد (آسبورن و بیکن، ۱۹۶۱). رطوبت نسبی مربوط به هر صفحه‌ی گردشی هر روز چندین بار با یک رطوبت‌سنج/گرماسنج دیجیتالی «تراسیبل» مورد بازبینی قرار می‌گرفت. سرعت گردش در هر شیشه ۱/۶۶ میلی‌لیتر بر ثانیه بود. سه شیشه تکرار از هر آزمایش یا تیمار مربوط به دما و رطوبت نسبی در فاصله‌های زمانی سه روز تا ۱۲ روز حذف شدند و کیفیت میوه‌های آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

کیفیت فیزیکی

وزن میوه‌ها در هر شیشه‌ی حذف شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و تغییرات وزن درصدی نسبت به زمان برداشت مورد محاسبه قرار گرفت. سپس میوه‌ها به‌صورت مجزا روی یک مقیاس ۵-۱ گزینه‌ای برحسب درصد تخریب سطح میوه مورد ارزیابی قرار گرفتند، به‌طوری‌که ۱= غیرقابل قبول (کم‌تر از ۵۰ درصد سطح میوه تخریب پوست یا بدرنگی را نشان می‌دهد) ۲= بد (۲۰ تا ۵۰ درصد سطح میوه تخریب پوست یا بدرنگی را نشان می‌دهد) ۳= قابل‌قبول (۵ تا ۲۰ درصد سطح میوه تخریب پوست یا بدرنگی را نشان می‌دهد) ۴= خوب (۵ درصد سطح میوه تخریب پوست یا بدرنگی را نشان می‌دهد) ۵= عالی بودند، نتایج به‌صورت یک شاخص کیفیت کلی بیان شدند. فقط میوه‌هایی که دارای خرابی یا فساد زیادی نبودند برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. ۱۰ میوه برای ارزیابی کیفیت فیزیکی انتخاب شدند و بقیه موارد با قاچ کردن در نیتروژن مایع فریز شدند. آن‌ها تا زمان استفاده برای عصاره‌گیری و اندازه‌گیری غلظت فنولیک، غلظت فلاونید آنتی‌سیانین، غلظت اسید اسکوربیک، ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل و فعالیت ضد تکثیری، در دمای ۸۰ – درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سفتی میوه‌ها با تست ایجاد سوراخ روی هر میوه‌ی دارای پوست سالم با استفاده از یک تستر فشار (که دارای یک میله‌ی کاوشگر سرپهن با قطر ۳ میلی‌متر بود) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. رنگ سطح میوه با استفاده از یک کرومومتر (رنگ سطح) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها به‌صورت کروم (شدت رنگ)، زاویه‌ی فام یا ته رنگ (رنگ واقعی یا قرمزی) و مقدار شفافیت (گستره‌ی شفافیت از ۰= سیاه تا ۱۰۰= سفید) بیان شدند. سه نمونه از منطقه استوایی و گرم هر میوه گرفته شده و مقادیر متوسط آن‌ها مورد محاسبه قرار گرفت.

عصاره‌گیری از میوه‌ها برای اندازه‌گیری آنتوسیانین، فلاونوئید، فنولیک، فعالیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت ضد تکثیری آن‌ها

میوه‌های یخ‌زده را به تکه‌های درشت خرد کرده و سپس ۱۰ گرم از این تکه‌های خرد شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد و با استفاده از یک هم‌زن تجاری به مدت سه دقیقه هموژیزه شدند (دوانتو و همکاران، ۲۰۰۲؛ سان و همکاران، ۲۰۰۲). محلول هموژیزه از کاغذ واتن ۱≠ عبور داده شد و مورد تصفیه قرار گرفت. مایع فیلتر شده مورد بازیابی قرار گرفت و استون آن از طریق یک تبخیرکننده گردان در ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شده سپس نمونه‌ها به‌وسیله آب یون‌زدایی شده به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شدند (که به‌صورت هر میلی‌گرم میوه روی یک پایه وزنی خالص بیان می‌شود) و به قسمت‌های متعددی تقسیم شده و تا زمان آنالیز به صورت فریز شده در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین میزان آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین کل عصاره توت‌فرنگی با استفاده از یک روش دیفرانسیل ph (که قبلا مورد توصیف قرار گرفته است) تعیین شد (بویلس و ورلستاد، ۱۹۹۳؛ مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ وولف و همکاران، ۲۰۰۳). برای اندازه‌گیری جذب در ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر در بافرهایی با pH برابر ۱ و ۴/۵ از یک اسپکتروفتومتر استفاده شد. قرائت‌های جذب به میلی‌گرم‌های سیانیدین ۳-گلوکوزید در هر کیلوگرم وزن خالص میوه تبدیل شد و برای این کار از ضریب جذب مولار ۹۰۰ و ۲۶ و جذب $A = [(A_{۵۱۰} - A_{۷۰۰})_{pH_{۱.۰}} - (A_{۵۱۰} - A_{۷۰۰})_{pH_{۴.۵}}]$ استفاده شد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳). غلظت آنتوسیانین کل به‌صورت سیانیدین ۳ـ گلوکوزید بر پایه‌ی وزن خالص میوه (میلی‌گرم در کیلوگرم) بیان شد.

تعیین میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل عصاره‌های توت‌فرنگی با استفاده از روش رنگ سنجی تعیین شد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ زایشن و همکاران، ۱۹۹۹). جذب محلول در طول‌موج ۵۱۰ نانومتر در مقابل یک بلانک بلافاصله مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج به‌صورت میلی‌گرم‌های معادل کاتچین در هر کیلوگرم وزن خالص میوه بیان شدند.

تعیین میزان فنولیک کل

میزان فنولیک کل عصاره‌های توت‌فرنگی با استفاده از یک روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ سینگلتون و همکاران، ۱۹۹۹). جذب در مقابل یک بلانک در طول‌موج ۷۵۰ نانومتر بعد از ۹۰ دقیقه در دمای اتاق مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج به‌صورت میلی‌گرم‌های معادل هاب گالیک اسید در هر کیلوگرم وزن خالص میوه بیان شدند.

اندازه‌گیری غلظت اسید آسکوربیک کل

میوه‌های یخ‌زده را به تکه‌های درشت خرد کرده و سپس ۱۰ گرم از این تکه‌های خرد شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر (۲ درصد متافسفریک اسید حاوی ۲ میلی‌مول بر لیتر EDTA) و با استفاده از یک مخلوط‌کن تجاری به‌مدت ۳ دقیقه هموژنیزه شدند. سپس ماده آبکی حاصل شده در xg ۱۷/۶۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روش آسکوربیک اسیداکسیداز برای اندازه‌گیری اسیدآسکوربیک مورد استفاده قرار گرفت (هویت و دیکز، ۱۹۶۱؛ رائو و اروم راد، ۱۹۹۵). میزان اسید آسکوربیک کل با اندازه‌گیری کاهش جذب در ۲۵۶ نانومتر هنگام اضافه کردن آسکوربات اکسیداز به مخلوط حاوی ۱۰۰ میلی‌مول بافر فسفات (با pH ۵/۶) و عصاره‌های خنثی‌شده (که با ۲۰ میلی‌مول در لیتر دی‌تیوتریتول (DTT) در ۵۰ میلی‌مول بافر ۲- هیدروکسی اینل پیرازین ۲- اتان سولفونیک اسید کاهش یافته بودند) تعیین شد. میزان اسید اسکوربیک اکسیدشده (اسید دی هیدرو اسکوربیک) با کاستن اسید اسکوربیک کاهیده از اسید آسکوربیک کل تعیین شد (رائو و اروم راد، ۱۹۹۵). غلظت‌ها برحسب اسید آسکوربیک کل یا اسید دی‌هیدرو اسکوربیک براساس وزن خالص میوه بیان شدند.

