

## مقاله پژوهشی

# پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از تصویربرداری فراطیفی فروسرخ نزدیک در سیب رد دلشز طی دوره نگهداری

عبداله گل محمدی<sup>\*</sup>، مهسا سادات رضوی<sup>۲</sup>، محمد طهماسبی<sup>۱</sup>

۱. دانشیار، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲. دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۹)

## چکیده

از آنجا که فعالیت آنزیمی یکی از پارامترهای کیفی مهم سیب به شمار می‌رود، در این تحقیق اثر طول دوره انبارداری سرد بر مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب رقم رد دلشز به مدت ۶۰ روز مطالعه شد. تصویربرداری فراطیفی بازتابی در محدوده طول موج ۴۰۰-۱۱۰۰ nm انجام و فعالیت آنزیمی در نمونه‌ها نیز براساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. پس از حذف نویزها با آنالیز PCA، برای بهبود طیف، پیش‌پردازش‌های اولیه مختلف اعمال و اثرات آنها مورد مطالعه قرار گرفت. مدل مناسب با استفاده از روش حداقل مربعات جزئی (PLS) تعیین شد. طول موج‌های مؤثر با استفاده از الگوریتم‌های پیش‌بینی متوالی (SPA) و ضریب رگرسیون (RC) بهترین مدل انتخاب و با استفاده از روش‌های مختلف مدل‌سازی شد. براساس آنالیز PLS بهترین نتایج با پیش‌پردازش هموارسازی ساویتزکی-گولای با  $RMSEC=0/574$ ،  $R^2=0/948$ ،  $RMSECV=0/518$ ،  $R^2_{CV}=0/940$  حاصل شد. بر اساس آنالیز داده‌های پیش‌پردازشی با ضریب رگرسیون (RC) و الگوریتم‌های پیش‌بینی متوالی (SPA) ۹ طول موج به‌عنوان طول موج‌های مؤثر در تخمین فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌ها تعیین شدند. در مدل‌سازی با استفاده از طول موج‌های مؤثر، مدل تلفیق شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و الگوریتم‌های پیش‌بینی متوالی (SPA) بهترین نتیجه را داشت. در نتیجه به نظر می‌رسد روش تصویربرداری فراطیفی می‌تواند به‌عنوان ابزاری باارزش برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب طی دوره نگهداری بکار برده شود و طول موج انتخابی می‌تواند منابع بالقوه برای توسعه یک ابزار غیرمخرب باشد.

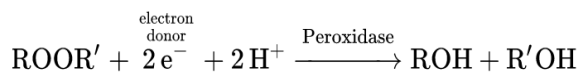
واژه‌های کلیدی: انبارداری، پراکسیداز، تصویربرداری فراطیفی، سیب، غیر مخرب

## ۱. مقدمه

مرئی برای دسته‌بندی اشیائی که دارای رنگ مشابه هستند، برای تشخیص معایب نامرئی و همچنین به منظور تخمین ویژگی‌های کیفی (ترکیب شیمیایی) اغلب ناکارآمد است، اگرچه خصوصیات خارجی مانند اندازه، شکل، رنگ، بافت و معایب خارجی با یک بینایی رایانه‌ای معمولی قابل ارزیابی می‌باشد، ولی تشخیص ویژگی‌های داخلی با یک وسیله تصویربرداری معمولی و نسبتاً ساده، مشکل است [۶]. گاهی ارزیابی محصولات طبیعی به سامانه‌های تصویربرداری فراطیفی نیاز دارد، دوربین‌های چندطیفی، چندین نوار مرئی و غیرمرئی را با استفاده از صافی‌ها و حسگرهای مناسب ترکیب می‌نمایند [۷]. در سال‌های اخیر کاربردهای تصویربرداری فراطیفی برای آزمون غیرمخرب در بسیاری از بخش‌های صنعتی و پژوهشی افزایش یافته است [۸].

یک تصویر طیفی، مجموعه‌ای از تصاویر می‌باشد که هر کدام در یک نوار باریک طیفی متفاوتی قرار دارند. تصاویر فراطیفی اطلاعاتی با جزئیات بیشتر در مقایسه با تصویربرداری معمولی که فقط سه نوار طیفی مختلف در رنگ‌های اولیه بصری (قرمز، سبز و آبی) به دست می‌آورد، فراهم می‌کند؛ بنابراین، تصویربرداری فراطیفی قابلیت و توانایی وسیعی برای دسته‌بندی اشیاء در تصویر براساس ویژگی‌های طیفی‌شان فراهم می‌کند. علاوه بر این، تصویربرداری فراطیفی می‌تواند اندازه‌گیری‌های طیفی در تمام سطح محصول را نیز فراهم کند، در حالی که طیف‌سنج‌های مرسوم تنها اندازه‌گیری نقطه‌ای را انجام می‌دهند [۷].

پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌ها و بیومولکول‌هایی با ساختار پروتئینی هستند که در فرآیندهای مختلف بیولوژیکی نقش دارند. این آنزیم‌ها واکنش کاهش اکسیداسیون را با مکانیسم رادیکال آزاد کاتالیز و چندین ترکیب از جمله پراکسیدها را از طریق واکنش زیر به محصولات اکسید شده یا پلیمریزه تبدیل می‌کند.



برای بسیاری از این آنزیم‌ها سوبسترای بهینه هیدروژن پراکسید است، اما برخی دیگر با هیدروپراکسیدهای آلی مانند

سیب (*Malus domestica* Bork) گیاهی از خانواده گلسرخیان (*Rosaceae*) و زیرخانواده *Pomoidea* از زمره اولین میوه‌هایی است که بشر از دوران ماقبل تاریخ و شروع دوران کشاورزی و باغبانی شناخته و مورد استفاده قرار داده است. عقیده بر این است که منشأ آن در آسیای مرکزی، چین و قفقاز می‌باشد [۱]. سیب یکی از مهم‌ترین میوه‌های استراتژیک کشور بوده و در حال حاضر از نظر وزنی بالاترین حجم صادرات محصولات باغی کشور را به خود اختصاص داده است [۲]. کشور چین به‌تنهایی ۷۰٪ تولید جهانی این محصول را به خود اختصاص داده است. ایران نیز رتبه هشتم جهان را از نظر تولید این محصول دارد [۳].

ارزیابی کیفیت و درجه‌بندی میوه‌ها یکی از فعالیت‌های مهم پس از برداشت است که با توجه به رشد تقاضا برای محصولات سالم و دارای کیفیت بهتر، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در دهه‌های اخیر تکنیک‌های مختلفی مانند اشعه X، روش‌های نوری، فراصوت، طیف‌سنجی فروسرخ نزدیک (NIR) و غیره برای ارزیابی میوه‌ها و سبزی‌ها به‌صورت غیرتخریبی کاربرد پیدا کرده‌اند. این فناوری‌های غیرتخریبی بسیار مطلوب و نسبت به روش‌های تخریبی سریع‌تر و اقتصادی‌تر هستند. طی دهه‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای روی کاربرد این روش‌ها در کیفیت‌سنجی میوه‌ها و سبزیجات صورت گرفته است. با این حال هیچ‌کدام از روش‌های پیشنهادی تاکنون نتوانسته‌اند تمام اطلاعات مورد نیاز تعیین کیفیت و رسیدگی محصول را فراهم نمایند و به‌صورت صنعتی همچنان از روش‌های مخرب استفاده می‌شود. استفاده از این روش‌ها مشکل، زمان‌بر و پرهزینه هستند؛ در نتیجه روش‌های غیرتخریبی در اندازه‌گیری ویژگی‌های میوه می‌تواند برای تعیین سریع کیفیت و رسیدگی تعداد بیشتری میوه به‌صورت تک تک مفید باشد [۴].

