

ارزیابی خواص ضد باکتریایی و پایداری رنگی شناساگرهای پی‌اچ بر پایه رنگدانه‌های طبیعی در طول نگهداری در شرایط مختلف

شهاب نقدی، مسعود رضائی*، سید فخرالدین حسینی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، ایران

چکیده

شناساگرهای pH مبتنی بر رنگدانه‌های طبیعی به دلیل زیست‌سازگاری و پاسخ رنگی، گزینه‌ای مناسب برای بسته‌بندی‌های هوشمند مواد غذایی محسوب می‌شوند، اما پایداری رنگی و عملکرد آن‌ها در طول نگهداری از چالش‌های اصلی کاربرد عملی است. در این پژوهش، شناساگرهای pH بر پایه بتاسیانین (Bet-Ind)، آنتوسیانین (Ant-Ind) و فیکوسیانین (Phy-Ind) بر روی کاغذ صافی سلولزی تهیه و خواص ضدباکتریایی، جذب رطوبت و پایداری رنگی آن‌ها طی ۱۲ روز نگهداری در دمای محیط (۲۰ °C)، سردخانه (۴ °C) و انجماد (۱۸- °C) بررسی شد. نتایج آزمون ضدباکتریایی نشان داد که تمامی شناساگرها توانایی مهار رشد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* را دارند؛ به‌طوری‌که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به *S. aureus* با میانگین ۷ میلی‌متر بود. Phy-Ind بیشترین اثر مهار را بر *B. cereus* (۶ میلی‌متر) و Ant-Ind بیشترین بازدارندگی را در برابر *L. monocytogenes* (۵/۶۷ میلی‌متر) نشان دادند ($P < 0.05$). بررسی جذب رطوبت نشان داد که جذب رطوبت کاغذ صافی شاهد از ۰/۳۵٪ به ۱۰/۵۶٪ افزایش یافت، در حالی که این مقدار برای شناساگرها کمتر بود ($P < 0.05$). ارزیابی پایداری رنگی نشان داد که تغییرات کلی رنگ (ΔE) به‌شدت وابسته به نوع رنگدانه و دما بود؛ به‌طوری‌که بتاسیانین در دمای سردخانه‌ای کمترین تغییرات رنگی ($\Delta E \approx 7$) را نشان داد؛ در حالیکه فیکوسیانین در شرایط انجماد با تغییر رنگ (۲/۲۴ $\Delta E \approx$) کمترین تغییرات رنگی و آنتوسیانین با مقدار ۱۳/۷۲ در دمای اتاق بیشترین رنگی را نشان داد ($P < 0.05$). به‌طور کلی، انتخاب مناسب رنگدانه و شرایط نگهداری نقش تعیین‌کننده‌ای در بهبود عملکرد شناساگرهای pH طبیعی دارد.

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۰

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۵/۰۳/۲۵

*نویسنده مسئول:

دکتر مسعود رضائی

rezai_ma@modares.ac.ir

کلید واژه‌ها: شناساگر pH، بسته بندی هوشمند، رنگدانه‌های طبیعی، پایداری رنگی، خواص

ضد باکتریایی

مقدمه

رنگدانه‌های طبیعی استخراج شده از منابع گیاهی و میکروبی، مانند آنتوسیانین‌ها، بتالاین‌ها (خصوصاً بتاسیانین‌ها) و فیکوسیانین به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی همچون سازگاری با محیط زیست، منشأ طبیعی و توانایی تغییر رنگ در پاسخ به تغییرات pH، به طور گسترده‌ای در طراحی حسگرهای مبتنی بر پلیمر و سیستم‌های بسته‌بندی هوشمند کاربرد دارند. آنتوسیانین‌ها با قدرت حساسیت بالا نسبت به تغییرات pH و ایجاد رنگ‌های متنوع و همچنین بتالاین‌ها و فیکوسیانین‌ها به دلیل رنگ‌های شاخص قرمز، نارنجی و آبی، به عنوان گزینه‌های مناسب در ساخت نشانگرهای تشخیص تازگی و تغییرات pH شناخته می‌شوند. امروزه خواص زیست فعالی نظیر خواص ضداکسیدانی و ضدباکتریایی در

برابر پاتوزنهای بیماری‌زای غذایی این رنگدانه‌ها بسیار مورد توجه بوده است [3-1]. با این وجود، چالش اصلی در استفاده عملی این رنگدانه‌ها، عدم پایداری رنگ آن‌ها در شرایط نگهداری گوناگون است. بنابراین، بررسی دقیق رفتار رنگی این ترکیبات در طول زمان، نقشی اساسی در توسعه حسگرهایی با عملکرد پایدار و قابل اعتماد دارد [4,5]. از عواملی که مؤثر بر کاهش پایداری رنگی رنگدانه‌ها در طول نگهداری هستند میتوان به مواردی همچون دما، نور، حضور اکسیژن، pH محیط و ترکیب ماتریس حامل (مانند سلولز، استات سلولز یا پلیمرهای زیست پایه) اشاره کرد. در همین راستا بر اساس مرور مطالعات مشخص شده است که افزایش دما و نور، به‌ویژه در حضور اکسیژن، سرعت تخریب و تغییر ساختار مولکولی رنگدانه‌ها را تشدید می‌کند؛ در مقابل، نگهداری در دمای پایین و شرایط تاریک می‌تواند عمر رنگی را به‌طور ویژه‌ای افزایش بدهد. از طرفی دیگر روش‌هایی مانند انکپسولاسیون و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند ثبات آنها را در طول نگهداری بهبود بخشند [6,7]. در آنتوسیانین‌ها، ساختار شیمیایی و نوع اسیدها/گلوکوزیداسیون نقش مهمی در پایداری ایفا می‌کند؛ بعنوان مثال گزارش شده است که آنتوسیانین‌های استیل‌شده معمولاً پایداری بالاتری نسبت به نوع استیل‌نشده دارند و معمولاً نگهداری در دمای پایین (مثلاً ۴°C) منجر به کاهش سرعت از بین رفتن رنگ و افزایش نیمه‌عمر آنها می‌شود [7]. همچنین بتالاین‌ها که شامل بتاسیانین و بتالاین می‌شود در بازه pH حدود ۳-۷ نسبتاً پایداری دارند اما در شرایط قلیایی دچار شکست ساختار کنژوگه شده و دچار کاهش رنگ قابل توجهی می‌شوند که انکپسولاسیون یا استفاده در ماتریس‌های پلیمری مختلف می‌تواند پایداری نوری و حرارتی آن‌ها را افزایش بدهد [8]. از طرفی دیگر فیکوسیانین به‌خاطر طبیعت پروتئینی‌اش نسبت به دما و نور حساس است و مطالعات اخیر روی آن نشان داده است که فیکوسیانین در محدوده pH میانی (تقریباً ۴-۸) پایداری بیشتری دارد در حالی‌که در دماهای بالا یا تحت تابش نوری شدید دنا توره شده و نیاز به کنترل دمایی برای نگهداری دارد [9].

در زمینه‌ی حسگرهای مبتنی بر پلیمر سلولز استات، چندین مطالعه نشان داده‌اند که عامل ماتریس حامل (نوع آن، جذب مولکولی، وجود پلاستی سائز یا پوشش محافظ) به‌طور قابل توجهی بر عملکرد و پایداری رنگی رنگدانه‌ها اثرگذار هستند. به‌عنوان مثال، حسگرهای مبتنی بر آنتوسیانین بر روی کاغذ فیلتری نشان داده‌اند که با بسته‌بندی مناسب و نگهداری در یخچال، تغییرات رنگی ناشی از اکسیداسیون و هیدرولیز به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد؛ با این حال، ساختار و ترکیب کاغذ (مثلاً سلولز خالص در مقابل استات سلولز) می‌تواند اثرات متفاوتی در میزان نگهداری مولکول رنگ و انتقال رطوبت داشته باشد [4,10].