تعیین کمی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از روش PSC (ظرفیت مهار رادیکال پروکسیل) تعیین شد (آدوم و لیو، ۲۰۰۵). تجزیه‌ی گرمایی ABAP (۲و۲- آزوبیس آمیدینو پروپان) باعث تولید رادیکال‌های پروکسیل (Roo) شد که دی

کلروفلورسین غیر فلورسانت (DCFH) را به دی‌کلروفلورسین فلورسانت (DCF) تبدیل می‌کند. میزان مهار اکسیداسیون DCFH توسط آنتی‌اکسیدان‌هایی که مهار رادیکال‌های پروکسیل را بر عهده دارند به‌عنوان مبنایی برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. فلورسانس در تحریک ۴۸۵ نانومتر و در انتشار ۵۳۸ نانومتر با یک اسپکتروفتومتر فلورسانس مورد کنترل قرار گرفت. نتایج به‌صورت میلی‌مول‌های معادل‌های ویتامین C در هر کیلوگرم وزن میوه خالص بیان شدند.

اندازه‌گیری تکثیر سلولی

سلول‌های سرطانی کبد انسان $HepG_2$ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با CO_2 ۵ کیلوپاسگال در محیط کشت ویلیامز که حاوی ۱۰ میلی‌مول بر لیتر Hepes، ۵ میلی‌گرم انسولین، ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلوکاگون، ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر هیدروکورتیزون و ۵ درصد سرم جنین گاوی بود در داخل یک انکورباتور نگهداری شدند (لیو و همکاران، ۱۹۹۳؛ لیو و همکاران، ۱۹۹۲). فعالیت ضد تکثیری عصاره‌های توت‌فرنگی با استفاده از آزمون تکثیر سلولی غیر رادیواکتیو سل تیتر ۹۶ مبنی بر MTS (که قبلا در این رابطه توضیحاتی داده شده است) اندازه‌گیری شد (لیو و همکاران، ۲۰۰۳). در کل $۲/۵\times۱۰^{۴}$ سلول $Hepg_2$ موجود در محیط کشت در هر یک از چاهک‌های مربوط به یک صفحه‌ی تخت صاف که دارای ۹۶ چاهک بود قرار داده شدند. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ کیلوپاسگال CO_2 محیط‌های رشد برداشته شده و محیط‌های حاوی غلظت‌های در حال افزایش (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ گرم بر لیتر) عصاره‌های توت‌فرنگی به سلول‌ها اضافه شدند. کشت‌های کنترل محلول استخراجی را منهای عصاره توت‌فرنگی دریافت کردند و چاهک‌های بلانک حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت رشد بدون هیچ سلولی بودن. بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون، تکثیر سلولی با استفاده از آزمون رنگ‌سنجی MTS با یک معرف تتراآزولیوم تعیین شد. جذب MTS در ۴۹۰ نانومتر با استفاده از یک اسپکترونتومتر MRXll اندازه‌گیری شد (لیو و همکاران، ۲۰۰۲؛ سان و همکاران، ۲۰۰۲).

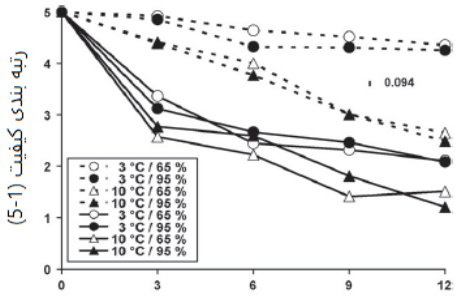
تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از مدل خطی عمومی مورد تحلیل واریانس قرار گرفتند تا اثرات و تعاملات اصلی تعیین شود. در صورت نیاز، تحلیل بیشتری از داده‌ها در هر سیستم دمایی صورت گرفت. منابع تغییر، مدت‌زمان ذخیره‌سازی و تیمار بود. مقایسات میانگین با استفاده از LSD در سطح ۰/۰۵ انجام شد. همبستگی پیرسون برای تعیین رابطه بین کیفیت‌های فیزیکی و فعالیت و میزان آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

کیفیت فیزیکی

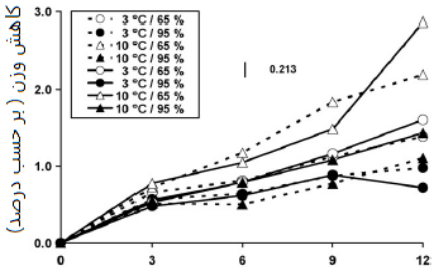
کاهش صورت گرفته در کیفیت توت‌فرنگی‌های برداشت‌شده در مرحله سرسفید با دمای انبار تحت تأثیر قرار ($p < ۰/۰۰۱$) گرفت، اما RH یا رطوبت نسبی ($p = ۰/۰۸۶$) تاثیری روی این نوع توت‌فرنگی‌ها نداشت، در حالی که کیفیت میوه‌های برداشت‌شده در مرحله‌ی رسید قرمز هم تحت تأثیر دمای انبار ($p < ۰/۰۰۱$) و هم تحت تاثیر RH ($p = ۰/۰۰۷$) قرار گرفت (شکل ۱). کیفیت میوه‌های برداشته‌شده در مرحله‌ی سرسفید در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سریع‌تر از ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش یافت، اگرچه میزان حداقل کیفیت ۳ تا ۹ روز بعد از ذخیره‌سازی نیز حاصل نشده بود. در مقابل، در حالی که کیفیت میوه‌های رسیده‌ی قرمز در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سریع‌تر از ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد دچار کاهش شد، اما کاهش کیفیت کلی میوه در هر دو دما نیز به وقوع پیوست.

همچنین کاهش کیفیت میوه در سطوح خرابی یا پوسیدگی آن نیز منعکس شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، پوسیدگی قابل اغماضی در توت‌فرنگی‌های مرحله سرسفید و قرمز رسیده که در ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شده بودند، مشاهده شد. با این‌حال، تا روز نهم و دوازدهم و در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، پوسیدگی در توت‌فرنگی‌های سرسفید به ۵ و ۲۵ درصد و در توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده به ۲۹ تا ۷۲ درصد رسید.



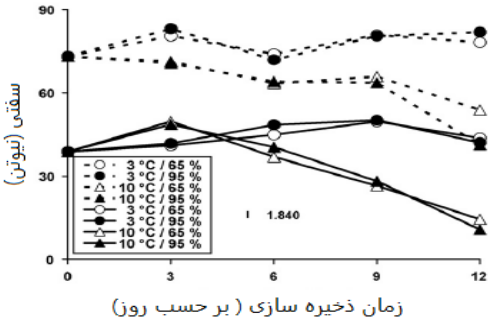
شکل ۱: شاخص کیفیت توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در p = ۰/۰۰۵ برای مقایسه‌ی میانه‌ها است.

کاهش وزن در تمام شرایط انبار تا روز ششم کمتر از ۱ درصد بود، اما این فاکتور همچنین تحت تأثیر رطوبت نسبی نیز قرار گرفت و در رطوبت نسبی ۶۵ درصد کاهش وزن بیش‌تری نسبت به رطوبت نسبی ۹۵ درصد در میوه‌های سرسفید و قرمز رسیده (به‌ترتیب p = ۰/۰۰۹ و p = ۰/۰۰۷) مشاهده شد (شکل ۲). در روز دوازدهم، توت‌فرنگی‌های سرسفید کاهش وزن کم‌تری نسبت به توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده (به‌ترتیب ۱/۴ و ۱/۷ درصد) داشتند. کاهش وزن در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر از ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت (به‌ترتیب ۱/۳ و ۰/۸ درصد) و این نوع کاهش در رطوبت نسبی ۹۵ درصد نسبت به رطوبت نسبی ۶۵ درصد (به‌ترتیب ۰/۸ و ۱/۳ درصد) کم‌تر بود.



