(مقاله کوتاه پژوهشی)

نشانگر رنگی جدید بر پایه نانوفیبر سلولز به منظور پایش فساد گوشت

اسماء وردیان[1*]، الهام شیخ‌زاده[1]

۱-گروه پژوهشی ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۸/۲۷

چکیده

امروزه سنسورهای رنگ‌سنج به عنوان نشانگرهای بسته‌بندی مواد غذایی با هدف تضمین ایمنی و کنترل کیفیت در صنایع غذایی بسیار مورد نیاز می‌باشند. دستیابی به نشانگری ارزان، کارا و زیست‌سازگار در محصولات غذایی همچنان چالش می‌باشد و کاربرد بسترهای زیستی اصلاح شده با رنگدانه‌های طبیعی و حساس به فساد موثر می‌باشد. این مطالعه با هدف ایجاد یک نشانگر رنگ‌سنج برای پایش تازگی گوشت گوساله چرخ‌کرده انجام شد. سنسور رنگ‌سنج طراحی شده با تثبیت کورکومین در اسکلت سه بعدی نانوفیبر سلولز سنتز شده توسط باکتری تهیه شد. تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی تثبیت موفق کورکومین در ساختار نانوفیبر و حفظ ساختار فیبری آن تائید می‌کند. نشانگر رنگ‌سنج تغییر رنگ محسوسی در pH ۱۲-۲ را نشان می‌دهد. همچنین پاسخ این نشانگر به حضور گاز آمونیاک با تغییر رنگ همراه بود. این سنسور یا نشانگر رنگ‌سنج بر پایه کورکومین و نانوفیبر سلولزی توانایی پایش تازگی گوشت گاو چرخ‌کرده را در حین نگهداری در یخچال از طریق تغییرات رنگ زرد به نارنجی را دارد.

واژه های کلیدی: نانوفیبر، گوشت، تازگی، فساد، کورکومین.