با توجه به اهمیت کاربرد روزافزون این نشانگرها در کاربردهای بسته‌بندی هوشمند و نظارت بر کیفیت مواد غذایی، آزمایش‌های مقایسه‌ای که رفتار رنگی آنتوسیانین، بتاسیانین و فیکوسیانین را در یک ماتریس یکسان و تحت شرایط نگهداری متفاوت بررسی کنند، اطلاعات ارزشمندی برای طراحی سیستم‌های پایدار فراهم می‌آورند. لذا در مطالعه حاضر پایداری رنگی شناساگرهای تولید شده با استفاده از آنتوسیانین، بتاسیانین و فیکوسیانین بر پایه کاغذ صافی در طول نگهداری به مدت دوازده روز در دمای محیط، دمای یخچال و دمای فریزر مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

استخراج رنگدانه‌ها

استخراج بتاسیانین از برگ‌های *Bougainvillea glabra*

گل‌های *B. glabra* جمع‌آوری، به‌خوبی با آب تازه شسته و سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز در آون خشک شدند. گل‌های خشک‌شده به پودر تبدیل شده و در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج نگهداری شدند. استخراج بتاسیانین طبق روش شرح‌داده‌شده توسط Naghdi و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد [11]. به‌طور خلاصه، پودر گل با آب مقطر به نسبت وزنی ۱:۱۰ (w/w) در دمای محیط مخلوط شد و به‌صورت دوره‌ای با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت یک شب هم زده شد. سپس مخلوط سه بار متوالی در ۸۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سوپرناتانت حاصل با استفاده از روتاری تغلیظ شد. عصاره تغلیظ‌شده در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و سپس خشک‌کرده انجمادی شد. پودر بتاسیانین حاصل در بطری شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری گردید.

استخراج آنتوسیانین

کلم قرمز تازه از بازار محلی تهیه، تمیز و به قطعات نازک برش داده شد و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. کلم خشک‌شده به پودر تبدیل و با استفاده از اتانول ۷۰٪ (v/v) در نسبت جامد به حلال ۱:۴ (g/mL) استخراج شد. pH محلول با استفاده از ۱M HCl به ۲ تنظیم گردید. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط به‌طور مداوم هم زده شد و سپس از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد. در نهایت،

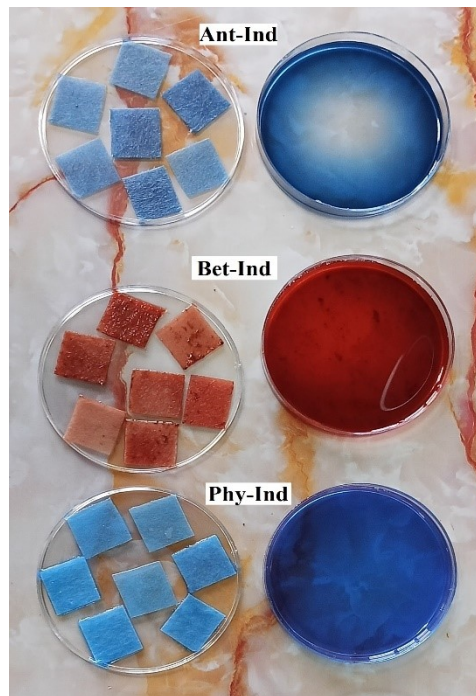
فیلتریت به کمک NaOH ۲/۵M تا pH ۸ خنثی گردید، تغلیظ و سپس به روش خشک کردن انجمادی به پودر تبدیل شد. پودر حاصل در ظروف تیره و کاملاً دربسته تا زمان استفاده نگهداری شد.

تهیه پودر فیکوسیانیین

پودر فیکوسیانیین از شرکت آلجی بانک که تحت نظارت سازمان شیلات ایران است تهیه گردید.

تولید شناساگرها

شناساگرهای تازگی بر پایه کاغذ صافی سلولزی، با استفاده از روش دیپ کوتینگ (dip-coating) شرح داده شده توسط Dodange و همکاران (۲۰۲۴) ساخته شدند. کاغذهای صافی بریده شده مربعی شکل به طول ۲ سانتی متر به مدت ۱۲ ساعت در محلول رنگدانه ها (با غلظت ۲۵ mg/mL) غوطه ور شدند و پس از آن خارج گردیده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در هوای آزاد خشک شدند. به این ترتیب که شناساگر بر پایه بتاسیانین، فیکوسیانیین و آنتوسیانیین به ترتیب به نام های Bet-Ind، Phy-Ind و Ant-Ind نام گذاری شدند. تصویر شناساگرهای تهیه شده در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱- شمایی از شناساگرهای تولید شده با روش غوطه وری.

فعالیت های ضدباکتریایی محلول های رنگدانه ای مختلف

در این بخش، برای بررسی فعالیت های ضدباکتریایی، از باکتری های بیماری زای منتقله از طریق غذا شامل *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* O157 استفاده شد. روش انجام آزمایش با استفاده از روش کار گزارش شده توسط Salamon و همکاران (۲۰۲۱) صورت گرفت. ابتدا، مقدار کمی از هر باکتری با لوپ برداشته شده و به لوله های فالكون حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مغز و قلب (BHI) منتقل گردید. این لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند تا رشد کافی باکتری ها حاصل شود. سپس، کشت ها با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی با محلول نمکی ۰/۹ درصد جایگزین گردید. برای حذف

کامل محیط کشت، این مرحله سانتیفریوژ مجدداً با همان شرایط تکرار شد. چگالی نوری سوسپانسیون حاصل در طول موج ۶۰۰ نانومتر به محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم شد که معادل حدود $10^8 \times 1$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر بود. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شده با استفاده از سوآب استریل به‌طور یکنواخت روی سطح محیط آگار پخش شد. دیسک‌های کاغذی با قطر ۶ میلی‌متر که با ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره آغشته شده بودند، روی محیط تلقیح‌شده قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد. در پایان، قطر ناحیه‌های بازدارندگی رشد باکتری اندازه‌گیری شده و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید.

نگهداری شناساگرهای تولید شده

به منظور ارزیابی پایداری رنگی شناساگرهای تولید شده آنها را در دماهای محیط، یخچال و فریزر به مدت دوازده روز نگهداری گردیدند و هر دو روز از شناساگرها عکس تهیه شد.

سنجش ویژگی‌های رنگی شناساگرهای تولید شده

در ابتدا عکس‌هایی یکسان و با کیفیت توسط گوشی سامسونگ A54 از شناساگرها گرفته شد. سپس تصاویر به نرم افزار فتوشاپ (Photoshop CC2017) منتقل شده و داده‌های رنگی Lab از نه نقطه هر شناساگر در سه تکرار از هر تیمار تهیه شدند. برای محاسبه شاخص تغییرات رنگی (ΔE) با استفاده از فرمول زیر مقادیر Lab تصویر اولیه شناساگرها را بعنوان زمان صفر در نظر گرفته شد سپس شاخص‌های Lab برای روزهای بعدی بعنوان مقادیر ثانویه (n) در نظر گرفته شد.

$$\Delta E^* = \sqrt{(a^*_{n} - a^*_{0})^2 + (b^*_{n} - b^*_{0})^2 + (L^*_{n} - L^*_{0})^2}$$

جذب رطوبت

جذب رطوبت نشانگرهای تازه‌سازی ساخته‌شده به روش زیر ارزیابی شد: مقدار ۳ گرم کلرید کلسیم خشک در شیشه‌های دربسته قرار داده شد که دارای روزه‌های مشخص (به قطر ۸ میلی‌متر) بودند. هر نوار نشانگر (به طول ۲ سانتی‌متر) به قسمت بیرونی درپوش شیشه‌ها متصل گردید. سپس شیشه‌ها در دسیکاتور دربسته با رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار داده شدند و به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وزن شیشه‌ها به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد و درصد جذب رطوبت با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [13].

$$\text{جذب رطوبت (\%)} = ((wt - w_i) / w_i) \times 100$$

که در آن wt وزن شیشه در زمان مشخص (میلی‌گرم) و w_i وزن اولیه شیشه در زمان 0 (میلی‌گرم) است.

