



کاربرد روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی با منبع تحریک ال‌ای‌دی در تخمین غیرمخرب

سفتی گوجه‌فرنگی

محمد حق‌شناس آدرمنابادی^۱، سید احمد میره‌ای^{۲*}، مرتضی صادقی^۲، مجید ناظری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- عضو هیأت علمی گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- عضو هیأت علمی گروه لیزر و فوتونیک، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان

* ایمیل نویسنده مسئول: samireei@cc.iut.ac.ir

چکیده

امروزه روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی یکی از روش‌های مفید در تشخیص غیر مخرب ویژگی‌های درونی محصولات کشاورزی به حساب می‌آید. در این تحقیق، سامانه‌ای برای اندازه‌گیری طیف فلورسانس القایی گوجه‌فرنگی در مد بازتابی توسعه داده شد. از منابع نور ال‌ای‌دی (LED) به عنوان منبع تحریک برای تولید پرتوهای فلورسانس استفاده گردید. پس از جمع‌آوری طیف فلورسانس القایی از ۱۷۰ نمونه‌ی گوجه‌فرنگی که در طول مراحل مختلف رسیدگی برداشت شده بودند، سفتی نمونه‌ها با استفاده از آزمون نفوذ با پروب استاندارد اندازه‌گیری شد. از روش‌های پیش‌پردازش مختلف برای حذف اثر عوامل مزاحم و از روش رگرسیون چند متغیره حداقل مربعات نسبی برای مدلسازی سفتی با استفاده از طیف‌های فلورسانس القایی استفاده گردید. نتایج نشان داد که در بررسی اولیه طیف‌ها، دو پیک در محدوده ۶۹۸ و ۷۴۵ نانومتر مشاهده گردید که به کلروفیل مربوط بود. همچنین روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی توانست سفتی گوجه‌فرنگی‌ها را با ضریب همبستگی پیش‌بینی (r_p) ۰/۸۸۴، خطای پیش‌بینی (RMSEP) برابر ۳/۲۹ نیوتن و RPD برابر ۱/۷۰ پیشگویی کند.

واژه‌های کلیدی: ال‌ای‌دی، حداقل مربعات نسبی، کلروفیل، بازتابی.

مقدمه

طبق آمار وزرات جهاد کشاورزی، سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در ایران در سال زراعی ۹۲-۹۳، حدود ۱۵۸ هزار هکتار و میزان تولید آن حدود ۶ میلیون تن می‌باشد که بخشی از این محصول صادرات شده است. با توجه به تولید و صادرات بالای این محصول، تعیین کیفیت درونی گوجه‌فرنگی اهمیت زیادی پیدا کرده است. از طرف دیگر، در سال‌های اخیر، روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی به دلیل مزایایی از جمله سرعت بالا در اندازه‌گیری تعداد زیاد نمونه، ارزان بودن و اندازه‌گیری بدون آماده‌سازی نمونه‌ها، مورد استقبال محققان فعال در زمینه‌ی ارزیابی غیرمخرب کیفیت محصولات کشاورزی قرار گرفته است.

پدیده‌ی فلورسانس زمانی رخ می‌دهد که یک ماده که در معرض یک تابش با انرژی بیشتر (یا طول موج کمتر) قرار گرفته است قادر باشد پرتو را جذب کرده و از خود تابشی با انرژی کمتر (یا طول موج بالاتر) ساطع کند. در این حالت ماده با جذب یک فوتون، می‌تواند یک الکترون از تراز پایه به یکی از ترازهای الکترونی بالاتر منتقل می‌شود. انرژی فوتون جذب شده تعیین‌کننده‌ی تراز است که الکترون به آنجا می‌رود. حال اگر الکترون از تراز برانگیخته یگانه‌ای به تراز پایه بازگردد، پدیده فلورسانس اتفاق می‌افتد (Abbasi *et al.*, 2014). به طور کلی در محصولات کشاورزی از طول‌موج‌های ناحیه فرابنفش و آبی برای القای فلورسانس

استفاده می‌شود و در نتیجه محصول قادر خواهد بود فلورسانس در طول‌موج‌های سبز تا مادون قرمز نزدیک تابش کند.