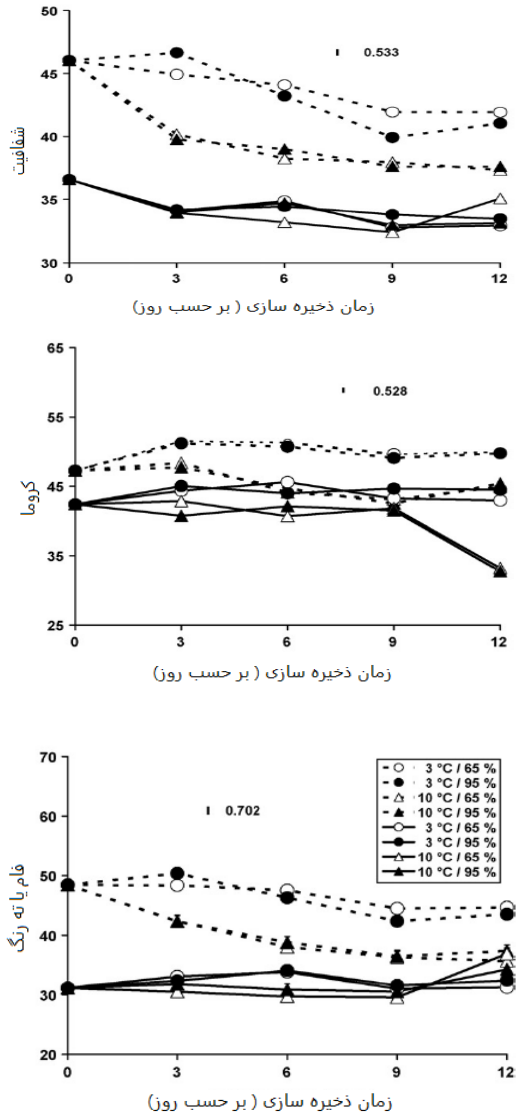
شکل ۲: شاخص کاهش وزن توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت‌شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره‌شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در p = ۰/۰۰۵ برای مقایسه‌ی میانه‌ها است.

در زمان برداشت، سفتی یا قوام میوه‌های سرسفید (۷۴ نیوتن) بیشتر از میوه‌های قرمز رسیده (۳۹ نیوتن) بود. میوه‌های هر دو مرحله در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر از ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد (p <۰/۰۰۱) نرم شده بودند، اما رطوبت نسبی تاثیری روی نرم شدگی نداشت (شکل ۳).



شکل ۳: شاخص سفتی توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در p = ۰/۰۰۵ برای مقایسه‌ی میانه‌ها است.

میزان شفافیت (L^*)، شدت رنگ (C^*) و قرمز بودن (h°) توت‌فرنگی سرسفید در طی ذخیره‌سازی بیش‌تر از توت‌فرنگی قرمز رسیده بود (شکل ۴).

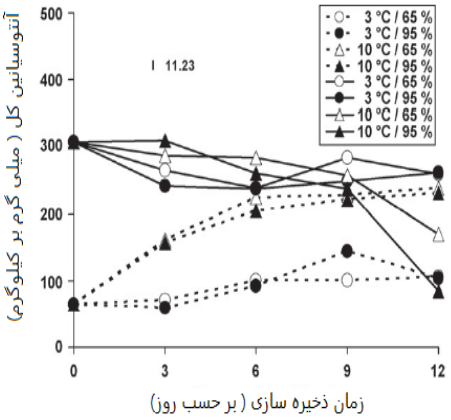


شکل ۴: مقادیر رنگ توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. اندازه‌گیری‌های رنگ برحسب شفافیت (۰=سیاه، ۱۰۰=سفید)، کروما (شدت رنگ) و زاویه‌ی ته رنگ (رنگ واقعی یا قرمزی) بیان شدند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در $p = ۰/۰۰۵$ برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

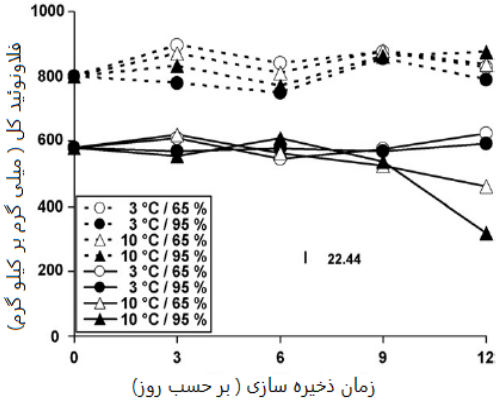
مقادیر L^* و C^* و h° توت‌فرنگی سرسفید در ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر از ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ($p < ۰/۰۰۱$) بود، در عین حال هیچی تاثیری در رابطه با رطوبت نسبی مشاهده نشد. با تبدیل به رنگ قرمز تیره، سرعت کاهش مقادیر L^* و h° در میوه‌های سرسفید در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر بود. در مقابل، L^* مربوط به توت‌فرنگی قرمز رسیده تا روز سوم کاهش یافته و در طی ذخیره‌سازی ثابت باقی ماند. با این‌حال، C^* تا روز نهم تغییر چشم‌گیری نداشت، اما در روز دوازدهم در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌سرعت کاهش یافت. در حالی‌که C^* توت‌فرنگی سرسفید در طی ذخیره در هر دو دما (یعنی ۱۰ و ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد) و در هر دو رطوبت نسبی (۶۵ و ۹۵ درصد) بالا می‌ماند.

میزان آنتوسیانین کل

در هنگام برداشت، غلظت آنتوسیانین توت‌فرنگی قرمز رسیده (که با سیانیدین ۳- گلوکوزید بیان شد) در ۳۰۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم حدود پنج برابر بیش‌تر از توت‌فرنگی سرسفید (۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (شکل ۵). غلظت‌های آنتوسیانین توت‌فرنگی‌های سرسفید در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد ($p=۰/۰۰۱$) افزایش بیش‌تری داشتند، اما رطوبت نسبی ($p=۰/۶۹۱$) هیچ تاثیری روی این غلظت‌ها نداشت. در مقابل، غلظت‌های آنتوسیانین توت‌فرنگی قرمز رسیده با دمای ذخیره‌سازی ($p=۰/۰۴۵$) و رطوبت نسبی ($p=۰/۰۴۳$) تحت تاثیر قرار گرفتند. این غلظت‌ها در توت‌فرنگی قرمز رسیده ثابت باقی ماندند یا در طی ذخیره‌سازی تا روز نهم کاهش جزئی نشان دادند، اما سپس در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش سریعی داشتند و میزان این کاهش در رطوبت نسبی ۹۵ درصد نسبت به رطوبت نسبی ۶۵ درصد خیلی زیاد بود.



شکل ۵: میزان آنتوسیانین کل توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در ۰/۰۰۵ = p برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

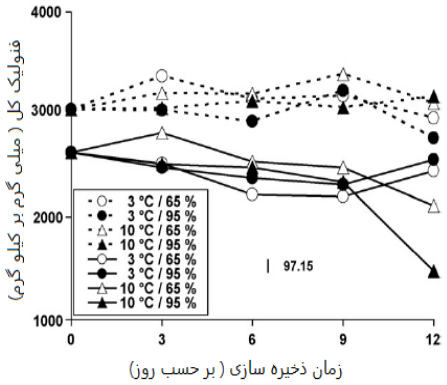


شکل ۶: میزان فلاونوئید کل توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت‌شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره‌شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در ۰/۰۰۵ = p برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

میزان فلاونوئید کل و فنولیک کل

در هنگام برداشت، غلظت فلاونوئید توت‌فرنگی‌های سرسفید (۷۹۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش‌تر از غلظت فلاونوئید توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده (۵۷۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (شکل ۶). غلظت فلاونوئید کل توت‌فرنگی‌های سرسفید فقط توسط رطوبت نسبی (p=۰/۰۰۸) تحت تاثیر قرار گرفت، به‌ترتیب ۸۵۶ و ۸۰۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رطوبت نسبی ۶۵ و ۹۵ درصد. غلظت فلاونوئید کل توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده با دما (p < ۰/۰۰۱) تحت تأثیر قرار گرفت، اما فقط در روز دوازدهم به‌وسیله‌ی رطوبت نسبی (p =۰/۰۱۷) تحت تأثیر قرار گرفت. در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، این غلظت‌ها در رطوبت نسبی ۹۵ درصد بیش‌تر از رطوبت نسبی ۶۵ درصد به‌ترتیب برابر ۳۱۹ و ۴۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز دوازدهم کاهش یافتند.