همچنین در سال‌های اخیر کاربرد ماشین‌بینایی در کشاورزی و صنایع غذایی در برخی زمینه‌ها مانند بازرسی غیرمخرب ویژگی محصولات، کنترل کیفیت و دسته‌بندی در خطوط فرآوری و عموماً خودکارسازی فرآیند، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است [۵]. با این حال روش تصویربرداری

تیمارهای مختلف آسیب کسب و سپس آنزیم پلی فنل اکسیداز استخراج و میزان فعالیت آن اندازه گیری شد و مدل های رگرسیون مؤلفه براساس داده های بازتاب خام و بازتاب چندگانه اصلاح شده (MSC) ایجاد شدند. نقشه های پیش بینی نشان داد که مدل MSC به دلیل انحنای نمونه و بی نظمی های سطحی، امکان جبران اختلاف طیفی را فراهم می کند. نتایج همچنین نشان داد که احتمال ایجاد یک سنسور که قادر به شناسایی سریع قارچ هایی که احتمال بیش تری برای افزایش قهوه ای شدن آنزیمی دارند را شناسایی کند، وجود دارد [۱۲]. کونگ و همکاران در مطالعه ای تشخیص سریع فعالیت پراکسیداز (POD) در برگ های گوجه فرنگی آلوده به قارچ *Botrytis cinerea* را با استفاده از تصویربرداری طیفی بررسی نمودند. در این مطالعه از الگوریتم ژنتیکی-حداقل مربعات جزئی (GA-PLS) برای انتخاب طول موج مطلوب استفاده شد. همچنین از یک الگوریتم عصبی یادگیری سریع جدید به نام دستگاه یادگیری شدید (ELM) به عنوان ابزار تحلیلی چند متغیره استفاده شد. ۲۱ طول موج بهینه توسط GA-PLS انتخاب و به عنوان ورودی سه مدل کالیبراسیون استفاده شد. پیش بینی بهینه با استفاده از مدل ELM با طول موج انتخابی به دست آمد. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که تصویربرداری فراطیفی می تواند به عنوان ابزاری با ارزش برای پیش بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز در نظر گرفته شود و طول موج انتخابی می تواند منابع بالقوه برای توسعه یک ابزار غیرمخرب باشد [۱۳]. یانگ و همکاران در پژوهشی به ارزیابی زمان واقعی فعالیت پلی فنل اکسیداز در سرخالو براساس ترکیب وزنی داده های طیفی و ویژگی های تصویر تعیین شده توسط شبکه عصبی فازی پرداختند. تصاویر سرخالو توسط یک سیستم تصویربرداری ابرطیفی بازتابی که در محدوده ۴۰۰-۱۰۰۰ نانومتر کار می کرد، به دست آمد. یک الگوریتم حذف ویژگی بازگشتی از ماشین بردار پشتیبان برای از بین بردن متغیرهای با اطلاعات کم و یا اندک استفاده شد. اطلاعات طیفی در طول موج مطلوب و ویژگی های رنگ تصویر به ترتیب برای تهیه مدل های کالیبراسیون برای پیش بینی فعالیت پلی فنل اکسیداز محصول در حین نگهداری مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصل از دو مدل مقایسه شد.

پراکسیدهای لیپیدی فعال تر هستند. پراکسیدازها می توانند حاوی یک کوفاکتور هم<sup>۱</sup> در محل های فعال خود یا به طور متناوب سیستئین<sup>۲</sup> یا سلنوسیستئین<sup>۳</sup> فعال اکسیداسیون باشند. ماهیت دهنده الکترون بسیار به ساختار آنزیم بستگی دارد. به عنوان مثال، پراکسیداز ترب کوهی<sup>۴</sup> می تواند از انواع ترکیبات آلی به عنوان دهنده و گیرنده الکترون استفاده کند. با این حال از آنجایی که یک محل فعال بسیار بسته برای آنزیمی مانند پراکسیداز سیتوکروم c وجود دارد، ترکیباتی که قادرند به عنوان برای این آنزیم ها به عنوان دهنده الکترون عمل کنند بسیار خاص هستند [۹]. هر آنزیمی از نظر کاتالیک تنها در محدوده باریکی از pH و دما فعالیت می کند و به عنوان یک قانون، هر آنزیم دارای یک محدود دما و pH بهینه می باشد، pH بهینه، تحت تأثیر نوع و قدرت یونی بافر مورد استفاده در آزمون قرار دارد و اغلب در محدوده بین ۵/۵ تا ۷/۵ قرار می گیرد. دلایل حساسیت آنزیم به تغییرات pH از دو نظر مطرح می شود: نخست تغییر در ساختار پروتئین که منجر به دناتوراسیون غیرقابل بازگشت پروتئین می شود و ثانیاً فعالیت کاتالیتیک به تعداد بارهای الکترواستاتیک جایگاه فعال آنزیم بستگی دارد که این بارها از گروه های پروتوتروپیک آنزیم حاصل می شوند. افزایش دما نیز سبب افزایش سرعت واکنش های آنزیمی می شود؛ با این دناتوراسیون غیرقابل بازگشت پروتئین در دمای بالا موجب کاهش یا توقف فعالیت آنزیم ها می شود [۱۰].

در مطالعه تغییرات آنزیمی میوه ها بین آنزیم های اکسیدوردوکتازها آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز که اغلب موجب قهوه ای شدن آنزیمی در طول عمر پس از برداشت محصول می شوند از اهمیت بسیاری برخوردارند [۱۱] و تاکنون پژوهش های مختلفی در رابطه با تخمین غیرمخرب فعالیت این آنزیم ها در محصولات کشاورزی و غذایی صورت گرفته است. گاستون و همکاران در مطالعه ای به بررسی توانایی پتانسیل روش تصویربرداری طیفی در پیش بینی فعالیت پلی فنل اکسیداز در قارچ خوراکی پرداختند. در این مطالعه تصاویر از قارچ های در معرض

1. Heme
2. Cysteine
3. Selenocysteine
4. Horseradish peroxidase

ناشی از عفونت در برگ‌های سیب‌زمینی ذخیره‌شده در انکوباتور با دمای  $25^{\circ}\text{C}$  با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت. چهار مدل پیش‌بینی با استفاده از حداقل مربعات جزئی خطی (PLS) و ماشین بردار پشتیبانی غیرخطی (SVM) براساس طیف کامل و طول‌موج مؤثر توسعه داده شد. طول‌موج مؤثر توسط الگوریتم پیش‌بینی پی‌درپی (SPA) انتخاب شد. در این مطالعه، مدل پیش‌بینی توسعه‌یافته با استفاده از روش SPA-SVM بهترین عملکرد را داشت [۱۷]. با این وجود به نظر می‌رسد تاکنون پیش‌بینی غیرمخرب فعالیت آنزیم پرکسیداز در میوه سیب طی نگهداری سرد تاکنون بررسی نشده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی امکان استفاده از روش تصویربرداری طیفی به‌منظور تخمین غیرمخرب فعالیت این آنزیم در سیب در طی دوره نگهداری است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. تهیه نمونه

در این پژوهش تعدادی سیب رقم ردلیش از باغ‌های تجاری سیب واقع در مشکین شهر اردبیل تهیه شد. میوه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و از بین آن‌ها ۸۰ میوه با اندازه، شکل و رنگ یکنواخت و بدون هیچ‌گونه نشانه‌ای از آسیب‌های مکانیکی و یا پوسیدگی قارچی برای انجام آزمایش‌ها انتخاب و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. در روزهای ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نگهداری به شرح زیر هر بار از ۲۰ عدد از نمونه‌ها تصویربرداری شده و بلافاصله میزان فعالیت آنزیم پرکسیداز در آنها به‌صورت مخرب مورد ارزیابی قرار گرفت.

### ۲.۲. تصویربرداری فراطیفی

تصاویر فراطیفی از نمونه‌ها با استفاده از یک بستر آزمون تصویربرداری چرخشی (Fanavaran Physics Co., Iran) به دست آمد. این سیستم از یک موتور افقی، یک رایانه، یک نرم‌افزار اکتساب تصویر و یک دوربین با لنز دستگاه بارجفت‌شده<sup>۲</sup> (CCD) تشکیل شده بود. تصویر به دست آمده

به‌منظور بهبود دقت پیش‌بینی، یک استراتژی تصمیم‌گیری براساس ترکیب وزنی داده‌های طیفی و ویژگی‌های تصویر تدوین شد که در آن وزن‌ها توسط FNN برای تخمین بهتری از فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز تعیین می‌شد. نتایج این پژوهش نشان داد که مدل تصمیم‌گیری ترکیبی بهترین مدل در بین کلیه مدل‌های کالیبراسیون است. این نتایج نشان داد که روش تصمیم‌گیری ترکیبی وزنی پیشنهادی پتانسیل بسیار خوبی برای بهبود عملکرد مدل دارد و از روش پیشنهادی می‌توان برای پیش‌بینی بهتر سایر خصوصیات کیفیت داخلی و خارجی میوه نیز استفاده نمود [۱۴]. نداف‌زاده و همکاران یک سیستم بینایی رایانه‌ای را برای پیش‌بینی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز برای ارزیابی روند قهوه‌ای شدن موز با استفاده از مدل‌سازی برنامه‌نویسی ژنتیکی توسعه دادند. برای این منظور، هدفه پارامتر از هر تصویر به‌عنوان پارامترهای غیرمخرب استخراج شد. در ادامه، فعالیت آنزیم‌ها از طریق روش‌های آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند و در نهایت با استفاده از مدل‌سازی برنامه‌نویسی ژنتیکی (GP)، دو معادله به دست آمد که می‌توان برای پیش‌بینی و تشخیص تغییرات فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در حین نگهداری استفاده نمود [۱۵]. پن و همکاران روش جدید برای تعیین دقیق فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز براساس کاهش شدت طیف‌سنجی رامان ارتقا یافته سطحی (SERS)<sup>۱</sup> کاتکول ارائه نمودند. از این روش برای تشخیص فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در نمونه‌های سیب و سیب‌زمینی استفاده شد و نتایج با نتایج به دست آمده از روش رنگ‌سنجی مقایسه شد که نشان داد روش پیشنهادی می‌تواند با موفقیت در تشخیص فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در نمونه‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد [۱۶]. لی و هیو مدل‌های سنتیک فعالیت پراکسیداز در برگ‌های سیب‌زمینی آلوده به بیماری سوختگی را براساس داده‌های ابرطیفی توسعه دادند. تغییرات

۱. به انگلیسی Surface-enhanced Raman spectroscopy: یک روش حساس به سطح است که پراکندگی رامان را بوسیله مولکول‌های جذب سطحی شده روی سطوح یک فلز زیر و ناهموار و یا توسط نانوساختارهایی مانند نانولوله‌های سیلیسی پلاسمونیک مغناطیسی تقویت می‌کند. ضریب تقویت می‌تواند از ۱۰۱۰ تا ۱۰۱۱ باشد که به این معنی است که این تکنیک ممکن است قادر به شناسایی تک مولکول‌ها باشد.

