تأثیر تیمار پس از برداشت گاما آمینو بوتیریک اسید بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیلاس رقم تک دانه مشهد

حمید حسن‌پور[۱]*، علی بیستی[۲] و سهیلا نوجوان[۳]

۱-* **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (ha.hassanpour@urmia.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میوه‌کاری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد میوه‌کاری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

به منظور حفظ کیفیت و افزایش عمر انبارمانی میوه‌های گیلاس رقم «تک دانه مشهد» تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) در چهار غلظت (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) روی میوه اعمال و میوه‌ها در دو زمان، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از انبارداری نمونه‌برداری و پارامترهای موردنظر اندازه‌گیری شدند. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. صفات مختلفی از قبیل اسیدیته قابل تیتراسیون (TA)، مقدار مواد جامد محلول (TSS)، pH، ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل، مقدار فنل کل، فلاوونوئید کل، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با محلول‌پاشی گابا مقدار اسیدهای قابل تیتراسیون حفظ شد. تیمار گابا منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کل، فنل کل، فلاوونوئید کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در میوه‌های تیمارشده نسبت به میوه‌های شاهد بعد از ۳۰ روز انبارداری شد. در حالی‌که مقدار pH در میوه‌های تیمارشده نسبت به میوه‌های تیمارنشده در طول انبارداری کاهش یافت. بنابراین غلظت‌های مختلف تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید با توجه به تأثیر بر صفات مطلوب برای افزایش کیفیت پس از برداشت میوه گیلاس رقم «تک دانه مشهد» پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها: آنزیم، عمر انباری، فلاوونوئید، کیفیت میوه، مواد جامد محلول

مقدمه

گیلاس با نام علمی *Prunus avium* از خانواده Rosaceae یک گونه میوه‌دهنده از فصل بهار تا فصل تابستان است که بیشتر به‌عنوان میوه تازه مصرف می‌شود و یکی از محصولات مهم و جذاب باغبانی در دنیا می‌باشد. بر اساس آمار سازمان خواروبار جهانی در سال ۲۰۱۳ سطح زیر کشت گیلاس در دنیا ۴۰۵۱۲۹ هکتار و در ایران ۲۹۰۰۰ هکتار می‌باشد. بر اساس همان آمار عملکرد گیلاس در دنیا ۵۱۰۱/۴ کیلوگرم بر هکتار و در ایران ۴۵۲۵/۹ کیلوگرم بر هکتار می‌باشد (FAO, 2013). به‌طورکلی چری‌ها[۱] که گیلاس نیز یکی از آن‌ها می‌باشد، غنی از ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در این میوه‌ها جلوی عمل رادیکال‌های آزاد را در بدن می‌گیرند (Ghafar *et al.*, 2010). همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها باعث جلوگیری از اکسیداسیون‌های مولکول‌های زیستی سلول‌ها مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Dar *et al.*, 2015). همچنین ترکیبات فنلی که یکی از متابولیت‌های مهم گیاهی هستند و از مسیر اسید شیکیمک[۲] سنتز می‌شوند، نقش مهمی را در خنثی‌سازی اثر رادیکال‌های آزاد بر عهده دارند (Lattanzio *et al.*, 2012). دلیل اصلی افت کیفیت

1- Cherries

2- Shikimic acid

گیلاس در پس از برداشت کاهش وزن، تغییرات رنگ، نرمی، چروکیدگی سطحی، قهوه‌ای شدن و کاهش اسیدیته است (Martinez *et al.*, 2005). میوه گیلاس به خاطر داشتن آب زیاد و سرعت بالای تنفس در دوره پس از برداشت شدیداً در معرض فساد بوده و انبارمانی بسیار کوتاهی دارد (Dever *et al.*, 1996). بنابراین کاهش سرعت رسیدن و به تعویق انداختن مرحله پیری در این میوه به منظور افزایش انبارمانی آن بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا)[1] یک اسیدآمینه غیرپروتئینی چهار کربنه بوده که مقدار آن در داخل سلول در حالت طبیعی کم می‌باشد. به‌طور مثال گوجه‌فرنگی در حالت طبیعی فاقد گابا می‌باشد (Malekzadeh *et al.*, 2012). با این حال، این اسیدآمینه می‌تواند به سرعت و به مقدار زیاد در پاسخ به تنش‌های خشکی، شوری و درجه حرارت‌های پایین انباشته شود و در تنظیم وضعیت pH و H^+ سیتوزول نقش دارد (Mazzucotelli *et al.*, 2006؛ Sawaki *et al.*, 2009؛ Xing *et al.*, 2007؛ Yang *et al.*, 2011). در مورد تأثیر گابا بر افزایش عمر انبارمانی میوه‌های مختلف گزارشات متعددی وجود دارد. Wang *et al.* (2014) بیان کردند که تیمار گابا باعث افزایش مقدار فنل کل در میوه موز شده است. همچنین افزایش مقدار فلاوونوئید کل در اثر تیمار با گابا در گل‌های شاخه بریده آنتوریوم نیز گزارش شده است. در رابطه با بررسی مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گل‌های شاخه بریده آنتوریوم در اثر تیمار با گابا گزارش شده است (Soleimani Aghdam *et al.*, 2016). ولی در هر دو مطالعه فوق‌الذکر گابا باعث افزایش عمر انبارمانی میوه‌های تیمارشده گردید.