آنالیز آماری

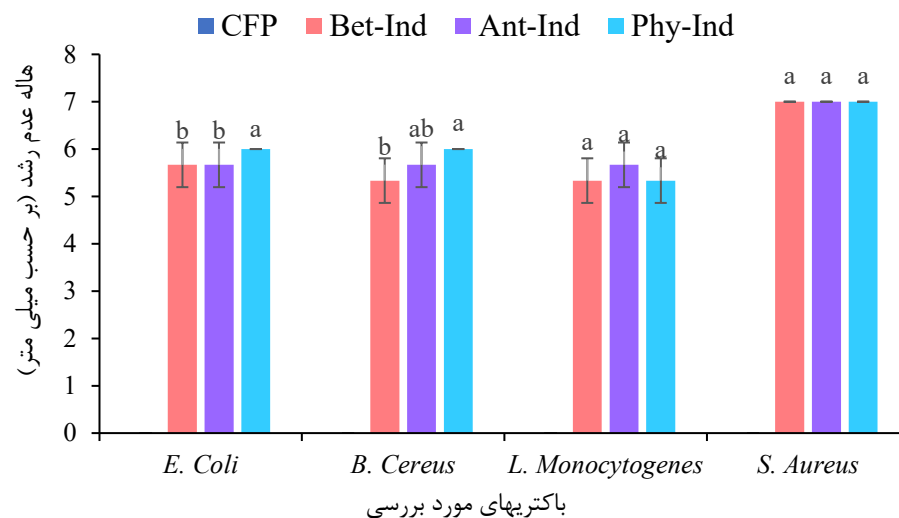
تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۷، IBM SPSS Statistics، شرکت IBM، شیکاگو) انجام شد. برای تعیین اختلافات معنی‌دار بین گروه‌ها، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) به‌کار گرفته شد و در ادامه آزمون چنددامنه‌ای دانکن مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد، به‌طوری که مقادیر کمتر از آن به‌عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

خواص ضدباکتریایی شناساگرهای تولید شده

نتایج خواص ضدباکتریایی شناساگرهای تولید شده در تصویر ۲ ارائه شده است. خواص ضدباکتریایی در برابر باکتری *E. coli* نشان داد شناساگرهای تولید شده توانستند هاله عدم رشد قابل توجهی ایجاد کنند؛ به‌طوری که میانگین قطر هاله برای Bet-Ind و Ant-Ind برابر با ۵/۶۷ میلی‌متر و برای Phy-Ind ۶ میلی‌متر بود. در برابر باکتری *B. cereus*، الگوی بازدارندگی کمی متفاوت بود؛ بیشترین اثر مربوط به Phy-Ind با میانگین ۶ میلی‌متر ثبت شد، Ant-Ind با ۵/۶۷ میلی‌متر در رتبه بعدی قرار گرفت و Bet-Ind با ۵/۳۳ میلی‌متر کمترین اثر را نشان داد. این نتایج بیانگر برتری نسبی شناساگر مبتنی بر فیکوسیاینین در مهار رشد این باکتری است. در برابر باکتری *L. monocytogenes* مشاهده شد که شناساگر آنتوسیانینی (Ant-Ind) با میانگین ۵/۶۷ میلی‌متر بیشترین بازدارندگی را داشت، در حالی که Bet-Ind و Phy-Ind هر دو میانگین ۵/۳۳

میلی‌متر را نشان دادند و در یک سطح آماری مشابه قرار گرفتند. در مورد *S. aureus*، نتایج بسیار واضح بود؛ هر سه شناساگر اثر یکسان و قوی نشان دادند و میانگین قطر هاله عدم رشد در همه موارد برابر با ۷ میلی‌متر بود، در حالی که دیسک شاهد در برابر همه‌ی باکتری‌های مورد بررسی هیچ‌گونه فعالیتی نشان نداد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به شناساگرهای تولید شده داشته است. به طور کلی، شناساگرهای رنگدانه‌ای در برابر همه باکتری‌های مورد بررسی اثر ضدباکتریایی معنی‌داری نشان دادند. در حالی که-Phy-Ind در مهار *B. cereus* برتر بود و Ant-Ind در برابر *L. monocytogenes* عملکرد بهتری داشت، در مورد *E. coli* و *S. aureus* تفاوتی میان شناساگرها مشاهده نشد و همه آن‌ها اثر مشابهی داشتند. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به *S. aureus* (۷ میلی‌متر) بود که نشان‌دهنده حساسیت بالای این باکتری به شناساگرهای تولید شده است.



شکل ۱- خواص ضدباکتریایی شناساگرهای تولید شده در برابر باکتریهای *E. coli*، *B. cereus*، *L. monocytogenes* و *S. aureus*

جذب رطوبت شناساگرهای تولید شده در طول نگهداری در دمای محیط

نتایج جذب رطوبت شناساگرهای تولید شده در طول نگهداری به مدت ۱۲ روز بصورت نقشه حرارتی در جدول ۱ نمایش داده شده است و نشان داد که تیمار شاهد (CFP) که کاغذ صافی سلولزی ساده بود، بیشترین میزان جذب رطوبت را در طول نگهداری داشت. مقدار جذب رطوبت آن از ۰/۳۵ درصد در روز اول به تدریج افزایش یافت و در روز دوازدهم به ۱۰/۵۶ درصد رسید. این روند افزایشی تقریباً خطی و یکنواخت بود و نشان داد که پایه سلولزی به تنهایی حساسیت بالایی نسبت به رطوبت محیط دارد. در مورد شناساگر Bet-Ind، میزان جذب رطوبت در روز اول ۰/۲۲ درصد بود و در طول نگهداری به طور پیوسته افزایش یافت تا در روز دوازدهم به ۹/۱۲ درصد برسد. این شناساگر در مقایسه با CFP مقدار کمتری رطوبت جذب کرد و روند افزایش آن ملایم‌تر بود، به‌ویژه در روزهای ابتدایی که تغییرات کمتر از یک درصد بود. شناساگر Ant-Ind در روز اول ۰/۱۹ درصد جذب رطوبت داشت و در روز دوازدهم به ۱۰/۰۹ درصد رسید. این شناساگر در روزهای میانی (روزهای ۴ تا ۸) افزایش نسبتاً سریع‌تری نشان داد و در نهایت به سطحی نزدیک به CFP رسید. بنابراین، آنتوسیانین‌ها در ساختار شناساگر باعث شدند که جذب رطوبت در ابتدا کمتر باشد اما در بلندمدت تقریباً مشابه کاغذ صافی سلولزی عمل کند. شناساگر Phy-Ind نیز در روز اول ۰/۲۱ درصد جذب رطوبت داشت و در روز دوازدهم به ۹/۳۵ درصد رسید. روند افزایش آن نسبتاً یکنواخت بود و در بیشتر روزها کمتر از CFP و Ant-Ind باقی ماند. این شناساگر

در روزهای پایانی نیز مقدار جذب کمتری نسبت به CFP داشت و در مقایسه با سایر شناساگرها در سطح متوسط قرار گرفت. در ابتدای نگهداری (روزهای ۱ تا ۲)، همه تیمارها جذب رطوبت بسیار پایینی داشتند و اختلافها ناچیز بود. در روز اول، میزان جذب بین ۰/۱۹ تا ۰/۳۵ درصد متغیر بود؛ بیشترین مقدار مربوط به CFP (۰/۳۵٪) و کمترین مربوط به Ant-Ind (۰/۱۹٪) بود. در روز دوم نیز روند مشابهی مشاهده شد و مقادیر بین ۰/۶۵ تا ۰/۸۳ درصد قرار گرفتند. بنابراین، در شروع نگهداری، CFP بیشترین و Ant-Ind کمترین جذب رطوبت را داشتند. در میانه نگهداری (روز ۶)، تفاوتها آشکارتر شد. CFP با ۴/۴۶٪ بیشترین جذب رطوبت را نشان داد. پس از آن Ant-Ind با ۴/۲۶٪ و Phy-Ind با ۳/۹۶٪ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. Bet-Ind کمترین مقدار را داشت (۳/۴۷٪). این نتایج نشان می‌دهد که در نیمه دوره، CFP همچنان بیشترین حساسیت به رطوبت داشت، در حالی که Bet-Ind مقاوم‌تر بود. در انتهای نگهداری (روز ۱۲)، روند افزایشی در همه تیمارها ادامه یافت. CFP با ۱۰/۵۶٪ بیشترین جذب رطوبت را داشت و Ant-Ind با ۱۰/۰۹٪ در جایگاه دوم قرار گرفت. Phy-Ind با ۹/۳۵٪ و Bet-Ind با ۹/۱۲٪ مقادیر کمتری داشتند. بنابراین، در پایان دوره، ترتیب شدت جذب رطوبت به صورت $CFP > Ant-Ind > Phy-Ind > Bet-Ind$ بود.

جدول ۱- نقشه حرارتی نتایج جذب رطوبت شناساگرهای تولید شده و کاغذ صافی سلولز استات در طول نگهداری در دمای محیط به مدت ۱۲ روز.