2. Charge-coupled device (CCD)

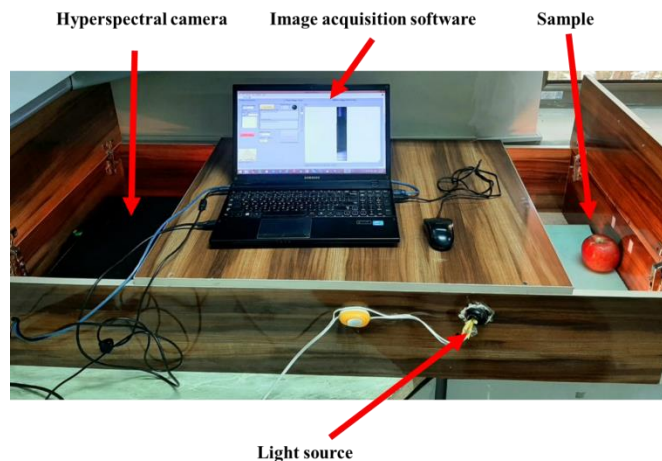
دوربین با استفاده از یک درپوش مات و تصویر بازتاب سفید با استفاده از یک تخته سفید تفلون (بازتاب ۰/۹۹/۹۹) به دست آمد [۱۸] و تصاویر خام به دست آمده ( $R_0$ ) با رابطه (۱) تصحیح شد:

$$R = \frac{R_0 - R_d}{R_w - R_d} \quad (1)$$

جایی که  $R_0$  تصویر اصلی فراطیفی،  $R_d$  تصویر سیاه و  $R_w$  تصویر بازتابی سفید است. از تصاویر تصحیح شده برای تجزیه و تحلیل بیشتر استفاده شد [۱۹].

شامل ۴۲۰ نمایه فضایی با طول موج از ۴۰۰ nm تا ۱۱۰۰ nm در بازه ۱/۴۳ nm بود. همچنین پارامترهای سیستم تصویربرداری فراطیفی به شرح زیر بود: به منظور قرار گرفتن میوه به صورت کامل در میدان دید لنز دوربین فاصله بین نمونه و لنز سامانه ۱۰۰ cm در نظر گرفته شد و به منظور جلوگیری از ایجاد سایه در تصاویر شدت منبع نور ۲۰ W با زاویه ۴۵ درجه نسبت به نمونه بود (شکل ۱).

برای کاهش تأثیر روشنایی و تاریک آشکارسازهای CCD، اختلافات در دوربین و پیکربندی فیزیکی سیستم تصویربرداری، تصاویر فراطیفی با یک تصویر مرجع سیاه و سفید اصلاح شد. تصویر بازتاب سیاه با پوشاندن کامل لنز



شکل (۱) اجزای اصلی سامانه تصویربرداری فراطیفی برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب  
**Fig 1.** Main components of the hyperspectral imaging system for predicting of Peroxidase Activity in apple

France) شد و از ماده شناور به منظور بررسی فعالیت آنزیمی استفاده شد. سپس ۵۰۰  $\mu$ l عصاره آنزیمی با ۱ ml بافر سدیم فسفات ۰/۰۵M (pH=۶/۵) مخلوط و برای شروع آزمایش ۱ ml بافر سدیم فسفات ۰/۰۵M (pH=۶/۵) حاوی ۵۰۰  $\mu$ l هیدروژن پروکسید ( $H_2O_2$ ) ۱/۵٪ (v/v) به عنوان سوبسترا با غلظت ثابت و ۱ mL پارا-فنیل دی آمین ۱٪ (w/v) به عنوان سوبسترا اصلی آن اضافه شد. نمونه شاهد نیز به روش مشابه و با جایگزینی آب با عصاره آنزیمی تهیه شد، سپس میزان جذب در ۴۸۵ nm به مدت ۱۰ min در دمای ۲۵ °C

### ۳.۲. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای این منظور ۱۰g از پالپ میوه درون یک مخلوط‌کن ریخته شد و به صورت کامل هموژن شد. سپس پالپ حاصل به ۲۰ml محلول استخراج آنزیمی شامل بافر سدیم فسفات ۰/۴M (pH=۶/۵) حاوی ۰/۴٪ (w/v) پلی‌ونیل‌پیرولیدون<sup>۱</sup> و ۱٪ (v/v) تریتون ایکس-۱۰۰ افزوده و با استفاده از ورتکس (Labtron LS-100, Iran) کاملاً مخلوط شد. محلول حاصل در دمای ۴ °C به مدت ۱۰min با سرعت ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ (LISA 2.5L centrifuge AFI, )

3. p-phenylenediamine

1. Polyvinylpyrrolidone (PVP)  
 2. Triton X-100

غیرممکن می‌سازد؛ لذا باید به دنبال یافتن راهی برای یافتن طول موج‌های مؤثر و محدود کردن طول موج‌ها به حداقل مقدار ممکن بود. روش رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) از این نظر ایده‌آل به نظر می‌رسد. در این پژوهش به منظور ساخت مدل‌ها، داده‌ها به صورت تصادفی به دو قسمت تقسیم شدند: ۸۰٪ نمونه‌ها به منظور آموزش و اعتبارسنجی و متقاطع و از باقی داده‌ها جهت اعتبارسنجی مستقل استفاده شد. مدل‌های PLS برای کلیه پیش‌پردازش‌های صورت گرفته روی داده‌ها ایجاد و از شاخص‌های آماری ضریب تبیین  $R^2$  و خطای جذر میانگین مربعات  $RMSE$  (روابط ۲ و ۳) به منظور یافتن بهترین مدل استفاده شد [۲۲].

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Z_i)^2}{\sum_{i=1}^n t_i^2} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (d_i - p_i)^2}{N}} \quad (3)$$

#### ۴.۴.۲. انتخاب طول موج‌های مؤثر

داده‌های فراطیفی با وضوح بالا حاوی متغیرهای غیرمفید و چندخطی بودن بین باندهای مجاور هستند که این امر منجر به پیچیدگی و بازده پایین مدل‌های کالیبراسیون می‌شود. علاوه بر این، سامانه‌های مبتنی بر باندهای طیفی کامل ممکن است هزینه بالایی داشته باشند که توسعه تکنیک‌های تصویربرداری فراطیفی را برای اهداف آنلاین محدود می‌کند؛ بنابراین، اغلب از الگوریتم‌های انتخاب طول موج چندمتغیره برای به دست آوردن چند طول موج مؤثر و کلیدی به منظور ایجاد مدل‌های کمی ساده‌تر و بهتر استفاده می‌شود. در این مطالعه از الگوریتم پیش‌بینی متوالی (SPA) و ضرایب رگرسیون (RC) برای استخراج طول موج‌های مؤثر (EWs) استفاده شد. از ضرایب رگرسیون بهترین مدل PLSR برای شناسایی طول موج‌های مؤثر بر متغیرهای پاسخ (فعالیت آنزیمی) استفاده شد. طول موج‌هایی با مقادیر بالای قدرمطلق ضریب رگرسیون (قله‌ها و دره‌ها) نشان می‌دهد که آن طول موج تأثیرات بالایی در پیش‌بینی متغیر Y دارند و

اسپکتروفتومتر نانودراپ (NanoDrop™ OneC, Thermo) در حال سینتیک<sup>۱</sup> اندازه‌گیری و فعالیت آنزیمی بر حسب  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  بیان شد [۲۰].

#### ۴.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

##### ۱.۴.۲. تجزیه مؤلفه‌های اصلی<sup>۲</sup> (PCA) به منظور حذف

##### نمونه‌های پرت

در طول انجام آزمایش‌ها به دلایل مختلفی نظیر مشکلات فنی تجهیزات، جمع‌آوری داده، نمونه‌گیری نادرست و ... ممکن است برخی نمونه‌ها نامناسب و یا به اصطلاح پرت باشند. به منظور حذف این نمونه‌ها قبل از هرگونه پردازش روی داده‌ها از تجزیه مؤلفه‌های اصلی استفاده شد.