*مسئول مکاتبات: a.verdian@rifst.ac.ir

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر بدلیل ارتقا سطح اطلاعات علمی جامعه و صنعت، تقاضا به دستیابی موادغذایی تازه و سالم افزایش یافته است. در واقع تغییر در سبک زندگی چالش‌های جدیدی را برای صنعت بسته‌بندی مواد غذایی ایجاد کرده و سیستم‌های بسته‌بندی هوشمند توسعه‌یافته‌اند .بسته‌بندی هوشمند سیستمی توانمند به انجام عملکردهای هوشمندانه (نظیرشناسایی،حس کردن،ثبت کردن،ردیابی،ثبت‌سیگنالهای قابل‌اندازه‌گیری) به منظور تسهیل تصمیم‌گیری در جهت افزایش ایمنی، افزایش زمان ماندگاری، بهبود کیفیت، فراهم کردن اطلاعات و هشدار در ارتباط با مشکلات احتمالی است.دراین زمینه می‌توان به بسیاری برچسب‌های هوشمندی اشاره نمود که با قرارگیری در محیط بسته‌بندی می‌توانند به صورت خودکار فعال شده و به مصرف‌کننده اطلاعات بصری در خصوص سلامت و تازگی محصول ارائه دهند. در این زمینه سنسورهای هوشمندی که اغلب از تکنولوژی نانو مواد بهره برده‌اند بسیار امیدوارکننده می‌باشند. این نوع بسته‌بندی شامل رشته‌ای از نانوحسگرها می‌باشند که نسبت رهایش مواد شیمیایی ناشی از فساد غذا به شدت حساس بوده و تغییر رنگ می‌دهد که این تغییر رنگ علامت واضحی از سلامت یا فساد ماده غذایی است. با به کارگیری نانو سنسورها در بسته‌بندی می‌توان یک بسته‌بندی با خواص جدید تولید کرد که نقش مهمی در افزایش ماندگاری و نظارت موثر بر کیفیت و ایمنی مواد غذایی دارند. به طور مثال می‌توان به نانوحسگرهایی اشاره نمود که با قرارگیری در بسته‌بندی گوشت با گذر زمان تغییر رنگ داده و در صورتی که تاریخ انقضا محصول برسد رنگ سنسور تغییر می‌کند و مصرف‌کننده از خرید آن خودداری می‌کند. در این روش در صورتی که محصول تحت شرایط نامناسبی نگهداری شود و روند فساد آن تسریع شود زمان انقضای مصرف آن کمتر از تاریخ مصرف قید شده روی بسته خواهد بود. سلولز فراوانترین بیوپلیمری است که در طبیعت وجود دارد (۷). سلولز بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیی، روش‌ها و عملکردهای آن‌ها سه طبقه اصلی دارد: نانو کریستال‌های سلولزی (CNC[1])، نانو فیبرهای سلولزی (NFCs[2])ونانوفیبرسلولزی‌باکتریایی (BCNF[3]). نانو فیبرهای سلولزی باکتریایی‌تولیدشده توسط‌باکتری‌های‌غیربیماری‌زای *استوباکترزایلینوم* به‌عنوان مواد زیستی‌امیدوارکننده، پتانسیل بسیار خوبی را در توسعه حسگرهای کاغذی نشان داده‌اند. به دلیل‌ویژگی‌های‌مکانیکی‌و شیمیایی قابل توجه، ویژگیهای بیولوژیکی‌عالی(سازگاری زیستی و تجزیه‌پذیری زیست محیطی)، ماتریس متخلخل، شفافیت نوری و قابلیت چاپ، کاغذ نانوسلولز باکتریایی به عنوان یک بستر کارآمد برای توسعه نسل جدید حسگرهای مبتنی بر کاغذ انتخاب شده‌اند (۴, ۹). نانوشبکه سه بعدی و متخلخل BCNF می‌تواند توسط نانوذرات مختلف نوری، لومینسانس و یا رنگ سنج اشغال گردد (۴). کورکومین یک‌رنگدانه طبیعی زرد نارنجی است که از زردچوبه "*Curcuma longa*" جدا شده است. کورکومین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد سرطان‌زایی، ضدالتهاب‌و ترمیم‌کننده زخم به خوبی شناخته می‌شود و به عنوان چاشنی، رنگ و ماده نگهدارنده در محصولات غذایی و دارویی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵, ۶). فساد میکروبی‌می‌تواند مقدار pH را افزایش داده و پروتئین‌را تجزیه کرده و گازهای بیوژنیک آمینی را افزایش دهد (۷). بسته‌بندی هوشمند به عنوان یک رویکرد نوظهور برای نظارت بر عملکرد بسته بندی و اطمینان از کیفیت و ایمنی در تأمین مواد غذایی به مصرف‌کنندگان ارائه شده است (۸). تغییر pH و آزاد شدن گازهای بیوژنیک آمینی همچون هیستامین، دو پارامتر قابل رهگیری‌طی‌فسادگوشت می‌باشند. سنسورهای هالوکرومیک یا حساس به pH گروهی از حسگرها با قابلیت تغییر رنگ با تغییرpH محیط هستند. آن‌ها ابزاری ساده، غیر مخرب، کم هزینه و کنترل آسان هستند که سیگنال‌های فوری قابل

1- Cellulose Nanocrystals
2- Nano-Fibrillated Cellulose
3- Bacterial Cellulose Nanofiber

مشاهده در مورد کیفیت محصول را ارائه می‌دهند. سنسور هالوکرومیک از دو بخش اصلی تشکیل شده اند: بستر پایه و رنگدانه حساس به pH (۲, ۸). در این تحقیق بر اساس تغییر رنگ کورکومین با تغییر pH و همچنین در حضور آمین‌های بیوژنیک نانو حسگر کاغذی بر پایه نانوسلولز باکتریایی طراحی و ساخته شد و برای پایش تازگی گوشت قرمز چرخ کرده به کار رفت.