Yang *et al.* (2011) نشان دادند که تیمار میوه‌هایهلو با پنج میلی‌مولار گابا به مدت ۱۰ دقیقه منجر به کاهش آسیب‌های سرمازدگی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون-اس-پراکسیداز، مونوهیدروآسکوربات ردوکتاز، دی‌هیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز شده است. همچنین افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه‌های گلابی تیمارشده با گابا باعث افزایش مقاومت این محصول به *Penicillium expansum* شده است (Yu *et al.*, 2014). با توجه به این‌که تاکنون مطالعه در مورد تأثیر گابا روی عمر انبارمانی میوه گیلاس انجام نشده است و افزایش عمر انبارمانی میوه گیلاس به وسیله ترکیبات طبیعی با حفظ کیفیت آن ضروری به نظر می‌رسد و نظر به این‌که گابا به‌عنوان یک ترکیب طبیعی و سالم و به‌عنوان مکمل غذایی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و حتی غذاهای حاوی گابا نیز در صنایع غذایی تولید می‌شوند. بنابراین استفاده از گابا هیچ عوارض جانبی بر بدن نخواهد نداشت و حتی در رژیم غذایی ورزشکاران نیز این اسیدآمینه گنجانده می‌شود (Nouvrozi and Esmaeili, 2013). لذا این پژوهش با هدف بهبود کیفیت پس از برداشت گیلاس، افزایش ویژگی‌های بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی و بهبود وضعیت ظاهری میوه با استفاده از ترکیب طبیعی گابا انجام گرفت تا امکان جایگزینی آن با مواد شیمیایی مصنوعی بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور انجام آزمایش میوه‌های گیلاس رقم تک دانه مشهد پس از رسیدن کامل تجاری و هنگامی که ۵۰ تا ۸۰ درصد رنگ گرفته بودند و دارای اندازه مناسب و سفتی خوبی بودند، از یک باغ تجاری در شهرستان ارومیه برداشت شدند و بلافاصله به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند و از لحاظ شکل، رنگ، اندازه، عاری بودن

1- γ- Amino butyric acid (GABA)

از آفات و بیماری‌ها و صدمات ظاهری بررسی شدند و پس از تیمار با گابا در ظروف پلاستیکی بسته‌بندی شدند.

روش اجرای آزمایش

میوه‌های گیلاس بسته‌بندی تا زمان اتمام آزمایشات لازم در سردخانه با درجه حرارت ۱±۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵-۹۰ درصد نگهداری شدند و با فاصله زمانی هر ۱۵ روز (۱۵ و ۳۰ روز بعد از انبارداری) صفات موردنظر اندازه‌گیری شد.

تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا)

گابا (Sigma–Aldrich, Tehran, Iran) موردنیاز پس از توزین در آب حل‌شده و در سه غلظت ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار آماده شد. سپس میوه‌ها به مدت پنج دقیقه در داخل محلول مورد نظر غوطه‌ور گردیدند. میوه‌های شاهد نیز در داخل آب مقطر غوطه‌ور شدند. میوه‌ها تا زمان خشک شدن کامل (حدود یک ساعت) در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند و پس از آن در داخل ظروف پلاستیکی بسته‌بندی‌شده و به سردخانه انتقال داده شدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتورها عبارت بودند از: گاما آمینو بوتیریک اسید در چهار سطح (صفر به‌عنوان شاهد، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) و زمان نگهداری در دو سطح (۱۵ و ۳۰).

اندازه‌گیری اسیدهای قابل تیتراسیون (TA)

برای اندازه‌گیری اسیدهای قابل تیتراسیون از روش تیتراسیون استفاده شد. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره میوه در داخل ارلن‌مایر ریخته شد و روی آن ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و سپس با قرار دادن الکترود pHمتر دیجیتالی مدل (pH-Meter CG 824) عمل تیتراسیون توسط هیدروکسیدسدیم (NaOH) ۰/۱ نرمال تا pH=۸/۲ صورت گرفت (Ayala-Zavala *et al.*, 2007). بر اساس مقدار هیدروکسید سدیم مصرفی در جریان تیتراسیون مقدار اسید موجود در عصاره میوه به‌صورت گرم اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره میوه محاسبه شد.