##### ۲.۴.۲. پیش‌پردازش

داده‌های حاصل از سیستم تصویربرداری طیفی ممکن است تحت تأثیر عواملی مانند اثر پراکنش نور توسط تغییر آشکارساز با نمونه، تغییر در اندازه نمونه، ناهمواری‌های سطحی در نمونه، نویزهای ایجادشده به علت افزایش دما سامانه و بسیاری عوامل دیگر قرار گیرد و این اطلاعات ناخواسته بر دقت مدل‌های کالیبراسیونی تأثیر بگذارد. از این رو جهت دستیابی به مدل‌های واسنجی پایدار، دقیق و قابل‌اعتماد نیاز به پیش‌پردازش داده‌ها است [۲۱]. در این پژوهش هموارسازی ساویتزکی-گولای<sup>۳</sup>، مشتقات اول و دوم، تصحیح خط مبنا<sup>۴</sup>، تصحیح پخش افزایشنده<sup>۵</sup> (MSC) و توزیع نرمال استاندارد<sup>۶</sup> (SNV) بر روی داده‌ها اعمال شد.

##### ۳.۴.۲. رگرسیون حداقل مربعات جزئی<sup>۷</sup> (PLS)

از آنجایی که به کارگیری روش‌های غیرمخرب مبتنی بر طیف‌سنجی با بازه کاملی از طول موج‌ها نیازمند صرف وقت و هزینه بسیار بالا است، کاربرد عملی این روش را تقریباً

1. Kinetics
2. Principal component analysis
3. Savitzky-Golay smoothing
4. Baseline
5. Multiplicative Scatter Correction
6. Standard normal distribution
7. Partial least squares regression

8. Coefficient of determination

9. Root mean square error

کلیه مراحل تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار The Unscrambler X 10.4 و Matlab 2018b انجام گرفت و محاسبات و رسم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 انجام گرفت.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۳.۱. تغییرات فعالیت آنزیمی نمونه‌ها در طول دوره نگهداری

جدول (۱) مقادیر فعالیت آنزیمی نمونه‌های سیب را در مراحل مختلف آزمایش نشان می‌دهد. براساس نتایج حاصل با گذشت زمان مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌ها افزایش می‌یابد. آنزیم‌های اکسیداسیونی از اکسیژن برای کاتالیز اکسیداسیون ترکیبات فنولی که به‌طور طبیعی در میوه‌ها یافت می‌شوند و در نهایت شکل‌گیری کوئینون‌ها<sup>۳</sup> که منجر به آشکار شدن رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای می‌شود، استفاده می‌کنند [۲۵-۲۷].

همچنین، محتوای آسکوربیک‌اسید در فعالیت آنزیمی بسیار مؤثر است و ممکن است موجب بازداری از قهوه‌ای شدن ناشی از فعالیت آنزیم‌ها شود [۲۸-۲۹]. از آنجایی که در طول دوره نگهداری معمولاً مقدار آسکوربیک‌اسید کاهش می‌یابد، می‌توان فرض نمود که این کاهش منجر به پیشروی فعالیت آنزیمی نمونه‌ها در فقدان آسکوربیک‌اسید شده است. باید در نظر داشت که ظرفیت آسکوربیک‌اسید برای کاهش فعالیت آنزیمی تا حد زیادی بستگی به غلظت آن دارد، بنابراین، در بعضی موارد اثر بازدارندگی آن می‌تواند قابل چشم‌پوشی باشد [۲۸]. علاوه بر این، افزایش نرخ تنفس در نمونه‌ها در ابتدای دوره نگهداری که به‌طور معکوسی وابسته به مصرف اکسیژن است، می‌تواند افزایش در فعالیت آنزیمی را تخمین بزند، چرا که تولید بیشتر CO<sub>2</sub> به معنای مصرف بیشتر O<sub>2</sub> توسط نمونه‌ها است که فرآیند اکسیداسیون را سرعت می‌بخشد [۲۷]. نتایج به

در نتیجه می‌توانند به‌عنوان طول موج‌های مؤثر انتخاب شوند [۲۳]. الگوریتم پیش‌بینی متوالی (SPA) نیز یک روش انتخاب پیش‌رونده است که از عملیات ساده در یک فضای برداری برای به‌حداقل رساندن خطی بودن متغیرها استفاده می‌کند. متغیر مفید را می‌توان در تحلیل داده‌های طیفی برای کالیبراسیون چند متغیره با استفاده از این روش انتخاب نمود. در این روش، در ابتدا هیچ متغیری در مدل وجود ندارد و اولین متغیری که وارد مدل می‌شود، آن متغیری است که بیش‌ترین همبستگی را با متغیر وابسته تحقیق دارد. اگر بعد از اجرا، مقدار آماره آن در حد قابل قبول باشد متغیر در مدل می‌ماند. در ادامه، متغیر دومی که بیش‌ترین همبستگی را بر روی متغیر وابسته دارد وارد مدل می‌شود و مدل مجدداً اجرا می‌شود. این روند تا آنجا ادامه دارد که مقدار RMSE که کم‌ترین حد خود برسد [۲۴].

#### ۵.۴.۲. مدل‌سازی با استفاده از طول موج‌های مؤثر

به‌منظور یافتن بهترین مدل برازش کننده رابطه بین طول‌موج‌های مؤثر و تغییرات فعالیت آنزیمی سیب در طول دوره نگهداری، مدل‌های PLS، رگرسیون خطی چندگانه (MLR)، ماشین‌بردار پشتیبان<sup>۱</sup> (SVM) و شبکه عصبی مصنوعی<sup>۲</sup> (ANN) پیاده‌سازی شد. مطابق با آنچه در بخش قبلی گفته شد به‌منظور ساخت مدل‌ها، داده‌ها به‌صورت تصادفی به دو قسمت تقسیم شدند و از شاخص‌های آماری ضریب تبیین (R<sup>2</sup>) و خطای جذر میانگین مربعات (RMSE) (روابط ۲ و ۳) به‌منظور یافتن بهترین مدل استفاده شد. از شبکه عصبی پرسپترون چندلایه بر پایه الگوریتم پس انتشار شامل یک لایه ورودی با تعداد نورون برابر با تعداد طول‌موج‌های مؤثر و لایه خروجی با یک نورون (فعالیت آنزیمی) و با یک و دو لایه پنهان در پنج سطح مختلف از تعداد نورون (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) استفاده شد. همچنین در این پژوهش از الگوریتم لونیگ-مارکوارت برای به‌هنگام سازی وزن‌های شبکه عصبی مصنوعی استفاده شد که به‌علت آموزش سریع شبکه و به‌حداقل رساندن سطح خطا از الگوریتم‌های پرکاربرد در این زمینه است [۲۲].

۳. به انگلیسی Quinones: دسته‌ای از ترکیب‌های آلی هستند که به‌صورت مرسوم از اکسایش ترکیب‌های آروماتیک تولید می‌شوند.

1. Support vector machines  
2. Artificial neural network

دست آمده با مطالعات پیشین صورت گرفته توسط عشقی و همکاران [۳۰]. در بررسی اثر پوشش نانوکیتوزان بارگذاری شده با مس رو توت‌فرنگی‌های تازه مطابقت دارد؛ اما نتایج در مغایرت با تحقیق صورت گرفته توسط اوتمن [۲۸] است که گزارش کرد فعالیت آنزیم در طول ۸ روز برای میوه‌های

آناناس، انبه و پاپایا کاهش یافت. اگرچه در تعدادی از گزارش‌ها مغایرت وجود دارد، اما فعالیت آنزیمی انتظار می‌رود که تحت تأثیر عوامل بسیاری مانند دما، pH، دسترسی به اکسیژن، مقدار و نوع ترکیبات فنولی موجود در نمونه، رقم و غیره باشد [۲۷-۲۸].