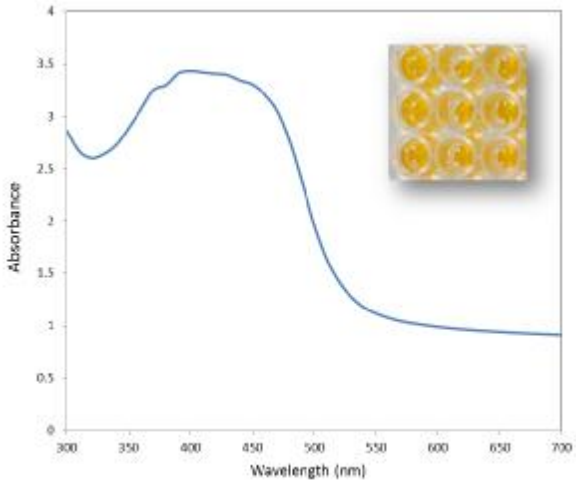
۲- مواد و روش‌ها

صفحات نانوفیبر سلولزی باکتریایی از شرکت نانونوین پلیمر تهیه شد. کورکومین از شرکت مرک آلمان تهیه شد. بافر استات در کلیه آزمایشات به کار برده شد. به منظور ثبت طیف‌های UV از دستگاه میکروپلیت ریدر Synergy H4 (BioTek, USA) استفاده شد. تصاویر میکروسکوپی FESEM توسط میکروسکوپ الکترونی TESCAN BRNO-Mira3LMU FEG-SEM ثبت شدند. به منظور آماده‌سازی نانونوارهای سلولزی حاوی کورکومین (BCNF-) نانو فیبرهای سلولزی در ابعاد ۰/۳ × ۲/۵ × ۲۰ برش داده شد و پنج نوار در ۱۰۰ میلی لیتر محلول کورکومین ۰/۱ %w/v در آب و استون به نسبت ۱ به ۳ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای محیط با سرعت پایین (۵۰rpm) شیک شد. پس از جداسازی فیبرهای لود شده با کورکومین از محلول، این نوارها چندین مرتبه با آب دیونیزه به منظور خروج کورکومین‌های آزاد شستشو شد. نانوشیت‌های مرطوب زرد رنگ در بین دو کاغذ صافی واتسمن قرار گرفت و سپس به کمک دو لام شیشه‌ای و گیره کاغذی ساندویچ شدند. اسلایدهای شیشه‌ای به مدت دو ساعت در آون ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. کاغذهای BCNF-CU خشک شده بدور از نور و در شیشه تاریک تا زمان مصرف نگهداری شدند. برای ثبت طیف جذبی نمونه کاغذ توسط پانچ به صورت دایره های کوچک سوراخ شد و در چاهک‌های میکروپلیت قرار گرفتند. همچنین برای ارزیابی تاثیرات pH بر روی نشانگر نمونه‌های پانچ شده در میکروپلیت قرار گرفتند و تغییرات رنگ پس از افزودن ۲۰۰میکرولیتر محلول بافری با pHهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی پاسخ نشانگر به حضور گازهای‌آمینی گازآمونیاک به عنوان مرجع به کار رفت. در این آزمایش ۰/۵ سی سی گاز آمونیاک بر روی کاغذ صافی $2\times2\ cm^2$ چکانده شد و کاغذ صافی در ظرفی که با نشانگر برچسب زنی شده بود نگهداری شد. بعد از یک‌ساعت تغییر رنگ ثبت شد. به منظور پایش فساد در نمونه حقیقی گوشت چرخ کرده گاو، ۳۰ گرم نمونه گوشت درون یک پلیت استریل شده منتقل شد و پس از قرار دادن درب بالای پلیت که قبلا بر روی آن نوار نانوسلولزی باکتریایی حاوی کورکومین با چسب نواری چسبیده شده بود، توسط پارافیلم کاملا بسته بندی شد و به یخچال منتقل شد. در این حالت حسگر کاغذی در تماس مستقیم با نمونه گوشت قرار ندارد. تغییرات رنگ نشانگر در طی روزهای مختلف توسط دوربین گوشی هوآوی Y7 ثبت شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- طیف جذبی uv-vis

شکل ۱ طیف جذبی نانوفیبر سلولزی را نشان می‌دهد که با کورکومین اشباع شده است. پیک مربوط به کورکومین در حدود ۴۲۰ نانومترموید تثبیت کورکومین داخل شبکه فیبری است.