روز نگهداری	CFP	Bet-Ind	Ant-Ind	Phy-Ind	
۱	۰/۳۵	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۲۱	۱
۲	۰/۸۲	۰/۶۵	۰/۶۷	۰/۸۳	۲
۳	۱/۹۹	۱/۰۸	۱/۴۳	۱/۴۶	۳
۴	۲/۵۸	۱/۸۴	۲/۲۸	۲/۲۹	۴
۵	۳/۴	۲/۶	۳/۴۱	۳/۱۲	۵
۶	۴/۴۶	۳/۴۷	۴/۲۶	۳/۹۶	۶
۷	۵/۲۸	۴/۳۴	۵/۱۱	۴/۵۸	۷
۸	۶/۸	۵/۳۱	۵/۸۷	۵/۳	۸
۹	۷/۷۴	۶/۴	۶/۹	۶/۳۳	۹
۱۰	۸/۵۶	۷/۴۸	۷/۷۵	۷/۲۷	۱۰
۱۱	۹/۲۷	۸/۴۶	۸/۹۸	۸/۲۱	۱۱
۱۲	۱۰/۵۶	۹/۱۲	۱۰/۰۹	۹/۳۵	۱۲

CFP: کاغذ صافی سلولز استات. شناساگر بر پایه بتاسیانین، فیکوسیانین و آنتوسیانین به ترتیب به نام های Bet-Ind، Phy-Ind و Ant-Ind نام گذاری شده‌اند. بر اساس راهنما مقادیر کمتر رطوبت جذب شده در هر سلول با رنگ نارنجی، سپس مقادیر متوسط با رنگ زرد و نهایتاً مقادیر بزرگتر به رنگ سبز هستند.

پایداری رنگی شناساگرهای تولید شده در شرایط مختلف نگهداری

بررسی تغییرات رنگی شناساگرهای تولید شده بر پایه بتاسیانین (Bet-Ind)، آنتوسیانین (Ant-Ind) و فیکوسیانین (Phy-Ind) طی ۱۲ روز نگهداری تحت شرایط مختلف نگهداری در جدول ۲ ارائه شده است.

در شرایط سردخانه‌ای (دمای 4°C)، شاخص روشنایی (L) برای تیمار Bet-Ind از ۴۸ در روز صفر به ۴۱ در روز ۱۲ کاهش یافت، در حالی که برای Ant-Ind از ۴۷/۶۷ به ۳۴/۶۷ رسید و کاهش بیشتری نشان داد. در همین شرایط، تیمار Phy-Ind از ۵۲/۶۷ به ۵۷/۳۳ تغییر کرد و برخلاف دو تیمار دیگر افزایش روشنایی داشت. شاخص a در Bet-Ind از ۱۶ به ۱۴ کاهش یافت، در Ant-Ind از ۷- به ۹- تغییر کرد و در Phy-Ind تقریباً ثابت ماند (۱۰- به ۱۰/۳۳-). شاخص b در Bet-Ind تغییرات ملایم داشت (۱۳/۳۳ به ۱۴/۶۷)، در Ant-Ind از ۱۸/۶۷- به ۱۳/۶۷- رسید و شدت آبی کاهش یافت، در حالی که در Phy-Ind از ۲۶/۳۳- به ۲۱/۳۳- تغییر کرد و کاهش آبی محسوس‌تر بود. در شرایط محیطی (دمای 20°C)، شاخص L برای Bet-Ind از ۴۳ در روز صفر به ۵۰/۳۳ در روز ۱۲ افزایش یافت و نمونه روشن‌تر شد. در مقابل، Ant-Ind از ۴۶/۳۳ به ۴۱/۶۷ کاهش یافت و تیره‌تر شد؛ Phy-Ind نیز از ۵۷/۶۷ به ۵۱/۳۳ کاهش یافت و بیشترین افت

روشنایی را در این دما داشت. شاخص a در Bet-Ind از ۱۹/۳۳ به ۱۴/۳۳ کاهش یافت، در Ant-Ind از ۸- به ۱۰/۳۳- رسید و در Phy-Ind تقریباً ثابت ماند (۱۰/۳۳- به ۱۰-). شاخص b در Bet-Ind از ۱۸ به ۱۴/۳۳ کاهش یافت، در Ant-Ind از ۱۸/۳۳- به ۱۷- تغییر کرد، و در Phy-Ind از ۱۵/۶۷- به ۲۶- کاهش یافت که نشان‌دهنده بیشترین تغییر رنگ در این دما بود. در شرایط انجماد (دمای °C ۱۸-)، شاخص L برای Bet-Ind از ۵۴ به ۴۸ کاهش یافت، برای Ant-Ind از ۴۹ به ۵۳۳/۳۳ افزایش یافت و برای Phy-Ind از ۵۹/۳۳ به ۵۷/۳۳ تغییر اندکی داشت. شاخص a در Bet-Ind از ۱۷/۳۳ به ۱۳/۶۷ کاهش یافت، در Ant-Ind از ۸- به ۱۲/۳۳- رسید و در Phy-Ind تقریباً ثابت ماند (۱۱- به ۱۱/۳۳-). شاخص b در Bet-Ind از ۱۲/۶۷ به ۱۶ افزایش یافت، در Ant-Ind از ۱۵/۶۷- به ۱۴/۳۳- تغییر کرد و در Phy-Ind از ۲۱- به ۲۰/۶۷- رسید.

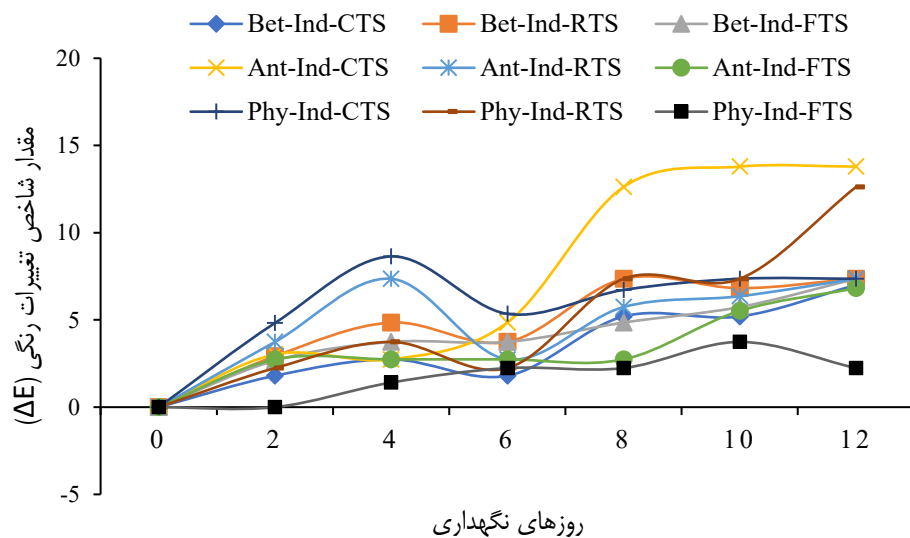
نتایج تغییرات شاخص ΔE در شرایط مختلف در شکل ۳ ارائه شده است. همانطوریکه از تصویر پیداست در دمای سردخانه‌ای، شناساگر Bet-Ind تغییر رنگ تدریجی و ملایمی داشت؛ از ΔE ۱/۸ در روز دوم به ۷ در روز دوازدهم رسید. شناساگر Ant-Ind بیشترین تغییر رنگ را در این شرایط نشان داد و شاخص ΔE آن از ۳/۰۲ در روز دوم به ۱۳/۷۹ در روز دهم و دوازدهم افزایش یافت و بیانگر ناپایداری شدید رنگی بود. در مقابل، شناساگر Phy-Ind تغییرات متوسط داشت و از ۴/۸۲ در روز دوم به ۷/۳۶ در روز دوازدهم رسید. بنابراین در دمای سردخانه‌ای، آنتوسیانین‌ها کم‌پایدارترین و بتاسیانین‌ها پایدارتر بودند، در حالی که فیکوسیانین تغییرات متوسطی داشت. در دمای محیط، شناساگر Bet-Ind تغییر رنگ قابل توجهی داشت؛ از ΔE ۲/۹۲ در روز دوم به ۷/۳۶ در روز دوازدهم رسید. همچنین شناساگر Ant-Ind نیز در این شرایط نوسان زیادی نشان داد و شاخص ΔE آن از ۳/۷۴ در روز دوم به ۷/۳۶ در روز دوازدهم رسید، اما در روز چهارم جهش شدیدی داشت (۷/۳۶) و سپس در روز ششم کاهش یافت (۲/۷۴). شناساگر Phy-Ind بیشترین تغییر رنگ را در این شرایط داشت؛ از ΔE آن ۲/۲۴ در روز دوم به ۱۲/۶۲ در روز دوازدهم رسید، که نشان‌دهنده ناپایداری شدید رنگی فیکوسیانین در دمای محیط است. بنابراین در دمای محیط، فیکوسیانین بیشترین تغییر رنگ را داشت، در حالی که بتاسیانین و آنتوسیانین تغییرات متوسطی نشان دادند. در دمای انجماد، شناساگر Bet-Ind تغییر رنگ تدریجی نشان داده بود بطوریکه شاخص ΔE آن از ۲/۶۷ در روز دوم به ۷/۳۶ در روز دوازدهم رسید. شناساگر Ant-Ind تغییرات متوسطی نشان داد. شناساگر Phy-Ind پایدارترین رنگ را در این شرایط داشت؛ از ΔE ۰ در روز دوم به ۲/۲۴ در روز دوازدهم رسید و تغییرات بسیار اندکی نشان داد. بنابراین در دمای انجماد، فیکوسیانین پایدارترین شناساگر بود، در حالی که بتاسیانین تغییرات بیشتری داشت و آنتوسیانین در سطح متوسط قرار گرفت.