مقدار TA برحسب معادل اسید سیتریک (اسید غالب گیلاس) طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$TA = (\frac{S \times N \times F \times E}{C}) \times 100$$

TA: مقدار اسیدهای قابل تیتراسیون موجود در عصاره میوه (g/ 100 mL)

S: مقدار NaOH مصرف‌شده (mL)

N: نرمالیته NaOH

F: فاکتور NaOH

C: مقدار عصاره میوه (mL)

E: اکی‌والان اسید موردنظر (اسید سیتریک)

اندازه‌گیری مواد جامد محلول (TSS) و pH عصاره میوه

برای اندازه‌گیری TSS چند قطره از آب میوه در دمای اتاق روی رفراکتومتر دستی مدل ATAGO ساخت کشور ژاپن قرار گرفت و عدد مربوطه از روی ستون مدرج قرائت شد و داده‌ها بر حسب بریکس یادداشت گردیدند (Jalili Marandi., 2009). برای تعیین مقدار pH آب میوه نیز از عصاره صاف‌شده میوه و با استفاده از دستگاه pHمتر مدل CP-411 ساخت کشور لهستان استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

برای تعیین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل از روش فرپ[1] (Tavarini *et al.*, 2008) استفاده شد. در این روش، محلول فرپ با مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر TPTZ و ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن آماده شد. در نهایت ۲/۸۵ میلی‌لیتر از محلول فرپ برداشته شد و با ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره میوه مخلوط گردید و بعد از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در اسپکتروفتومتر مدل (Unico, S 2100 SUV) در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید. سپس با رسم منحنی استاندارد مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل به‌دست آمد و بر حسب معادل میلی‌مول آهن بر ۱۰۰ گرم وزن تر بیان شد.

1- Ferric Reducing Antioxidant Power

اندازه‌گیری مقدار فنل کل

اندازه‌گیری مقدار فنل کل با استفاده از روش فولین سیوکالچو[1] صورت گرفت (Slinkard and Singleton, 1977). ابتدا عصاره میوه گیلاس با آب‌میوه‌گیری تهیه‌شده و از کاغذ صافی عبور داده شد و در میکروتیوب دو میلی‌لیتر ریخته شد. سپس آب میوه را سانتریفیوژ کرده و محلول رویی درون میکروتیوب دیگری ریخته شد و برای اندازه‌گیری از این محلول‌رویی استفاده گردید. جذب نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Unico, S 2100 SUV) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. اسید گالیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم اسیدگالیک بر لیتر بر اساس وزن تر بیان گردید.

ارزیابی فلاوونوئید کل

برای ارزیابی فلاوونوئید کل ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر عصاره تهیه‌شده را با ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم پنج درصد مخلوط کرده و بعد از پنج دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شد. سپس بعد از پنج دقیقه یک میلی‌لیتر سود یک مولار اضافه‌شده و درنهایت حجم نهایی را به پنج سی‌سی رسانده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Unico, S 2100 SUV) با طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار فلاوونوئید کل برحسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم وزن تر کاتچین به‌دست آمد (Shin *et al*., 2008).

استخراج عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره جهت تعیین مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، ابتدا ۰/۵ گرم از میوه وزن‌شده و به داخل هاون سرد منتقل شد و توسط سه میلی‌لیتر محلول بافر تریس با pH= ۷/۵ شامل (اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار، کلرید منیزیم سه میلی‌مولار و EDTA یک میلی‌مولار) باهاون خوب ساییده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد واز قسمت روشناور حاصله برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و گایاکول پراکسیداز استفاده شد (Kang and Saltiveit, 2002).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز با اندازه‌گیری سرعت حذف پراکسید هیدروژن صورت پذیرفت (Beers and Sizer, 1952). مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ محتوای ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت کاهش در جذب در طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار فعالیتی از آنزیم که یک میکرومول از سوبسترا را در یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیم در مدت یک دقیقه کاتالیز می‌کند که بر طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{فعالیت آنزیم کاتالاز} = \frac{\Delta A}{Min} \times \frac{1}{0/0436} \times \frac{total\ volum}{sample\ volum} \times df$$

ΔA = اختلاف جذب

Min = دقیقه

Total volume = حجم کل نمونه

Sample volume = مقدار عصاره در نمونه

df = فاکتور رقت

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌صورت افزایش در جذب گایاکول اکسیدشده در طی یک دقیقه در طول موج ۴۹۰ نانومتر محاسبه شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷ محتوی یک میلی‌لیتر گایاکول یک درصد، یک میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت است از میزان

1- Folin ciucaeltiu

فعالیتی از آنزیم که ۱ میکرومول از سوبسترا را در یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیم در مدت یک دقیقه کاتالیز می‌کند که بر طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود (Updhayaya *et al*., 1985):

$$\text{فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز} = \frac{\Delta A}{\text{Min}} \times \frac{1}{0/026} \times \frac{\text{Total volum}}{\text{Sample volum}} \times df$$