تحقیقات فراوانی در زمینه‌ی بکارگیری طیف‌سنجی فلورسانس القایی در تخمین یا طبقه‌بندی براساس یک یا چند ویژگی محصولات کشاورزی انجام گرفته است. برای مثال، نسبت کاروتنوئید به فلاونوئید با طول‌موج تحریک ۲۶۶ نانومتر برای میوه گوجه‌فرنگی با ضریب تبیین (R^2) ۰/۷۸ پیشگویی شد (Lai *et al.*, 2007). با استفاده از طول‌موج تحریک ۳۳۷ نانومتر، میزان کافئیک اسید در سیب با استفاده از روش حداقل مربعات نسبی (PLS) و با ضریب همبستگی (r) ۰/۹۹ پیشگویی شد (Wulf *et al.*, 2005). همچنین وارپته‌های مختلف پرتقال شیرین با استفاده از طول‌موج تحریک ۵۶۱ نانومتر و دو روش PLS و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) به ترتیب با دقت‌های ۱۰۰٪ و ۹۹٪ تشخیص و کلاس‌بندی شد (Wulf *et al.*, 2008).

هدف از این تحقیق، بررسی توانایی طیف‌سنجی فلورسانس القایی با طول موج تحریک در محدوده‌ی آبی (۴۵۱ نانومتر) برای تخمین سفتی گوجه‌فرنگی می‌باشد.

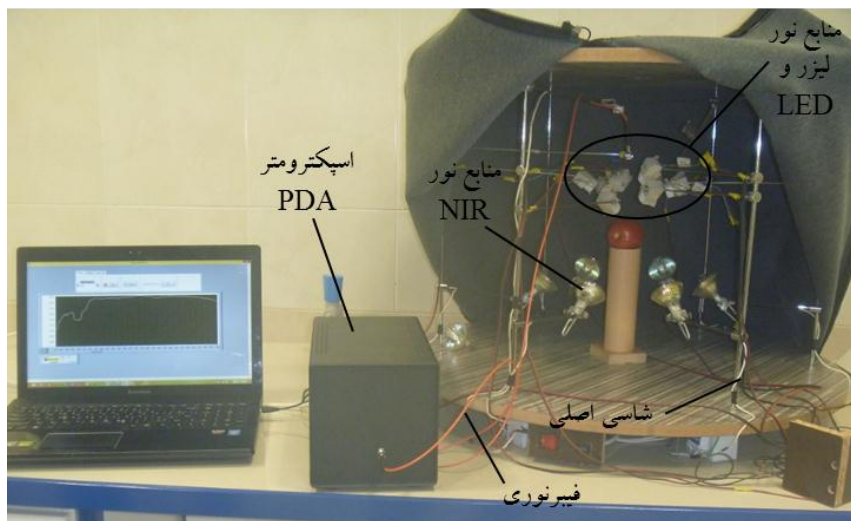
مواد و روش‌ها

در این تحقیق نمونه‌های میوه گوجه‌فرنگی از گلخانه‌ای در روستای روران شهرستان اصفهان تهیه شدند. پس از بررسی اولیه، تعداد ۱۷۰ نمونه سالم تشخیص و به آزمایشگاه آزمون‌های غیرمخرب گروه مهندسی بیوسیستم دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شد. سپس نمونه‌ها قبل از آزمایش، برای برقراری تعادل با محیط آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس

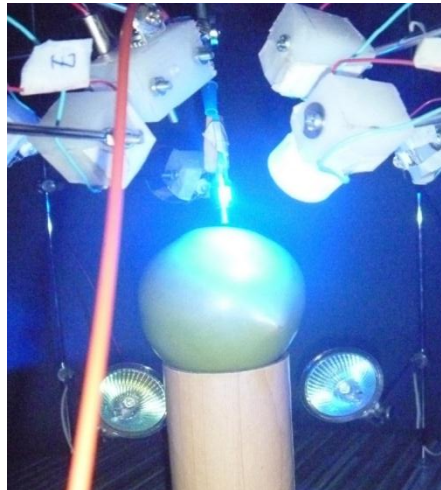
بر اساس رنگ ظاهری و به صورت چشمی به سه گروه نارس (نمونه‌های سبز رنگ-G)، گروه نیمه رس (نمونه‌های زرد رنگ-O) و گروه رسیده (نمونه‌های قرمز رنگ-R) تقسیم و کدگذاری شدند.

پس از اندازه‌گیری مشخصه‌های فیزیکی شامل اندازه و وزن و همچنین رنگ، طیف‌های فلورسانس القایی نمونه‌ها در مد بازتابشی جمع‌آوری شد. شکل ۱ سامانه‌ی توسعه داده شده برای اندازه‌گیری طیف فلورسانس القایی با استفاده از منبع LED در وضعیت بازتابشی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشخص است این سامانه شامل منبع نور، اسپکترومتر PDA با آشکارساز CCD، فیبر نوری و یک شاسی انعطاف‌پذیر اصلی برای اتصال قسمت‌های مختلف است. منبع نور شامل یک LED با طول موج ۴۵۱ نانومتر و توان ۳ وات بود. اسپکترومتر استفاده شده از نوع آرایه دیودی حساس به نور (PDA) با توانایی ثبت طیف‌های الکترومغناطیس در ناحیه ۴۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر (مرئی-فروسرخ نزدیک) با وضوح ۲ نانومتر بود. از یک فیبر نوری شیشه‌ای با قطر ۲۰۰ میکرون با درگاه خروجی SMA برای انتقال پرتوی بازتابشی از میوه به داخل اسپکترومتر بهره گرفته شد. طیف بدست آمده از طریق درگاه USB به رایانه منتقل و در آنجا از طریق برنامه‌ی نوشته شده در محیط Lab View در رایانه ذخیره می‌شد (مومکش و همکاران، ۱۳۹۴).

شکل ۲ لحظه‌ی جمع‌آوری طیف فلورسانس القایی برای یک نمونه‌ی گوجه‌فرنگی با استفاده از تحریک LED را نشان می‌دهد. در این حالت نحوه قرارگیری LED و فیبر نوری به گونه‌ای است که نسبت به یکدیگر زاویه ۴۵ درجه دارند. همچنین فیبر نوری در راستای قطر استوایی میوه قرار می‌گیرد. لازم است که در ابتدای هر آزمایش، طیف تیره (Rdark) نیز تعریف گردد که این کار با تاریک کردن محفظه‌ی اندازه‌گیری و خاموش کردن منابع نور انجام می‌شد.

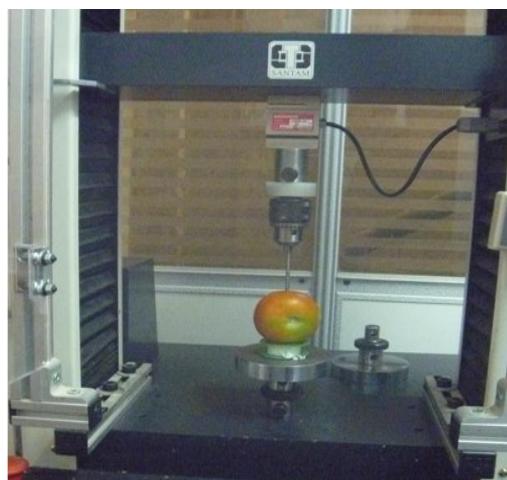


شکل ۱ - سامانه اندازه‌گیری طیف فلورسانس القایی از نمونه‌ها



شکل ۲ - لحظه‌ی ثبت طیف فلورسانس القایی گوجه‌فرنگی در مد بازتابشی با منبع تحریک LED