جدول ۲. شاخص های رنگی a، b و شناساگرهای تولیدی نگهداری شده در شرایط مختلف.

	۴ °C			۲۰ °C			-۱۸ °C		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b
نگهداری روز									
۰	۴۸/۰۰ ± ۱/۴۱	۱۶/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۳/۳۳ ± ۰/۴۷	۴۳/۰۰ ± ۲/۱۶	۱۹/۳۳ ± ۱/۲۵	۱۸/۰۰ ± ۰/۰۰	۵۴/۰۰ ± ۱/۴۱	۱۷/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۲/۶۷ ± ۰/۴۷
۲	۴۷/۰۰ ± ۱/۶۳	۱۴/۶۷ ± ۰/۹۴	۱۴/۶۷ ± ۱/۲۵	۴۵/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۷/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۸/۳۳ ± ۰/۴۷	۵۱/۳۳ ± ۳/۳۰	۱۷/۳۳ ± ۱/۲۵	۱۲/۶۷ ± ۱/۷۰
Bet-Ind ۴	۴۶/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۴/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۳/۶۷ ± ۰/۴۷	۴۳/۳۳ ± ۲/۴۹	۱۵/۳۳ ± ۱/۲۵	۱۶/۰۰ ± ۰/۸۲	۵۲/۰۰ ± ۲/۹۴	۱۴/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۴/۶۷ ± ۱/۲۵
۶	۴۶/۶۷ ± ۲/۰۵	۱۴/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۴/۳۳ ± ۰/۴۷	۴۶/۰۰ ± ۱/۴۱	۱۶/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۷/۶۷ ± ۱/۷۰	۵۱/۶۷ ± ۱/۷۰	۱۴/۶۷ ± ۱/۲۵	۱۴/۶۷ ± ۰/۴۷
۸	۵۱/۳۳ ± ۴/۶۴	۱۳/۶۷ ± ۱/۴۱	۱۶/۰۰ ± ۰/۰۰	۵۰/۰۰ ± ۲/۱۶	۱۴/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۳/۳۳ ± ۱/۲۵	۵۱/۰۰ ± ۱/۶۳	۱۴/۰۰ ± ۰/۴۷	۱۳/۶۷ ± ۰/۹۴
۱۰	۴۳/۳۳ ± ۱/۲۵	۱۳/۶۷ ± ۰/۴۷	۱۴/۰۰ ± ۰/۰۰	۴۹/۶۷ ± ۴/۹۲	۱۴/۳۳ ± ۰/۴۷	۱۴/۶۷ ± ۱/۲۵	۵۰/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۴/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۴/۳۳ ± ۱/۲۵
۱۲	۴۱/۰۰ ± ۰/۸۲	۱۴/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۴/۶۷ ± ۱۳/۲۰	۵۰/۳۳ ± ۴/۵۰	۱۴/۳۳ ± ۰/۹۴	۱۴/۳۳ ± ۱۴/۴۳	۴۸/۰۰ ± ۱/۴۱	۱۳/۶۷ ± ۰/۴۷	۱۶/۰۰ ± ۱۳/۹۱
۰	۴۷/۶۷ ± ۱/۲۵	-۷/۰۰ ± ۰/۸۲	-۱۸/۶۷ ± ۰/۴۷	۴۶/۳۳ ± ۵/۷۹	-۸/۰۰ ± ۰/۸۲	-۱۸/۳۳ ± ۰/۹۴	۴۹/۰۰ ± ۰/۸۲	-۸/۰۰ ± ۰/۸۲	-۱۵/۶۷ ± ۰/۹۴

Ant-Ind	۲	$45/33 \pm$	$-11/00 \pm$	$-17/00 \pm$	$45/33 \pm$	$-11/00 \pm$	$-16/67 \pm$	$51/67 \pm$	$-8/33 \pm$	$-15/33 \pm$
		$3/40$	$0/82$	$0/82$	$4/50$	$0/00$	$0/47$	$1/25$	$0/47$	$0/47$
	۴	$49/33 \pm$	$-10/00 \pm$	$-16/33 \pm$	$45/00 \pm$	$-10/00 \pm$	$-11/00 \pm$	$47/00 \pm$	$-10/33$	$-17/00 \pm$
		$2/05$	$0/00$	$0/47$	$0/82$	$0/82$	$0/82$	$1/63$	$0/47 \pm$	$0/82$
	۶	$43/67 \pm$	$-10/00 \pm$	$-15/67 \pm$	$48/33 \pm$	$-11/33 \pm$	$-11/33 \pm$	$49/00 \pm$	$-11/00$	$-15/33 \pm$
		$2/36$	$0/82$	$0/94$	$1/89$	$0/47$	$0/94$	$0/82$	$0/00 \pm$	$0/47$
	۸	$35/67 \pm$	$-8/67 \pm$	$-13/67 \pm$	$43/67 \pm$	$-6/00 \pm$	$-12/33 \pm$	$49/67 \pm$	$-10/67$	$-15/00 \pm$
		$1/25$	$0/94$	$0/47$	$1/89$	$0/82$	$0/94$	$3/40$	$0/47 \pm$	$0/82$
	۱۰	$34/67 \pm$	$-8/67 \pm$	$-13/33 \pm$	$50/33 \pm$	$-6/00 \pm$	$-19/00 \pm$	$43/67 \pm$	$-10/67$	$-14/00 \pm$
		$3/40$	$0/47$	$0/94$	$0/47$	$0/00$	$0/00$	$0/47$	$0/47 \pm$	$0/82$
	۱۲	$34/67 \pm$	$-9/00 \pm$	$-13/67 \pm$	$41/67 \pm$	$-10/33 \pm$	$-17/00 \pm$	$53/33 \pm$	$-12/33$	$-14/33 \pm$
		$2/05$	$0/82$	$2/62$	$4/50$	$0/47$	$6/38$	$2/05$	$0/47 \pm$	$2/16$
Phy-Ind	۰	$52/67 \pm$	$-10/33 \pm$	$-26/33 \pm$	$57/67 \pm$	$-10/33 \pm$	$-15/67 \pm$	$59/33 \pm$	$-11/00$	$-21/00 \pm$
		$2/05$	$1/25$	$4/11$	$1/25$	$1/25$	$1/25$	$0/94$	$0/00 \pm$	$0/00$
	۲	$57/33 \pm$	$-10/00 \pm$	$-25/67 \pm$	$55/67 \pm$	$-10/67 \pm$	$-15/33 \pm$	$59/33 \pm$	$-11/00$	$-21/00 \pm$
		$2/36$	$0/82$	$4/64$	$0/47$	$0/47$	$1/25$	$0/94$	$0/00 \pm$	$1/41$
	۴	$61/00 \pm$	$-12/67 \pm$	$-23/00 \pm$	$59/00 \pm$	$-9/67 \pm$	$-12/33 \pm$	$58/33 \pm$	$-11/00$	$-22/33 \pm$
		$1/41$	$0/94$	$0/82$	$0/82$	$0/47$	$1/25$	$2/05$	$0/00 \pm$	$0/47$
	۶	$57/33 \pm$	$-12/67 \pm$	$-22/00 \pm$	$57/33 \pm$	$-11/33 \pm$	$-13/67 \pm$	$58/33 \pm$	$-12/00$	$-21/67 \pm$
		$1/25$	$0/47$	$1/41$	$0/94$	$0/47$	$1/25$	$1/70$	$0/00 \pm$	$1/25$
	۸	$56/33 \pm$	$-10/33 \pm$	$-21/33 \pm$	$58/33 \pm$	$-11/00 \pm$	$-23/33 \pm$	$57/33 \pm$	$-11/00$	$-21/33 \pm$
		$1/70$	$0/00$	$2/49$	$2/36$	$0/00$	$2/87$	$0/47$	$0/47 \pm$	$1/25$
	۱۰	$55/67 \pm$	$-10/33 \pm$	$-24/33 \pm$	$58/67 \pm$	$-11/00 \pm$	$-23/00 \pm$	$56/33 \pm$	$-11/00$	$-24/00 \pm$
		$3/40$	$0/94$	$2/62$	$3/09$	$0/00$	$4/08$	$0/47$	$0/00 \pm$	$2/94$
	۱۲	$57/33 \pm$	$-10/00 \pm$	$-21/33 \pm$	$51/33 \pm$	$-10/00 \pm$	$-26/00 \pm$	$57/33 \pm$	$-11/33$	$-20/67 \pm$
		$1/25$	$0/82$	$0/50$	$3/40$	$0/82$	$2/50$	$1/25$	$1/25 \pm$	$0/50$

داده ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف از معیار بیان شده اند.



