# تشخیص فساد ماهی قزل آلا (*Salmo trutta*) در طول نگهداری با استفاده از یک سنسور رنگ سنجی کاغذی ساده

مرجان مجدی نسب*[۱]، مرضیه سپیدنامه[۲]، منیژه نگهداری فر[۲]

۱- دکترای علوم و صنایع غذایی و استادیار بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز
۲- دانشجویان کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه شیراز

**(تاریخ دریافت: ۹۵ /۱۲/۰٤ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰٦/۲۸)**

## چکیده

در این پژوهش یک سنسور رنگ سنجی ساده و حساس به تغییرات pH به منظور تشخیص فساد ماهی در طول نگهداری در دمای محیط و دمای یخچال ارائه شده است. به منظور توسعه این سنسور از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و رنگدانه های محلول در آب آنتوسیانین استخراجی از کلم قرمز استفاده شده است و تشخیص فساد ماهی بر مبنای تغییرات رنگ آنتوسیانینها در مقادیر مختلف pH میباشد .رشد میکروارگانیسمها در طول نگهداری ماهی و تولید پروتئازهای میکروبی توسط آنها منجر به تجزیه پروتئینهای ماهی و تولید آمینهای فرار شده که با تجمع در بسته بندی ماهی باعث قلیایی کردن محیط و تغییر در رنگ کاغذ صافی محتوی آنتوسیانین خواهد شد. این تغییرات رنگ با استفاده از سیستم CIELab مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تأیید استفاده از این سنسور در تشخیص فساد ماهی، آزمایشات دیگری از قبیل بررسی تغییراتpH، اندیس تیوباربیتیوریک اسید(TBA)، میزان کل بازهای ازته فرار(TVBN)، و تعیین رشد میکروبی نمونه های فیله ماهی در طول زمان نگهداری انجام شد. نتایج نشان داد که با گذشت زمان و افزایش رشد میکروبی میزان pH، TBA و TVBN افزایش می یابد که همگی گواهی بر پیشرفت فساد ماهی میباشد. همچنین نتایج همخوانی مناسبی با تغییرات رنگ سنسور در طول نگهداری ماهی داشت و نشان داد که سیستم حساسیت بسیار خوبی نسبت به تغییرات pH ناشی از فساد ماهی دارد. بنابراین این سنسور رنگ سنجی ساده به راحتی میتواند در بسته بندی های هوشمند به کار گرفته شود.

**کلید واژگان:** سنسور رنگی، سنسور کاغذی، آنتوسیانین، فساد ماهی

* مسئول مکاتبات: majdinasab@shirazu.ac.ir

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

## ۱- مقدمه

یکی از عمده ترین چالش ها در صنعت غذا تشخیص فساد مواد غذایی به صورت کم هزینه، ساده، غیر تهاجمی و غیر مخرب است. برای رسیدن به این هدف، بسته بندی هوشمند می تواند یک گزینه خوب باشد. بسته های هوشمند توانایی نظارت بر شرایط غذایی در زمان واقعی را دارند .یک نوع از این بسته بندی های هوشمند، بسته بندی است که با استفاده از تغییرات pH قادر به شناسایی تغییرات و فساد ماده غذایی میباشد .ساده ترین این نوع بسته بندی قادر است به صورت بصری تغییرات pH ماده غذایی را در طول نگهداری به نمایش بگذارد [۱].

در بسیاری از مواد غذایی رشد میکروارگانیسمها باعث تولید انواعی از متابولیتها می شود که قادر به تغییر pH میباشند . یکی از این مواد غذایی ماهی است .ماهی، منبعی غنی از اسیدهای چرب امگا ۳ به ویژه اسیدهای ایکوزانوئیک و دوکزاهگزانوئیک میباشد که دریافت کافی آنها در رژیم غذایی روزانه، به دلیل آثار مفید تغذیه ای، جلوگیری و درمان احتمالی بسیاری از بیماریها و اختلالات قلبی اخیرا مورد توجه بسیاری از کارشناسان قرار گرفته است [۲]. ماهی دارای ارزش تغذیه ای بسیار بالایی است و اکثر مواد مغذی مفید و ضروری برای انسان را به تنهایی داراست. علیرغم ارزش تغذیه ای بالای آن، یکی از عمده ترین مشکلات آن فسادپذیری سریع و بالای آن در طول نگهداری میباشد که در صورت عدم ایجاد شرایط مناسب نگهداری علاوه بر زیانهای اقتصادی، مشکلات سلامتی را نیز به همراه دارد .فساد پذیری ماهی پدیده چندان پیچیده ای نیست. عوامل مختلفی بعد از صید میتوانند فعال شده و شرایط را برای تجزیه و فساد بافت های ماهی فراهم کنند .یکی از عواملی که در فساد پذیری ماهی ها تاثیر میگذارد، فعالیت آنزیم ها بعد از صید است .بسیاری از آنزیمها که در زمان زنده بودن ماهی کاملا در کنترل بودهاند، بعد از صید از کنترل خارج شده و شروع به فعالیت های تخریبی میکنند که از جمله آنها تجزیه پروتئین ها و لیپیدها میباشد .با توجه به ساختمان سه بعدی آنزیمها فعالیت هر گروه بسته به ساختمان آنها در دمای خاصی صورت میگیرد، ولی بطور کلی با کاهش دما فعالیت آنزیم ها بطور قابل ملاحظه ای کم میشود [۳].