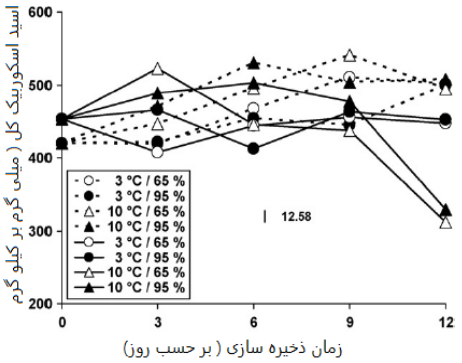
در هنگام برداشت، غلظت فنولیک توت‌فرنگی‌های سرسفید (۳۰۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش‌تر از توت‌فرنگی‌های رسیده‌ی قرمز (۲۶۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (شکل ۷). غلظت فنولیک کل توت‌فرنگی‌های سرسفید فقط با رطوبت نسبی (p =۰/۰۰۷) تحت تأثیر قرار گرفت، به‌ترتیب ۳۲۰۰ و ۳۰۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رطوبت نسبی ۶۵ و ۹۵ درصد. دمای ذخیره تاثیری روی غلظت فنولیک توت‌فرنگی‌های سرسفید (p =۰/۲۸۵) نداشت. غلظت‌های فنولیک طی ذخیره‌سازی در توت‌فرنگی‌های سرسفید ثابت بودند، در حالی‌که در توت‌فرنگی‌های رسیده‌ی قرمز همین غلظت‌ها در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌سرعت کاهش یافتند و این میزان کاهش در روز دوازدهم در رطوبت نسبی ۹۵ درصد (۱۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به رطوبت نسبی ۶۵ درصد (۲۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) خیلی بیش‌تر بود.



شکل ۷: میزان فنولیک کل توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره‌شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در $p = ۰/۰۰۵$ برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

میزان اسید آسکوربیک کل

در هنگام برداشت، غلظت اسید آسکوربیک کل در توت‌فرنگی‌های سرسفید و قرمز رسیده به ترتیب برابر ۴۲۰ و ۴۵۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (شکل ۸). باگذشت زمان غلظت اسید آسکوربیک در توت‌فرنگی‌های سرسفید به‌طور جزیی افزایش یافت و در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (۵۰۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد (۴۶۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش‌تر بود، اما طی ذخیره‌سازی رطوبت نسبی تأثیری روی آن نداشت (p=۰/۵۱۱). غلظت اسید آسکوربیک توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده تا روز نهم ثابت باقی ماندند و سپس در روز دوازدهم در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت بیش‌تری کاهش یافتند ($P < ۰/۰۰۱$). رطوبت نسبی تأثیری روی غلظت اسید آسکوربیک توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده نداشت (p =۰/۱۵۵). در طی ذخیره‌سازی، دهیدرواسکوربیک اسید (DHA) در توت‌فرنگی‌های سرسفید یافت نشد، اما غلظت همین اسید در توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده که در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در رطوبت نسبی ۶۵ و ۹۵ درصد در روز دوازدهم ذخیره شده بودند، ۳۶ و ۴۶ درصد غلظت کل اسید اسکوربیک بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

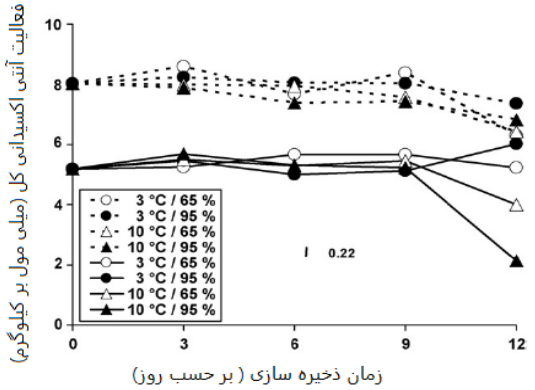


شکل ۸: میزان اسید اسکوربیک کل توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت‌شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره‌شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در $p = ۰/۰۰۵$ برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

در هنگام برداشت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل توت‌فرنگی‌های سرسفید (۸/۰۲ میلی‌مول بر کیلوگرم) بیشتر از توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده (۵/۱۸ میلی‌مول بر کیلوگرم) بود (شکل ۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل توت‌فرنگی‌های سرسفید با دما (p =۰/۰۳۵) تحت تاثیر قرار گرفت، اما رطوبت نسبی (p =۰/۸۶۷) تأثیری روی آن نداشت. تفاوت بین دماها کم بود، اما به هر حال فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل میوه‌های ذخیره شده در ۳ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۷/۸۴ و ۷/۴۴ میلی‌مول بر کیلوگرم بود. اثرات دما روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده کم بود، به استثنای این‌که فعالیت میوه‌های نگه‌داری شده در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

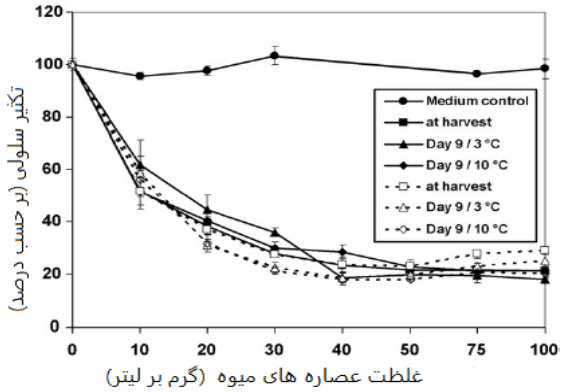
نسبت به ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد در روز دوازدهم با سرعت بیش‌تری کاهش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده که در رطوبت نسبی ۶۵ و ۹۵ ذخیره شده بودند، به‌ترتیب برابر ۵/۲۶ و ۵/۰۰ میلی‌مول بر کیلوگرم بود (p =۰/۰۴). در روز دوازدهم فعالیت در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌سرعت کاهش یافت و این کاهش در رطوبت نسبی ۹۵ درصد (۲/۱۳ میلی‌مول بر کیلوگرم) نسبت به رطوبت نسبی ۶۵ درصد (۴/۰۱ میلی‌مول بر کیلوگرم) خیلی بیش‌تر بود.