شکل ۳- نتایج تغییرات شاخص تغییر رنگ (ΔE) شناساگرهای تولید شده در شرایط مختلف نگهداری. پسوندهای CTS، RTS و FTS اضافه شده به نام شناساگرها به ترتیب مخفف Cold Temperature Storage (نگهداری در دمای 4°C)، Room Temperature Storage (نگهداری در دمای 20°C) و Freezing Temperature Storage (نگهداری در دمای -18°C) می باشد.

بحث و نتیجه گیری

بررسی خواص ضدباکتریایی شناساگرهای رنگدانه‌ای تولیدشده

نتایج به دست آمده از آزمون انتشار دیسک نشان داد که تمامی شناساگرهای تولید شده بر پایه رنگدانه‌های طبیعی شامل Bet-Ind (بتاسیانین)، Ant-Ind (آنتوسیانین) و Phy-Ind (فیکوسیانین) در برابر باکتری‌های مورد بررسی اثر ضدباکتریایی نشان داده‌اند، به طوری که در برابر *E. coli*، *B. cereus*، *L. monocytogenes* و *S. aureus* مهار رشد قابل اندازه‌گیری ایجاد کردند. خواص ضدباکتریایی آنتوسیانین‌ها در برابر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پیش‌تر نیز در مطالعات مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال، عصاره‌های حاوی آنتوسیانین از بلوبری نشان داده‌اند که می‌توانند رشد عفونت‌های باکتریایی را به طور موثر کاهش دهند، از جمله *S. aureus* و *E. coli* که برگرفته از توانایی این ترکیبات در اختلال ساختار غشای باکتری‌ها و کاهش رشد سلولی است [14]. همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داده که آنتوسیانین‌های استخراج شده از سورگوم قرمز دارای فعالیت ضدباکتریایی قوی در برابر *S. aureus* هستند، که این موضوع با نقش برجسته‌ی Ant-Ind در نتایج ما همسو است [15]. بتاسیانین‌ها نیز به عنوان گروهی از بتالائین‌ها شناخته می‌شوند که توانایی مهار رشد باکتری‌ها را دارند. مطالعات نشان داده‌اند که بتاسیانین‌ها می‌توانند تشکیل بیوفیلم و چسبندگی باکتری‌ها را کاهش دهند و به این ترتیب فعالیت ضدباکتریایی گسترده‌ای ارائه دهند. به طور خاص، بررسی‌ها نشان داده‌اند که ترکیبات بتاسیانینی استخراج شده از گیاهانی مانند اسفناج قرمز و پیتاها می‌توانند تشکیل بیوفیلم *S. aureus* و *P. aeruginosa* را مهار کنند [16]. این گزارش‌ها با اثر قابل توجه Bet-Ind در نتایج ما سازگار بوده، اگرچه در برخی موارد مانند *B. cereus* اثر Phy-Ind قوی‌تر ظاهر شد که می‌تواند به تفاوت ساختار و مکانیسم عمل این رنگدانه‌ها نسبت داده شود. در مورد فیکوسیانین (Phy-Ind) اگرچه مطالعات مستقیم اندکی در مورد خاصیت ضدباکتریایی این رنگدانه وجود دارد، اما پژوهش‌ها نشان داده‌اند که رنگدانه‌های پروتئینی مانند فیکوسیانین به دلیل ساختار پروتئینی و گروه‌های فعال زیستی ممکن است دارای خاصیت مهاری در برابر باکتری‌های خاص باشند. مکانیزم‌های احتمالی می‌توانند شامل تداخل با دیواره سلولی باکتری و القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های باکتریایی باشند [17-19]. با این حال در نتایج ما مشاهده شد که Phy-Ind در مهار *B. cereus* عملکرد قوی‌تری نسبت به Bet-Ind و Ant-Ind داشت، که می‌تواند نشان‌دهنده پتانسیل ویژه‌ی این رنگدانه در برابر برخی گونه‌های گرم مثبت باشد. در مجموع، نتایج به دست آمده در این تحقیق با پیشینه مطالعات موجود همسو بوده و نشان‌دهنده این است که شناساگرهای بر پایه رنگدانه‌ای طبیعی نه تنها در تشخیص تغییرات pH کاربرد دارند، بلکه می‌توانند فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری نیز ارائه دهند، پدیده‌ای که می‌تواند در توسعه حسگرهای هوشمند غذایی و بسته‌بندی‌های فعال نقش مهمی ایفا کند.

بررسی جذب رطوبت شناساگرهای رنگدانه‌ای در طول نگهداری در دمای محیط

نتایج این پژوهش نشان داد که پایه سلولزی خالص (CFP) در مقایسه با شناساگرهای حاوی رنگدانه‌های طبیعی، بیشترین میزان جذب رطوبت را در طول نگهداری در دمای محیط از خود نشان داد. این رفتار به ماهیت ذاتی سلولز نسبت داده می‌شود؛ به‌طوری‌که وجود تعداد بالای گروه‌های هیدروکسیل آزاد در ساختار سلولز، امکان برقراری پیوندهای هیدروژنی متعدد با مولکول‌های آب را فراهم می‌کند و در نتیجه، کاغذ صافی سلولزی به‌عنوان یک بستر بسیار هیدروفیل، به‌طور پیوسته رطوبت محیط را جذب می‌نماید. افزایش تقریباً خطی و یکنواخت جذب رطوبت در CFP طی ۱۲ روز نگهداری مؤید این ویژگی ساختاری است و با گزارش‌های پیشین در مورد رفتار رطوبتی مواد سلولزی مطابقت دارد [20,21]. در مقابل، شناساگرهای تهیه شده با رنگدانه‌های طبیعی (Bet-Ind، Ant-Ind و Phy-Ind) در کل دوره نگهداری جذب رطوبت کمتری نسبت به CFP نشان دادند که بیانگر تأثیر اصلاح‌کننده رنگدانه‌ها بر ویژگی‌های سطحی و رطوبتی ماتریس سلولزی است. حضور رنگدانه‌ها می‌تواند با اشغال بخشی از نواحی فعال سلولز و کاهش دسترسی مستقیم مولکول‌های آب به گروه‌های هیدروکسیل، میزان جذب رطوبت را محدود کند. این پدیده پیش‌تر در سامانه‌های سلولزی اصلاح‌شده با ترکیبات آلی نیز گزارش شده و به‌عنوان یکی از راهکارهای بهبود پایداری رطوبتی مواد سلولزی شناخته می‌شود [22]. در میان شناساگرهای بررسی‌شده، Bet-Ind کمترین میزان جذب رطوبت را در طول نگهداری نشان داد. این رفتار می‌تواند به ساختار مولکولی بتاسیانین و برهم‌کنش مناسب آن با ماتریس سلولزی نسبت داده شود که منجر به توزیع یکنواخت‌تر رنگدانه و کاهش فضاهای آزاد برای نفوذ آب می‌گردد. Phy-Ind نیز روند افزایشی یکنواخت و کنترل‌شده‌ای در جذب رطوبت داشت و در بیشتر زمان‌ها مقدار جذب آن کمتر از CFP و Ant-Ind باقی ماند، که نشان‌دهنده پایداری رطوبتی متوسط اما مطلوب این شناساگر است [20,22]. در مقابل، شناساگر آنتوسیانینی (Ant-Ind) اگرچه در روزهای ابتدایی نگهداری کمترین میزان جذب رطوبت را نشان داد، اما در ادامه و به‌ویژه در روزهای میانی و پایانی دوره، افزایش بیشتری را تجربه کرد و در پایان به سطحی نزدیک به CFP رسید. این رفتار می‌تواند ناشی از ماهیت قطبی آنتوسیانین‌ها و توانایی آن‌ها در برقراری پیوندهای هیدروژنی با آب باشد [23]. با گذشت زمان و در اثر تماس مداوم با رطوبت محیط، این پیوندها می‌توانند موجب تسهیل جذب آب در ساختار شناساگر شوند و در بلندمدت رفتار رطوبتی آن را به بستر سلولزی خالص نزدیک کنند. در انتهای دوره نگهداری، ترتیب شدت جذب رطوبت به صورت $CFP > Ant-Ind > Bet-Ind$ مشاهده شد که به‌خوبی بیانگر اثر تعدیل‌کننده رنگدانه‌ها، به‌ویژه بتاسیانین، بر کاهش حساسیت ساختار سلولزی نسبت به رطوبت محیط است.