ΔA =اختلاف جذب

Min = دقیقه

Total volume = حجم کل نمونه

Sample volume = مقدار عصاره در نمونه

DF = فاکتور رقت

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اسیدهای قابل تیتراسیون (TA)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) مؤید اثر معنی‌دار تیمار گابا و اثر متقابل گابا با زمان انبارداری در سطح احتمال یک درصد و اثر زمان انبارداری در سطح احتمال پنج درصد بر مقدار اسیدهای قابل تیتراسیون عصاره آب میوه می‌باشد. با گذشت زمان مقدار TA نسبت به زمان برداشت کاهش داشته است و مقدار آن در میوه‌های تیمارشده تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. همچنین میوه‌های تیمارشده با گابا در زمان‌های مختلف انبارداری تفاوت معنی‌داری با هم داشتند ولی بین غلظت‌های مختلف گابا در روز ۱۵ و در روز ۳۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده در میوه گیلاس تیمارشده با گاما آمینو بوتیریک اسید در طول انبارداری

Table 1. Analysis of Variance of measured traits in sweet cherry fruit treated with gamma-amino butyric acid during storage

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	اسیدهای قابل تیتراسیون TA	مواد جامد محلول TSS	اسیدیته pH	آنتی‌اکسیدان کل Total antioxidant	فنل کل Total phenol	فلاونوئید کل Total flavonoid	کاتالاز Catalase	گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase
		میانگین مربعات صفات Mean square of traits							
گاما آمینو بوتیریک اسید GABA	3	0.04**	1.24**	1.71**	7332.24*	28316.61**	43039.82**	8.51*	1.93**
زمان انبارداری Storage Time	1	0.005*	0.82**	0.69*	9954.11*	8836.87*	54369.51**	11.32*	3.43**
گاما آمینو بوتیریک اسید ×زمان انبارداری GABA × Storage Time	3	0.08**	2.34**	7.41**	6942.51*	56866.37**	42165.43**	8.46*	2.09**
خطا Error	24	0.001	0.04	0.13	2197.24	2004.79	5778.65	2.40	0.34
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	-	5.4	9.8	9.8	6.57	8.44	13.88	10.20	15.46

* و ** به‌ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد.

*, ** significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل گاما آمینو بوتریک اسید و زمان انبارداری بر صفات اندازه‌گیری شده در میوه گیلاس رقم تک دانه مشهد

Table 2. The mean comparison of the interaction effect of GABA and storage time on the assessed traits of sweet cherry cv. Tak daneyeh mashhad

فعالیت گایاکول پراکسیداز (میکرومول بر گرم بر دقیقه) Guaiacol peroxidase activity (µmol/min g)	فعالیت کاتالاز (میکرومول بر گرم بر دقیقه) Catalase activity (µmol/min g)	فلاوونوئید کل (میلی گرم بر صد گرم وزن تر کاتچین) Total flavonoid ((mg CAT/100 g FW)	فنل کل (میلی گرم اسید گالیک بر لیتر وزن تر) Total phenol (mg GAE/L FW)	آنتی‌اکسیدان کل (میلی‌مول آهن بر صد گرم وزن تر) Total antioxidant (mM fe+2/100 g FW)	اسیدیته pH	مواد جامد محلول (درصد) TSS (%)	اسیدهای قابل تیتراسیون (میلی گرم بر صد میلی لیتر) TA (mg/100 ml)	قبل از انبارداری Before storage	زمان انبارداری (روز) Storage Time (day)	گاما آمینو بوتریک اسید (میلی‌مولار) GABA (Mm)
250	115	57.75	471.66	534.72	3.95	17	0.8	قبل از انبارداری Before storage		
241.38^{c}	118.12^{ef}	73.12^{d}	856.99^{c}	593.05^{c}	4.07^{a}	17.75^{b}	0.79^{a}		15	0
224.52^{c}	111.01^{f}	105.75^{b}	976.07^{bc}	713.61^{a}	4^{a}	16.75^{c}	0.64^{b}		30	
299.46^{b}	132.57^{d}	72^{d}	770.71^{d}	616.67^{c}	3.77^{b}	16.75^{c}	0.81^{a}		15	5
354.22^{a}	177.58^{a}	122.37^{a}	1259.64^{a}	611.1^{c}	3.88^{ab}	16.62^{d}	0.65^{b}		30	
172.64^{d}	125.91^{de}	86.62^{c}	668.93^{e}	638.62^{b}	3.92^{ab}	18.25^{a}	0.85^{a}		15	10
180.71^{d}	162.44^{b}	113.87^{ab}	851.78^{c}	656.7^{b}	3.89^{ab}	18^{a}	0.62^{b}		30	
165^{d}	121.56^{e}	81.37^{cd}	865.35^{c}	605.55^{c}	3.77^{b}	18.62^{a}	0.81^{a}		15	20
186.77^{d}	140.94^{c}	101.12^{b}	1078.93^{b}	553^{d}	3.46^{c}	17.87^{a}	0.69^{b}		30	

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌داری از نظر آماری می‌باشد.

The same letters in each column indicates statistically none-significant difference.

