

ساخت حسگر H₂S بر پایه آهن (III) کلرید / استات سلولز برای تشخیص فساد میکروبی در بسته‌بندی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

تارا زارعی^۱، مسعود رضائی^{۱*}، نادر بهرامی^۲

۱. گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲. گروه علوم و مهندسی محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به دلیل خواص تغذیه‌ای ارزشمند خود جایگاه خوبی در سبده غذایی خانوار پیدا کرده است. لذا عرضه به صورت بسته‌بندی بهداشتی این فراورده در دوران همه‌گیری بیماری کرونا اجتناب ناپذیر است. این پژوهش در راستای عرضه بسته‌بندی هوشمند ارزان، قابل اعتماد و با قابلیت تشخیص تازگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انجام شده است. فیله ماهی به همراه حسگر گاز H₂S ساخته شده از آهن (III) کلرید / استات سلولز به صورت بسته‌بندی در آورده شد. طی دوره نگهداری با دمای یخچال ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد بسته‌ها به لحاظ تعداد باکتری کل، سودوموناس، تولیدکننده H₂S و باکتری *Escherichia coli* (۱×۱۰^۴ CFU/ml) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تصویر برداری از همبستگی تغییرات رنگ حسگر به صورت ارزش رنگ محاسبه و بررسی شد. عملکرد حسگر از لحاظ تغییر رنگ معنی دار ($P < 0.05$) و همبستگی ارزش رنگ حسگر با رشد باکتری کل در دوره ۳ روزه ۰/۹۰۱ بود. در بررسی دقت شناسایی رشد باکتری *E. coli* همبستگی پیرسون ارزش رنگ و رشد باکتری برابر با ۰/۹۳۲ بدست آمد. همچنین در بررسی همبستگی ارزش رنگ با تعداد باکتری کل، باکتری سرما گرا و باکتری تولیدکننده H₂S به ترتیب ۰/۸۳۵، ۰/۸۶۹ و ۰/۸۳۶ بدست آمد. استفاده از حسگر با ترکیب آهن (III) کلرید و استات سلولز برای تعیین فساد میکروبی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بسته‌بندی می‌تواند در آینده به عنوان یک روش کنترل کیفیت مصرف‌کننده محور مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: کنترل کیفیت، بسته‌بندی هوشمند، حسگر H₂S، ماهی قزل‌آلای، *Escherichia coli*

مقدمه

با شروع همه‌گیری بیماری کرونا صنایع غذایی و شرکت‌های وابسته از سوی دولت‌ها ملزم به رعایت پروتکل‌های بهداشتی در فرآیندهای تولید، حمل و فروش مواد غذایی شده‌اند (۱). در واقع علاوه بر افزایش الزامات فردی بهداشتی در زنجیره انسانی فراورده‌های غذایی، بخش‌های بسته‌بندی غذا و کنترل کیفیت صحیح آن، از زمان تولید تا مصرف نیز بیش از پیش مورد توجه دولت‌ها واقع شده است. از طرف دیگر عواملی مانند افزایش ریسک بیماری، نیاز به مصرف مواد غذایی سالم و تازه، تقاضای مردم را برای عرضه روش‌های کنترل کیفیت مصرف‌کننده محور افزایش داده است (۱، ۲). در حال حاضر صنایع غذایی از روش‌های مختلفی برای تعیین کیفیت، تازگی و سلامت مواد غذایی از لحاظ میکروبی، ویروسی، شیمیایی و حسی استفاده می‌نمایند (۲، ۳، ۴). اکثر روش‌های متداول مورد استفاده نیازمند صرف زمان و هزینه هستند و تنها در آزمایشگاه‌ها توسط متخصصین قابلیت انجام دارند (۳). این در حالی است که نمونه‌برداری تصادفی برای تعیین کیفی فراورده در خط تولید امکان خطا در سیستم کنترل کیفیت را ایجاد می‌کند. همچنین این گونه بررسی‌ها تشخیص کیفیت، تازگی و سلامت غذایی برای افراد غیرمتخصص مانند مصرف‌کنندگان و فروشندگان را پوشش نمی‌دهند، به ویژه با ممنوعیت عرضه محصولات بدون بسته‌بندی و کد شناسایی فروشندگان این معضل بیش از پیش خود را آشکار می‌شود (۳، ۵). در حالیکه بسته‌بندی محصولات غذایی اولین اقدام برای حفظ، ارتقا کیفیت تازگی و عمر