از عوامل دیگری که در فساد ماهی دخیل میباشد فعالیت میکروارگانیسمها بالاخص باکتریها میباشد. باکتریهای گوناگونی از جمله سودوموناس ها، آلتروموناس و یا پروتئوس و... میتوانند از نیتروژن غیر پروتئینی موجود در ماهی ترکیباتی تولید کنند که هر کدام به نوبه خود اثراتی مخرب و نابود کننده داشته باشند. در این تبدیل برخی ترکیبات از جمله تری متیل آمین اکسید TMAO بعنوان ماده اولیه مناسب محسوب میگردد که توسط این میکروارگانیسمها به تری متیل آمین تبدیل میشود که یکی از مهمترین ترکیبات شاخص در فساد ماهی میباشد. اکثر ترکیبات که حضور آنها نشانه فساد ماهیها است، از دسته مواد فرار یا آلی حلقوی میباشند [٤]. میکروارگانیسم های فسادزا ماهی با تخریب پروتئینها باعث تولید آمینهای فرار از جمله تری متیل آمین (TMA)، دی میتل آمین (DMA)، آمونیاک، هیستامین، پوتریسین و کاداورین میشوند [۵].

آنتوسیانین ها رنگدانه های محلول در آبی هستند که قابلیت کاربرد در بسیاری از محصولات غذایی را دارا میباشند. آنها ترکیبات فلاوونوئیدی بوده که مسئول ایجاد رنگها قرمز، ارغوانی، بنفش و آبی در بسیاری از میوه ها و سبزیجات میباشند. کلم قرمز (*Brassica oleracea* L.) یک منبع خوراکی با میزان بالای آنتوسیانین میباشد. عصاره آنتوسیانینی کلم قرمز دارای مقادیر قابل توجهی از آنتوسیانین های سیانیدینی مونو و دی آسیله شده میباشد. نوع و آسیله شدن آنتوسیانینها دو فاکتور مهمی هستند که ویژگیهای رنگی آنها را در مقادیر معین pH تعیین میکنند .به واسطه ترکیب آنتوسیانینی آن، عصاره کلم قرمز می تواند طیف وسیعی از رنگها را از نارنجی-قرمز تا ارغوانی و آبی تحت شرایط pH محیط نشان دهد .بنابراین می تواند به عنوان یک شاخص pHمورد استفاده قرار گیرد.

تاکنون پژوهش های زیادی در زمینه طراحی سنسورهای تشخیص فساد ماهی صورت گرفته است که هر یک از مزایا و معایب خاص خود برخوردار بوده اند. در یکی از این تحقیقات، فیلم های پلی آنیلین رنگی برای توسعه بسته بندی های هوشمند به عنوان یک سنسور شیمیایی برای کنترل فساد میکروبی ماهی بسته بندی شده مورد استفاده قرار گرفتند. شاخص این بسته بندی فیلم های پلی آنیلین بودند که براساس تغییر رنگ به تغییرات آمین فرار در طول دوره نگهداری ماهی، فساد آن را تشخیص میدادند. در این پژوهش ویژگی فیلم پلی آنیلین در تماس با آمینهای فرار بررسی شد. همچنین مشخص



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

شد که این فیلم ها ارتباط خوبی با الگوی رشد میکروبی ماهی دارند، اما این فیلمهای پلی آنیلی از قیمت بالایی برخوردار بودند و تولید بسته بندی هوشمند توسط این فیلمهای پلی آنیلی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبود [٦]. همچنین در پژوهشی یک سنسور گازی کاغذی در بسته بندی موادغذایی استفاده کردند که مکانسیم آن تغییر رنگ در اثر تماس با ترکیبات نیتروژنی فرار بوده است. در طراحی این سنسور از ذرات ریز ساختار خاک دیاتومه، پلی وینیل الکل و رنگهای حساس به pH استفاده شده بود .حساسیت این سنسور کاغذی با آمونیاک مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج خوبی بدست آمد اما مشکل این سنسور عدم توانایی در نشان دادن روند فساد در طی نگهداری بود [۷]. بنابراین با توجه به توضیحات ذکر شده هدف از این پژوهش بهینه سازی یک سنسور رنگسنجی ارزان با استفاده از آنتوسیانین استخراج شده از کلم قرمز و کاغذ صافی واتمن شماره ۱ برای تشخیص فساد ماهی با توجه به آزاد شدن ترکیبات فرار آمینی بود که قادر باشد روند و میزان فساد را در طول نگهداری تشخیص دهد.

## ۲- مواد وروشها

### ۲-۱- مواد مورد نیاز

کلم قرمز (*Brassica oleracea* L.)و ماهی قزل آلای (*Salmo trutta*) صید شده در فصل زمستان از بازارهای محلی شیراز خریداری شد. کاغذ واتمن شماره ۱، اتانول، اکسید منیزیم، اسید بوریک، متیل رد، و اسید سولفوریک از شرکت سیگما (St. Louis, USA) خریداری شدند.

### ۲-۲- استخراج عصاره از کلم قرمز

استخراج عصاره از کلم قرمز با روش مایکروویو صورت گرفت .از مایکروویو با توان ۲۰۰ وات به مدت 5دقیقه استفاده شد .کلم قرمز کاملا خرد شده درون آب مقطر ریخته شد و سپس در معرض امواج مایکروویو قرار گرفت .بعد از استخراج عصاره کاغذهای صافی در ابعاد معین برش داده شدند، سپس این کاغذها به عصاره رنگی حاوی آنتوسانین آغشته شدند .حدود ۳۰ گرم ماهی به دقت توزین شد و در درون پلیتهای ۸ سانتیمتری قرار گرفت .کاغذ صافیهای آغشته به عصاره کلم قرمز در قسمت پایین درب پلیت چسبانده شدند .به منظور جلوگیری از خروج ترکیبات فرار حاصل از فساد ماهی دور پلیتها به صورت کامل با پارافیلم پوشانده شد. تغییرات رنگی کاغذ صافی به مدت ۱۲روز در دمای یخچال و ٦٤ ساعت در دمای محیط مورد بررسی قرارگرفت [۱].