جدول (۱) فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه‌های سیب در مراحل مختلف آزمایش

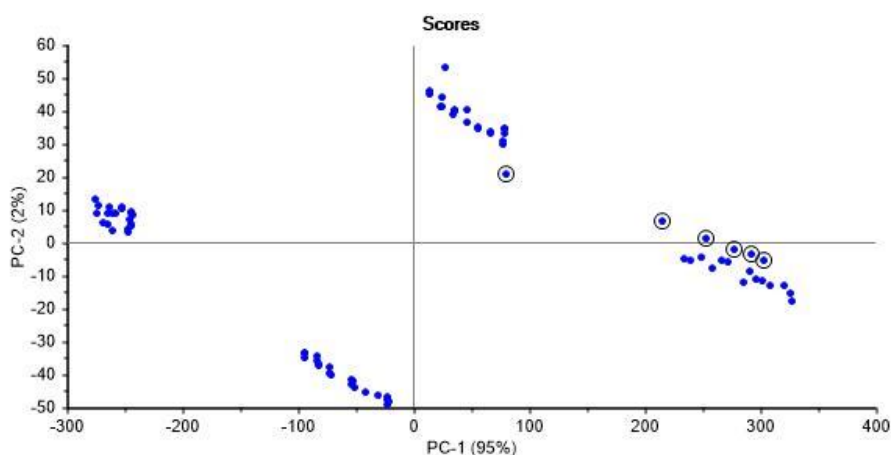
Table 1. The peroxidase enzyme activity of apple samples at different test stages

انحراف معیار Standard deviation	میانگین ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) Mean ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	تعداد Number	زمان (روز) Time (Day)
0.155	2.242	20	0
0.220	3.551	20	20
0.395	5.140	20	40
0.628	7.849	20	60

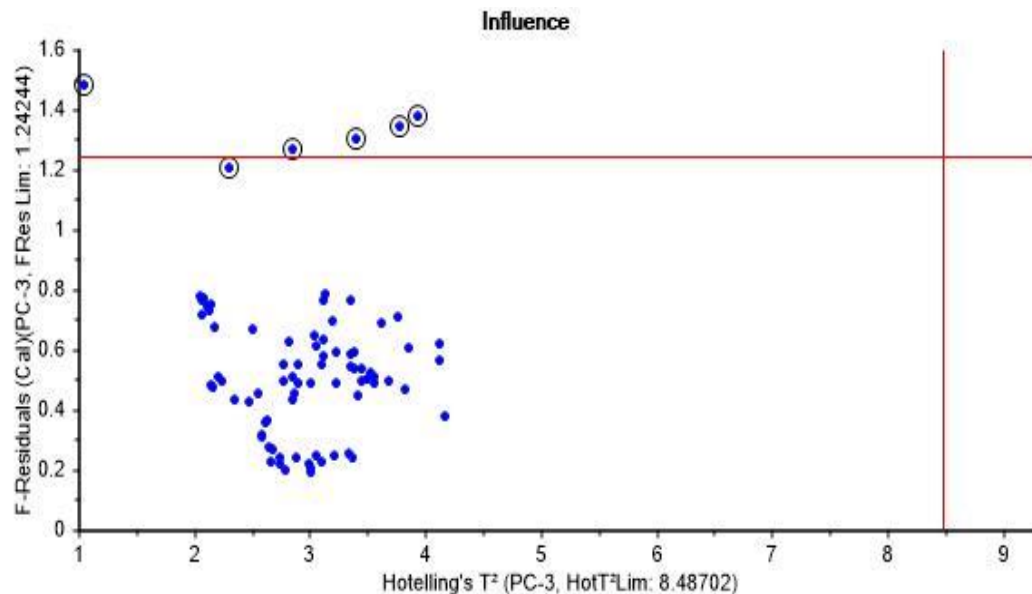
نمونه‌گیری نادرست و ... ممکن است نامناسب و یا به اصلاح پرت باشند [۳۱-۳۳] که در این پژوهش برای تشخیص آنها از توزیع تی‌مربع هاتلینگ-باقیمانده F استفاده شد. در این روش باقیمانده F فاصله نمونه تا مدل را بیان می‌کند و توزیع تی‌مربع هاتلینگ نشان‌دهنده توصیف نمونه توسط مدل است [۳۳]. براساس نتایج حاصل که در شکل (۱-ب) نشان داده شده است، تعداد شش عدد از کل نمونه‌ها به‌عنوان داده‌های پرت تعیین شد که با علامت دایره نشان داده شده‌اند که در آنها مقادیر توزیع تی‌مربع هاتلینگ بالاتر از ۸/۵ است. داده‌های پرت شناسایی شده در آنالیزهای بعدی حذف شدند.

### ۲.۳. تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA)

براساس نتایج آنالیز PCA که در شکل (۲) نشان داده شده است، اولین مؤلفه اصلی (PC-1) ۹۵٪ و دومین مؤلفه اصلی (PC-2) ۲٪ از واریانس نمونه‌های مورد آزمایش را توصیف می‌کنند و در نتیجه دو مؤلفه اصلی اول مجموعاً ۹۷٪ از داده‌ها را بیان می‌کنند. همچنین همان‌گونه که در این شکل مشخص است نمونه‌ها هر یک از زمان‌های مورد ارزیابی در کنار هم و به‌صورت کاملاً تفکیک‌شده قرار دارند که این امر نشان می‌دهد که این روش به‌خوبی قادر به تشخیص تغییرات نمونه‌ها در طول دوره نگهداری است. همان‌گونه که پیش‌تر گفته شد در طول انجام آزمایش‌ها برخی نمونه‌ها به‌دلایل مختلفی نظیر مشکلات فنی تجهیزات، جمع‌آوری داده،







شکل (۲) نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA)

Fig 2. Principal Component Analysis Results (PCA)

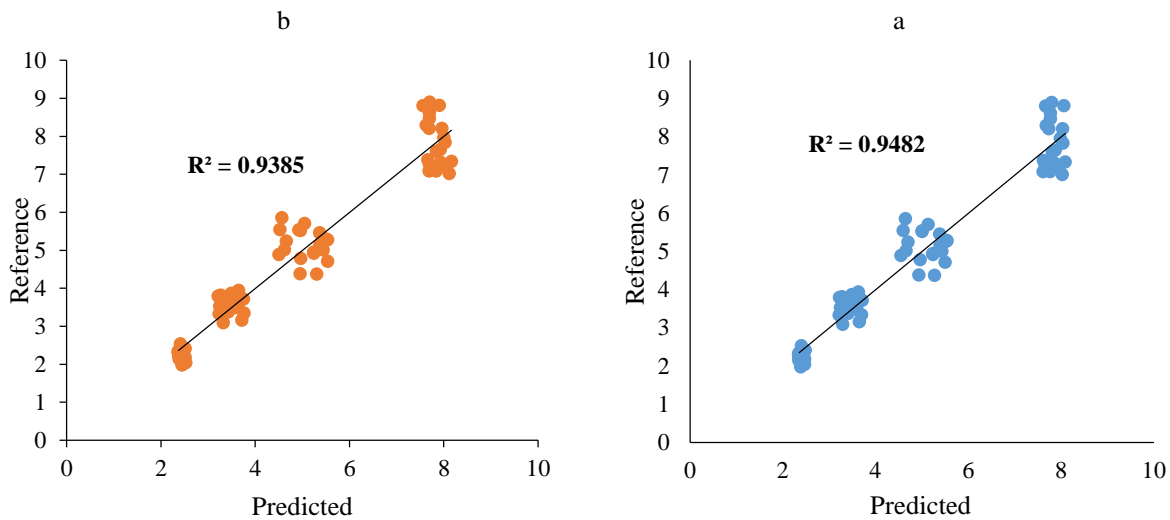
گوجه‌فرنگی شامل SSC، pH و محتوای رطوبتی را بررسی نمودند. در این پژوهش از بین روش‌های میانگین متحرک، نرمال‌شده با بیشینه، میانگین و محدوده، هموارسازی ساویتزکی-گولای مشتقات اول و دوم، تصحیح پخش افزاینده (MSC) و توزیع نرمال استاندارد (SNV)، استفاده از هموارسازی ساویتزکی-گولای مشتقات اول بالاترین دقت در تشخیص پارامترهای کیفی گوجه‌فرنگی را در پی داشت. کیم و همکاران [۳۶] در تخمین SSC خربزه شرقی با استفاده از طیف‌سنجی فروسرخ نزدیک در بین روش‌های مختلف پیش‌پردازش شامل هموارسازی ساویتزکی-گولای، نرمال‌سازی با بیشینه و کمینه، نرمال‌سازی استواری، استانداردسازی، متغیر نرمال استوار، توزیع نرمال استاندارد (SNV) و تصحیح پخش افزاینده (MSC) گزارش نمودند که بهترین نتیجه با توزیع نرمال استاندارد (SNV) حاصل شده است. هر چند با توجه به ماهیت متفاوت نمونه‌ها، روش و تجهیزات اندازه‌گیری و سایر شرایط اثرگذار در خواص طیفی محصول بهتر است، مقایسه‌ای بین داده‌های حاصل از پژوهش‌های مختلف با یکدیگر مورد مقایسه قرار نگیرد [۳۷].