* E-mail: rezaei.ma@modares.ac.ir

ماندگاری ماده غذایی تازه است (۶، ۷، ۸)؛ با این وجود اعتماد مصرف‌کنندگان و فروشندگان این فرآورده‌ها به تاریخ درج شده روی بسته‌بندی‌ها نیز به دلیل اثرگذاری عوامل مختلف از جمله شرایط دمایی، سرعت حمل‌ونقل و کیفیت حمل فرآورده، فاصله زمانی ما بین تولید تا عرضه، انواع آسیب‌های مکانیکی، شیمیایی و فیزیکی بر میزان تازگی مواد غذایی، کمتر شده است (۹). بنابراین همیشه نیاز به یک سیستم کنترلی ساده، ارزان قیمت و سریع که قابلیت استفاده برای تمام اقشار اعم از متخصصین و غیر متخصصین را داشته باشد احساس می‌شده و با این نیاز با همه‌گیری بیماری کرونا تشدید شده است (۱۰). یکی از راه‌های پیشنهاد شده برای رفع این نیاز در بازارهای جهانی عرضه محصولات تازه به صورت بسته‌بندی‌های هوشمندی است (۴). هدف از سیستم‌های هوشمند در دنیا ارتقاء قدرت تعیین نقاط بحرانی و کنترل آنها یا HACCP^۱ و آنالیز کیفیت و کنترل آن یا QACCP^۲ (۱۱) و از طرف دیگر جهت تشخیص غذای ناسالم، خطر بیماری‌زایی آن و ایجاد یک روش برای کاهش یا رفع این مشکلات است. این روش کنترل کیفیت تنها روش مصرف‌کننده محور موجود در دنیا به حساب می‌آید (۱۰). بسته‌بندی‌های هوشمند دارای شناساگرها یا حسگرهایی هستند که پس از نصب روی بسته غذا کیفیت آن را از طریق بخش گیرنده با اندازه‌گیری شاخص‌های فساد میکروبی یا شیمیایی ثبت و این اطلاعات را به صورت یک پیام ساده مثلاً تغییر رنگ در بخش مترجم نشان می‌دهند (۱۰، ۱۲). در واقع مهم‌ترین دلیل افت کیفیت تازگی، رشد باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در فضای بسته‌بندی است و در بین ترکیبات حاصل از فساد میکروبی که عمدتاً در ارتباط با فعالیت آنزیمی آن‌ها می‌باشد می‌توان به ترکیبات آمینی (۱۳)، سولفیدی (۱۵)، دی اکسید کربن (۱۷) و از آن دست اشاره نمود. ترکیبات نام برده پس از تولید به صورت گاز در فضای بالای بسته‌بندی منتشر می‌شوند (۷). گاز H₂S در اثر فعالیت باکتری‌ها انتروباکتریاسه در شرایط بی‌هوازی بسته‌بندی و یا توسط باکتری‌های تولید کننده این گاز در بسته‌بندی تولید می‌شود (۱۸). همانطور که بیان شد این گاز به عنوان یکی از شاخص‌های نشان دهنده افت کیفیت است که به دلیل سمیت و بوی بد دارای اهمیت بالایی از نظر کنترل کیفیت فرآورده‌های تخمیری و فرآورده‌های شیلاتی بسته‌بندی شده به‌ویژه ماهی و میگو است (۱۸). تاکنون پژوهش‌های زیادی به منظور ساخت و عرضه بسته‌بندی هوشمند تشخیص این گاز صورت گرفته است. از جمله انجام مطالعه روی میزان تشخیص به کمک هموگلوبین در مرغ کبابی بسته‌بندی (۱۵)، تشخیص به کمک نانو ذرات طلا پوشش داده شده با نقره در شیر (۱۹)، تشخیص گاز H₂S در هوا به کمک استات مس (II) (۲۰) و ساخت پروپ فلوروسانس جهت تشخیص در نوشیدنی‌های تخمیری (۱۸). به علت اثرات اثبات شده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر تقویت سیستم ایمنی، افزایش سلامت مصرف‌کننده و همچنین نیاز به عرضه این محصول به صورت تازه در کل کشور (با تولید سالانه ۱۴۰ هزار تن)، ماهی قزل‌آلا دارای بیشترین پتانسیل به منظور عرضه به صورت بسته‌بندی است (۱۷)؛ بنابراین برای بهبود صادرات و همچنین حفظ جایگاه در بازار رقابت با سایر تولیدکنندگان، لازم است پژوهش بیشتری برای تدوین روش‌های کنترل کیفیت مصرف‌کننده محور به صورت بسته‌بندی‌های هوشمند روی آن انجام شود.

با توجه به ضرورت توسعه روش‌های جدید کنترل کیفیت، در این پژوهش تلاش شد با استفاده از طراحی و ساخت حسگری برای شناسایی گازهای سولفیدی حاصل از فساد میکروبی در فضای بسته‌بندی ماهی قزل‌آلا؛ کیفیت تازگی و سلامت این فرآورده طی مدت زمان نگهداری با دمای ۴±۲ درجه سانتی‌گراد و ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد اعتبارسنجی شود. از جمله مهم‌ترین روش‌های

¹Hazard Analysis and Critical Control Points

²Quality Analysis and Critical Control Points

متداول تعیین کیفیت تازگی و سلامت ماهی تازه استفاده شده در این پژوهش می‌توان به اندازه‌گیری بار میکروبی کل، سرماگرا، تولید کنندگان H_2S (۲۱، ۲۲) و شاخص عوامل بیماری‌زا مانند شمارش *E. coli* اشاره نمود (۲۳).

مواد و روش‌ها

ساخت حسگرها

پس از تهیه محلول اتانولی از ۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید آهن (III) قطعات فیلم استات سلولز به روش غوطه‌وری در ۱۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه تحت امواج التراسونیک قرار گرفت. سپس حسگرها در تاریکی به مدت ۱ شب در دمای اتاق خشک شدند.