### ۲-۳- ارزیابی میکروبی

برای شمارش تعداد باکتریهای موجود در نمونهها در طول دوره نگهداری، در هر بازه زمانی ۱۰ گرم از نمونه گوشت ماهی در شرایط استریل با ۹۰ میلی لیتر محلول نمک طعام ۰/۸۵ درصد با کمک استوماکر هموژن شد. از این محلول جهت تهیه رقت های متوالی و شمارش باکتریایی مورد نظر با قرار دادن در محیط کشت مناسب و دمای مخصوص هر باکتری استفاده گردید [۸].

#### ۲-۳-۱- شمارش کلی باکتریهای سرمادوست

به منظور شمارش باکتریهای سرمادوست در طول نگهداری ماهی، یک میلیلیتر از رقت های مورد نظر در محیط کشت پلیت کانت آگار به صورت پورپلیت دو لایه کشت داده شد و پلیت ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۷ °C نگهداری شدند [۸].

#### ۲-۳-۲- شمارش کلی باکتریهای هوازی مزوفیل

بدین منظور یک میلی لیتر از رقت های مورد نظر در محیط کشت پلیت کانت آگار به روش پور پلیت دو لایه کشت داده شد و پلیت ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند [۸].

### ۲-٤- آنالیز شیمیایی نمونه ها

#### ۲-٤-۱- ارزیابی pH

۵ گرم از نمونه ماهی هموژن شده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و در نهایت pH نمونه با دستگاه pH متر که با بافر ٤ و ۷ استاندارد شده بود خوانده شد.

#### ۲-٤-۲- اندازه گیری میزان ترکیبات ازته فرار

اندازه گیری میزان ترکیبات ازته فرار موجود در نمونه به روش تقطیر کلدال صورت گرفت .بدین منظور ۱۰ گرم نمونه ماهی، ۲ گرم اکسید منیزیم، ۵۰۰ میلی لیتر آب، چند قطعه سنگ جوش و مقداری پارافین به عنوان ضد کف به بالن تقطیر کلدال اضافه شد. در یک ارلن مایر به عنوان بخش سردکننده دستگاه تقطیر، جمع آوری بازهای ازته فرار در داخل محلول شامل اسید بوریک ۲ % و چند قطره متیلرد به عنوان معرف انجام شد .سپس تیتراسیون محلول زرد رنگ حاصل با اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تا حاصل شدن رنگ ارغوانی انجام



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

گرفت .میزان ترکیبات ازته فرار به صورت میلیگرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی بیان می شود [ ۹].

**۲-٤-۳- اندازه گیری فرآوردههای ثانویه اکسیداسیون (اندیس تیوباربیتیوریک اسید)**

مقدار ۲۰۰ میلی گرم از نمونه هموژن شده ماهی در ۲۵ میلی لیتر بوتانول حل شد و ۵ میلی لیتر از محلول درون لوله آزمایش در بسته که حاوی ۵ میلی لیتر معرف واکنش پذیر تیوباربیتیوریک اسید بود ریخته شد و مخلوط به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. قبل از اندازه گیری به مدت ۱۰ دقیقه در حمام یخ قرار داده شد و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب نمونه شاهد نیز خوانده شد و میزان جذب با استفاده از معادله ۱ به اندیس تیوباربیتوریک اسید که معادل میلی گرم مالون آلدهید در یک کیلوگرم نمونه است تبدیل شد [۱۰].

$$TBA = 50 \times (A_s - A_b) / 200$$

## ۲-۵- تعیین پارامترهای رنگ سنجی

برای تعیین رنگ از دوربین دیجیتال و نرم افزار گرافیکی فتوشاپ استفاده شد .نمونهها در درون یک محفظه MDFبا زمینه سفید رنگ قرار داده شدند .پس از عکسبرداری با دوربین دیجیتال عکسها توسط نرم افزار فتوشاپ بررسی شده و فاکتورهای رنگی *L، *a و *bمشخص شدند [۱۱].

## ۲-٦- آنالیز آماری

همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد و با استفاده از تست آنالیز واریانس یک طرفه به وسیله نرم افزار SAS (ver. 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین آزمون چند دامنه ای دانکن برای مقایسه میانگین داده ها در سطح اطمینان ۰/۰۵ انجام شد. تمام نمودارها با استفاده از میکروسافت آفیس اکسل ۲۰۱۰ رسم شد.

# ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- آزمونهای میکروبی

ماهی تازه یکی از محصولات دریایی فاسد شدنی است .فساد عضله ماهی ترکیبی از مکانیسمهای مختلف از جمله فساد اکسیداسیون چربی، میکروبی و فعالیت آنزیم های درونی و همچنین قهوه ای شدن آنزیمی میباشد [۱۲]. باکتری های سایکروفیل گرم منفی گروه اصلی میکروارگانیسمهای ایجاد کننده فساد هوازی در ماهی تازه در دمای پایین هستند و گونه سودوموناسها باکتریهای اصلی در این گروه میباشند که به دلیل تولید لیپازها و پروتئازهای خارج سلولی در دماهای پایین موجب فساد کیفی فراوردههای گوشتی میگردند [۸]. به منظور ارزیابی سنسور رنگی، تغییرات در رشد باکتریهای مزوفیل و سایکروفیل در نمونه ماهی در طول ۳روز نگهداری در دمای محیط و ۱۲روز در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت .با توجه به شکل a - ۱، مقدار اولیه باکتری های مزوفیل و ساکروفیل نمونههای نگهداری شده در دمای محیط به ترتیب۴/۲۳ log CFU/g و ۳/۹۸ بود، اما به طور کلی مقدار آنها در طی مدت نگهداری افزایش یافت .همچنین با توجه به شکل b - ۱، مقدار باکتریهای مزوفیل و سایکروفیل در دمای یخچالی در طی مدت نگهداری به ترتیب از ۳/۳۵ log CFU/gو ۳/۲۰ به ۱۱/۲٤ و ۱۳/۰۵ افزایش یافت که این نتایج در توافق با سایر مطالعات انجام شده در زمینه بررسی کیفیت میکروبی ماهی قزل آلا میباشد [۱۳ و ۹]. براساس استاندارد بین المللی میکروبیولوژی مواد غذایی حداکثر مقدار میکروبی قابل قبول در ماهی تازه ۷ log CFU/g میباشد [۱٤]. نمونه های ماهی بعد از ۱۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق و ۳ روز در دمای یخچالی به این مقدار قابل قبول رسیده اند .با مقایسه این نتایج با نتایج آنالیز رنگ سنجی *L، *a و (*b سنسور کاغذی ) جدول ۱ و ۲ می توان مشاهده نمود که تغییرات رنگ ایجاد شده توسط این سنسور در طول نگهداری نمونههای ماهی متناسب با افزایش جمعیت میکروبی نمونهها در طول این دوره بود .کاهش فاکتور *a نشان دهنده فساد ماهی، در اثر افزایش تولید آمین، افزایش pH و سبز شدن کاغذ صافی می باشد. این پارامتر تا روز هفتم نگهداری در دمای یخچال به کمترین مقدار خود رسیده و سپس مجددا افزایش یافته است اما روند کلی یک روند کاهشی بوده است. اما در مورد فاکتور *b که افزایش آن نشان دهنده زرد شدن کاغذ صافی است روند افزایش یک روند کاملا منظم است و متناسب با افزایش رشد میکروبی در طول نگهداری، این فاکتور نیز افزایش یافته است. نقطه شروع تغییر رنگ کاغذ صافی در نمونههای یخچالی، روز سوم یعنی همان زمانی بوده است که جمعیت میکروبی به حدی افزایش یافته (log CFU/g 8) که قادر به ایجاد علائم



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

فساد شده است .در مورد نمونه ها نگهداری شده در دمای محیط نیز فاکتورهای (a*و b* به ترتیب یک روند کاهشی) سبز شدن کاغذ صافی (و افزایشی) زرد شدن کاغذ صافی را دنبال نموده اند که متناسب با افزایش رشد میکروبی در این دوره بوده است. نقطه شروع تغییر رنگ کاغذ صافی در نمونه های نگهداری شده در دمای محیط نیز ساعت دوازدهم بوده است که با توجه به نمودار a - ۱ جمعیت میکروبی به بیشترین مقداری که قادر به ایجاد علائم فساد میشود رسیده است.

بنابراین سنسور طراحی شده، قادر است به درستی تغییرات میزان ترکیبات نیتروژنی فرار در سرفصای بسته بندی ماهی تشخیص داده و با تغییر رنگ نسبت به آنها عکس العمل نشان دهد.

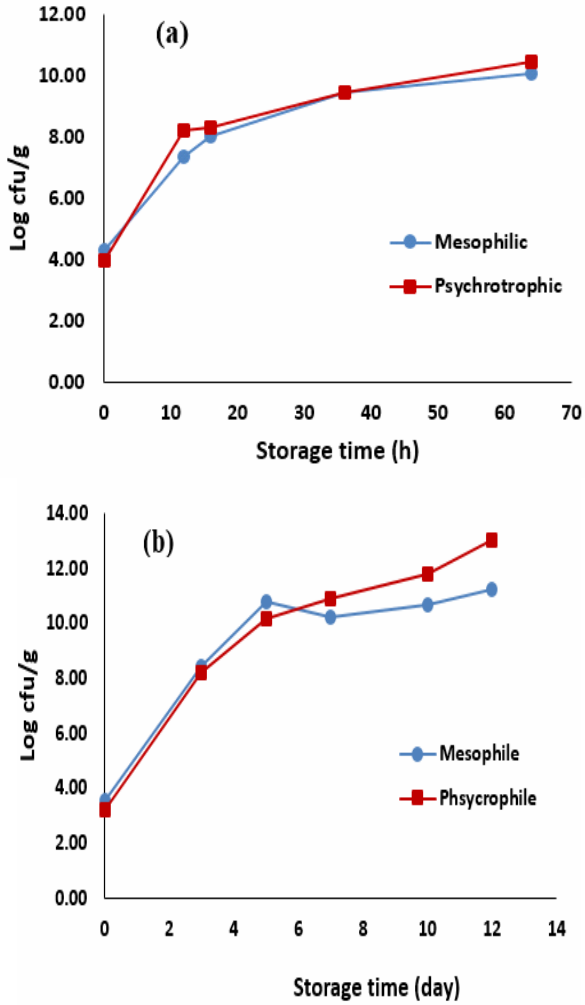



**Fig 1** Changes in mesophilic and psychrotrophic counts of fish samples during storage: a) at room temperature, and b) at refrigeration temperature.