### ۳.۳. رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS)

مقادیر  $R^2$ ، RMSE برای مجموعه‌های کالیبراسیون و اعتبارسنجی مدل‌های مختلف رگرسیون (PLS) با داده‌های خام و پردازش‌شده با توابع مختلف در جدول (۲) ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که همه پیش‌پردازش‌های انجام‌شده و همچنین طیف‌های بدون پیش‌پردازش قادر به پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز با دقت مطلوب هستند و بهترین نتایج در مدل تدوین‌شده در پیش‌پردازش هموارسازی ساویتزکی-گولای با  $RMSEC=0/475$ ،  $R^2_{CV}=0/940$ ،  $RMSECV=0/518$ ،  $R^2_c=0/948$  خدابخشیان و همکاران [۳۴] پتانسیل طیف‌سنجی مرئی و فروسرخ برای طبقه‌بندی مرحله رسیدگی و پیش‌بینی صفات کیفی رقم انار شامل SSC و TA را بررسی نمودند. از بین روش‌های مرکزسازی، هموارسازی ساویتزکی-گولای، فیلتر میانه، متغیر نرمال استاندارد، تصحیح پخش افزاینده (MSC) و تمایز با مشتق اول و مشتق دوم، استفاده از تصحیح پخش افزاینده (MSC) بالاترین دقت در تشخیص پارامترهای کیفی انار را در پی داشت. رحمان و همکاران [۳۵] پتانسیل تصویربرداری فرایطیفی به‌منظور پیش‌بینی صفات کیفی

جدول (۲) مقادیر  $R^2$ , RMSE برای مجموعه‌های کالیبراسیون و اعتبارسنجی مدل‌های مختلف رگرسیون (PLS)  
 Table 2.  $R^2$  and RMSE values for calibration and validation sets of different regression models (PLS)

RMSECV	$R^2_{cv}$	RMSEC	$R^2_c$	روش پیش‌پردازش Pre-processing method
0.549	0.933	0.519	0.938	بدون پیش‌پردازش Without preprocessing
<b>0.518</b>	<b>0.940</b>	<b>0.475</b>	<b>0.948</b>	هموارسازی ساویتزکی-گولای Savitsky-Gulay smoothing
0.536	0.936	0.506	0.941	مشتق اول 1th derivation
0.525	0.939	0.496	0.944	مشتق دوم 2th derivation
0.521	0.939	0.486	0.946	خط مبنا
<b>0.553</b>	<b>0.932</b>	<b>0.524</b>	<b>0.937</b>	توزیع نرمال استاندارد (SNV) Standard normal distribution
0.520	0.940	0.476	0.948	تصحیح پخش افزایشده (MSC) Multiplicative scatter correction (MSC)



شکل (۳) همبستگی بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط مدل رگرسیون مربعات جزئی (PLS) پیش‌پردازش شده با هموارسازی ساویتزکی-گولای

Fig 3. Correlation between Actual and Predicted Values of Peroxidase Activity Regression Model (PLS) Preprocessed with Savitsky-Gulay Smoothing

### ۴.۳. طول موج‌های مؤثر

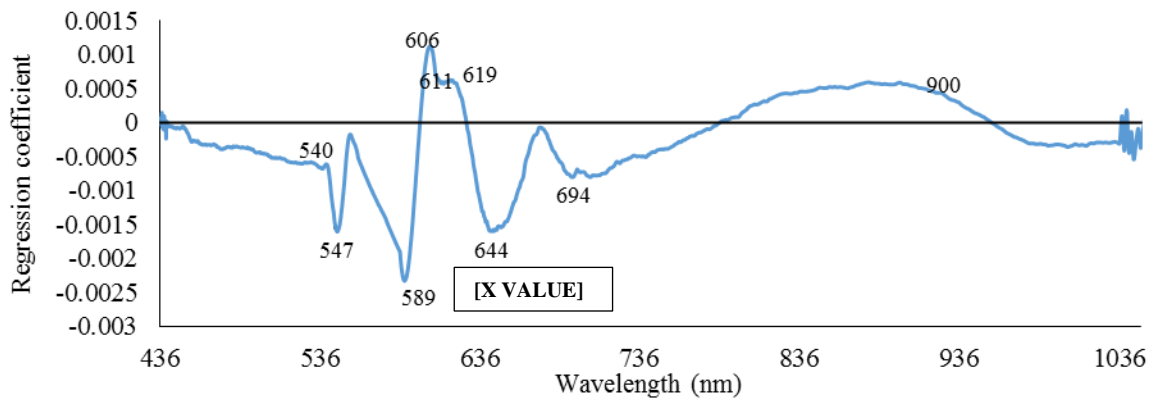
طول موج‌های مؤثر انتخاب شدند (شکل ۴ ج). این طول موج‌های مؤثر شناسایی شده براساس دو روش ضریب رگرسیونی و الگوریتم پیش‌بینی متوالی (SPA) در اطراف طول موج ۴۷۰ nm را می‌توان به جذب کاروتنوئیدها و محدوده طول موج ۶۷۰ نانومتر را به جذب کلروفیل‌ها نسبت داد [۳۸] که احتمالاً با کاهش میزان تغییر میزان رنگ‌دانه‌های نظیر آنتوسیانین و کلورفیل در اثر فعالیت آنزیم و رسیدگی بیشتر نمونه‌ها در طول دوره نگهداری مرتبط است. همچنین میزان فعالیت آنزیمی اکسیداسیونی در

براساس ضریب رگرسیونی داده‌های پیش‌پردازشی با هموارسازی ساویتزکی-گولای (شکل ۴ الف) ۹ طول موج به‌عنوان طول موج‌های مؤثر در تخمین فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌ها انتخاب شدند. همچنین نتایج آنالیز این داده‌ها با الگوریتم پیش‌بینی متوالی (SPA) (شکل ۴ ب) میزان RMSE پس از استفاده از ۹ طول موج به کم‌ترین مقدار خود رسیده و سپس با افزایش تعداد طول موج‌ها تغییرات محسوسی ندارد؛ لذا این ۹ طول موج نیز به‌عنوان

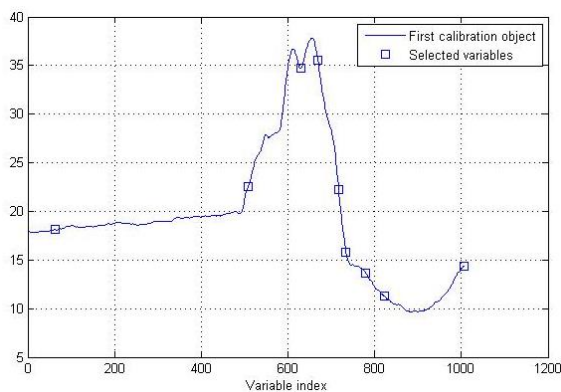
میوه‌ها متأثر از غلظت انواع مختلف اسیدهای آلی خصوصاً آسکوربیک اسید است [۲۸-۲۹]؛ این مولکول‌های آلی حاوی پیوندهای C-H، O-H، C-O و C-C هستند؛ لذا بر اساس چگونگی توزیع اورتون‌های پیوندهای اصلی [۳۸] تفکیک نمونه‌های مورد آزمایش براساس فعالیت آنزیم‌های اکسیداسیونی را می‌توان با اورتون‌های دوم و سوم CH، CH<sub>2</sub>

و CH<sub>3</sub> در این محدوده‌های طیفی ۷۰۰ تا ۹۰۰ و ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ nm مرتبط دانست. نتایج مشابه در تشخیص غیرمخرب فعالیت پراکسیداز در برگ‌های سیب‌زمینی آلوده به بلایت دیررس براساس داده‌های فراطیفی [۱۷] نیز گزارش شده است.

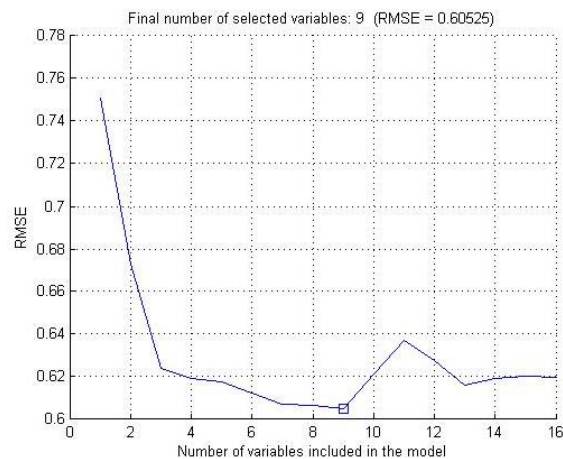
(الف) a



(ج) c



(ب) b



شکل (۴) تغییرات ضرایب رگرسیونی بهترین مدل PLS (الف)، تغییرات RMSE با تعداد طول موج‌های مؤثر (ب) و طول موج‌های مؤثر انتخاب‌شده توسط SPA (ج)

**Fig 4.** Changes in regression coefficients of the best PLS model (a), RMSE changes with number of effective wavelengths (b) and Selected Effective wavelengths by SPA (c)

نگهداری براساس طول موج‌های مؤثر هستند؛ اما در بین این مدل‌ها مدل ایجادشده با تلفیق الگوریتم پیش‌بینی متوالی (SPA) و ANN به ترتیب با  $RMSEC=0/279$ ،  $R^2_C=0/987$  و  $RMSECV=0/316$  و  $R^2_{CV}=0/987$  دارای بالاترین دقت