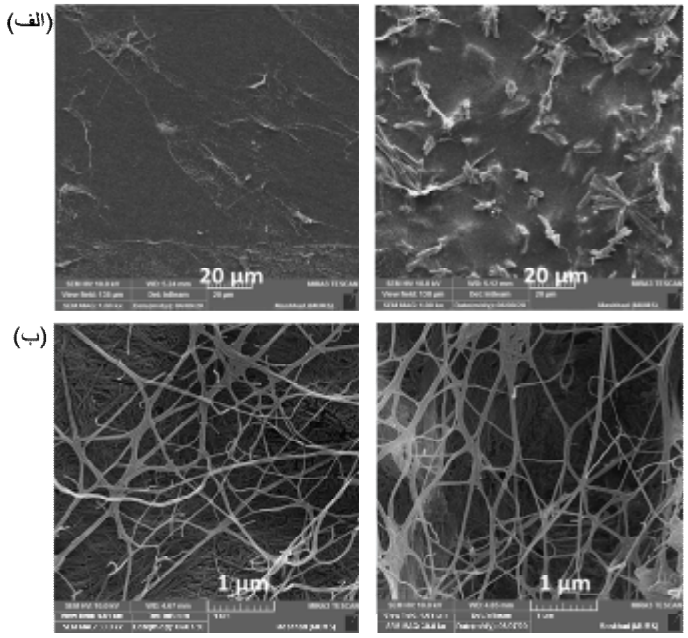


شکل ۱- طیف UV-Vis کورکومین بارگذاری شده در شبکه نانوفیبر سلولز باکتریایی

۳-۲-مورفولوژی‌سطحی نشانگرها (تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FESEM[1]))

شکل۲ تصاویرمیکروسکوپی SEM نانو کاغذ تهیه شده قبل (تصاویر بالا) و پس از جذب کورکومین (تصاویر پایین) با دو اسکیل بار ۲۰ و ۱ میکرومتر را نشان می‌دهد. تفاوت بین دومیکروگرافSEM بانواردرمقیاس۲۰ میکرومتر به وضوح وجودکورکومینو بارگیری‌آن در شبکه نانو BCNF شفاف را نشان می‌دهد. به وضوح‌هردوشکل در مقیاس ۱ میکرومتر مورفولوژی‌فیبری را نشان دادند. لذا پس‌از تثبیت کورکومین ساختار شبکه‌ای فیبری نانوسلولز باکتریایی حفظ شده است.

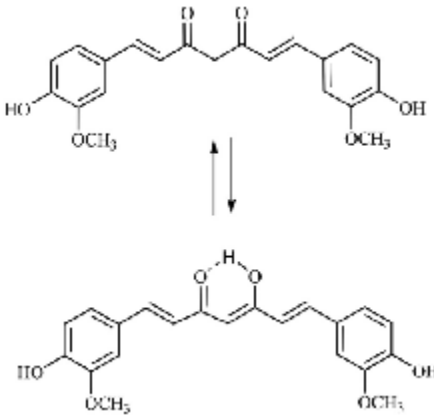
1- Field Emission Scanning Electron Microscope



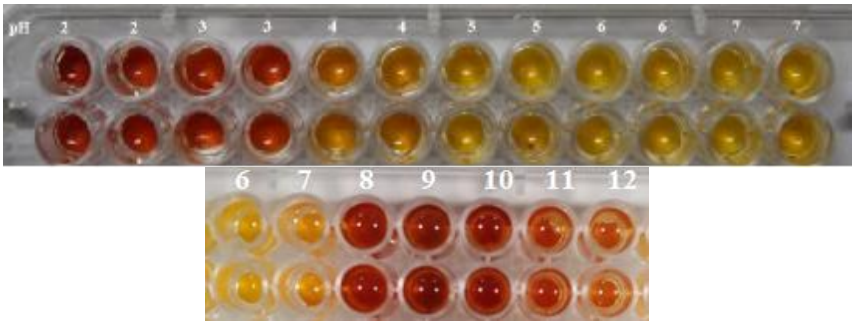
شکل۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FESEM) نانوفیبرهای سلولزی تهیه شده قبل (سمت چپ) و بعد (سمت راست) از تثبیت کورکومین. (الف) اسکیل بار µm ۲۰ و (ب)) اسکیل بار µm ۱