## ۳-۲- آزمونهای شیمیایی

### ۳-۲-۱- تغییرات pH

یکی از مهمترین ویژگیهای ماهی pH بالای آن بعد از مرگ است .افزایش pHماهی در طی دوره نگهداری ممکن است مربوط به تولید ترکیباتی مثل تری متیل آمین (TMA)، دی متیل آمین (DMA) و آمونیاک توسط باکتری های عامل فساد باشد [۱۵]. با توجه به شکل a - ۲ و b - ۲، pH ماهی به ترتیب در طی نگهداری در در شرایط محیطی از۶/۰۵ به ۶/۳۴ و در شرایط یخچالی از ۶/۲۱ به ۷/۰۷ با سطح معنیداری کمتر از ۰/۰۵ افزایش یافت .افزایش pH ناشی از رشد میکروارگانیسم ها، تجزیه پروتئین ها و تولید بازهای ازته فرار میباشد که باعث تغییر رنگ کاغذ صافی محتوی آنتوسیانین میشود. کاهش ناگهانی pH بعد از ۱۰ روز نگهداری در دمای یخچال و بعد از ۳۶ ساعت نگهداری در دمای اتاق میتواند به علت رشد باکتریهای اسید لاکتیک و تولید اسید لاکتیک توسط آنها باشد.

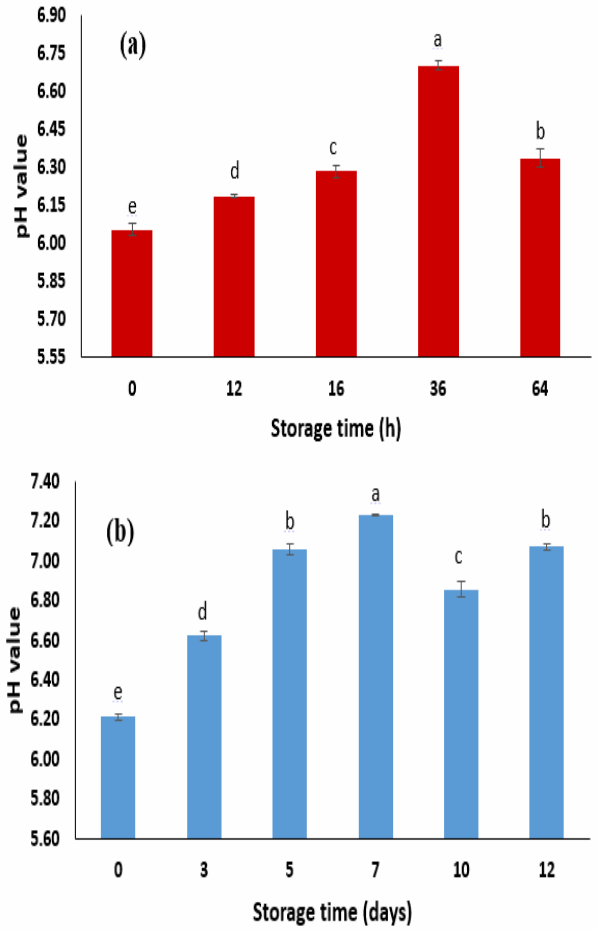


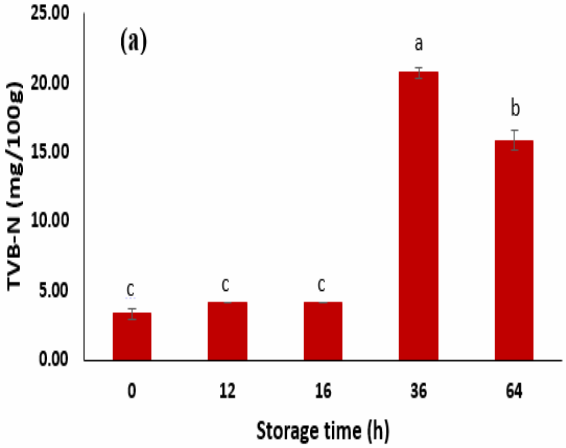

**Fig 2** Changes in pH values of fish samples during storage: a) at room temperature, and b) at refrigeration temperature. Different letters at different sampling times indicate significant differences ($p < 0.05$).



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

### ۳-۲-۲- میزان ترکیبات ازته فرار

یکی از مهمترین شاخص های اندازه گیری کیفیت ماهی میزان ترکیبات ازته فرار (TVB-N) میباشد. این ترکیبات شامل آمونیاک، آمینهای نوع اول، دوم و سوم است [۱۶و ۱۷]. شکل 3-aمیزان ترکیبات فرار حاصل از ماهی در دمای محیط را در مدت 64ساعت نگهداری نشان میدهد .بر این اساس مقدار این ترکیبات در زمان صفر ۳/۳۲ g /mg ۱۰۰ بود و بعد از ۳۶ ساعت به حداکثر مقدار خود یعنی ۲۰ /۷۰ g / mg ۱۰۰ رسید اما در ساعت ٤٦ به طور ناگهانی کاهش یافت .این روند در نمونه های نگهداری شده در دمای یخچال نیز مشاهده شد.



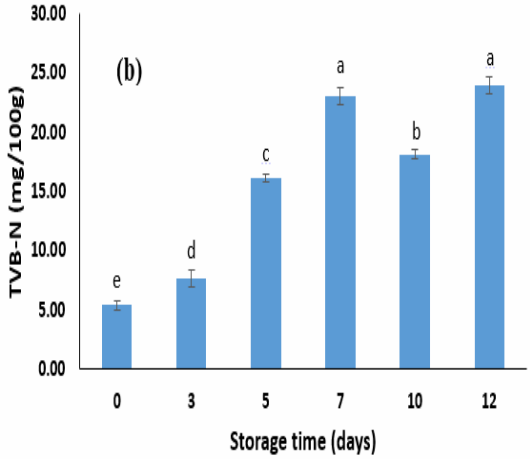




**Fig 3** Changes in TVB-N values of fish samples during storage: a) at room temperature, and b) at refrigeration temperature. Different letters at different sampling times indicate significant differences ($p < 0.05$).