بلافاصله پس از ثبت طیف‌های فلورسانس القایی، سفتی نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد تعیین شد. برای این منظور از دستگاه جامع آزمون کشش و فشار مدل STM-20 محصول شرکت سنتام (SANTAM)، ساخت کشور ایران استفاده شد (شکل ۳). در این دستگاه از یک بارسنج ساخت کشور کره جنوبی، محصول شرکت بونگ‌شین، مدل DBBP-50 با ظرفیت ۵۰ kgf استفاده شده است. برای انجام آزمون نفوذ، طبق استاندارد ASABE از یک پروب سر تخت با قطر ۴ میلی‌متر استفاده شد. روش آزمایش به این صورت بود که نمونه به‌گونه‌ای داخل محفظه نگهدارنده قرار می‌گرفت که سطح نمونه، عمود بر پروب باشد تا نیروهای مماسی در سطح پروب به حداقل برسد. سپس پروب روی سطح میوه مماس شده و آزمون نفوذ تا رسیدن به اولین نقطه تسلیم میوه انجام می‌شد. سرعت حرکت فک بالایی دستگاه، ۲۵/۴ میلی‌متر بر دقیقه طبق استاندارد انتخاب شد. نمودار نیرو در برابر جابجایی توسط نرم‌افزار دستگاه در فایل اکسل ذخیره و حداکثر مقدار نیروی لازم برای نفوذ پروب به داخل بافت گوجه‌فرنگی به‌عنوان شاخص سفتی میوه در نظر گرفته شد.



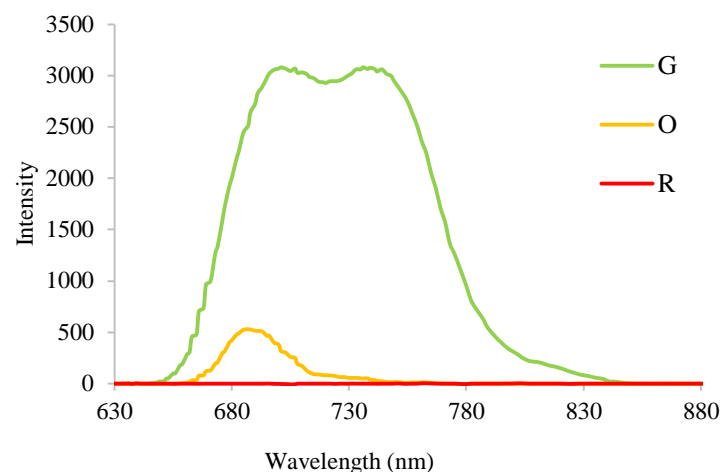
شکل ۳- دستگاه جامع آزمون کشش و فشار برای اندازه‌گیری سفتی گوجه‌فرنگ



نتایج و بحث

شکل ۴ طیف‌های میانگین فلورسانس القایی بدست آمده از تمام گوجه‌فرنگی‌ها در سه مرحله رسیدگی نارس، نیمه‌رس و رسیده را نشان می‌دهد. مطابق این شکل، در طیف میانگین بدست آمده از مرحله‌ی نارس (G)، دو پیک قابل مشاهده بود. پیک اول در اطراف طول موج ۶۹۸ نانومتر و پیک دوم در اطراف طول موج ۷۴۵ نانومتر اتفاق افتاد. شبیه این مشاهده در مطالعات دیگر محققان نیز گزارش شده است که هرکدام از این پیک‌ها را به یکی از مشخصات فیزیولوژیکی میوه‌ها مربوط دانسته‌اند. پیک ۶۸۵ و پیک ۷۴۰ نانومتر در طیف فلورسانس بدست آمده از میوه‌ی زیتون به کلروفیل نسبت داده شد (Agati *et al.*, 2005). در طیف فلورسانس (پوست و خلال) پرتقال (نارنج) و سیب، طول موج‌های ۶۷۰ و ۶۵۰ نانومتر به ترتیب به کلروفیل‌های آلفا و بتا مربوط بود (Sighicelli *et al.*, 2005; Merzlyak *et al.*, 2008). همچنین از طول موج ۶۸۵ نانومتر موجود در طیف فلورسانس القایی لیزر سیب توانستند کلروفیل آلفا را تشخیص دهند (Noh and Lu, 2007). اما همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در نمونه‌های رسیده (R) میزان شدت فلورسانس القایی بسیار ناچیز و تقریباً صفر بود. لای و همکاران نیز گزارش دادند که در گوجه‌فرنگی‌های رسیده، شدت فلورسانس بسیار ناچیز است (Lai *et al.*, 2007).