۳-۳- اثر pH

سنجشpH به دلیل اهمیت اندازه‌گیری pH در زمینه‌های مختلف تحقیقات علمی و کاربردهای عملی مورد توجه بسیاری قرارگرفته است. به طورکلی، رنگ‌های pH در حسگرهای رنگ‌سنجی، رنگدانه‌های شیمیایی حساس مانند بروموکرزول سبز، بروموکرزول بنفش، بروموفنول آبی و کرسول قرمز هستند. استفاده از رنگ‌های شیمیایی در حسگرهای pH به دلیل مسائل زیست محیطی محدود است و استفاده از آن‌ها در غذا نیز دارای محدودیت‌های بهداشتی دارد. رنگدانه‌های طبیعی حاصل از منابع مختلف مانند کورکومین (۳)، کلم قرمز (۱۱)، آنتوسیانین هویج (۱۵) و غیره جایگزین این ترکیبات شیمیایی‌هستند. کورکومین یک ترکیب پلی فنول آبگریز است که به عنوان یک رنگدانه طبیعی شناخته می‌شود. شکل ۳ تاتومریسم فرم‌های کتو-انول کورکومین را نشان می‌دهد (۶). شکل ۴ تغییرات سنسور را در رنج pH ۲ تا ۱۲ نشان می‌دهد. علت مشاهده این تغییرات محسوس در رنگ سنسور تغییرات ساختاری کورکومین می باشد.کورکومین به عنوان یک دهنده قوی اتم H در ۷-۴ pH عمل می‌کند و فرم کتو غالب است و بالاتر از ۸ pH ، شکل انولات (شکل۳، پایین) غالب است و کورکومین عمدتا به عنوان یک دهنده الکترون عمل می‌کند. نشان داده شده است که کورکومین با pH بسیار بالا در شرایط فوق قلیایی کاملاً دِپروتونه می‌شود و گونه‌های دارای بار بسیار منفی cur^{-3} را تشکیل می‌دهد. بر اساس مباحث فوق وابستگی به pH رنگ کورکومین با تغییر pH بسیار بالاست. رفتار کورکومین تثبیت شده در شبکه نانوسلولز باکتریایی مشابه با رفتار فاز محلول آن می‌باشد. طبق شکل در pHهای اسیدی رنگ قرمز غالب است و در pH ۴ تا ۷ رنگ زرد و در رنج ۸-۱۰ رنگ قرمز و بالاتر از ۱۰ ساختار cur^{-3} با رنگ نارنجی شکل می‌گیرد (شکل ۴).



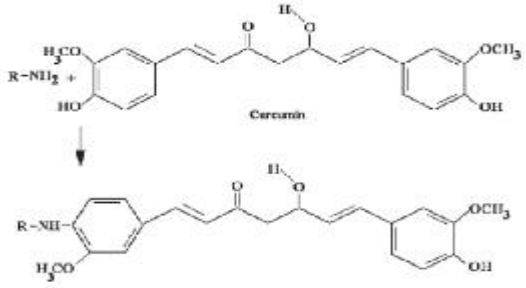
شکل ۳- تاتومریسم فرم‌های کتو-انول کورکومین