آماده‌سازی ماهی و بسته‌بندی

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تازه با میانگین وزنی 300 ± 20 گرم در پوشش یخ تهیه و به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. ماهی‌ها پس از تخلیه شکمی و شست‌وشو به قطعات فیله تقسیم شدند و به صورت تصادفی مقدار 300 ± 10 گرم از آن‌ها در ظروف بسته‌بندی درب‌دار قرار داده شد. در نهایت هوشمندسازی بسته‌بندی با نصب ۴ حسگر بر روی دیواره ظروف انجام شد (۱۳). بسته‌ها در دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت هر شش ساعت از تعداد باکتری‌های کل کشت سطحی با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد. همچنین وضعیت تغییر رنگ حسگرها با تصویربرداری توسط دوربین دیجیتال نیکون (مدل coolpix s2900) هر دو ساعت یک بار ثبت شد. در نگهداری ماهی با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز تعداد باکتری‌های کل، سرماگرا و باکتری‌های بی‌هوازی تولیدکننده H_2S در روز ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ بررسی شد و از وضعیت حسگرها عکس برداری شد.

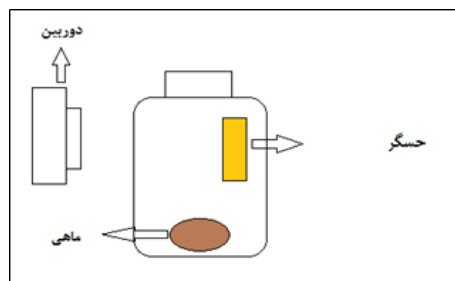
آنالیز میکروبی باکتری‌های مزوفیل هوازی، سرماگرا و تولیدکننده H_2S

کیفیت باکتریایی نمونه‌های ماهی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. مقدار ۵ گرم از عضله پشتی هر ماهی در ۴۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی همگن شد و پس از ساخت رقت‌ها برای شمارش باکتری‌های کل و باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های تهیه شده، از محیط کشت پلیت کانت آگار و برای باکتری‌های تولیدکننده H_2S از محیط کشت تریپل شوگر آبرون آگار استفاده شد (۲۵). پس از تهیه نمونه و رقت‌های اعشاری رقت‌های مورد نیاز روی محیط کشت‌ها به صورت پورپلیت کشت داده شدند و جهت شمارش پلیت کانت‌های کشت داده شده مربوط به باکتری‌های مزوفیل بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در $37^\circ C$ ، پلیت‌های مربوط به باکتری‌های سرماگرا بعد از ۴۸ روز انکوباسیون در $10^\circ C$ و برای شمارش باکتری‌های تولیدکننده H_2S در دمای $25^\circ C$ به ۷۲ ساعت تحت خلاء انکوباسیون اقدام صورت گرفت (۱۵).

آزمون شناسایی رشد عامل بیماری‌زا اشرشیا کلای

پس از تهیه فیله‌های ماهی قزل‌آلا مقدار 1×10^4 CFU/ml باکتری *E. coli* به فیله‌ها تلقیح شد (۲۴). نمونه‌های فیله به صورت تصادفی در ظروف درب‌دار استریل شده با اشعه UV قرار داده شد. سپس سه تکرار از حسگرهای تهیه شده روی دیواره هر ظرف بسته‌بندی نصب شد. تمامی تیمارهای تلقیح شده و شاهد آن به مدت ۳ روز در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. برای بررسی رشد باکتری *E. coli* در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مقدار ۵ گرم از فیله ماهی قزل‌آلا نمونه‌برداری شد. سپس با

تهیه عصاره گوشت در ۴۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی کشت سطحی با استفاده از محیط کشت اختصاصی باکتری یا محیط کشت S mac انجام شد. هم‌چنین در طول زمان نگهداری هر ۸ ساعت از عملکرد حسگرها تصویربرداری به عمل آمد (شکل ۱).

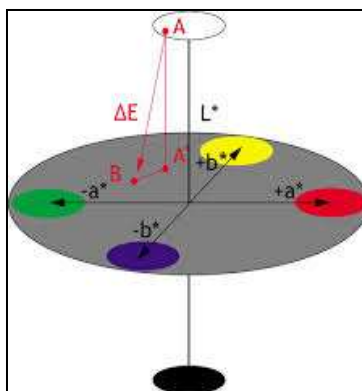


شکل ۱ تصویربرداری از شناسایی رشد باکتری شاخص سلامت (*E. coli*)

از نتایج نهایی مراحل ارزیابی تغییر رنگ حسگر برای تهیه برچسب تعیین وضعیت در مرحله اعتبارسنجی نهایی نگهداری در دمای یخچالی به مدت ۱۶ روز استفاده شد. برای دوره نگهداری در دمای 4 ± 2 درجه سانتی‌گراد مجدداً ماهی قزل‌آلا با وزن 300 ± 7 گرم تهیه شد و در هر بسته یک ماهی تخلیه شکمی شده و فاقد آبشش قرار داده شد. پس از نصب حسگرها در بسته‌بندی آزمون‌های میکروبی، شیمیایی، حسی و دیجیتالی هر چهار روز یکبار انجام شد.

آزمون دیجیتالی

پس از انتقال تصاویر به کامپیوتر تا با استفاده از نرم افزار فتوشاپ CS2016 شاخص LAB محاسبه شود. طبق تئوری رنگها (شکل ۲) ارزش رنگ به میزان اختلاف شاخص‌های lab رنگ تعیین شده از شاخص‌های lab رنگ اولیه اطلاق می‌شود که از رابطه (۱) ΔE محاسبه می‌شود (۱۶):



شکل ۲ تئوری رنگها

$$\Delta E = \sqrt{(a_0 - a_n)^2 + (b_0 - b_n)^2 + (L_0 - L_n)^2}$$

رابطه ۱

تحلیل رنگ حاصل براساس نتایج به دست آمده به صورت برجسب تحلیل وضعیت چاپ و به عنوان راهنما به بسته بندی ها افزوده می شود تا افراد زنجیره با کمک آن وضعیت بسته های هوشمند را تحلیل نمایند (۱۶).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها از طریق نرم افزار spss نسخه ۱۶ انجام شد (۱۶). ابتدا نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ($P < 0.05$) و سپس همگنی داده ها از آزمون لون سنجیده شد. برای مقایسه آماری تغییرات تیمارها در ارزیابی های میکروبی طی مدت نگهداری از آزمون های طرح آمیخته ریپتد میژر ($P < 0.05$) استفاده شد. در نهایت برای تعیین میزان مطابقت روش استفاده شده در این پژوهش با کیفیت میکروبی از همبستگی آماری پیرسون بین شاخص های میکروبی و ارزش رنگ استفاده شد (۱۶).