شکل b – ۳ میزان ترکیبات ازته فرار را در دمای یخچال به مدت ۱۲ روز نگهداری نشان میدهد .در این نمونه میزان ترکیبات فرار از ۱۰۰g /mg ۳۷/۰۵ g در زمان صفر به ۱۰۰/ mg ۹۹/۲۲g در روز هفتم رسید و سپس در روز دهم به ۱۰۰ / mg ۱٤/۱۸ g کاهش و یافت و مجدداً در روز داوزدهم به ۱۰۰/ mg ۲٤/۰۱g افزایش یافت . افزایش تولید این ترکیبات در طی دوره نگهداری به دلیل رشد باکتریهای مزوفیل و سایکروتروف است .این میکروارگانیسمها از طریق تجزیه پروتئینها و لیپیدها منجر به افزایش تولید ترکیبات نیتروژنی فرار میشوند .روند کلی افزایش میزان ترکیبات ازته فرار در طول نگهداری ماهی در دمای یخچل و دمای محیط همخوانی مناسبی با تغییرات رنگ سنسور داشت . به طوری که با افزایش تولید ترکیبات ازته و تجمع آنها در سرفضای بستهبندی ماهی، pH محیط به سمت قلیایی پیش رفته و ترکیبات آنتوسیانینی موجود در کاغذ صافی در برابر این تغییرات pH تغییر رنگ میدهند .در نمونههای نگهداری شده در دمای محیط افزایش TVB-Nاز ۱۰۰ /mg ۳/۳۲ در زمان صفر به ۱۰۰ / mg ٤/۰۸ g در روز دوازدهم منجر به تغییر رنگ آنتوسیانین شده که کاهش فاکتور $a^*$ مؤید آن میباشد .در نمونههای نگهداری شده در دمای یخچال نیز افزایش TVB-Nاز ۱۰۰/ mg ۵/۳۷g در زمان صفر به g ۷/٦٦ /mg ۱۰۰ در روز سوم منجر به تغییر رنگ آنتوسیانین شده که در این زمان شاهد کاهش فاکتور $a^*$ نیز بودهایم .تغییر رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار این ترکیبات آمینی در طول دوره نگهداری میباشد که در بخش آنالیز رنگسنجی و تعیین فاکتورهای Lab توضیح داده شده است.

کاهش میزان ترکیبات ازته فرار در روز ۵ و ۱۰ شرایط یخچالی و نقطه آخر نگهداری در شرایط محیطی نیز میتواند ناشی از رشد باکتریهای اسیدلاکتیک باشد که روند کاهشی pHدر طی مدت نگهداری حاکی از این پدیده بوده است .در حقیقت این باکتریها در شرایط نگهداری با تولید اسید لاکتیک باعث خنثی سازی ترکیبات قلیایی آمینی شدهاند .یکی دیگر از دلایل این کاهش میتواند ناشی از واکنش ترکیبات آمینی با محصولات ثانویه اکسیداسیون لیپیدها مانند آلدهیدها باشد .

### ۳-۲-۳- تیوباربیوتیک اسید

تیوباربیوتیک اسید شاخصی است که به طور گستردهای برای ارزیابی اکسیداسیون لیپیدها استفاده میشود .روند افزایشی این شاخص در طول مدت نگهداری ممکن است به دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسیدانها در ماهیچه باشد. طی آزمون



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

تیوباربیوتیک اسید ترکیب مالون آلدهید اندازهگیری میشود. در میان انواع مختلف مولکولهای ایجاد شده در نتیجه اکسیداسیون لیپید، انواع ثانویه آنها به عنوان ترکیبات عمده ایجاد کننده طعم اکسید شده و بوی نامطبوعی که باعث کاهش کیفیت محصول میشود، در نظر گرفته میشوند [۱۸]. اندازه گیری این شاخص درجهی اکسیداسیون ثانویه چربی را نشان میدهد [۸]. در شکل ٤-b و ٤-a این شاخص برای زمانهای مختلف در طول نگهداری ماهی ارائه شده است. تغییر در میزان TBA در طول نگهداری روند مشابه ی را با میزان TVB-Nنشان میدهد. مقدار تیوباربیوتیک اولیه در شرایط یخچالی و شرایط محیطی به ترتیب ۰/۲٤ و ۰/۰۱ بوده است. عدد TBA در طی مدت زمان نگهداری در شرایط یخچالی و محیطی به طور قابل توجهی با سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ افزایش یافت.