شکل٤- تغییرات رنگ حسگر با تغییر pH

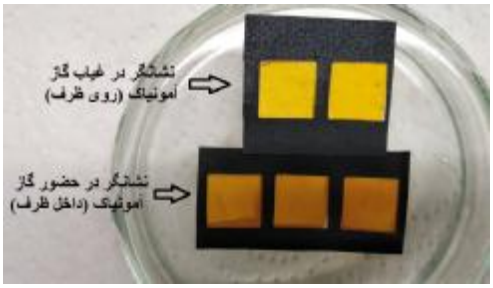
۳-٤- اثر گازهای بیوژنیک

آمین‌های‌بیوژنیک به عنوان‌نشانگر زیستی مهمی برای کنترل کیفیت غذا و تشخیص تازگی محصولات پروتئینی در نظر گرفته می‌شوند. آمین‌های بیوژنیک بازهای آلی با وزن مولکولی پایین هستند که عمدتاً توسط میکروارگانیسم‌ها و از طریق دکربوکسیالسیون آنزیمی اسیدهای آمینه خارجی در هنگام فساد مواد غذایی یا متابولیسم بافت درون‌زا تولید می‌شوند.تیرامین،تریپتامین، پوتریسین، کاداورین، اسپرمیدین و هیستامین از جمله آمین‌های بیوژنیک هستند (۱۴, ۱۳). این نوع از آمین‌ها در مواد غذایی ازجمله گوشت مختلف وجود دارند. کورکومین با توجه به ساختار شیمیایی خود می‌تواند به این آمین‌ها متصل شود (شکل ۵).



شکل۵- ساختار شیمیایی کورکومین متصل شده به گروه‌های آمینی

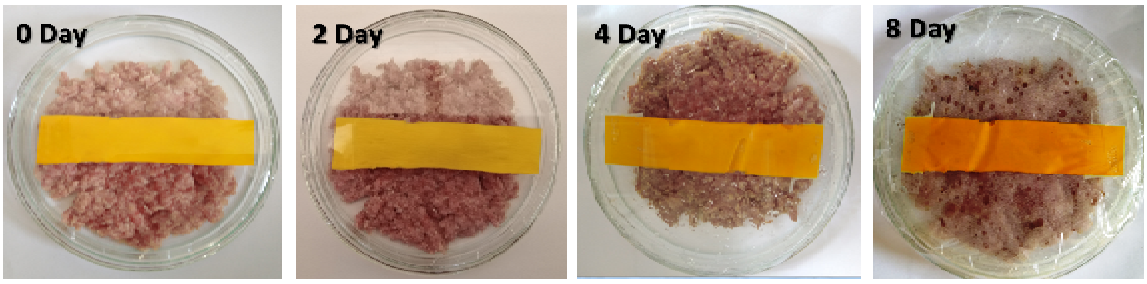
شکل۶ تغییرات‌رنگ نشانگر را در حضورگازآمونیاک نشان می‌دهد. پس‌ازیک‌ساعت‌قرارگرفتن‌در معرض گاز آمونیاک تغییر رنگ مشهودی در نشانگر مشاهده می‌شود. این تغییر رنگ بدلیل تغییرات ساختاری کورکومین در مجاورت آمین است.



شکل ٦- تغییرات رنگ نشانگر در حضور گاز آمونیاک

۳-۵- ارزیابی نمونه حقیقی

نتایج مطالعه حاضر ارتباط خوبی بین تغییررنگ نشانگر رنگ‌سنج و تازگی گوشت چرخ کرده گوساله نشان داد. در طی فساد میکروبی گوشت، ترکیبات مختلف فرار آزاد شده و منجر به تجمع گازهای قلیایی در فضای اصلی بسته بندی می‌شود. همراه با افزایشpH و آمین‌های فرار در فضای بالای ظرف، رنگ نشانگر تغییر می‌کند و شروع فرآیند فساد را به صورت بصری نمایش می‌دهد. تغییرات رنگ نشانگر رنگ سنجی در ۰ ، ۲ ، ۴ و ۸ روز ذخیره سازی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در شکل ۷ نشان داده شده است. نشانگر BCNF-CU تغییرات رنگی قابل مشاهده‌ای را پس از ۴ روز ذخیره‌سازی نشان می‌دهد که با تازگی گوشت گوساله چرخ شده ارتباط مستقیم دارد. طبق نتایج رنگ زرد تیره پس از دو روز نشان‌دهنده هشدار هنوز تازه، رنگ نارنجی کم رنگ پس از ۴ روز هشدار عدم تازگی و پس از ۸ روز رنگ نزدیک به قرمز هشدار فساد است.