مواد جامد محلول (TSS)

بر اساس نتایج حاصله تیمار گابا باعث افزایش TSS در میوه‌های تیمارشده در طول انبارداری نسبت به میوه‌های شاهد شده است. البته غلظت پنج میلی‌مولار گابا باعث کاهش TSS حتی نسبت به شاهد شده است. می‌توان گفت که غلظت‌های پایین گابا تأثیر در افزایش TSS مانند غلظت بالا ندارد. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشترین مقدار TSS در تیمار ۲۰ میلی‌مولار گابا در ۱۵ روز بعد از انبارداری مشاهده شد و کمترین مقدار TSS در میوه‌های تیمارشده با گابای پنج میلی‌مولار در ۳۰ روز بعد از انبارداری مشاهده گردید (جدول ۲).

اسیدیته میوه (pH)

همان‌طور که در جدول (۲) نشان داده شده است مقدار pH در میوه‌های شاهد در طول انبارداری کاهش یافته است ولی این کاهش معنی‌دار نبوده است در حالی‌که تیمار گابا در غلظت ۲۰ میلی‌مولار مقدار pH را به‌طور معنی‌داری در ۳۰ روز بعد از انبارداری کاهش داده است. بر اساس جدول دو بیشترین مقدار pH در میوه‌های شاهد ۱۵ روز بعد از انبارداری مشاهده شده است. البته بین میوه‌های شاهد بعد از ۱۵ روز انبارداری و میوه‌های تیمارشده با ۵ و ۱۰ میلی‌مولار گابا بعد از پایان انبارداری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) به‌دست آمده مشخص گردید که تیمار گابا و زمان انبارداری و اثر متقابل آنها بر مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بوده است. مقدار آنتی‌اکسیدان کل در طول انبارداری تغییرات اندکی داشت. با گذشت زمان مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدان کل نسبت به زمان برداشت افزایش داشته است و مقدار آن در تیمار پنج میلی‌مولار در ۱۵ روز بعد از انبارداری تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت در حالی‌که میوه‌های شاهد در ۳۰ روز بعد از انبارداری بالاترین فعالیت آنتی‌اکسدانی را داشتند (جدول ۲). ولی در پایان دوره انبارداری مقدار آنتی‌اکسیدان کل در این غلظت پایین‌تر از شاهد بود. همچنین نتایج نشان داد که بالاترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های تیمارنشده می‌باشد. البته در بین غلظت‌های گابا، غلظت ۱۰ میلی‌مولار در ۳۰ روز بعد از انبارداری بیشترین تأثیر را بر افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان کل داشته است (جدول ۲).

مقدار فنل کل

مقدار فنل کل در میوه‌های گیلاس در طول ۳۰ روز انبارداری افزایش یافته است. ولی این افزایش در میوه‌های تیمارشده با پنج میلی‌مولار بیشتر از شاهد بوده است. غلظت‌های مختلف گابا تأثیر متفاوتی روی فنل کل میوه‌ها داشته است. در ۱۵ روز بعد از انبارداری فنل کل میوه‌های تیمارشده روند نزولی پیدا کرده است ولی در غلظت ۲۰ میلی‌مولار دوباره محتوی فنل کل افزایش پیدا کرده است (جدول ۲).

مقدار فلاوونوئید کل

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر گابا و زمان انبارداری و اثر متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد بر محتوی فلاوونوئید کل معنی‌دار می‌باشد. مقدار فلاوونوئید کل در طول انبارداری هم در میوه‌های شاهد وهم در میوه‌های تیمارشده با گابا افزایش‌یافته است. ولی این افزایش در میوه‌های تیمارشده با پنج میلی‌مولار گابا بیشتر از بقیه بود. با افزایش غلظت گابا از پنج میلی‌مولار به ۲۰ میلی‌مولار تاثیرآن در حفظ ترکیباتی فلاوونوئیدی میوه‌ها در پایان انبارداری کمتر شده است (جدول ۲).

مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

اثر تیمار گابا، زمان انبارداری و اثر متقابل آن‌ها روی فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). استفاده از تیمار گابا به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم کاتالاز را در غلظت‌های پایین افزایش داد

به‌طوری‌که در ۳۰ روز بعد از انبارداری مقدار فعالیت این آنزیم در غلظت پنج میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش‌یافته است. ولی با افزایش غلظت گابا فعالیت این آنزیم روند کاهشی پیدا کرد (جدول ۲).

مقدار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD)

میوه‌های تیمارشده با گابا در غلظت ۲۰ میلی‌مولار در ۱۵ روز بعد از انبارداری در دمای ۱±۱ درجه سانتی‌گراد مقدار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز کمتری داشتند. بیشترین مقدار فعالیت این آنزیم در میوه‌های ۳۰ روز انبارشده با کاربرد گابای پنج میلی‌مولار مشاهده شد. در طول زمان انبارداری روند فعالیت این آنزیم به این شکل بوده که در غلظت پنج میلی‌مولار فعالیت این آنزیم افزایش‌یافته ولی در غلظت‌های دیگر این روند کاهشی بوده و نسبت به شاهد فعالیت کمتری داشته است. شاید می‌توان نتیجه‌گیری نمود که غلظت پنج میلی‌مولار در افزایش فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی بسیار مؤثر بوده است (جدول ۲).