همان‌طور که اشاره شد شکل ۴ نشان می‌دهد که با افزایش مراحل رسیدگی، شدت طیف فلورسانس نیز کاهش می‌یابد به نحوی که برای نمونه‌های کاملاً رسیده تقریباً طیفی مشاهده نمی‌شود. با توجه به تغییر رنگ گوجه‌فرنگی در طول فرآیند رسیدگی و تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد شده در این مسیر، با افزایش رسیدگی، شدت پرتوهای نفوذکننده به داخل میوه افزایش می‌یابد و در نتیجه از میزان بازتابش کاسته می‌شود. به عبارت دیگر، تغییرات فیزیولوژیکی که در طول رسیدن میوه اتفاق می‌افتد، شامل تنزل تدریجی کلروفیل و ایجاد ترکیب کاروتن‌ها، باعث افزایش عبور پرتوها از میوه و کاهش تعداد پرتوهایی می‌شود که به صورت بازتابشی به آشکارساز برخورد می‌کند که این موضوع به خوبی در شکل ۴ مشاهده می‌شود.



LED2

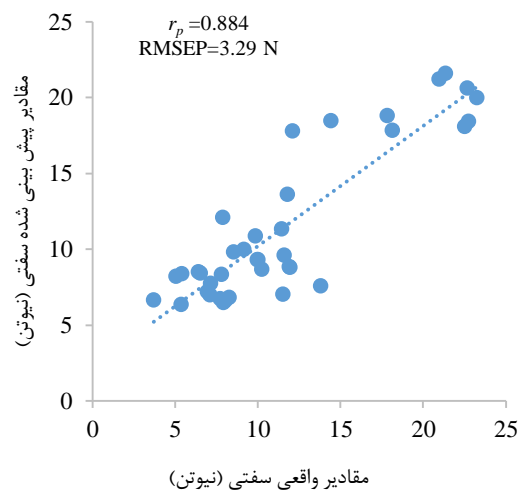
شکل ۴ - طیف فلورسانس القایی LED بدست آمده از سه مرحله مختلف رسیدگی گوجه‌فرنگی

در این تحقیق، برای اعتبارسنجی مدل‌های PLS بدست آمده، از دو روش اعتبارسنجی متقاطع یگانه و اعتبارسنجی آزمونی استفاده شد. همچنین نتایج نشان داده که پیش‌پردازش‌های مختلف، تأثیر چندانی بر ارتقای دقت مدل‌های پیشگویی سفتی نداشتند، به نحوی که بهترین مدل با استفاده از داده‌های طیفی خام بدست آمد. نتایج بهترین مدل پیشگویی سفتی با استفاده از روش طیف‌سنجی القایی LED در جدول ۱ خلاصه شده است. چنانچه ملاحظه می‌شود، روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی LED برای مؤلفه‌ی سفتی توانست نتایج قابل قبولی با ضریب همبستگی (r_p) برابر ۰/۸۶۶، ریشه میانگین مربعات خطای (RMSEP) برابر ۳/۲۹ نیوتن و نسبت انحراف استاندارد ۱/۷۰ ارائه دهد.