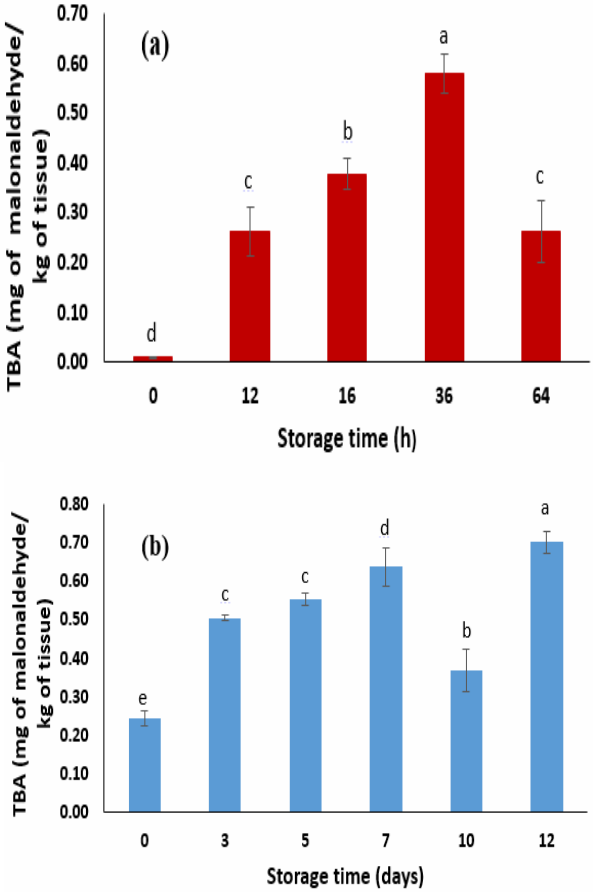



**Fig 4** Changes in TBA values of fish samples during storage: a) at room temperature, and b) at refrigeration temperature. Different letters at different sampling times indicate significant differences ($p < 0.05$).

البته یک کاهش در مقدار TBA در روز ۵ و ۱۰ در شرایط یخچالی و در نقطه پایان نگهداری نمونه ها در شرایط محیطی مشاهده شد که ناشی از واکنش آلدهیدها با ترکیبات آمینی میباشد. همان گونه که در شکل b–۳ و a–۳ مشاهده میشود مقدار ترکیبات آمینی فرار نیز در این زمان ها کاهش یافته است.

### ۳-۲-٤- تعیین فاکتورهای (*L (روشنایی)*aق(قرمزی-سبزی) و *b (زرد -آبی)

جداول ۱ و ۲میزان تغییر در فاکتور رنگی *L، *aو *b را طی دوره نگهداری نمونه های ماهی به ترتیب در شرایط محیطی و دمای یخچال نشان میدهد. براساس این نمودارها فاکتور *a قرمزی-سبزی (در ابتدا مقادیر بالایی) قرمزی را داشته است. سپس به تدریج کاهش پیدا کرده است .علت این امر برهمکنش بین ترکیبات ازته فرار حاصل از ماهی با آنتوسیانینهای موجود بر روی سطح کاغذ صافی است که از طریق تغییر pH باعث تغییرات رنگی در کاغذ صافی آغشته به آنتوسیانین میشود .همان طور که در جدول مشاهده میشود، پارامتر *a در عصاره استخراجی با مایکروویو و دمای محیط در زمان صفر بیشترین (۵/۳۳) و بعد از ٦٤ ساعت کمترین ۰/٦- مقدار را داشته است. کاهش مقدار این پارامتر رنگ سنجی به سمت اعداد منفی با گذشت زمان نشان دهنده سبزتر شدن رنگ کاغذ صافی نسبت به نمونه کنترل (بنفش) میباشد . به طور کلی در دمای محیط بعد از ۱۲ ساعت تغییرات رنگ خاصی صورت نگرفت، اما بعد از ۱٦ساعت رنگ آبی، ۳٦ ساعت رنگ سبز و در نهایت رنگ کاملا زرد بعد از ٦٤ ساعت مشاهده گردید که نشان دهنده اوج فساد ماهی بود. فاکتور *b در نمونه قرار گرفته در دمای محیط بعد از ٦٤ ساعت و در نمونه قرار گرفته در دمای یخچال بعد از روز دوازدهم به حداکثر مقدار خود رسید و در طول مدت نگهداری یک روند افزایشی را طی نمود که نشان دهنده تغییر رنگ کاغذ صافی از بنفش در زمان صفر (به زرد) در بیشترین مقدار فساد بود . همچنین در نمونه یخچالی تا روز سوم تغییرات رنگی زیادی مشاهده نشد، در روز پنجم رنگ آبی، روز هفتم رنگ سبز و روزهای ۱۰ و۱۲ که حداکثر میزان ترکیبات فرار تولید شده بود، رنگ زرد مشاهده گردید [۱].



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

**Table 1** CIElab colour parameters for paper sensor containing red cabbage extract during fish samples storage at room temperature

| $b^*$ | $a^*$ | $L^*$ | Storage time (h) |
|---|---|---|---|
| -6.0 ± 0.1 | 33.5 ± 0.0 | 42.5 ± 0.4[a] | 0 |
| -2.0 ± 0.4 | 23.0 ± 0.2 | 51.0 ± 0.2 | 12 |
| 11.0 ± 0.0 | 7.5 ± 0.1 | 59.5 ± 0.1 | 16 |
| 17.0 ± 0.4 | 0.5 ± 0.0 | 54.0 ± 0.2 | 36 |
| 28.0 ± 0.5 | -6.0 ± 0.2 | 52.0 ± 0.0 | 64 |

[a] ±SD Mean deviation of a triplicate

**Table 2** CIElab colour parameters for paper sensor containing red cabbage extract during fish samples storage at refrigerator temperature

| $b^*$ | $a^*$ | $L^*$ | Storage time (days) |
|---|---|---|---|
| -6.0 ± 0.7 | 16.0 ± 0.4 | 57.0 ± 0.4[a] | 0 |
| -3.0 ± 0.3 | 13.0 ± 0.7 | 69.5 ± 0.4 | 3 |
| 1.5 ± 0.1 | 2.5 ± 0.7 | 67.0 ± 0.7 | 5 |
| 5.0 ± 0.2 | -3.5 ± 0.3 | 43.5 ± 0.0 | 7 |
| 15.0 ± 0.5 | 1.0 ± 0.0 | 73.5 ± 0.7 | 10 |
| 21.0 ± 0.1 | 4.0 ± 0.0 | 76.0 ± 0.4 | 12 |