شکل ۹: فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در p = ۰/۰۰۵ برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

بازداری از تکثیر سلولی

میوه‌ها در موقع برداشت و در روز نهم نگهداری در دمای ۳ و ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انتخاب شدند تا فعالیت آن‌ها در مقابل تکثیر سلولی HepG2 مورد ارزیابی قرار گیرد، زیرا کیفیت در روز ۱۲ بدتر شده بود، به‌خصوص در میوه‌های قرمز رسیده. علاوه بر این، فلاونوئید کل، فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در روز ششم نسبتا بدون تغییر بودند. در یک حالت وابسته به دوز، از تکثیر سلولی HepG2 بعد از قرار گرفتن در معرض عصاره‌های توت‌فرنگی بازداری به‌عمل آورد (شکل ۱۰). هیچ تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. غلظت ۵۰ گرم بر لیتر عصاره توت‌فرنگی تقریباً ۸۰ درصد از تکثیر سلولی پیش‌گیری کرد. هیچ نوع سمیتی در هر کدام از غلظت‌های آزمایش شده مشاهده نشد. فعالیت ضد تکثیری همچنین به‌صورت دوز موثر متوسط سنجیده شد. Ec_{50}، به‌طوری‌که Ec_{50} پایین نشان‌دهنده مقدار ضد تکثیری بالا بود. در هنگام برداشت، مقدار Ec_{50} توت‌فرنگی‌های سرسفید ۵,۶ گرم بر لیتر بود، این میزان در میوه‌های قرمز رسیده ۸,۳ گرم بر لیتر بود، اما این مقادیر در هر دو نوع میوه تحت تأثیر دما قرار نگرفتند (به‌ترتیب p =۰/۹۸۶ و p=۰/۵۳۵).



شکل ۱۰: فعالیت توت‌فرنگی‌های "Jewel" که در مرحله‌ی سرسفید (---) و قرمز رسیده (—) برداشت شده و در دمای ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند. میله یا خط افقی نشان‌دهنده‌ی مقدار LSD در p = ۰/۰۰۵ برای مقایسه‌ی میانه‌هاست.

روابط مربوط به کیفیت

برای تعیین رابطه بین کیفیت فیزیکی و میزان و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از همبستگی پیرسون استفاده شد (جدول ۱).

کیفیت با کاهش وزن و آنتوسیانین رابطه داشت، اگرچه این رابطه بسیار معنی‌دار بود، اما بسیار ضعیف بود. نکته‌ی جالب اینکه کیفیت با ویژگی‌های مربوط به سفتی و رنگ رابطه‌ی قوی داشت، با این‌حال، کیفیت با فلاونوئید کل، فنولیک کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی رابطه داشت، اما با اسید آسکوربیک رابطه‌ای نداشت. فعالیت آنتی‌اکسیدان کل همبستگی بالایی با فلاونوئید کل و فنولیک کل داشت و هم‌چنین رابطه‌ی بین فلاونوئید و فنولیک بسیار قوی بود.

جدول ۱- همبستگی‌های پیرسون بین ویژگی‌های فیزیکی و عوامل آنتی‌اکسیدانی توت‌فرنگی‌های که در ۳ یا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ یا ۹۵ درصد ذخیره شده بودند

	کیفیت	کاهش وزن	سفتی	شفافیت	کروما	ته رنگ	آنتو سیانین	فلاونوئید	فنولیک	اسید اسکوربیک
کاهش وزن	-۰/۴۵۲									
سفتی	۰/۸۲۹	-۰/۲۹۱								
شفافیت	۰/۸۴۳	-۰/۲۱۷	۰/۸۰۷							
کروما	۰/۷۷۸	-۰/۳۹۴	۰/۸۴۶	۰/۷۴۶						
ته رنگ	۰/۷۷۵	-۰/۱۲۹	۰/۷۸۰	۰/۹۶۷	۰/۷۰۴					
آنتوسیانین	-۰/۵۳۹	۰/۰۰۲	-۰/۵۵۱	-۰/۷۹۷	-۰/۴۶۷	-۰/۸۷۹				
فلاونوئید	۰/۶۷۴	-۰/۱۴۹	۰/۷۸۹	۰/۷۱۱	۰/۷۰۱	۰/۶۵۷	-۰/۳۸۴			
فنولیک	۰/۶۶۴	-۰/۱۶۶	۰/۷۲۶	۰/۶۶۸	۰/۶۶۴	۰/۵۸۵	-۰/۲۸۳	۰/۹۱۹		
اسید اسکوربیک	۰/۱۸۴	-۰/۰۹۳	۰/۴۰۱	۰/۰۸۸	۰/۳۳۸	-۰/۰۱۲	۰/۲۰۱	۰/۴۵۶	۰/۴۶۶	
TAA	۰/۷۴۲	-۰/۲۲۱	۰/۸۵۲	۰/۷۵۲	۰/۷۷۴	۰/۷۰۶	-۰/۴۳۹	۰/۸۳۸	۰/۸۲۰	۰/۴۱۶

یافته ها و بحث

اثرات کلی مربوط به مراحل رسیدن و دمای انبار روی خواص کیفی میوه از الگوهای پیش‌بینی شده‌ای تبعیت می‌کند. توت‌فرنگی‌ها در مرحله‌ی سرسفید، کیفیت و سفتی کلی خود را حفظ می‌کنند (شکل‌های ۱ و ۳) و در این حالت شفاف‌تر هستند و قرمزی آن‌ها کم‌تر است (شکل ۴)، که این نشان‌دهنده‌ی تجمع کم‌تر آنتوسیانین است (شکل ۵). هم‌چنین رسیدن میوه نیز در ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد آهسته‌تر از ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود، گرچه در هنگام برداشت غلظت کروما و آنتوسیانین موجود در توت‌فرنگی‌های سرسفید که در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شده بودند، به سطحی تقریبا برابر با توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده رسید. به هر حال، رطوبت نسبی اثر ضعیفی روی گستره‌های کیفیت، سفتی یا رنگ داشت (شکل‌های ۱ و ۳-۵)، اگر چه کاهش وزن در ۶۵ درصد بیش‌تر از ۹۵ درصد بود (شکل ۲). در کل نتایج روی مطلوبیت دمای انبار پایین‌تر برای حفظ کیفیت میوه و هم‌چنین لزوم برداشت کم‌تر میوه‌های رسیده برای افزایش دوره‌های ذخیره‌سازی تاکید می‌کنند. می‌توان توت‌فرنگی‌هایی که در مرحله‌ی سه چهارم حالت رسیدن و

قرمز بودن خود برداشت می‌شوند و همچنین دارای رنگ و سفتی بهتری هستند، برای دوره‌های طولانی‌تری ذخیره کرد (نونز و همکاران، ۲۰۰۶). به‌علاوه، این تحقیق نتایج گزارش شده توسط شین و همکارانش (۲۰۰۷) را مورد تأیید قرار می‌دهد که پیشنهاد می‌کنند استفاده از دمای متوسط مثل ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، توسط تولیدکنندگان جهت اجتناب از تراکم و ظاهر تیره‌ی میوه بعد از گرم کردن دوباره، زمانی می‌تواند قابل قبول باشد که میوه‌های رسیده‌ی کم‌تری برداشت شوند.