شکل۷- کاربرد نشانگر رنگ سنج بر پایه نانوسلولز باکتریایی و کورکومین برای ارزیابی تازگی گوشت چرخ کرده گاو در طی ۸ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد

٤- نتیجه‌گیری

نانوشناساگر جدید رنگ‌سنج بر پایه نانوسلولز باکتریایی لود شده با رنگدانه طبیعی کورکومین به منظور پایش فساد گوشت گوساله چرخ شده در دمای یخچال طراحی و ارزیابی شد. در طی فساد، نشانگر تحت تأثیر گازهای قلیایی موجود در فضای بالای بسته قرار گرفت و از زرد به نارنجی تغییر یافت و در توافق با نتایج تغییرات رنگ با pH بود. بنابراین، تغییرات‌رنگ درنشانگر بدلیل فساد و تولید گازهای فرار از جمله آمین‌های بیوژنیک است و می‌تواند به مصرف-کنندگان امکان کنترل تازگی و کیفیت گوشت چرخ کرده را در حین نگهداری در یخچال را دهد.

٥- منابع

1. Ahmed, I., et al. 2018. An overview of smart packaging technologies for

monitoring safety and quality of meat and meat products. *Packaging Technology and Science*, 31(7): 449-471.
2. Devarayan, K., et al. 2020. Halochromic sensors for real-time monitoring of spoilage of packed seer fish. Materials Today: Proceedings,
3. Ezati, P. and J.-W. Rhim. 2020. pH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 230: p. 115638.
4. Golmohammadi, H., et al. 2017. Nanocellulose in sensing and biosensing. *Chemistry of Materials*, 29(13): 5426-5446.
5. Griffiths, K., et al. 2016. Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. *Diseases*, 4(3): 28.
6. Kaur, R., et al. 2018. Keto–Enol Tautomerism of Temperature and pH Sensitive Hydrated Curcumin Nanoparticles: Their Role as Nanoreactors and Compatibility with Blood Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(45):11974-11980.
7. Klemm, D., et al. 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angewandte chemie international edition, 2005. 44(22): 3358-3393.
8. Moradi, M., et al. 2019. A novel pH-sensing indicator based on bacterial cellulose nanofibers and black carrot anthocyanins for monitoring fish freshness. Carbohydrate polymers, 222: p. 115030.
9. Morales-Narváez, E., et al. 2015. Nanopaper as an optical sensing platform. ACS nano, 9(7): 7296-7305.
10. Naghdi, T., et al. 2020. *Chitin* Nanofiber Paper toward Optical (Bio) sensing Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(13): 15538-15552.
11. Pourjavaher, S., et al. 2017. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (Brassica oleraceae) extract. Carbohydrate Polymers, 156: p. 193-201.
12. Ruiz-Capillas, C. and F. 2005. Jiménez-Colmenero, Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in food Scince and Nutrition*, 44(7):489-599.
13. Stadnik, J. and Z. J. 2010. Dolatowski, Biogenic amines in meat and fermented meat products. ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 9(3): 251-263.
14. Tirtashi, F. E., et al. 2019. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International journal of biological macromolecules*, 136: 920-926.
15. Vinci, G. and M. L. 2002. Antonelli, *Biogenic amines: quality index of* freshness in red and white meat. *Food control*, 13(8): 519-524.

(Short Research Paper)

A Novel Colorimetric Indicator Based on Cellulose Nanofiber to Monitor the Meat Spoilage

Asma Verdian[1,*], Elham Sheikhzadeh[1]

1-Department of food safety and quality control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

Received: 6/10/2020 Accepted:17/11/2020

Abstract

Today, colorimeter sensors are highly regarded as food packaging indicators to monitor the quality and safety of foods. Achieving cheap, efficient and biodegradable indicators in foods remains a challenge, and nanosensor technology is promising in this field. The aim of this study is develop of a colorimetric indicator to monitor the freshness of minced beef. A colorimeter sensor fabricated with curcumin immobilization into a three-dimensional scaffold of cellulose nanofiber synthesized by bacteria. Scanning electron microscopy images confirmed the successful immobilization of curcumin into nanofiber network and the preservation of its fibrous structure. The colorimetric indicator shows a noticeable color change at pH 2-12. The indicator response to the presence of ammonia gas was also associated with discoloration. This sensor-based on curcumin and nanofiber cellulose-based could monitor the freshness of minced beef during storage in refrigerator via yellow to orange color change.

Keywords: Nanofiber, Meat, Freshness, Spoilage, Curcumin.

[*]Corresponding Author: a.verdian@rifst.ac.ir