نتایج

آزمون نگهداری در دمای محیط (25°C)

به منظور ارزیابی عملکرد حسگر و تهیه برجسب کنترل در مراحل بعد آزمون نگهداری در دمای محیط انجام شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. نتایج بررسی تغییرات ارزش رنگ حسگرها و تعداد باکتری کل بسته های هوشمند طی دوره نگهداری در دمای 25°C به مدت ۳ روز نشان داد که ارزش رنگ حسگرها و تعداد باکتری کل در طول دوره دچار تغییر شده است. رابطه همبستگی پیرسون (R^2) در تغییر ارزش رنگ حسگر و تعداد باکتری کل، مثبت و معنی دار $0/901$ بود.

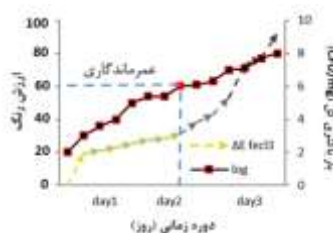
جدول (۱) تغییرات رشد باکتری کل در دوره نگهداری با دمای 25°C درجه سانتی گراد و همبستگی پیرسون تغییرات ارزش رنگ و رشد باکتری

کل

وضعیت بسته بندی				
R^2	Sig	df	منبع تغییرات	
۰/۹۰۱	*۰/۰۰۰۱	۲	روز	تعداد باکتری کل
	*۰/۰۰۰۱	۲		ارزش رنگ

*سطح معنی داری ۵ درصد

مطابق شکل ۳ نمودار ارتباط بین ارزش رنگ حسگر و تعداد باکتری کل طی دوره نگهداری ۳ روز (دمای 25°C) نشان می دهد که با افزایش تعداد باکتری کل موجود در نمونه ها مقدار ارزش رنگ نیز افزایش یافته است و در روز دوم تعداد باکتری کل به 1×10^6 CFU/mg رسید.



شکل ۳ نمودار ارتباط بین ارزش رنگ حسگر و بار باکتریایی کل طی دوره نگهداری ۳ روز (دمای 25°C)

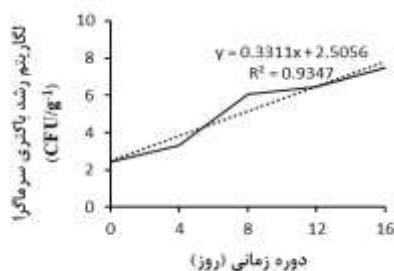
رنگ حسگر در پایان دوره نگهداری به رنگ سیاه با ارزش عددی ۸۶ تغییر نمود. همچنین شکل (۴) تصویر تغییرات حسگرها طی دوره نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز را نشان می‌دهد.



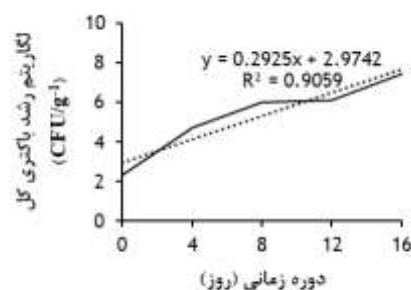
شکل ۴ تغییرات رنگ حسگرها طی دوره نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز (الف- نمونه تازه ب- نمونه فاسد شده پس از سه روز)

نتایج نگهداری در دمای یخچالی و اندازه‌گیری رشد بار باکتریایی

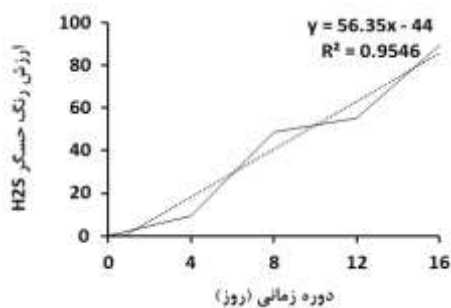
بار میکروبی کل، سرماگرا و باکتری‌های تولیدکننده H₂S به ترتیب از لگاریتم ۲/۴۷، ۲، ۱/۴ CFU/g⁻¹ روز صفر به لگاریتم ۷/۳۹، ۷/۴۰ CFU/g⁻¹ در روز ۱۶ رسید (شکل ۵ بخش الف، ب و ج). مطابق تصاویر ارزش رنگ در حسگر H₂S از صفر به ۸۳/۵ در روز ۱۶ تغییر یافت (شکل ۵ بخش د). بار میکروبی کل، سرماگرا و باکتری‌های تولیدکننده H₂S ماهی در بسته‌ها در روز ۸ نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر ۵/۴۷، ۵/۹۰، ۴/۱۴ CFU/g⁻¹ شمارش شد و ارزش رنگی حسگر H₂S در بسته‌های هوشمند ۵۴/۵ اندازه‌گیری شد.