[a] ±SD Mean deviation of a triplicate

## ٤- نتیجه گیری

در این مقاله یک سنسور رنگسنجی بسیار ساده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 1و عصاره آبی استخراج شده از کلم قرمز که محتوی رنگدانه آنتوسیانین می باشد به منظور تشخیص فساد ماهی در طی دوره نگهداری طراحی شد .این سنسور در برابر تغییرات pHو آمینهای فرار تولید شده در طول نگهداری ماهی بسیار حساس بود .نتایج مشاهده بصری و نیز نتایج حاصل از آنالیز رنگسنجی *L، *aو *b این سنسور در توافق با مقادیر TVB-Nو الگوی رشد میکروبی بود که نشان دهندهی امکان کاربرد این سنسور به عنوان شاخص pH در تشخیص فساد ماهی و سایر محصولات با میزان پروتئین بالا می باشد .این سنسور ساده را می توان در کیسههای پلاستیکی منفذدار کوچک قرار داده و در بستهبندی محصول استفاده کرد.

## ٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از انجمن علمی دانشگاه شیراز به دلیل تأمین بودجه مالی این تحقیق ابراز میدارند.

## ٦- منابع

[1] Silva-Pereira, M. C., Teixeira, J. A., Pereira-Júnior, V. A., & Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. LWT-Food Science and Technology, 61(1), 258-262.

[2] Harris, W. S. (2004). Fish oil supplementation: evidence for health benefits. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 71(3), 208-221.

[3] Nicholson, T., Khademi, H., & Moghadasian, M. H. (2013). The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review. Food & Function, 4(3), 357-365.

[4] Schuchardt, J. P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., von Schacky, C., & Hahn, A. (2011). Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations-a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. Lipids in Health and Disease, 10(1), 1-7.

[5] Morsy, M. K., Zor, K., Kostesha, N., Sonne Alstrøm, T., Heiskanen, A., El-Tanahi, H., et al. (2016). Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring, Food Control, 60, 346-352.

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

[6] Kuswandi, B., Restyana, A., Abdullah, A., Heng, L. Y., & Ahmad, M. (2012). A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. Food Control, 25(1), 184-189.

[7] Hakovirta, M., Aksoy, B., & Hakovirta, J. (2015). Self-assembled micro-structured sensors for food safety in paper based food packaging. Materials Science and Engineering: C, 53, 331-335.

[8] Sallam, K. I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control, 18(5), 566-575.

[9] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120(1), 193-198.

[10] Cai, L., Wu, X., Dong, Z., Li, X., Yi, S., & Li, J. (2014). Physicochemical responses and quality changes of red sea bream (Pagrosomus major) to gum arabic coating enriched with ergothioneine treatment during refrigerated storage. Food Chemistry, 160, 82-89.

[11] Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. (2011). Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. Journal of Food Engineering, 106(2), 170-175.

[12] Raeisi, M., Tajic, H., Aliakbarlu, J., Mirhosseini, S. H., Hosseini, S. M. H. (2015).Effect of carboxymethyl cellulose-based coating incorporated with Zatariamultiflora Boiss. Essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. Food Science and Technology, 64, 898-904.

[13] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A., & Khazaei, N. (2014). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. International Journal of Food Microbiology, 174, 88-97.

[14] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1986). Sampling plans for fish and shellfish, ICMSF, Microorganisms in Foods, second ed. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, pp. 181-196.

[15] Goulas, A. E., & Kontominas, M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (Scomber japonicus): biochemical and sensory attributes. Food Chemistry, 93, 511-520.

[16] Ritz, C. W., Fairchild, B. D., & Lacy, M. P. (2004). Implications of ammonia production and emissions from commercial poultry facilities: a review. Journal of Applied Poultry Research, 13, 684-692.

[17] Fan,W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry, 115, 66-70.

18. Shekarforoush, S. Sh., Azizi Shirazi, A., & Abbasvali, M. (2015). The effect of packaging on biological, chemical and physical characteristics of farmed rainbow trout during refrigerated storage. Oloum va Fonoune Shilat, 3(4), 31-42.

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]

# Detection of fish spoilage during the storage using a simple colorimetric paper sensor

**Majdinasab, M. [1*], Sepidname, M. [2], Negahdarifar, M. [2]**

1. PhD in Food Science and Technology, Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. MSc in Food Science and Technology, Graduate students of the Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

**(Received: 2017/02/22 Accepted:2017/09/19)**

In this study, a simple and sensitive colorimetric sensor towards pH changes for the detection of fish spoilage during storage at room and refrigeration temperature is presented. Colorimetric sensor was developed using Whatman filter paper No. 1 and water soluble anthocyanin pigments extracted from red cabbage. Fish spoilage was monitored based on anthocyanin color change in various pH. Microbial growth during storage and production of proteolytic enzymes resulted in protein degradation, accumulation of volatile amine compounds, increase in the pH and finally color change of anthocyanin-impregnated filter paper. Color change was measured using the CIELab method. The colorimetric sensor was validated by measuring total volatile basic nitrogen (TVB-N) levels, peroxide value (PV), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and microbial populations in fish samples. Results indicated that the values of TVBN, pH, PV and TBARS increased with time of storage which was evidence of fish spoilage development. Also, the results were in accordance with color change of colorimetric sensor during storage and showed that proposed system enjoys a high sensitivity to pH variations. Therefore, the simple colorimetric sensor is capable to use in intelligent packaging.

**Keywords**: Colorimetric sensor, Paper sensor, Anthocyanin, Fish spoilage

* Corresponding Author E-Mail Address: majdinasab@shirazu.ac.ir

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-07-09 ]