فلاونوئید کل، فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در میوه‌های سرسفید بالاتر از میوه‌های قرمز رسیده بود (شکل ۹ و ۷ و ۶)، در حالی‌که غلظت‌های آنتوسیانین (شکل ۵) و اسید آسکوربیک کل (شکل ۸) در میوه‌های قرمز رسیده بالاتر بود. با این‌حال، فعالیت ضد تکثیری کل تحت تأثیر رسیدگی میوه قرار نمی‌گیرد (شکل ۱۰). تحقیقات متعددی تغییرات به وقوع پیوسته در یک یا دو ترکیب آنتی‌اکسیدانی را گزارش کرده‌اند، اما تعداد کمی از آن‌ها غلظت‌های چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی را در میوه‌های مربوط به مراحل مختلف رسیدن گزارش کرده‌اند. افزایش غلظت آنتوسیانین با رسیدن توت‌فرنگی یک پدیده شناخته شده است (فرریارا و همکاران، ۲۰۰۷؛ گیون و همکاران، ۱۹۸۸؛ وانگ و لین، ۲۰۰۰) که در این فرآیند پلارگونیوم ۳- گلوکوزید و سیانیرین ۳- گلوکوزید به منزله‌ی رنگدانه‌های اصلی می‌باشند (گیل و همکاران، ۱۹۹۷؛ نونز و همکاران، ۲۰۰۲). غلظت اسیدآسکوربیک معمولاً در میوه‌های رسیده در مقایسه با میوه‌های نرسیده بیش‌تر است (کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۲؛ کافکاس و همکاران، ۲۰۰۷؛ مونترو و همکاران، ۱۹۹۶؛ السون و همکاران، ۲۰۰۴). در مقابل، توت‌فرنگی‌های کم‌تر رسیده حاوی غلظت‌های بالاتری از فنولیک می‌باشند (فرریارا و همکاران، ۲۰۰۷؛ وانگ و لین، ۲۰۰۰) و الاجیک اسید که یک ترکیب فنولیک مهم در توت‌فرنگی به‌شمار می‌رود، در میوه‌های سبز بیش‌تر از میوه‌های قرمز وجود دارد (کوثر و همکاران، ۲۰۰۷؛ ماس و همکاران، ۱۹۹۱؛ ویلنر و همکاران، ۲۰۰۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی توت‌فرنگی‌ها درگذر از مراحل بلوغ کم‌تر به مرحله‌ی رنگ صورتی و مرحله‌ی دارای ۵۰ درصد قرمزی دچار کاهش می‌شود و سپس افزایش می‌یابد (وانگ و لین، ۲۰۰۰)، در حالی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدان کل محلول در آب درگذر از مرحله‌ی قرمز رسیده به مرحله قرمز تیره افزایش می‌یابد (السون و همکاران، ۲۰۰۴). در تحقیق ما، اثرات دمای انبار اما نه رطوبت نسبی، روی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی معمول هستند. غلظت آنتوسیانین در توت‌فرنگی‌های سرسفید که در ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شده بودند به‌طور جزئی افزایش یافت (شکل ۵). با گذشت زمان غلظت‌های آنتوسیانین در توت‌فرنگی‌های قرمز رسیده تا روز نهم به آرامی کاهش یافت، اما سپس در میوه‌های ذخیره‌شده در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌سرعت دچار کاهش شد. غلظت‌های آنتوسیانین نوعا با رسیدن میوه‌ها افزایش می‌یابند (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کالت و همکاران، ۲۰۰۵؛ نونز و همکاران، ۲۰۰۶)، اما آن‌ها می‌توانند کاهش پیدا کنند (آیالا-زاوالا و همکاران، ۲۰۰۴)، به‌ویژه در گیاهان دارای سطوح بالاتری از برداشت (کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۳). احتمالاً تجزیه‌ی آنتوسیانین از طریق فرآیندهای اکسیداسیون در حضور سایر ترکیبات فنولیک که توسط پلی فنون اکسیداز (PPO) کاتالیز می‌شوند صورت می‌گیرد (کادر و همکاران، ۲۰۰۴؛ وسچبلینگ و مونتوگمری، ۱۹۹۰). نونز و همکاران (۲۰۰۵) به این نکته پی بردند که

کاهش آب با میوه‌های تیره‌تر و دارای قرمزی کم‌تر و همچنین با غلظت پایین‌تر آنتوسیانین و فعالیت بالاتر پلی فنون اکسیداز (PPO) مرتبط است.

غلظت‌های فلاونوئید و فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌مدت ۱۲ روز در میوه‌های برداشت‌شده در مرحله‌ی سرسفید و به مدت ۹ روز در میوه‌های برداشت‌شده در مرحله‌ی قرمز رسیده نسبتاً ثابت باقی ماند (شکل‌های ۶، ۷ و ۹). با این‌که میوه‌های سرسفید نگهداری شده در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رسیده شده‌اند (شکل‌های ۴ و ۵)، اما فاکتورهای آنتی‌اکسیدان آن‌ها به سطحی کاهش نمی‌یابد که نزدیک میزان آنتی‌اکسیدان میوه‌هایی باشد که در هنگام برداشت به‌صورت قرمز رسیده بوده‌اند. پایداری یا ثبات غلظت فلاونوئید و فنولیک کل در طی ذخیره‌سازی توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (کالت و همکاران، 2004؛ شین و همکاران، ۱۹۹۰). اگرچه آیالا- زاوالا و همکارانش (۲۰۰۴) به این نکته پی بردند که غلظت فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های نگهداری شده در ۱۰ و ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در مقایسه با میوه‌های نگهداری شده در ۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. ما در تحقیق قبلی خود (شین و همکاران، ۲۰۰۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌طور مرزی در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بیش‌تر از ۰/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود (p=۰/۰۵۲)، اما به استثنای میوه‌های قرمز رسیده در روز دوازدهم، بقیه تحت تأثیر دمای انبار قرار نگرفتند. کاهش بارز در غلظت فلاونوئید و فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان کل میوه‌های قرمز رسیده در روز دوازدهم در ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (شکل‌های ۶،۷ و ۸) الگویی مشابه افزایش اتلاف آب و کاهش کیفیت و سفتی، غلظت آنتوسیانین و کروما دارد (شکل‌های ۱ و ۳-۵). کاهش یا اتلاف آب بیشتر با غلظت فنولیک کل پایین‌تر در توت‌فرنگی رابطه دارد (نونز و همکاران، ۲۰۰۵).

غلظت کل اسید آسکوربیک در طی زمان ذخیره‌سازی متغیر بود، اما در هنگام برداشت تمایلی به افزایش این اسید از مقادیر پایین‌تر در میوه‌های سرسفید مشاهده شد تا اینکه در روز دوازدهم به بالاترین مقدار خود رسید (شکل ۸). جالب‌ترین تغییر، کاهش سریع صورت گرفته در غلظت‌های اسید آسکوربیک میوه‌های قرمز رسیده بعد از ۹ روز در دمای ۱۰ درجه-ی سانتی‌گراد بود. غلظت اسید آسکوربیک کل در پنج نوع گیاه توت‌فرنگی که به‌مدت شش روز در دمای ۶ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری یا ذخیره شده بود تا ۵۰ درصد کاهش یافت (کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۳). با این‌حال، کالت و همکارانش (۱۹۹۹) متوجه هیچ نوع کاهشی در میزان اسید آسکوربیک در گستره دمایی ۳۰- ۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در طول ۸ روز نشدند و چندین گزارش مبنی بر افزایش غلظت اسید آسکوربیک در طی ذخیره-سازی توت‌فرنگی‌ها وجود دارد (کوردوننسی و همکاران، ۲۰۰۵؛ نونز و همکاران، ۲۰۰۶؛ السون و همکاران، ۲۰۰۴). افزایش غلظت اسید آسکوربیک می‌تواند به افزایش سنتز مونوساکاریدها مربوط باشد (نونز و همکاران، ۲۰۰۶). بیش‌تر گزارش‌ها مربوط به افزایش اسید آسکوربیک زمانی رخ می‌دهد که میوه‌های کم‌تر رسیده مورد استفاده قرار گرفته باشند، شاید به این خاطر که فعالیت آنابولیکی بیش‌تری در این میوه‌ها به هنگام رسیدن صورت می‌پذیرد. اسید آسکوربیک عموماً در توت‌فرنگی‌ها پایدار یا ثابت است (کالت و همکارانش، ۱۹۹۹) که شاید دلیل آن به‌خاطر غلظت‌های آلی بالاتر این اسید (پرکینز وآزای، ۱۹۹۵)، اثر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌های فنولیک (مایلر و رایس ایوانز، ۱۹۹۷) و یا تقسیم‌بندی درون سلولی آسکوربیک اسید و فنولیک‌ها باشد (کالت و همکارانش، ۱۹۹۹).