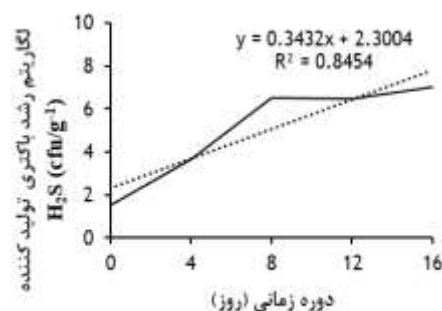
ب.



الف



د



ج

شکل ۵- نمودار رابطه همبستگی بار میکروبی، ارزش رنگ و زمان در دوره نگهداری با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد الف- باکتری کل ب- باکتری سرم‌گرا ج- باکتری تولیدکننده H₂S د- ارزش رنگ حسگر H₂S

رابطه بین ارزش رنگ یا ΔE در بسته هوشمند و میزان بار میکروبی کل، سرم‌گرا و باکتری‌های تولیدکننده H₂S طی دوره ۱۶ روزه از طریق رابطه همبستگی بررسی شد. در تمامی تیمارها رابطه همبستگی معنی‌دار و مثبت مشاهده شد که جدول زیر نشان‌دهنده نتایج این بررسی است (جدول ۲).

جدول (۲) تغییرات رشد باکتری *E. coli* در دوره نگهداری ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آزمون رپیتد میژر طرح آمیخته آماری در سطح ۵ درصد

وضعیت بسته‌بندی			
R ²	Sig	Df	منبع تغییرات
۰/۹۳	*۰/۰۰۰۱	۲	روز
	*۰/۰۰۰۱	۲	

*معنی‌دار در سطح ۵ درصد

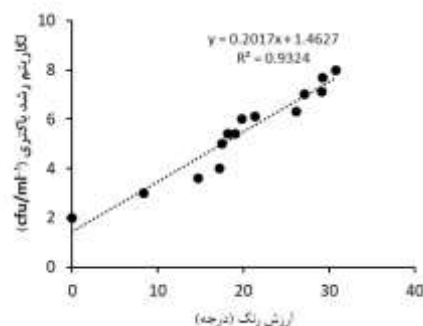
نتایج شناسایی رشد عامل بیماری‌زا *E. coli*

به منظور بررسی عملکرد حسگر در تشخیص شاخص باکتری‌های بیماری‌زا پس از تلقیح باکتری وضعیت ارزش رنگ تصویر برداری شد که در جدول ۳ نتایج بررسی آن آورده شده است.

جدول (۳) رابطه همبستگی بار میکروبی کل، سرماگرا و باکتری‌های تولید کننده H₂S تیمار شاهد و تغییرات ΔE تیمارهای هوشمند در دوره نگهداری ۱۶ روزه

وضعیت بسته‌بندی		منبع تغییرات	R ²
بار میکروبی کل		ارزش رنگ	۰/۸۳۵
سرماگرا			۰/۸۶۹
باکتری‌های تولیدکننده			۰/۸۳۶

نتایج حاصل از بررسی اختلاف ارزش رنگ حسگرهای گازی و تعداد باکتری شمارش شده در طول دوره نگهداری به مدت ۳ روز نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر تغییر رنگ بین ساعت‌ها وجود دارد. همبستگی پیرسون بین ارزش رنگ حسگر و رشد باکتری شاخص مثبت و ۹۳ درصد نشان داد (شکل ۶).



شکل ۶ نمودار رابطه همبستگی ارزش رنگ و رشد *E. coli*

بحث

وقوع فساد میکروبی در ماهی منجر به کاهش ارزش غذایی و به خطر افتادن امنیت غذایی مصرف کننده می‌شود. یکی از گازهای شاخص تازگی در سردخانه، ماشین‌های حمل و نقل، بسته‌بندی ماده غذایی H₂S است که نشان‌دهنده رشد میکروبی موثر بر عمرماندگاری می‌باشد (۲۶، ۲۷، ۲۸). این گاز در اثر تجزیه ترکیبات پروتئینی حاوی اسید آمینه‌های گوگردی مانند سستین، و متیونین توسط انواع مختلفی از باکتری‌ها تولید می‌شود (۲۷، ۲۸). شرایط رشد باکتری‌هایی که قابلیت تجزیه این اسید آمینه را دارند به شرایط دمایی، حضور یا نبود اکسیژن بستگی دارد (۲۹، ۳۰). لذا با بررسی این گاز میتوان به شرایط نگهداری محصول تا مصرف پی برد؛ به همین علت قابلیت تشخیص کیفیت میکروبی ماهی توسط حسگر در دماهای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد در این پژوهش بررسی شد. مطابق منابع مطالعه شده در راستای ساخت حسگرها تغییر ارزش رنگ باید دارای همبستگی پیرسون مثبت و معنی‌دار با حد مجاز به مصرف بار باکتریایی کل یا مزوفیل در گونه‌های آب شیرین لگاریتم (۱-۵ CFU/g⁻¹) باشد، تا عملکرد حسگر در تشخیص کیفیت تازگی دارای اعتبار باشد (۲۶، ۲۷، ۲۹). مطابق نتایج بررسی دوره نگهداری سه روزه (شکل ۳) تغییر رنگ حسگر از کرم به سیاه در روز دوم نگهداری مطابق با رسیدن بار باکتریایی به حد مجاز مصرف نشان‌دهنده پایان عمر ماندگاری و فساد میکروبی در بسته‌بندی بوده است. همبستگی تغییر ارزش رنگ حسگر با میزان بار باکتریایی کل (جدول ۱) با