اسیدهای آلی یک منبع اندوخته انرژی برای میوه می‌باشند که در هنگام رسیدن میوه با افزایش سوخت و ساز، طی اکسایش اسیدها در چرخه کربس مصرف می‌شوند. همچنین محتوای اسیدهای آلی طی دوره نگهداری به دلیل تخمیر و در اثر تنفس میوه‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین هر عاملی که باعث کاهش تنفس بشود، باعث کاهش مصرف اسیدهای آلی به‌عنوان سوبسترای تنفسی در طول انبارداری میوه‌ها می‌شود (Marsh *et al.*, 2004). علت حفظ و کاهش نیافتن اسیدهای آلی در میوه‌های تیمارشده در طول انبارداری می‌تواند احتمالاً به دلیل نقش گابا در افزایش سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که در نتیجه باعث جلوگیری از آسیب‌های وارد شده به غشاء شده و کاهش نیاز به مصرف اسیدهای آلی را در پی دارد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مطابق نتایج انجام‌شده در هلو می‌باشد که گزارش کرده‌اند تیمار گابا باعث حفظ بیشتر TA در میوه هلو در طول انبارداری می‌شود. نتایج ما در مورد اثر گابا بر مقدار مواد جامد محلول در طول انبارداری مطابق یافته‌های، گزارش‌شده در مورد میوه‌های هلوی تیمارشده با گابا در طول انبارداری بود (Shang *et al.*, 2011). Soleimani Aghdam *et al.* (2016) نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که تیمار گل‌های شاخه بریده آنتوریوم با گابا منجر به افزایش مقدار مواد جامد محلول در طول دوره نگهداری می‌گردد. تیمار گابا از مصرف بیشتر قندها جلوگیری می‌کند و از این طریق باعث افزایش TSS در طول انبارداری می‌گردد. با توجه به اینکه در طول دوره نگهداری پیش ماده‌های تنفس یعنی قندها و اسیدها کاهش پیدا می‌کنند. این امر باعث تغییرات متفاوتی در pH در طول مدت نگهداری میوه‌ها می‌شود (Zhang *et al.*, 2008). البته واکنش میوه‌های مختلف نیز به تیمار گابا در طول انبارداری متفاوت می‌باشد.

ترکیبات فنلی جزء سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی بوده که نقش مهمی را در خنثی‌سازی اثرات رادیکال‌های آزاد بازی می‌کنند و در نتیجه باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌شوند (Zapata *et al.*, 2014). مکانیسم اثر گابا بر افزایش مقدار فنل کل و فلاوونوئید کل در طول انبارداری ممکن است به دلیل تحریک تولید آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) باشد که در واقع باعث به راه‌اندازی مسیر فنیل پروپانوئید می‌شود و مسیر فنیل پروپانوئید باعث سنتز ترکیبات فنلی نظیر ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود. نتایج مطالعات قبلی در موز و در گل‌های شاخه بریده آنتوریوم نشان داد که گابا باعث افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان کل در طول انبارداری می‌گردد (Soleimani Aghdam *et al.*, 2016؛ Wang *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر نیز آنتی‌اکسیدان کل در اثر استفاده از گابا نسبت به زمان برداشت در طول انبارداری افزایش یافت. همچنین در ۱۵ روز بعد از انبارداری میوه‌های تیمار شده، مقدار آنتی‌اکسیدان کل بیشتری نسبت به شاهد داشتند هر چند که این تفاوت فقط در غلظت ۱۰ گابا معنی‌دار بود. ولی در ۳۰ روز بعد از

انبارداری مقدار آنتی‌اکسیدان کل شاهد بیشتر از میوه‌های تیمارشده با گابا شده است که احتمالاً دلیل آن این باشد که با طولانی شدن انبارداری تأثیر گابا روی تحریک PAL کمتر شده و باعث کاهش تجمع ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتوسیانینی شده است و از این طریق باعث کاهش اندک در فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (Yang *et al*., 2011).

کاتالاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در حفاظت از سلول‌ها به شمار می‌رود و باعث تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. به همین دلیل به احتمال زیاد گابا از طریق افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی منجر به جاروب کردن رادیکال‌های آزادشده و از این طریق گیاه را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. گزارش‌هایی هماهنگ با نتایج ما مبنی بر تأثیر کاربرد پس از برداشت گابا در افزایش مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در طول دوره نگهداری روی گندم، هلو و گل‌های شاخه بریده آنتوریوم موجود است (Malekzadeh *et al*., 2012؛ Soleimani Aghdam *et al*., 2016؛ Yang *et al*., 2011). همچنین گایاگول پراکسیداز یکی از آنزیم‌های کلیدی در گیاهان برای مقابله در برابر پاتوژن‌ها می‌باشد (Cao *et al*., 2008؛ Ma *et al*., 2013؛ Zhang *et al*., 2011). در گزارش‌هایی کاربرد گابا سبب افزایش فعالیت آنزیم گایاگول پراکسیداز در موز و گلابی در طول انبارداری شده است (Wang *et al*., 2014؛ Yu *et al*., 2014). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات فوق‌الذکر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این‌که به دلیل آگاهی مصرف‌کنندگان، تقاضا برای محصولات ارگانیک روز به روز در حال افزایش بوده و تمایل به استفاده از روش‌هایی که بتوانند جایگزین روش‌های شیمیایی مضر شوند، بیشتر شده است. بنابراین تیمار گابا یکی از راهکارهایی است که می‌تواند برای تحریک مقاومت طبیعی گیاه و افزایش کیفیت پس از برداشت میوه‌های گیلاس رقم تک دانه مشهد به کار رود. همچنین با توجه به این‌که بیشترین ویژگی‌های بیوشیمیایی در اثر کاربرد تیمار گابای پنج میلی‌مولار ۳۰ روز بعد از انبارداری حاصل شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بهترین نتیجه در اثر کاربرد غلظت پنج میلی‌مولار حاصل شده است.

References

Ayala-Zavala, J. F., Wang, S. Y., Wang, C. Y. and Gonzalez-Aguilar, G. A. (2007). High oxygen treatment increases antioxidant capacity and postharvest life of Srawberry fruit. Food Technology and Biotechnology, 45(2), 166-173.

Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, 195(1), 133-140.

Cao, S. F., Zheng, Y. H., Yang, Z. F., Tang, S. S., Jin, P. and Wang, K. T. (2008). Effect of methyl jasmonate on the inhibition of *Colletotrich umacutatum* infection in Loquat fruit and the possible mechanisms. Postharvest Biology and Technology, 49(2), 301-307.

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), 49-57.

Dever, M. C., Macdonald, R. A., Cliff, M. A. and Lane, W. D. (1996). Sensory evolution of sweet cherry cultivars. Hortscience, 31(1), 150-153.

FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). Retrieved from http://www.fao.org.

Ghafar, M., Nayendraprasad, K., Weng, K. and Ismail, A. (2010). Flavonoied, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from *citrus* species. Africa Journal of Biotechnologhy, 9(3), 326-330.

Jalili Marandi, R. (2012). Post-harvest physiology (handling and storage of fruit, vegetables and ornamental plants). Urmia: Urmia Jahad Daneshgahi Press. [In Farsi]

kang, H. M. and Saltveit, M. E. (2002). Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots and differentially affected by salicylic acid. Plants Physiology, 115(4), 571-576.

Lattanzio, V., Cardinali, A. and Linsalata, V. (2012). Plant phenolics: A biochemecal and physiological perspective, In Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., Quideau, S. (Eds.), Recent advances in polyphenol research (1 ed.). Wiley-Blackwell: John Wiley & Sons, Ltd.

Ma, Z. X., Yang, L. Y., Yan, H. X., Kennedy, J. F., and Meng, X. H. (2013). Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. Carbohydrate Polymers, 94(1), 272-277.

Malekzadeh, P., Khara, J. and Heidari, R. (2012). Effect of exogenous Gama-aminobutyric acid on physiological tolerance of wheat seedlings exposed to chilling stress. Iranian Journal of Plant Physiology, 3(1), 611-617.

Marsh, K., Attanayake, S. Walker, S. Gunson, A., Boldingh, H. and Macrae, E. (2004). Acidity and taste in kiwifruit. Postharvest Biology and Technology, 32(2), 159-168.

Martinez, R. D., Alburquerque, J. M., Valverde, F., Guillen, S., and Serrano, M. (2005). Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by *Aloe vera* treatment: A new edible coating. Postharvest Biology and Technology, 39(1), 93-100.

Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L. and Forlani, G. (2006). Metabolism of γ-aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. Journal of Experimental Botany, 57(14), 3755-3766.

Nouvrozi, N. and Esmaeili, M. (2013). The production of Functional food containing GABA. The twenty-first National Congress of Food Science and Technology, Shiraz University, 320-327. [In Farsi]

Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Ikka. T., Sakurai, N., Fujita, M., Shinozaki, K., Shibata, D., Kobayashi, M. and Koyama, H. (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. Plant Physiology, 150(1), 281-294.

Shang, H. T., Cao, S. F., Yang, Z. F., Cai, Y. T. and Zheng, Y. H. (2011). Effect of exogenous ɣ-aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury

in peach fruit after long-term cold storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(4), 1264-1268.

Shin, Y. J., Jung, A. R., Rui, H. L., Nock, J. F. and Watkins, C. B. (2008). Harvest maturity, storage temperature and relative humidity effect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 49(2), 201-209.

Slinkard, K. and Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1), 49-55.