ممکن است غلظت‌های بالاتر اسید دهیدروآسکوربیک در میوه‌های قرمز رسیده که در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

ذخیره شده بودند، به خاطر افزایش اکسیداسیون اسکوربیک اسید باشد که با کاهش وزن بیش‌تر در دماهای بالاتر رابطه دارد. اهمیت توجه به کاهش وزن در ارائه‌ی داده‌های اسکوربیک اسید مورد تاکید قرار گرفته است (نونز و همکاران، ۱۹۹۸؛ نونز و همکاران، ۱۹۹۵). نونز و همکارانش به این نکته پی بردند که کاهش اسیداسکوربیک تنها زمانی قابل شناسایی است که داده‌ها بر مبنای وزن خشک بیان شوند، با این حال کاهش وزن در تحقیق آن‌ها که ۳۰- ۲۰ درصد در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بوده بسیار بیش‌تر از چیزی است که ما مشاهده کردیم (شکل ۲؛ شین و همکاران، ۲۰۰۷).

غلظت ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی اغلب با فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل رابطه دارد، اما تحلیل‌ها فاکتورهای کیفی مثل رنگ و سفتی را شامل نکرده‌اند (جدول ۱). همبستگی بین رتبه‌بندی کیفیت، سفتی، L^*، کروما و ته رنگ با فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بالا بود. در بین ترکیبات مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدان کل همبستگی بالایی با غلظت‌های فلاونوئید و فنولیک داشت، اما با غلظت آنتوسیانین و اسید آسکوربیک همبستگی پایینی داشت (جدول ۱). ممکن است اسید اسکوربیک به منزله‌ی عامل ضعیفی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در نظر گرفته شود (ابرهارد و همکاران، ۲۰۰۰؛ کالت و همکاران، ۱۹۹۹؛ السون و همکاران، ۲۰۰۴). همبستگی‌های قوی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و غلظت‌های کل فنولیک (آیالا- زاوالا و همکارانش، ۲۰۰۴؛ فرریارا و همکاران، ۲۰۰۷؛ مایرز و همکاران، ۲۰۰۳؛ سان و همکارانش، ۲۰۰۲؛ وانگ و لین، ۲۰۰۰) الاجیک اسید (السون و همکاران، ۲۰۰۴)، آنتوسیانین‌ها (کالت و همکاران، ۱۹۹۹؛ وانگ و لین، ۲۰۰۰) و آسکوربیک اسید (فرریارا و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده است. در مقابل کالت و همکاران، (۱۹۹۹) هیچ رابطه‌ای بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و فنولیک کل پیدا نکردند و شیل و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با غلظت فلاونوئید رابطه‌ی قوی‌تری دارد تا با آنتوسیانین یا فنولیک. ممکن است توضیحات مربوط به تفاوت بین نتایج منعکس‌کننده تفاوت مراحل رسیدن میوه و در نتیجه دامنه‌ای از غلظت‌های ترکیبات به‌دست آمده و استفاده‌شده برای تحلیل آماری باشد، مثلاً بعضی تحقیقات از گستره‌های نسبتا محدود مراحل رسیدن میوه استفاده می‌کنند، در حالی‌که برخی دیگر در تحلیل‌های خود میوه‌های نرسیده و جوان را می‌گنجانند.

هیچ اطلاعاتی درباره اثرات هماوری بعد از برداشت روی فعالیت ضد تکثیری عصاره توت‌فرنگی موجود نیست. ما فعالیت ضد تکثیری را در توت‌فرنگی سرسفید با توت‌فرنگی قرمز رسیده در هنگام برداشت و در روز نهم مورد مقایسه قرار دادیم. مواد شیمیایی موجود در توت‌فرنگی دارای فعالیت مهاری بالقوه در برابر تکثیر سلولی سرطان کبدی انسان HepG2 هستند (شکل ۱۰). البته در حالی‌که غلظت‌های آنتوسیانین کل، فلاونوئید و فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بسته به مرحله‌ی رسیدن میوه در هنگام برداشت و یا شرایط ذخیره‌سازی متفاوت است (شکل‌های ۵-۷ و ۹)، هیچ تأثیری از این فاکتورها روی فعالیت ضد تکثیری کشف نشد (شکل ۱۰). سایر تحقیقات نیز موفق به شناسایی رابطه‌ی بین فعالیت ضد تکثیری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشده‌اند (لیو و همکاران، ۲۰۰۲؛ مایزر و همکاران، ۲۰۰۳) که این نشان می‌دهد ترکیبات ویژه‌ی ناشناخته‌ای مسئول جلوگیری از تکثیر سلولی سرطان کبد انسانی HepG2 هستند. اخیراً هی و لیو (۲۰۰۷) دریافته‌اند که تریترپنوییدهای جدا شده از

پوست سیب دارای فعالیت ضد تکثیری در مقابل سلول‌های سرطانی کبد انسان HepG2، سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 و سلول‌های سرطانی کولون caco-2 هستند. تحقیقات بیش‌تری مورد نیاز است تا ترکیبات ویژه موثر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل یا فعالیت ضد تکثیری میوه‌ی توت‌فرنگی را مورد بررسی و تحقیق قرار دهند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، میوه کم‌تر رسیده که در دمای سردتر نگهداری می‌شود منجر به دوره ذخیره‌سازی طولانی‌تر می‌شود، اما حتی دمای متوسط ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز منجر به حفظ کیفیت میوه می‌شود به شرطی که میوه در مرحله‌ی سرسفید برداشت شده باشد. رطوبت نسبی اثر کمی روی تمام خواص مطالعه شده در این تحقیق به‌جز کاهش وزن داشت. هم‌چنین توت‌فرنگی‌های کم‌تر رسیده نسبت به توت‌فرنگی‌های رسیده دارای غلظت‌های فلاونوئید و فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری بودند و این تفاوت‌ها عمدتاً در طول زمان ذخیره‌سازی حفظ می‌شوند. گرچه ترکیبات منفرد هر یک از انواع آنتی‌اکسیدان مورد شناسایی قرار نگرفتند، با این‌حال داده‌ها نشان می‌دهند که فلاونوئیدها و فنولیک‌ها نسبت به آنتوسیانین و اسیدآسکوربیک در طول ذخیره‌سازی کم‌تر مورد تغییر قرار می‌گیرند. در کل کیفیت بالاتر توت‌فرنگی در طی ذخیره و انبار با برداشت میوه‌های کم‌تر رسیده و هم‌چنین با غلظت‌های بالاتر فلاونوئید و فنولیک کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارد.

سپاس‌گذاری

از مسئولین محترم بخش تحقیق و توسعه شرکت دانش‌بنیان پژوهشگران داروی سبز که در تامین هزینه‌های طرح، فعالیت‌های تولیدی و آزمایشگاهی همکاری داشته‌اند و هم‌چنین از مسئولین و کارکنان دانشکده داروسازی و دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اهـر جهت همکاری در انجام کارهای آزمایشگاهی قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Adom. K, Liu. R.H, 2005. Rapid peroxyl radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. J. Agric. Food Chem. 53, 6572–6580.
[2] Ayala-Zavala. J.F, Wang. S.Y, Wang. C.Y, Gonzalez-Aguilar, G.A., 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. LWT - Food Sci. Technol. 37, 687–695.
[3] Azodanlou. R, Darbella. C, Luisier. J, Villettaz. J.C, Amado. R, 2003. Quality assessment of strawberries (*Fragaria* species). J. Agric. Food Chem. 51, 715–721.
[4] Boyles. M, Wrolstad. R. E, 1993. Anthocyanin composition of red raspberry juice-influences of cultivar, processing, and environmental-factors. J. Food Sci. 58, 1135–1141.
[5] Cao. G.H, Russell. R.M, Lischner. N, Prior. R.L, 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. J. Nutr. 128, 2383–2390.
[6] Cheel. J, Theoduloz. C, Rodriguez. J. A, Caligari. P.D.S, Schmeda-Hirschmann. G, 2007. Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from*Fragaria chiloensis* ssp *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. Food Chem. 102, 36–44.
[7] Cordenunsi. B.R, do Nascimento. J.R.O, Genovese. M.I, Lajolo, F.M., 2002. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. J. Agric. Food Chem. 50, 2581–2586.
[8] Cordenunsi. B.R, Genovese. M.I, Nascimento. J.R.O., Hassimotto. N.M.A, Santos,
[9] Lajolo. F.M, 2005. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. Food Chem. 91, 113–121.
[10] Cordenunsi. B.R, Nascimento. J.R.O, Lajolo. F.M, 2003. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. Food Chem. 83, 167–173.
[11] Dewanto. V, Wu. X. Z, Adom, K. K, Liu. R.H, 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 50, 3010–3014.
[12] Eberhardt. M.V, Lee. C.Y, Liu. R.H, 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature 405, 903–904.
[13] Ferreyra. R.M, Vina. S.Z, Mugridge. A, Chaves. A.R, 2007. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. Scientia Hortic.112, 27–32.
[14] Gil. M.I, Holcroft. D.M, Kader. A.A, 1997. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. J. Agric. Food Chem. 45, 1662–1667.
[15] Given. N.K, Venis. M.A, Grierson. D, 1988. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. J. Plant Physiol. 133, 25–30.