سایر پژوهش‌های انجام شده روی بسته‌بندی هوشمند دارای مطابقت بوده است (۳۰، ۳۱، ۳۲). مطابق نتایج بدست آمده از نگهداری ماهی با دمای یخچال (شکل ۶) افزایش تعداد باکتری‌های کل، سرماگرا و تولیدکننده H_2S با طول مدت نگهداری دارای رابطه همبستگی معنی داری بوده است یعنی با افزایش مدت زمان نگهداری ماهی بسته‌بندی در دمای یخچال تعداد جمعیت این نوع باکتری‌ها در هر سه تیمار افزایش داده است. این نتیجه با تمامی پژوهش‌های انجام شده روی موضوع نگهداری مواد غذایی در دمای یخچال در تطابق است و مطابق نظر تمامی مطالعات یکی از دلایل اصلی افت کیفیت و بروز فساد در مواد غذایی افزایش تعداد باکتری‌ها است (۳۳، ۳۴، ۳۵). در پژوهش Mary و همکارانش (۲۰۲۰) قابلیت شناسایی فساد میکروبی میگو در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (۳۳) با حسگری ساخته شده از فیلم نشاسته و آنتوسیانین گل کاغذی بررسی شد، این حسگر از قرمز به سبز تغییر میکند که با فساد میکروبی همانند ساخت حاضر دارای همبستگی بوده است. در نگهداری ماهی با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد میزان باکتری‌های گرم منفی سرماگرا نقش مهمی دارند، مطابق نتایج بدست آمده میزان بار باکتریایی آن‌ها در دوره نگهداری تمامی تیمارها افزایش معنی داری داشته است ($P \leq 0/05$) که با افزایش ارزش رنگ حسگر دارای همبستگی مثبت معنی دار بود. در بررسی نتایج پژوهش Shukla و همکاران (۲۰۱۵) بر کیفیت تازگی گوشت بوفالو با بسته‌بندی هوشمند نیز میزان رشد باکتری‌های کل و سرماگرا با افت کیفیت و تغییر رنگ حسگر تازگی دارای رابطه مستقیم بود که در این رابطه نیز نتایج مشابهی در تشخیص فساد به کمک تجمع گاز حاصل از فساد میکروبی اما به لحاظ دقت و سرعت تشخیص حسگر ساخته شده در این پژوهش دارای برتری است. همچنین در بررسی همبستگی میان رشد باکتری‌های کل، تولیدکننده H_2S و انتروباکتریاسه و میزان فساد نیز نتایج مشابهی با پژوهش حاضر بدست آوردند (۷). از جمله دلایل دیگر افزایش گاز H_2S در فضای بسته‌بندی میتوان به فعالیت انزیمی رشد باکتری‌ها اشاره نمود در این رابطه میتوان به نتایج مشابه Bhadra و همکارانش (۲۰۱۵) تغییر در ترکیب گاز بسته‌بندی بر اثر افزایش لگاریتم باکتریایی طی فرایند فساد در هر دو دوره نگه داری با دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به ثبت رسید که مشابه نتایج به دست آمده در پژوهش روی تیلایپا است. در پژوهش دیگری بر خامه ماهی (۱۳) مشخص شد این تغییر ناشی از تجمع طی گازهای آمونیاک، دی سولفید هیدروژن و کربن دی اکسید است که با یافته‌های این پژوهش دارای همسویی است. یکی دیگر از مطالعات اخیر انجام شده روی قابلیت تشخیص فساد با بسته‌بندی هوشمند میتوان به پژوهش Yong و همکاران (۲۰۱۹) اشاره نمود (۳۵).

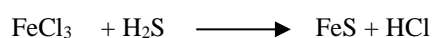
حسگر علاوه بر شناسایی فساد میکروبی باید قابلیت تشخیص آلودگی پاتوژن‌های بیماری‌زای مواد غذایی را نیز داشته باشد در پژوهش‌های بسیاری قابلیت تشخیص باکتری‌های مختلف بررسی شده است (۲۹، ۳۳، ۳۵). با توجه به اهمیت تشخیص آلودگی کلی فرم‌ها بر اثر رعایت نمودن بهداشت توسط کارگران خط تولید قابلیت حسگر در این رابطه سنجیده شد. نتایج (جدول ۲ و شکل ۵) نشان‌دهنده همبستگی نتیجه تغییر رنگ در طول دوره با پژوهش‌های انجام شده در رابطه با اثر رشد باکتری‌های شاخص از جمله باکتری *E. coli* همسو است و حسگر می‌تواند رشد این عامل مسمومیت‌زا را پیش از غلظت بیماری‌زایی با ۹۳ درصد همبستگی شناسایی کند (۳۳، ۳۴) نتایج این بررسی نشان‌دهنده تغییر ارزش رنگ مطابق با رشد باکتری شاخص حسگر در دمای محیط با ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. مقایسه ویژگی‌های عملکردی در کنار قیمت تمام شده با موارد مشابه نشان داد که نتایج بدست آمده نشان‌دهنده برتری حسگر ساخته شده بود (۱۹، ۲۳، ۲۹).