پایداری رنگی شناساگرهای تولیدشده در شرایط مختلف نگهداری

پایداری رنگی شناساگرهای مبتنی بر رنگدانه‌های طبیعی تحت تأثیر عوامل محیطی مانند دما، نور، pH، اکسیژن و ترکیب ماتریس حامل قرار می‌گیرد و این اثرات در مطالعات قبلی به‌وضوح گزارش شده‌اند. رنگدانه‌هایی مانند آنتوسیانین، بتاسیانین و فیکوسیانین به‌عنوان گزینه‌های طبیعی برای شناساگرهای pH و بسته‌بندی هوشمند استفاده شده‌اند، اما حساسیت آن‌ها به شرایط نگهداری می‌تواند منجر به ناپایداری رنگ شود [24]. آنتوسیانین‌ها، به‌عنوان رنگدانه‌های فلاونویدی، به‌دلیل ساختار شیمیایی خود نسبت به تغییرات محیطی دما و pH حساس هستند؛ این حساسیت منجر به تغییرات در فرم شیمیایی و شکست پیوندهای کروموفوری می‌شود که نهایتاً باعث تغییر رنگ یا بی‌رنگی می‌گردد. در بررسی‌های فراگیر مشخص گردیده است که آنتوسیانین‌ها در دماهای بالاتر و در مواجهه با اکسیژن زیست‌محیطی بیشتر دچار تجزیه می‌شوند و رنگ خود را از دست می‌دهند، به‌ویژه زمانی که در معرض نور قرار می‌گیرند [25]. بتاسیانین‌ها نیز مانند آنتوسیانین‌ها در محدوده‌های pH خاص نسبت به تغییرات رنگی حساس هستند، اما معمولاً پایداری نسبی بهتری در محدوده‌ی pH اسید تا خنثی از خود نشان می‌دهند. این موضوع نمایان شده است که بتاسیانین‌ها در محیط‌های اسیدی تا حد زیادی رنگ خود را حفظ می‌کنند، اما در مواجهه با دماهای بالاتر یا شرایط قلیایی ناپایدار می‌شوند [26]. در مورد فیکوسیانین، مطالعات نشان داده‌اند که این رنگدانه‌ی پروتئینی نسبت به دما و شرایط محیطی بسیار حساس است و در دمای بالاتر یا در حضور عوامل اکسیدکننده، ناپایداری بیشتری نسبت به دیگر رنگدانه‌های طبیعی نشان می‌دهد. به‌عنوان مثال، تحقیقات اخیر بر روی بهبود پایداری رنگ فیکوسیانین در مواجهه با نور و محیط اسیدی، اهمیت تجزیه پروتئینی و تعاملات مولکولی را برجسته کرده‌اند و نشان می‌دهند که به‌کارگیری لیگاندها یا ماتریس‌های محافظ می‌تواند پایداری را افزایش دهد [27]. نتایج ما نشان داد که در شرایط سردخانه‌ای (4°C)، Bet-Ind کمترین تغییر رنگ را داشت و تغییرات ΔE آن در طول نگهداری تدریجی و ملایم بود، که نشان‌دهنده پایداری بهتر بتاسیانین‌ها در دماهای پایین است؛ این مشاهده با مفهوم کلی پایداری بهتر رنگدانه‌ها در دماهای خنک‌تر همخوانی دارد. در همین شرایط، Ant-Ind بیشترین تغییر رنگی را نشان داد که می‌تواند ناشی از حساسیت ساختار آنتوسیانین‌ها به محیط ذخیره‌سازی باشد [24]. در دمای محیط (20°C)، فیکوسیانین بیشترین تغییر رنگ را تجربه کرد، که نشان‌دهنده ضعف ذاتی این رنگدانه در برابر دماهای نسبتاً بالا و شرایط محیطی است. این رفتار را می‌توان با حساسیت پروتئینی فیکوسیانین نسبت به دما و اکسیژن تفسیر کرد، همان‌طور که در مطالعات مربوط به تثبیت فیکوسیانین با ترکیبات محافظ نیز عنوان شده است [27]. در دمای انجماد (-18°C) پایداری رنگی Phy-Ind برجسته‌تر بود و ΔE آن تقریباً ثابت باقی ماند، که نشان می‌دهد کاهش شدت فرآیندهای تخریبی در دماهای بسیار پایین می‌تواند به حفظ رنگ کمک کند. این نتایج تأیید می‌کند که دمای پایین می‌تواند به‌طور قابل توجهی پایداری رنگ را افزایش دهد [24]. به‌طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که پایداری رنگی شناساگرها به‌طور کلی با کاهش دما بهبود می‌یابد و این اثر بسته به نوع رنگدانه طبیعی متفاوت است؛ بتاسیانین‌ها، به‌ویژه در شرایط سردخانه‌ای، پایدارترین عملکرد رنگی را داشتند، در حالی که آنتوسیانین‌ها در بسیاری از شرایط ناپایدارتر عمل کردند و فیکوسیانین در دماهای بسیار پایین عملکرد مناسبی داشت.

نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که شناساگرهای pH بر پایه رنگدانه‌های طبیعی علاوه بر قابلیت پاسخ رنگی، از خواص ضدباکتریایی مناسبی نیز برخوردار هستند و می‌توانند نقش دوگانه‌ای در پایش کیفیت و افزایش ایمنی مواد غذایی ایفا کنند. تمامی شناساگرهای تولیدشده توانستند رشد باکتری‌های مورد بررسی را مهار کنند، به‌طوری‌که *S. aureus* بیشترین حساسیت را نسبت به این شناساگرها نشان داد. تفاوت در الگوی بازدارندگی میان رنگدانه‌ها بیانگر آن است که ماهیت شیمیایی هر رنگدانه نقش مهمی در فعالیت ضدباکتریایی ایفا می‌کند. همچنین بررسی جذب رطوبت نشان داد که افزودن رنگدانه‌های طبیعی به بستر سلولزی باعث کاهش حساسیت شناساگر به رطوبت محیط می‌شود و این اثر در شناساگر بتاسیانینی بارزتر بود. از سوی دیگر، ارزیابی پایداری رنگی نشان داد که دما عامل تعیین‌کننده‌ای در ثبات رنگی شناساگرهاست؛ به‌گونه‌ای که بتاسیانین در دمای سردخانه‌ای پایداری رفتار رنگی را داشت، فیکوسیانین در شرایط انجماد بیشترین ثبات را نشان داد و آنتوسیانین در اغلب شرایط بیشترین نوسانات رنگی را تجربه کرد. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شناساگرهای مبتنی بر رنگدانه‌های طبیعی، در صورت انتخاب مناسب نوع رنگدانه و شرایط نگهداری، پتانسیل بالایی برای کاربرد در بسته‌بندی‌های هوشمند و سامانه‌های پایش تازگی مواد غذایی دارند و می‌توانند به‌عنوان جایگزینی ایمن و پایدار برای شناساگرهای شیمیایی مصنوعی مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تأییدیه اخلاقی:

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع:

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی:

تحقیق حاضر با حمایت های مالی و معنوی بنیاد ملی علم ایران از طرح پسادکترای با شماره ۴۰۴۲۶۰۵ انجام شده است.