### ۵.۳. مدل‌سازی بر اساس موج‌های مؤثر

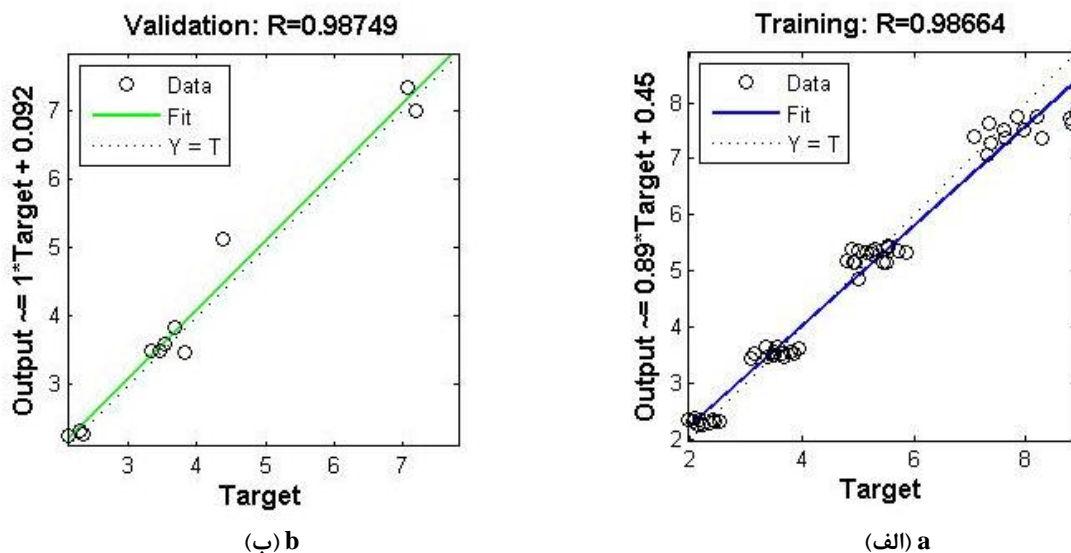
براساس نتایج ارائه‌شده در جدول (۳) کلیه مدل‌های ایجادشده به غیر از مدل خطی با دقت قابل قبولی قادر به پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب طی دوره

ایجادشده با تلفیق شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و الگوریتم رقابت استعماری بهترین عملکرد را به‌منظور پیش‌بینی محتوای نیتروژن برگ خیار داشت. گل محمدی و همکاران [۴۱] نیز در تخمین غیر مخرب pH سیب ردلشز در دوره نگهداری با استفاده از تصویربرداری فراطیفی فروسرخ نزدیک نیز گزارش نمودند شبکه عصبی مصنوعی (ANN) نسبت به سایر روش‌ها دقت بالاتری در تخمین pH سیب در طی دوره نگهداری با استفاده از تصویربرداری فراطیفی دارد.

در پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز بود (شکل ۵). در سال‌های اخیر، قابلیت بالاتر شبکه‌های عصبی مصنوعی (ANN) جهت محاسبات تکمیلی نسبت به مدل‌های رگرسیونی به‌علت یادگیری مستقیم از روی داده‌ها، بدون نیاز به برآورد مشخصات آماری آنها در بسیاری از زمینه‌ها و در علوم مختلف گزارش شده است [۲۲، ۴۰، ۴۱]. سبزی و همکاران [۴۲] در دسته‌بندی برگ گیاه خیار براساس محتوای نیتروژن با استفاده از تصویربرداری فراطیفی نیز گزارش نمودند که در بین الگوریتم‌های مختلف، مدل

جدول (۳) مقادیر  $R^2$ ، RMSE برای مجموعه‌های کالیبراسیون و اعتبار سنجی مدل‌های مختلف رگرسیون ایجادشده با طول موج‌های مؤثر  
Table 3.  $R^2$  and RMSE values for calibration and validation sets of different regression models created with effective wavelengths

RMSE <sub>CV</sub>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	RMSE <sub>C</sub>	R <sup>2</sup> <sub>c</sub>	مدل تلفیقی Combined Models
0.531	0.937	0.509	0.940	RC-PLS
0.556	0.931	0.537	0.933	RC-PCR
1.186	0.677	1.203	0.677	RC-MLR
0.487	0.946	0.440	0.956	RC-SVM
0.391	0.984	0.378	0.985	RC-ANN
0.539	0.935	0.511	0.940	SPA-PLS
0.535	0.936	0.507	0.941	SPA-PCR
1.274	0.628	1.292	0.628	SPA-MLR
0.487	0.948	0.434	0.959	SPA-SVM
<b>0.316</b>	<b>0.987</b>	<b>0.279</b>	<b>0.987</b>	<b>SPA-ANN</b>



شکل (۵) همبستگی بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده فعالیت آنزیم پراکسیداز با مدل تلفیقی شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و ضریب رگرسیون (RC) ایجادشده با طول موج‌های مؤثر برای داده‌های کالیبراسیون (الف) و اعتبارسنجی (ب)

Fig 5. Correlation between references and predicted Peroxidase activity with artificial neural network and regression coefficient combined Model that created with effective wavelengths for calibration (a) and validation (b) sets

پیش پردازش قادر به پیش بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز با دقت مطلوب هستند اما در بین آنها بهترین نتایج با پیش پردازش هموارسازی ساویتزکی-گولای حاصل شد. همچنین براساس آنالیز داده های پیش پردازش شده با هموارسازی ساویتزکی-گولای با الگوریتم های RF و SPA ۹ طول موج به عنوان طول موج های مؤثر در تخمین فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه ها انتخاب شدند. مدل سازی با استفاده از طول موج های مؤثر همچنین نشان داد که تلفیق الگوریتم SPA و شبکه عصبی مصنوعی بهترین نتیجه را در مدل سازی فعالیت آنزیم داشت؛ بنابراین به نظر می رسد روش تصویربرداری فراطیفی می تواند به عنوان ابزاری با ارزش برای تخمین فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب طی دوره نگهداری در نظر گرفته شود و طول موج انتخابی می تواند منابع بالقوه برای توسعه یک ابزار غیرمخرب باشد.

#### ۴. نتیجه گیری

این تحقیق به منظور بررسی امکان استفاده از روش غیرمخرب تصویربرداری طیفی در تخمین فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب طی ۶۰ روز نگهداری انجام شد. طیفسنجی بازتابشی در محدوده طول موج های ۴۰۰ تا ۱۱۰۰ nm انجام شد. پس از حذف نویزها با آنالیز PCA، برای بهبود طیف، پیش پردازش های اولیه مختلف اعمال و اثرات آنها مورد بررسی قرار گرفت. مدل مناسب با استفاده از روش حداقل مربعات جزئی (PLS) تعیین گردید. طول موج های مؤثر با الگوریتم های RF و SPA انتخاب و با استفاده از روش های مختلف مدل سازی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش زمان نگهداری تأثیر افزایشی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سیب داشت. براساس آنالیز PLS همه پیش پردازش های انجام شده و همچنین طیف های بدون

#### منابع

- [1] Thovhogi, F. (2009). *Consumer reference (of red-fleshed apples) an quantification of quality related traits, particularly skin and flesh colour, in apple breeding families*. Stellenbosch, South Africa: University of Stellenbosch, Department of Horticulture.
- [2] Hosseinpour, R., Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Mohammadnia S., Afrooz & Abbasteghani, R. (2014). *Export and import of agricultural sector*. Tehran, I.R. Iran: Ministry of Jihad Keshvarzi Publisher. [In Persian]
- [3] FAO (Food and Agriculture Organization). Crops and livestock products, 2019. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Accessed 08.08.21.
- [4] Rai, M., Ribeiro, C., Mattoso, L., & Duran, N. (2015). *Nanotechnologies in food and agriculture*. New York: Springer.
- [5] Du, C. J., & Sun, D. W. (2006). Learning techniques used in computer vision for food quality evaluation: a review. *J. Food Eng.*, 72(1), 39-55.
- [6] Park, B., & Lu, R. (Eds.). (2015). *Hyperspectral imaging technology in food and agriculture*. New York: Springer.
- [7] ElMasry, G., Kamruzzaman, M., Sun, D. W., & Allen, P. (2012). Principles and applications of hyperspectral imaging in quality evaluation of agro-food products: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 52(11), 999-1023.
- [8] Gowen, A. A., Taghizadeh, M., & O'Donnell, C. P. (2009). Identification of mushrooms subjected to freeze damage using hyperspectral imaging. *J. Food Eng.*, 93(1), 7-12.
- [9] Smulevich, G., Feis, A., Howes, B. D., & Ivancich, A. (2010). Structure-function relationships among heme peroxidases: New insights from electronic absorption, resonance Raman and multifrequency electron paramagnetic resonance spectroscopies. In: Kadish, K. M., Guillard, R., & Smith, K. M. (Eds.). *Handbook of Porphyrin Science with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine* (pp. 367-453).
- [10] Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Food chemistry*. New York: Springer.
- [11] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008). *Biochemistry (Loose-Leaf)*. New York: Macmillan.
- [12] Gaston, E., Frias, J. M., Cullen, P. J., O'Donnell, C. P., & Gowen, A. A. (2010). Prediction of polyphenol oxidase activity using visible near-infrared hyperspectral imaging on mushroom (*Agaricus bisporus*) caps. *J. Agric. Food Chem.*, 58(10), 6226-6233.
- [13] Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Bao, Y., Yu, J., & He, Y. (2014). Fast detection of peroxidase (POD) activity in tomato leaves which infected with *Botrytis*