همانطور که در آزمون‌های سنجش قابلیت تشخیص کیفیت میکروبی بالا مطرح شد رنگ حسگر بر اثر افزایش بار میکروبی از کرم به مشکی تغییر میکند (شکل ۴). در پژوهش حاضر طراحی حسگر H_2S با الهام از پدیده Black Spot صنعت کنسروسازی که در

آن گاز H₂S با آهن آزاد موجود در عضله ماهی تون واکنش داده و تولید ماده سیاه‌رنگی به نام آهن سولفید (FeS) می‌نماید (۱۴)، انجام شد (۱۴). بروز این لکه های سیاه رنگ در کنسروسازی یک پدیده مضر و نامطلوب است و منجر به کاهش بازارپسندی کنسرو ماهی می‌شود (۱۴). آهن (III) کلرید حسگر در اثر واکنش با گاز H₂S تولید آهن سولفید (FeS) نموده و به‌عنوان شناساگر طیف رنگی شیری به سفید، زرد، قهوه‌ای و سیاه را طی مدت نگهداری و رشد باکتری‌ها نشان می‌دهد. از دلایل تغییر رنگ حسگر با شناسایی گاز H₂S پس از نصب در بسته‌بندی ماهی قزل‌آلا می‌توان به واکنش مشابه عنصر آهن (رابطه ۲) با گاز H₂S اشاره نمود که با نتایج پژوهش انجام شده توسط Smolander و همکارانش (۲۰۰۲) روی ساخت بسته‌بندی هوشمند مرغ کبابی با استفاده از شناساگر آگارز/ هموگلوبین مشابه بود (۱۵).

واکنش آهن کلرید با گاز H₂S به‌صورت رابطه زیر بیان میشود (رابطه ۲):

رابطه ۲



نتیجه گیری کلی

به‌عنوان نتیجه کلی این مطالعه، به علت تغییر رنگ بصری بسیار واضح حسگر تمامی افراد در زنجیره شیلاتی اعم از بخش‌های تولیدکننده، عرضه‌کننده و مصرف‌کننده به آسانی و با صرف کمترین هزینه می‌توانند از این روش به‌منظور تشخیص کیفیت تازگی محصول بسته‌بندی شده استفاده نمایند. این ساخت می‌تواند در آینده برای تعیین کیفیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با هدف کاهش هزینه‌های تعیین کیفیت، افزایش سلامت غذایی ناشی از کاهش مسمومیت و رفع نیاز مصرف‌کنندگان در تشخیص سلامت و کیفیت تازگی فرآورده‌های بسته بندی مورد استفاده تجاری قرار گیرد.

سپاسگزاری

از کارشناسان محترم آزمایشگاه منابع طبیعی و علوم دریایی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس آقایان دکتر کمالی، مهندس نورانی و مهندس حسینی به سبب همکاری در پیش برد این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Xie, X., et al., Generational Differences in Perceptions of Food Health/Risk and Attitudes toward Organic Food and Game Meat: The Case of the COVID-19 Crisis in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020. 17(9): p. 3148.
2. Ghosh, S., et al., Implementations of Food Safety Measures Inside Food Processing Industries & Prepared Food Outlets During COVID-19 Pandemic, 2020. 17(9): p. 3148.
3. Heising, J., et al., A non-destructive ammonium detection method as indicator for freshness for packed fish: Application on cod. *Journal of Food Engineering*, 2012. 110(2): p. 254-261.
4. Kerry, J. and P. Butler, *Smart packaging technologies for fast moving consumer goods*. 2008: Wiley Online Library. 348.
5. Kalhoff, H., et al., Fate of a food nudging intervention during the Corona-pandemic: unexpected shopping ban on a small clinic bistro. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2020: p. 1-3.
6. RANKA, M.S., How Corona Virus could Affect the Culture of Eating Special Reference to Street Food: THE NEW NORMAL. 2020.