[16] He. X.J, Liu. R.H, 2007. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. J. Agric. Food Chem. 55, 4366–4370.
[17] Heinonen. I.M, Meyer. A.S, Frankel. E.N, 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J. Agric. Food Chem. 46, 4107–4112.
[18] Heo. H.J, Lee. C.Y, 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. J. Agric. Food Chem. 53, 1984–1989.
[19] Hewitt. E, Dickes. G.J, 1961. Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues. Biochem. J. 78, 384–391.
[20] Kader. F, Rovel. B, Girardin. M, Metche. M, 1997. Mechanism of browning in fresh high-bush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. J. Sci. Food Agric. 73, 513–516.
[21] Kafkas. E, Kosar. M, Paydas. S, Kafkas. S, Baser, K.H.C, 2007. Quality characteristics of strawberry genotypes at different maturation stages. Food Chem. 100, 1229–1236.
[22] Kalt. W, Forney. C.F, Martin. A, Prior. R.L, 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. J. Agric. Food Chem. 47, 4638–4644.
[23] Kosar. M, Kafkas. E, Paydas. S, Baser. K.H.C, 2004. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. J. Agric. Food Chem. 52, 1586–1589.
[24] Liu. M, Li. X.Q, Weber. C, Lee. C.Y, Brown. J, Liu. R.H, 2002. Antioxidant and anti-proliferative activities of raspberries. J. Agric. Food Chem. 50, 2926–2930.
[25] Liu. R.H, 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am. J. Clin. Nutr. 78, 517S–520S.
[26] Liu. R.H, 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr. 134, 3479S–3485S.
[27] Liu. R.H, Jacob, J.R., Hotchkiss, J.H., Tennant, B.C., 1993. Synthesis of nitric-oxide and nitrosamine by immortalized woodchuck hepatocytes. Carcinogenesis 14, 1609–1613.
[28] Liu. R.H, Jacob. J.R, Tennant. B.C, Hotchkiss. J.H, 1992. Nitrite and nitrosamine synthesis by hepatocytes Isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. Cancer Res. 52, 4139–4143.
[29] Maas. J.L,Wang. S.Y, Galletta. G.J, 1991. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid Content. HortScience 26, 66–68.
[30] Meyers. K.J, Watkins. C.B, Pritts. M.P, Liu, R.H., 2003. Antioxidant and anti-proliferative activities of strawberries. J. Agric. Food Chem. 51, 6887–6892.
[31] Miller. N.J, Rice Evans. C.A, 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. Food Chem. 60, 331–337.
[32] Mitcham. E.J, 2004. Strawberry. In: Gross. K.C,Wang. C.Y, Saltveit, M.E. (Eds.), The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Crops. U.S. Dept. Agric., Agric. Handbook 66, http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/index.html.
[33] Montero. T.M, Molla. E.M, Esteban. R.M, LopezAndreu. F.J, 1996. Quality attributes of strawberry during ripening. Sci. Hortic. 65, 239–250.
[34] Nunes. M.C.N, Brecht. J.K, Morais. A, Sargent. S.A, 1998. Controlling temperature and water loss to maintain ascorbic acid levels in strawberries during postharvest handling. J. Food Sci. 63, 1033–1036.
[35] Nunes. M.C.N, Brecht. J.K, Morais. A, Sargent. S.A, 2005. Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso Grande) during storage at 1 ◦C. J. Food Sci. 70, S79–S84.
[36] Nunes. M.C.N, Brecht. J.K, Morais. A, Sargent, S.A., 2006. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared to those that occur in harvested fruit during storage. J. Sci. Food Agric. 86, 180–190.
[37] Nunes. M.C.N, Brecht, J. K, Sargent, S. A, Morais. A, 1995. Effects of delays to cooling and wrapping on strawberry quality (cv Sweet Charlie). Food Control 6, 323–328.
[38] Nunes. M.C.N, Morais. A, Brecht. J.K, Sargent. S.A, 2002. Fruit maturity and storage temperature influence response of strawberries to controlled atmospheres. J. Am. Soc. Hort. Sci. 127, 836–842.
[39] Olsson. M.E, Ekvall. J, Gustavsson. K.E, Nilsson. J, Pillai, D., Sjoholm, I., Svensson, U., Akesson, B., Nyman, M.G.L., 2004. Antioxidants, lowmolecularweight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. J. Agric. Food Chem. 52, 2490–2498.
[40] Osborne. T.S, Bacon. J.A, 1961. Two improved and inexpensive systems for moisture stabilization in seeks and other tissues. J. Plant Physiol. 36, 309.
[41] Perkins-Veazie. P., 1995. Growth and ripening of strawberry fruit. Hortic. Revs. 267–297.
[42] Rao. M.V, Ormrod.D.P, 1995. Ozone exposure decreases UVb sensitivity in a UVbsensitive flavonoid mutant of Arabidopsis. Photochem. Photobiol. 61, 71–78.
[43] Rekika. D, Khanizadeh. S, Deschenes, M., Levasseur, A., Charles, M.T., Tsao, R., Yang, R., 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. HortScience 40, 1777–1781.
[44] Shin, Y., Liu, R.H.,Nock, J.F., Holliday, D.,Watkins, C.B., 2007. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. Postharvest Biol. Technol. 45, 349–357.
[45] Singleton. V.L, Orthofer. R, Lamuela-Raventos. R.M, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152–178.
[46] Smith. S.H., Tate. P.L, Huang. G, Magee. J.B, Meepagala, K.M, Wedge. D.E, Larcom. L.L, 2004. Antimutagenic activity of berry extracts. J. Med. Food 7, 450–455.
[47] Sun. J, Chu. Y.F,Wu. X.Z, Liu. R.H, 2002. Antioxidant and anti-proliferative activities of common fruits. J. Agric. Food Chem. 50, 7449–7454.
[48] Wang. H, Cao. G.H, Prior. R.L, 1996. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 44, 701–705.
[49] Wang. H., Cao, G.H., Prior, R.L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 45, 304–309.
[50] Wang. S.Y, Feng. R.T, Lu, Y.J, Bowman. L, Ding. M, 2005. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries

(Fragaria x ananassa Duch.). J. Agric. Food Chem. 53, 4187–4193.
[51] Wang. S.Y, Lin. H.S, 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agric. Food Chem. 48, 140–146.
[52] Wescheebeling. P, Montgomery. M.W, 1990. Strawberry polyphenoloxidase-its role in anthocyanin degradation. J. Food Sci. 55, 731–734.
[53] Williner. M.R, Pirovani. M.E, Guemes. D.R, 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. J. Sci. Food Agric. 83, 842–845.
Wolfe, K.,Wu, X.Z., Liu, R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. J. Agric. Food Chem. 51, 609–614.
[54] Zhishen. J, Mengcheng. T, Jianming, W, 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64, 555–559.