جدول ۱- نتایج رگرسیون PLS برای پیش‌بینی سفتی با استفاده از منبع تحریک LED در طیف‌سنجی فلورسانس القایی

اعتبارسنجی آزمونی		اعتبارسنجی متقاطع یگانه			کالیبراسیون		مؤلفه	بهترین	مورداندازه‌گیری
RPD	RMSEP	r_p	RMSECV	r_{cv}	RMSEC	r_c	LV	پیش‌پردازش	سفتی
۱/۶۹۰	۳/۲۸۹	۰/۸۸۴	۲/۸۴۰	۰/۸۳۷	۲/۵۷۶	۰/۸۶۶	۷	Raw	سفتی

مقادیر پیش‌بینی شده سفتی در مقابل مقادیر واقعی بدست آمده از بهترین مدل PLS در طیف‌سنجی فلورسانس القایی LED در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- مقادیر پیش‌بینی شده سفتی در مقابل مقادیر واقعی بدست آمده از مدل‌سازی PLS در طیف‌سنجی فلورسانس القایی

LED

در فرآیند رسیدگی گوجه‌فرنگی، همزمان با شکست کلروفیل، سنتز کاروتنوئید نیز اتفاق می‌افتد که باعث ایجاد لیکوپن و تغییر رنگ از سبز به قرمز می‌شود. همچنین این تغییرات عموماً با نرم شدن محصول همراه است که این روند توانست به خوبی توسط طیف‌های فلورسانس القایی بدست آمده پیش‌بینی شود. نتایج این تحقیق نشان داد که روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی می‌تواند یک روش کارآمد در تشخیص خواص درونی محصول گوجه‌فرنگی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که با استفاده از روش طیف‌سنجی فلورسانس القایی به کمک منبع تحریک LED می‌توان سفتی گوجه‌فرنگی را با دقت مناسب پیش‌بینی نمود. همچنین بدلیل سرعت بالای این روش، امکان بکارگیری آن در تشخیص‌های برخط نیز وجود دارد.

منابع

موم‌کش، ش.، ا. میره‌ای، م. صادقی، م. ناظری. ۱۳۹۴. توسعه سامانه اندازه‌گیری طیف‌های مرئی-فروسرخ نزدیک در سه حالت عبوری، بازتابشی و تقابلی برای محصولات کشاورزی. نهمین کنگره ملی مهندسی ماشین‌های کشاورزی (مکانیک بیوسیستم) و مکانیزاسیون، ۲ تا ۳ اردیبهشت‌ماه ۹۴، کرج.

Abbasi, H., M. Nazeri, A. Balooch and S. A. Mireei. 2014. LIF Spectroscopy of fruits: Study of excitation wavelength independence. The third Iranian Conference on Engineering Electromagnetic (ICEEM 2014), December 4, 2014, Tehran, Iran.

Agati, G., P. Pinelli, S. Cortés Ebner, A. Romani, A. Cartelat, and Z. G. Cerovic. 2005. Nondestructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by in situ chlorophyll fluorescence spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1354-1363.

Lai, A., E. Santangelo, G. P. Soressi, and R. Fantoni. 2007. Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques. *Postharvest Biology and Technology* 43(3): 335-342.

Merzlyak, M. N., T. B., Melø, and K. R. Naqvi. 2008. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit:



- signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 59(2): 349-359.
- Noh, H. K., and R. Lu. 2007. Hyperspectral laser-induced fluorescence imaging for assessing apple fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* 43(2): 193-201.
- Sighicelli, M. P., S. Patsayeva, and A. Lai. 2005. Characterization of citrus fruit quality using reflectance spectroscopy. *Proceedings of 31th IRSCE, San Petersburg, Russia.*
- Wulf, J. S., S. Rühmann, I. Rego, I. Puhl, D. Treutter, and M. Zude. 2008. Nondestructive application of laser-induced fluorescence spectroscopy for quantitative analyses of phenolic compounds in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56(9): 2875-2882.
- Wulf, J. S., M. Geyer, B. Nicolai, and M. Zude. 2005. Non-destructive assessment of pigments in apple fruit and carrot by laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) measured at different time-gate positions. *The V International Postharvest Symposium* 682: 1387-1394.