7. Shukla, V., G. Kandeepan, and M.R. Vishnuraj, Development of On-Package Indicator Sensor for Real-Time Monitoring of Buffalo Meat Quality During Refrigeration Storage. *Food Analytical Methods*, 2015: p. 1-7.
8. Han, J., *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Science & Technology Books, 2005: p. 509.
9. Fuertes, G., et al., Nanosensors for a Monitoring System in Intelligent and Active Packaging. *Journal of Sensors*, 2016. 501: p. 7980476.
10. Biji, K., et al., Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2015: p. 1-11.
11. Heising, J., et al., Non-destructive sensing of the freshness of packed cod fish using conductivity and pH electrodes. *Journal of Food Engineering*, 2014. 124: p. 80-85.
12. Realini, C.E. and B. Marcos, Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat science*, 2014. 98(3): p. 404-419.
13. Bhadra, S., et al., Non-destructive detection of fish spoilage using a wireless basic volatile sensor. *Talanta*, 2015. 134: p. 718-723.
14. shirazi, h.r., *seafood technology: processing science*. 1381 (2).
15. Smolander, M., et al., Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2002. 3(3): p. 279-288.
16. Kuswandi, B., et al., Real-time monitoring of shrimp spoilage using on-package sticker sensor based on natural dye of curcumin. *Food Analytical Methods*, 2012. 5(4): p. 881-889.
17. bahmani, z.a., khanipoor, a, a., Oromieie, a., and motalebi, a., Application of freshness indicator in smart packaging of rainbow trout fillets during refrigerator storage, *iranian fishery sience journal*, 2016. 25(3): p. 121-132.
18. Chen, H., et al., A visible colorimetric fluorescent probe for hydrogen sulfide detection in wine. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2019. 2019.
19. Zhang, C., et al., Time-Temperature indicator for perishable products based on kinetically programmable Ag overgrowth on Au nanorods. *ACS nano*, 2013. 7(5): p. 4561-4568.
20. Sarfraz, J., et al., Printed copper acetate based H₂S sensor on paper substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. 173: p. 868-873.
21. Jiang, X., et al., Future Perspectives Towards the Use of Nanomaterials for Smart Food Packaging and Quality Control. *Particle & Particle Systems Characterization*, 2015. 32(4): p. 408-416.
22. Atef, M., M. Rezaei, and R. Behrooz, Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocolloids*, 2015. 45: p. 150-157.
23. Yaghoobzadeh, z. and Safari, r., 1393. Effect of Boiss Zataria Multiflora Essential Oil on Escherichia coli and Listeria monocytogenes Inoculated into Ground Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), 24(120): p. 100-107.
24. Abdollahzadeh, E., Rezaei, m., Hosseini, h., Safari, r., and Yaghoobzade, z., 1390. Inhibitory Effect of Nisin on Listeria monocytogenes Inoculated into Surimi and Minced Meat, 6 (4): 221-226
25. *Microbiology of Food and Animal Feed - Test Preparation, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiology Test - Part 3: Special Regulations for the Preparation of Fish and Its Products*, 2006: Iranian Institute of Standards and Research.
26. Jonušaitė, K., Venskutonis, P.R., Martínez-Hernández, G.B., Taboada-Rodríguez, A., Nieto, G., López-Gómez, A. and Marín-Iniesta, F. 2021. Antioxidant and Antimicrobial Effect of Plant Essential Oils and Sambucus nigra Extract in Salmon Burgers. *Foods*, 10(4): 776.
27. Fang, H., et al., Ppb-level H₂S gas sensor based on CuNi-MOFs derivatives for meat freshness detection at low temperature environment. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022. 368: p. 132225.
28. Al Shboul, A.M., et al., Hydrogen sulfide gas detection in ppb levels at room temperature with a printed, flexible, disposable In₂O₃ NPs-based sensor for IoT food packaging applications. *Advanced Materials Technologies*, 2022.
29. Huang, X., et al., Hydrogen sulfide gas sensing toward on-site monitoring of chilled meat spoilage based on ratio-type fluorescent probe. *Food Chemistry*, 2022. 396: p. 133654.
30. Wang, B., et al., Reversible AIE-active fluorescent probe with a large emission peak shift for ratiometric detection of food freshness indicator H₂S. *Food Chemistry*, 2022. 386: p. 132768.
31. Qiu, S., et al., Highly selective colorimetric bacteria sensing based on protein-capped nanoparticles. *Analyst*, 2015. 140(4): p. 1149-1154.

32. Musso, Y.S., P.R. Salgado, and A.N. Mauri, Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocolloids*, 2019. 89: p. 674-681.
33. Mary, S.K., et al., Development of starch based intelligent films by incorporating anthocyanins of butterfly pea flower and TiO₂ and their applicability as freshness sensors for prawns during storage. *RSC Advances*, 2020. 10(65): p. 39822-39830.
34. Maa, Q., et al., Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness. *Food Packaging and Shelf Life*, 2021. 28.
35. Yong, H., et al., Development of antioxidant and intelligent pH-sensing packaging films by incorporating purple-fleshed sweet potato extract into chitosan matrix. *Food Hydrocolloids*, 2019. 90: p. 216-224.
36. Thakur, B., et al., Polyaniline nanoparticle based colorimetric sensor for monitoring bacterial growth. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. 207: p. 262-268.

Construction of H₂S Sensor Based on FeCl₃ /Cellulose Acetate Substrate to Detect Microbial Spoilage in Rainbow Trout Pack

Tara Zarei¹, Masoud Rezaei^{*1}, Nader Bahramifar²

¹ Seafood processing technology, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

^{*2}Environmental science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

ABSTRACT

Rainbow trout have found a good place in the household food basket due to their valuable nutritional properties. Therefore, supply in the form of hygienic packaging of this product due to CORONA pandemic in the country will be inevitable. This research has been done in order to provide intelligent packaging with the ability to detect microbial spoilage of rainbow trout. Fish fillet was packaged with H₂S gas sensor based on FeCl₃/Cellulose acetate. These packages were examined for total bacteria, temperatures swing, H₂S producing bacteria and *Escherichia coli* (1×10⁴CFU/ml) during storage at 25 ° C for 3 days as well as storage at 4 ° C for 16 days. After imaging the correlation, the color changes of the sensor were calculated and evaluated as the color value. Sensor performance in terms of color change was significant (P <0.05) and the correlation between sensor color value and total bacterial growth in a 3-day period was 0.901. In order to accurately identify the growth of *Escherichia coli*, the correlation of Pearson color value and bacterial growth was equal to 0.932. Also, in the study the correlation between the color value with the number of total bacteria, temperatures swing bacteria and H₂S producing bacteria were 0.835, 0.869 and 0.836, respectively. Using a sensor with a combination of iron (III) chloride and cellulose acetate to determine the microbial spoilage of rainbow trout can be used in the future as a consumer-centric quality control method that can be commercialized.

KEYWORDS: Quality Control, Intelligent Packaging, H₂S Sensor, Rainbow Trout, *Escherichia coli*.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 12 oct 2023

Accepted: 4 Feb 2024

ePublished: 20 Feb
2024

* Corresponding Author:

Email address: rezaei.ma@modares.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513