سهام نویسندگان:

منابع

- [1] S. Roy, J.-W. Rhim, Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 61 (2021) 2297–2325.
- [2] M. Patel, P. Patel, E. Pithawala, Antioxidant and Antibacterial Properties of bio-pigment from Beta vulgaris, Biosci. Biotechnol. Res. Asia 20 (2023) 1327–1339. <https://doi.org/10.13005/bbra/3179>.
- [3] R. Safari, R.Z. Amiri, R. Esmaeilzadeh Kenari, Z. Raftani Amiri, R. Esmaeilzadeh Kenari, Antioxidant and antibacterial activities of C-phycocyanin from common name Spirulina platensis, Iran. J. Fish. Sci. 19 (2020) 1911–1927. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.118129>.
- [4] D. Liu, C. Zhang, Y. Pu, S. Chen, L. Liu, Z. Cui, Y. Zhong, Recent Advances in pH-Responsive Freshness Indicators Using Natural Food Colorants to Monitor Food Freshness, Foods 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/foods11131884>.
- [5] M.M. Calabretta, D. Gregucci, R. Desiderio, E. Michelini, Colorimetric Paper Sensor for Food Spoilage Based on Biogenic Amine Monitoring, Biosensors 13 (2023). <https://doi.org/10.3390/bios13010126>.
- [6] Y. Cheng, J. Liu, L. Li, J. Ren, J. Lu, F. Luo, Advances in embedding techniques of anthocyanins: Improving stability, bioactivity and bioavailability, Food Chem. X 20 (2023) 100983. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100983>.
- [7] L. Zhang, Y. Wang, Y. Cao, F. Wang, F. Li, Review: Enhancing the Bioavailability and Stability of

- Anthocyanins for the Prevention and Treatment of Central Nervous System-Related Diseases, *Foods* 14 (2025) 1–30. <https://doi.org/10.3390/foods14142420>.
- [8] R.M. Martinez, C.P.B. Melo, I.C. Pinto, S. Mendes-Pierotti, J.A. Vignoli, W.A. Verri, R. Casagrande, Betalains: A Narrative Review on Pharmacological Mechanisms Supporting the Nutraceutical Potential Towards Health Benefits, *Foods* 13 (2024). <https://doi.org/10.3390/foods13233909>.
- [9] M. Mao, G. Han, Y. Zhao, X. Xu, Y. Zhao, A review of phycocyanin: Production, extraction, stability and food applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 280 (2024) 135860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135860>.
- [10] S.U. Haq, M. Aghajamali, H. Hassanzadeh, Cost-effective and sensitive anthocyanin-based paper sensors for rapid ammonia detection in aqueous solutions, *RSC Adv.* 11 (2021) 24387–24397. <https://doi.org/10.1039/d1ra04069c>.
- [11] S. Naghdi, M. Rezaei, M. Abdollahi, A starch-based pH-sensing and ammonia detector film containing betacyanin of paperflower for application in intelligent packaging of fish, *Int. J. Biol. Macromol.* 191 (2021) 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.045>.
- [12] I. Salamon, E.N.Ş. Sezer, M. Kryvtsova, P. Labun, Antiproliferative and antimicrobial activity of anthocyanins from berry fruits after their isolation and freeze-drying, *Appl. Sci.* 11 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3390/app11052096>.
- [13] S. Dodange, H. Shekarchizadeh, M. Kadivar, Real-time tracking of fish quality using a cellulose filter paper colorimetric indicator incorporated with prickly pear fruit betacyanins, *LWT* 205 (2024) 116523. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116523>.
- [14] E.J. Jeyaraj, G.C. Vidana Gamage, J.C. Cintrat, W.S. Choo, Acylated and non-acylated anthocyanins as antibacterial and antibiofilm agents, *Discov. Food* 3 (2023). <https://doi.org/10.1007/s44187-023-00062-8>.
- [15] P. Suganyadevi, M. Saravanakumar, S. Mohandas, Studies on Antimicrobial Activity of Anthocyanins Extracted from Red Sorghum (*Sorghum bicolor* .L) Bran, *Int. Res. J. Microbiol.* 10 (2021) 1–5.
- [16] Y.Y. Yong, M.W.K. Ong, G. Dykes, W.S. Choo, Betacyanin-inhibited biofilm formation of co-culture of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on different polymer surfaces, *FEMS Microbiol. Lett.* 368 (2021) fnaa214.
- [17] R. Safari, Z. Raftani Amiri, S. Reyhani Poul, R. Esmaeilzadeh Kenari, Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial activity of phycocyanin extracted from spirulina microalgae (*Spirulina Platensis*) in both pure and nanoencapsulated forms with maltodextrin-sodium caseinate combination coating, *J. Food Sci. Technol.* 19 (2022) 345–358. <https://doi.org/10.22034/FSCT.19.127.345>.
- [18] E. Mohammadi-Gouraji, S. Soleimani-Zad, M. Ghiaci, Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage, *LWT* 102 (2019) 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.057>.
- [19] B. Nowruzi, M. Ghorbani, M. Ghane, M. Ashrafizadeh, R. Barandak, M. Targholizadeh, Studying the effect bio-based sensors packaging based on magnetic fields extraction of phycocyanin on the shelf life of fish fillets infected with *Staphylococcus aureus*, *BMC Microbiol.* 25 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03975-9>.
- [20] L. Huang, Q. Hu, S. Gao, W. Liu, X. Wei, Recent progress and applications of cellulose and its derivatives-based humidity sensors: A review, *Carbohydr. Polym.* 318 (2023) 121139.
- [21] S. Khoshtinat, V. Carvelli, C. Marano, Moisture absorption measurement and modelling of a cellulose acetate, *Cellulose* 28 (2021) 9039–9050.
- [22] J. Zhu, P. Zhu, Y. Zhu, Y. Ye, X. Sun, Y. Zhang, O.J. Rojas, P. Servati, F. Jiang, Surface charge manipulation for improved humidity sensing of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils, *Carbohydr. Polym.* 335 (2024) 122059.

- [23] R. Cortez, D.A. Luna-Vital, D. Margulis, E. Gonzalez de Mejia, Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16 (2017) 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>.
- [24] R. Huang, S. Xia, S. Gong, J. Wang, W. Zhang, F. Zhong, Q. Lin, J. Deng, W. Li, Enhancing sensitivity and stability of natural pigments in pH-responsive freshness indicators: A review, *Food Chem.* 463 (2025) 141357.
- [25] Z. Zang, S. Tang, Z. Li, S. Chou, C. Shu, Y. Chen, W. Chen, S. Yang, Y. Yang, J. Tian, An updated review on the stability of anthocyanins regarding the interaction with food proteins and polysaccharides, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 21 (2022) 4378–4401.
- [26] J.A. Fernández-López, V. Fernández-Lledó, J.M. Angosto, New insights into red plant pigments: more than just natural colorants, *RSC Adv.* 10 (2020) 24669–24682.
- [27] Z. Yu, S. Yang, W. Zhao, H. Sun, Q. Kong, Improving the color storage stability of phycocyanin under light and acidified conditions through antisolvent precipitation of phycocyanin-zein complex, *Algal Res.* 81 (2024) 103571.

Assessment of Antibacterial Activity and Color Stability of Natural Pigment-Based pH Indicators During Storage Under Variable Conditions

Shahab Naghdi, Masoud Rezaei*, Seyed Fakhreddin Hosseini

Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box 46414-356, Noor, Iran

ABSTRACT

Natural pigment-based pH indicators are considered promising candidates for intelligent food packaging due to their biocompatibility and visible color response; however, their color stability and performance during storage remain major challenges for practical application. In this study, pH indicators based on betacyanin (Bet-Ind), anthocyanin (Ant-Ind), and phycocyanin (Phy-Ind) were prepared on cellulose filter paper, and their antibacterial activity, moisture absorption, and color stability were evaluated over 12 days of storage at room temperature (20 °C), refrigeration (4 °C), and freezing (-18 °C). The antibacterial assay showed that all indicators were able to inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*; the largest inhibition zone was observed against *S. aureus*, with an average diameter of 7 mm. Phy-Ind exhibited the strongest inhibitory effect against *B. cereus* (6 mm), while Ant-Ind showed the highest inhibition against *L. monocytogenes* (5.67 mm) ($P < 0.05$). Moisture absorption results showed that the water uptake of the control filter paper increased from 0.35% to 10.56%, whereas the corresponding values for the indicators were significantly lower ($P < 0.05$). Color stability analysis demonstrated that the overall color change (ΔE) was strongly dependent on pigment type and storage temperature. Betacyanin showed the lowest color variation under refrigeration ($\Delta E \approx 7$), whereas phycocyanin exhibited the smallest color change under freezing conditions ($\Delta E \approx 2.24$), and anthocyanin showed the highest color change at room temperature ($\Delta E = 13.72$) ($P < 0.05$). Overall, the appropriate selection of pigment type and storage conditions plays a decisive role in improving the performance of natural pH indicators.

KEYWORDS: pH indicator, intelligent packaging, natural pigments, color stability, antibacterial properties

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 16 March 2026

Revised:
10 May 2026

Accepted:
10 June 2026

ePublished:
15 June 2026