Soleimani Aghdam, M., Naderi, R., Jannatizadeh, A., Askari Sarcheshmeh, M. A. and Babalar, M. (2016). Enhancement of postharvest chilling tolerance of *anthurium* cut flowers by ɣ-aminobutyric acid (GABA) treatments. Scientia Horticulturae, 198, 52-60.

Tavarini, S., DeglInnocenti, E., Remorini, D., Massai, R. and Guidi, R. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage on Hayward kiwifruit. Food Chemistry, 107(1), 282-288.

Updhayaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smidth, B. N. (1985). Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Journal of Plant Physiology, 121(5), 453-461.

Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, SH., and Du, R. (2014). Effect of exogenous ɣ-aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. Scientia Horticulturae, 168, 132-137.

Xing, S. G., Jun, Y. B., Hau, Z. W. and Liang, L. Y. (2007). Higher accumulation of γ-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. Plant Physiology and Biochemistry, 45(8), 560-566.

Yang, A., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y. and Zheng, Y. (2011). γ-Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. Food Chemistry, 129(4), 1619-1622.

Yu, C., Zeng, L., Sheng, K., Chen, F., Zhou, T., Zheng, X. and Yu, T. (2014). γ-Aminobutyric acid induces resistance against *Penicillium expansum* by priming of defence responses in pear fruit. Food Chemistry, 159, 29-37.

Zapata, P. J., Martinez-Espla, A., Guillen, F., Diaz-Mula, H. M., Martinez-Romero, D., Serrano, M. and Valero, D. (2014). Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plum cultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. Postharvest Biology and Technology, 98, 115-122.

Zhang, C. F., Wang, J. M., Zhang, J. G., Hou, C. J. and Wang, G. L. (2011). Effects of β aminobutyric acid on control of postharvest blue mould of apple fruit and its possible mechanisms of action. Postharvest Biology and Technology, 61(2), 145-151.

Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., and Zheng, X. (2008). Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. Biological Control, 47(1), 60-65.

Effect of Postharvest Treatment of Gamma-Amino Butyric Acid on Some Biochemical and Antioxidant Properties of Sweet Cherry cv. Tak Daneyeh Mashhad

H. Hassanpour[1]*, A. Bisti[2] and S. Nojavan[3]

1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (ha.hassanpour@urmia.ac.ir)
2- M.Sc. Student of Pomology, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3- M.Sc. Student of Pomology, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 8 December, 2016 Accepted: 5 July, 2017

Abstract

Background and Objectives

Sweet cherry fruit due to high water content and respiration rate is rotten in post-harvest period and hence has a short storage life. So, reducing of respiration rate and delaying of senescence process are required for increasing of storage life. Gamma amino butyric acid (GABA) is a non-protein amino acid with low content in the cell in normal state. No study has taken into account the effect of GABA on the storage life of sweet cherry fruit and also, increasing of shelf life by natural compounds seems essential to maintain the quality. Therefore, this study was conducted with the aim of improving the post-harvest quality of sweet cherry fruit, increasing biochemical and antioxidant properties and improving fruit appearance using GABA with the purpose of replacing it with synthetic chemicals.

Materials and Methods

Fruits of sweet cherry cv. Tak Daneyeh Mashhad were harvested at commercial maturity from a commercial orchard in Urmia (Iran) and transported to laboratory immediately. GABA was used in three concentrations (5, 10 and 20 mM). Titration method was used for determination of Titratable acid (TA) and pH was determined by pH meter. TSS was determined by refractometer. Total antioxidant capacity was determined by ferric ions reducing antioxidant power assay (FRAP). Total phenolic content was determined by Folin ciocalteu method and total flavonoid content was determined by the aluminum chloride colorimetric method.

Results

The results showed that TA content remains constant with treatment of GABA during storage. GABA treatment leads to an increase in total antioxidant activity, total phenol, total flavonoid and activity of catalase and guaiacol peroxidase enzymes in the treated fruits compared to control fruit after 30 days of storage. The pH value in treated fruits compared to untreated fruits was decreased during storage. Also, GABA at 10 mM level compared with other concentrations had the highest effect on total antioxidant capacity after 30 days of storage.

Discussion

The increasing of organic acids in treating fruits can be probably due to increasing of antioxidant capacity by GABA treatment, hence the damage to membrane was prevented and the organic acids were used less frequently. Treatment of fruits with GABA decreased the pH during storage, which may be due to its role in reducing of respiration rate in harvested fruits. The mechanism of the effect of GABA on increasing of total phenol and flavonoid content may be due to stimulating the production of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) which can trigger phenylpropanoid pathway and hereby, syntheses of phenolic compounds such as flavonoids compounds were occurred. Catalase is one of the key enzymes to protect the cells and cause the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen. Therefore, probably the GABA treatment via the increasing the antioxidant system such as catalase leads to scavenge free radicals thereby protecting plants against oxidative stress.

Keywords: Enzymes, Flavonoid, Fruit quality, Postharvest, Storage life, Total soluble solid