- cinerea* using hyperspectral imaging. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 118, 498-502.
- [14] Yang, Y. C., Sun, D. W., Wang, N. N., & Xie, A. (2015). Real-time evaluation of polyphenol oxidase (PPO) activity in lychee pericarp based on weighted combination of spectral data and image features as determined by fuzzy neural network. *Talanta*, 139, 198-207.
- [15] Nadafzadeh, M., Mehdizadeh, S. A., & Soltanikazemi, M. (2018). Development of computer vision system to predict peroxidase and polyphenol oxidase enzymes to evaluate the process of banana peel browning using genetic programming modeling. *Sci. Hortic.*, 231, 201-209.
- [16] Pan, T. T., Sun, D. W., Paliwal, J., Pu, H., & Wei, Q. (2018). New method for accurate determination of polyphenol oxidase activity based on reduction in SERS intensity of catechol. *J. Agric. Food Chem.*, 11180-11187.
- [17] Li, Q., & Hu, Y. (2019). Kinetic models of peroxidase activity in potato leaves infected with late blight based on hyperspectral data. *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, 12(2), 160-165.
- [18] Polder, G., van der Heijden, G. W., Keizer, L. P., & Young, I. T. (2003). Calibration and characterisation of imaging spectrographs. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 11(3), 193-210.
- [19] Xu, K., Wang, A., & Brown, S. (2012). Genetic characterization of the Ma locus with pH and titratable acidity in apple. *Mol. Breed.*, 30(2), 899-912.
- [20] Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R., & Versteeg, C. (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 11(1), 52-60.
- [21] Rossel, R. A. V. (2008). ParLeS: Software for chemometric analysis of spectroscopic data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 90(1), 72-83
- [22] Tahmasebi, M., Golmohammadi, A., & Tabatabaei-kolor, R. (2017). Measuring of Paddy mass flow using capacitive sensor and modeling with using multiple regression, ANN, and ANFIS models. *Iran. J. Biosyst. Eng.*, 48 (2), 221-227. [In Persian]
- [23] Zhang, T., Fan, S., Xiang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Sun, Q. (2020). Non-destructive analysis of germination percentage, germination energy and simple vigour index on wheat seeds during storage by Vis/NIR and SWIR hyperspectral imaging. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 239, 118488.
- [24] Gao, Q., Wang, M., Guo, Y., Zhao, X., & He, D. (2019). Comparative Analysis of Non-Destructive Prediction Model of Soluble Solids Content for *Malus micromalus* Makino Based on Near-Infrared Spectroscopy. *IEEE Access.*, 7, 128064-128075.
- [25] Aslmoshtaghi, E., & Shahsavari, A. R. (2016). Peroxidase, polyphenol oxidase and protein changes in olives during adventitious root formation. *Trakia J. Sci.*, 14(2), 176-182.
- [26] Deutch, C. E. (2018). Browning in apples: Exploring the biochemical basis of an easily-observable phenotype. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 46(1), 76-82.
- [27] Hutabarat, O. S., & Halbwirth, H. (2019). Polyphenol oxidase and peroxidase activity in apple: dependency on cultivar and fruit processing. In: 3<sup>rd</sup> *Int Sympos Agric Biosyst. Eng*, South Sulawesi, Indonesia, (pp. 1-8)
- [28] Othman, O. C. (2012). Polyphenoloxidase and peroxidase activity during open air ripening storage of pineapple (*Ananas comosus* L.), mango (*Mangifera indica*) and papaya (*Carica papaya*) fruits grown in Dares Salaam, Tanzania. *Tanz. J. Sci.*, 38(3), 84-94.
- [29] Can, Z., Dincer, B., Sahin, H., Baltas, N., Yildiz, O., & Kolayli, S. (2014). Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 29(6), 829-835.
- [30] Eshghi, S., Hashemi, M., Mohammadi, A., Badii, F., Mohammad hoseini, Z., & Ahmadi, K. (2014). Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne) during storage. *Food Bioproc. Tech.*, 7(8), 2397-2409.
- [31] Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Shah, N., & Smith, P. (2011). Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Res. Int.*, 44(7), 1888-1896.
- [32] Jamshidi, B., Minaei, S., Mohajerani, E., & Ghassemian, H. (2012). Reflectance Vis/NIR spectroscopy for nondestructive taste characterization of Valencia oranges. *Comput. Electron. Agric.*, 85, 64-69.
- [33] Heidari, P., Rezaei, M., Sahebi, M., & Khadivi, A. (2019). Phenotypic variability of *Pyrus boissieriana* Buhse: Implications for conservation and breeding. *Sci. Hortic.*, 247, 1-8.
- [34] Khodabakhshian, R., Emadi, B., Khojastehpour, M., Golzarian, M. R., & Sazgarnia, A. (2017). Non-destructive evaluation of maturity and quality parameters of pomegranate fruit by visible/near infrared spectroscopy. *Int. J. Food Prop.*, 20(1), 41-52.
- [35] Rahman, A., Kandpal, L. M., Lohumi, S., Kim, M. S., Lee, H., Mo, C., & Cho, B. K. (2017). Nondestructive estimation of moisture content, pH

and soluble solid contents in intact tomatoes using hyperspectral imaging. *Appl. Sci.*, 7(1), 109.

[36] Kim, S. Y., Hong, S. J., Kim, E., Lee, C. H., & Kim, G. (2021). Neural Network based Prediction of Soluble Solids Concentration in Oriental Melon using VIS/NIR spectroscopy. *Appl Eng Agric*, 37(4), 653-663

[37] Jamshidi, B., Minaei, S., Mohajerani, E., & Ghassemian, H. (2012). Reflectance Vis/NIR spectroscopy for nondestructive taste characterization of Valencia oranges. *Comput. Electron. Agric.*, 85, 64-69.

[38] Merzlyak, M. N., Solovchenko, A. E., & Gitelson, A. A. (2003). Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 27(2), 197-211.

[39] Magwaza, L. S., Opara, U. L., Nieuwoudt, H., Cronje, P. J., Saeys, W., & Nicolaï, B. (2012). NIR

spectroscopy applications for internal and external quality analysis of citrus fruit—a review. *Food Bioproc. Tech*, 5(2), 425-444.

[40] Razavi, M. S., Golmohammadi, A., Sedghi, R., & Asghari, A. (2020). Prediction of bruise volume propagation of pear during the storage using soft computing methods. *Food Sci. Nutr.*, 8(2), 884-893.

[41] Golmohammadi, A., Tahmasebi, M., & Razavi, M. S. (2021). Near infrared hyperspectral imaging for non-destructive determination of pH value in red delicious apple fruit during shelf life. *Innov. Food Technol.*, 9(2), 99-111. [In Persian]

[42] Sabzi, S., Pourdarbani, R., Rohban, M. H., Fuentes-Penna, A., Hernández-Hernández, J. L., & Hernández-Hernández, M. (2021). Classification of Cucumber Leaves Based on Nitrogen Content Using the Hyperspectral Imaging Technique and Majority Voting. *Plants*, 10(5), 898-911

*Research Article***Prediction of peroxidase activity using near infrared hyperspectral imaging in red delicious apple fruit during storage time****Abdollah Golmohammadi<sup>1\*</sup>, Mahsa Sadat Razavi<sup>2</sup>, Mohammad Tahmasebi<sup>2</sup>**

- 1. Associate Professor, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil**
- 2. PhD Graduated, Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil**

**Abstract**

Regarding this fact that peroxidase (POD) activity is considered as one of the important qualitative parameters of apple fruits, in this study, the effect of cold storage on POD activity of Red Delicious apples were investigated during 60 days. Hyperspectral reflecting imaging in range of 400-1000 nm has been applied while POD of samples were measured according to standard methods. After discarding noises using principal component analysis (PCA), to improve spectrum, different primary pre-processing had been applied and their effects were investigated. The suitable model was obtained via Partial Least Square method (PLS). Important wavelengths were selected based on regression coefficient of the best model includes large absolute values of weighted regression coefficients (RC) and sequential predictions algorithm (SPA) and using various techniques were modeled. Concerning the PLS analysis, the best results were obtained through smoothing Savitzky-Golay pre-processing with mean square root error (RMSE) of 0.475 and 0.518 and coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.948 and 0.940 for calibration and validation data, respectively. According to RC and SPA, 9 wavelengths were determined as the best. In modeling by efficient wavelength, artificial neural network (ANN) and SPA Combined Model gave the best result. The results indicated that hyperspectral imaging could be considered as a valuable tool for POD activity prediction and the selected wavelengths could be potential resources for instrument development.

**Keywords:** Shelf life, peroxidase, hyperspectral imaging, apple, non-destructive.

---

\* Corresponding Author: golmohammadi@uma.ac.ir