

اثر بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده و لفاف‌های انعطاف‌پذیر بر رشد باکتری‌های کشت خشک

نازنین زند^{۱*}، علیرضا شهاب لواسانی^۲

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۲- مرکز تحقیقات فناوری های نوین تولید غذای سالم، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۱۰)

چکیده

در این مطالعه اثر غلظت‌های سه نوع مخلوط گازی (دی‌اکسیدکربن، نیتروژن، اکسیژن) و نیز شرایط تحت خلاء و بسته‌بندی بدون تزریق گاز و ۳ نوع فیلم قابل انعطاف چند لایه برای افزایش زمان ماندگاری کشت خشک در شرایط دمای محیط (۲۰°C) مورد بررسی قرار گرفت. بسته‌بندی بدون تزریق گاز به عنوان نمونه شاهد با ۴ نوع بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده با ترکیب‌های گازی (۳۰ درصد CO₂ و ۷۰ درصد N₂) و (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) و (۴۸ درصد N₂ و ۴ درصد CO₂ و ۴۸ درصد O₂) و تحت خلاء مقایسه گردید. آزمون‌های شمارش کلی فرم، کپک و مخمر و باکترهای هوازی و pH طی شصت روز نگهداری انجام شد. مدت ماندگاری کشت خشک در لفاف ۴ لایه تحت شرایط ترکیبات گازی (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂)، خلاء و (۴۸ درصد N₂ و ۴ درصد CO₂ و ۴۸ درصد O₂) به ترتیب ۵۵،۶۰ و ۴۰ روز، تحت شرایط (۳۰ درصد CO₂ و ۷۰ درصد N₂)، خلاء و (۴۸ درصد N₂ و ۴۰ درصد CO₂) بدون تزریق گاز ۳۰ روز، در لفاف ۳ لایه (آلومینیم قوی) تحت شرایط (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂)، خلاء و (۴۸ درصد N₂ و ۴۸ درصد CO₂ و ۴ درصد O₂) به ترتیب ۵۰،۴۵ و ۳۵ روز تحت شرایط (۳۰ درصد CO₂ و ۷۰ درصد N₂) ۳۰ روز و بدون تزریق گاز ۲۵ روز همراه با لفاف ۳ لایه (آلومینیم ضعیف) تحت شرایط (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂)، خلاء و (۴۸ درصد N₂ و ۴۸ درصد CO₂ و ۴ درصد O₂) به ترتیب ۴۰،۳۵ و ۳۰ روز و تحت شرایط (۳۰ درصد CO₂ و ۷۰ درصد N₂) ۲۵ روز و بدون تزریق گاز ۲۰ روز گزارش شد. بنابراین استفاده از ترکیب گازی (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) و بسته‌بندی با پوشش چهار لایه، برای ماندگاری کشت خشک در زمان طولانی با خاصیت ضد میکروبی بالاتر و تأثیر مطلوب تر بر میزان pH ارزیابی شد.

کلید واژگان: بسته‌بندی تحت اتمسفر اصلاح شده، جمعیت میکروبی، کشت خشک، لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه

* مسئول مکاتبات: n_zand2008@yahoo.com

۱- مقدمه

بشر از ابتدای خلقت به دنبال روش‌هایی برای نگهداری بهینه مواد غذایی به منظور افزایش مدت ماندگاری و قابلیت مصرف آنها بوده است. روش‌های نگهداری مواد غذایی با خشک کردن آنها در مجاورت آفتاب در طی فصل تابستان و انجماد آنها در هوای آزاد در طی فصل زمستان آغاز شده است. البته تخمیر طبیعی برخی مواد غذایی نیز از جمله روشهای نگهداری مواد غذایی است که از قدیم الایام توسط آسیایی‌ها به کار گرفته شده است. در پرتو شناخت تکنولوژی‌های مرتبط با فرآوری مواد غذایی، آنچنان پیشرفت در صنایع غذایی روی داد که امروزه مصرف‌کنندگان بیشتر به کیفیت مواد غذایی عرضه شده به جای کمیت آنها اهمیت می‌دهند [۱]. بسته‌بندی یک عامل مؤثر در مسیر طولانی تولید، توزیع و بازاریابی عمل می‌کند، به طوری که بسته‌بندی می‌تواند به عنوان یک مزیت رقابتی، در بازارهای داخلی و خارجی استفاده نمود [۲]. بسته‌بندی علمی رو به رشد و تحول‌پذیر است به طوری که امروزه ورود به بسته‌بندی‌های هوشمند موجب افزایش سهم فروش کالاهای با این نوع بسته‌بندی در رقابت با سایر کالاها شده است. هدف از بسته‌بندی کردن مواد غذایی نگهداری و جلوگیری از خطر فساد درونی و بیرونی و اکسایشی آن و همچنین حمل و نقل مواد غذایی بهتر و آسانتر آن می‌باشد [۳]. سالهای گذشته نمی‌توانستند از مواد اولیه بسته‌بندی مانند کاغذ، کارتن‌های شیر، قوطی‌های فلزی، شیشه‌های مربا و یا شیشه‌های غذایی کودکان استفاده کنند، اما امروزه صنعت بسته‌بندی تا حدی پیشرفت کرده است که می‌توان آنها را بازیافت کرد. این روش باعث کاهش زباله و نیز جلوگیری از آلودگی محیط زیست می‌شود. با تحقیقاتی که کنسلر انجام داد به این نتیجه رسید که از ۱۵ نوع ماده غذایی بسته‌بندی شده یکبار مصرف فقط به مقدار ۷/۵ درصد از لحاظ وزن و ۲۳/۲ درصد از لحاظ حجم مواد غذایی بسته‌بندی شده جایگزین مواد اولیه چند بار مصرف خواهد شد که قسمت اعظم آنها را نوشابه‌های غیر الکلی تشکیل می‌دهد [۴]. تکنولوژی بسته‌بندی مرتباً در حال تغییر است. کارخانجات صنایع غذایی به دنبال کسب موفقیت در بازارهای داخلی و بازارهای صادرات هستند به طوری که از نظر طراحی بسته‌بندی و استفاده از تکنولوژی جدید، همگام با بازار حرکت کنند. تکنولوژی بسته‌بندی تحت اتمسفر اصلاح شده، می‌تواند خشک خشک را برای مدت طولانی‌تری حفظ

کند. بسته‌بندی تحت اتمسفر اصلاح شده روش مؤثر و اقتصادی برای افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی، در طی حمل و نقل و بازاریابی بدون استفاده از انجماد و کنسرو کردن می‌باشد [۵ و ۶].

کشک در واقع یک فرآورده فرعی ماست است، که تهیه آن از قدیم در اغلب کشورهای خاورمیانه به ویژه، ایران در بین عشایر کشور ما متداول بوده این محصول به علت داشتن پروتئین و مواد معدنی ارزش غذایی فراوانی داشته و به دلیل ارزان بودن و سهولت در نگهداری آن، در تغذیه انسان و به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه دام و طیور به کار می‌رود. شکل ظاهری کشک به سلیقه و عادت‌های مردم هر منطقه بستگی داشته و اغلب رنگ آن سفید یا کمی متمایل به زرد به ندرت قهوه‌ای است. ابعاد مختلفی داشته و مزه آن به واسطه وجود اسید لاکتیک و افزودن نمک، ترش و تا حدی شور است. کشک یک محصول تخمیری می‌باشد که در ایران و بخصوص مناطق روستایی و عشایر به دست می‌آید. از محصولاتی که به عنوان چاشنی در غذاهای مختلف مانند آش‌ها به خصوص آش رشته، سوپ و غذای کشک و بادمجان به کار می‌روند و به بخاطر وجود ترشی اسید لاکتیک و طعم مخصوص خود مزه و طعم مطبوعی به غذاهای مختلف می‌دهد [۷]. کشک دارای یک منبع غنی از پروتئین، کلسیم، فسفر و کمی چربی است و از ماست یا دوغ گرفته شده، حاوی اسیدهای آلی هم می‌باشد. ارزش غذایی هر محصول با توجه به نوع تکنولوژی‌ای که در تهیه آن استفاده می‌شود، نوع ماده اولیه و حتی فصلی که شیر دوشیده شده و منطقه‌ای که مربوط به آن است و فرآوری‌های صورت گرفته روی آن متفاوت است. هرچه بر کشک، بسته‌بندی حرارتی کمتری انجام شود، ارزش غذایی آن بالاتر خواهد بود. از سوی دیگر هرچه درصد رطوبت کمتر باشد، از نظر چگالی مواد مغذی ارجحیت خواهد داشت. مهم‌ترین اثر سلامت بخش کشک، پیشگیری از بروز یا پیشرفت بیماری پوکی استخوان است. میزان مناسب کلسیم و فسفر و نسبت این دو ماده مغذی در ترکیب کشک، شرایط ایده آلی را برای استفاده بهینه از کشک در پیشگیری از پوکی استخوان به وجود می‌آورد. همچنین کشک منبع خوبی برای تامین کلسیم و نیز فسفر مورد نیاز در گروه‌های مختلف سنی و به ویژه کودکان است. با توجه به اینکه ممکن است، درصد نمک یا چربی برخی کشک‌ها بالا

بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده و فیلم‌های چند لایه انعطاف‌پذیر بر تغییرات pH، رشد باکتری‌های هوازی، کلی‌فرم، کپک و مخمر طی ۶۰ روز نگهداری خشک خشک بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی و تولید خشک خشک

مواد اولیه: برای اجرای این تحقیق، ۵ کیلوگرم ماست سنتی با چربی ۵ درصد از لبنیات تاجیک تهیه شد. محیط‌های کشت مورد نیاز (YGC، VBRA، CMM، PCA) از شرکت کیولنت (کانادا)، لفاف‌های بسته‌بندی از شرکت پلاستیک ماشین الوان (ایران)، و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها: در ابتدا ماست سنتی تهیه شده (۵ درصد چربی) با ۱۰ کیلوگرم آب مخلوط شده و تبدیل به دوغ و نسبتاً رقیق شد در این مرحله از کار ۱۵ گرم نمک تصفیه شده استاندارد به دوغ افزوده شد سپس روی حرارت قرار گرفت و دائماً مخلوط هم زده شد تا ته نگیرد، زمانی که دوغ حالت بریده پیدا کرد آن را در صافی از جنس (کرباس) صاف شد و بعد از آنکه آب کاملاً از بافت خارج شد ادغام به فرم دادن خشک گردید و نهایتاً در دستگاه خشک‌کن (پارس خزر مدل GP102، ایران) در شرایط کاملاً بهداشتی خشک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را تا حدود ۱۳ درصد رطوبت خشک گردید. کلیه نمونه‌های خشک خشک (اندازه قطعات ۵×۵ حدود ۵۰ گرم) پس از تولید به آزمایشگاه گروه صنایع غذایی- پردیس کشاورزی دانشگاه تهران منتقل و با دستگاه بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده (HENKELMAN مدل Boxer-200A ساخت کشور آلمان) توسط ۴ نوع گاز A₁، A₂، A₃ و A₄ پس از تخلیه هوا در سه نوع لفاف C₁، C₂ و C₃ بسته‌بندی گردیدند. سپس درب بسته‌ها دوخته شدند و آزمون‌های میکروبی و شیمیایی روی نمونه‌ها به مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط (۲۰°C) روی آنها صورت پذیرفت. لازم به ذکر است سه نمونه خشک خشک در هر سه نوع لفاف بدون تزریق گاز بسته‌بندی شدند بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

باشد، مصرف کشک شور یا پر چرب در افرادی که مشکل فشار خون بالا دارند، می‌بایست با احتیاط صورت گیرد و میزان کشک مصرف باید کنترل شود [۸].

بسته‌بندی MAP¹ یا بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده، عمل اصلاح ترکیب فضای داخلی یک بسته به منظور بهبود عمر مفید محصول مورد نظر می‌باشد. کشور انگلستان اولین کشوری بود که از سیستم اتمسفر اصلاح شده برای افزایش ماندگاری گوشت خوک و ماهی استفاده کرد اما این روش به تدریج در سایر کشورها گسترش یافت و امروزه بیشتر در مورد میوه و سبزیجات تازه به کار می‌رود. در ایران نیز گرچه اغلب از سیستم وکیوم (خروج هوا) در بسته‌بندی‌ها استفاده می‌شود اما در چند سال اخیر با پیشرفت در روش‌های بسته‌بندی نوین و مطابق استانداردهای جهانی استفاده از بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده در حال گسترش است. بر اساس تحقیقات، خروج اکسیژن از محیط برای حفظ و نگهداری ماده غذایی کافی نیست [۹]. در روش MAP نگهداری مواد غذایی دارای دو نکته بسیار مهم یکی درجه حرارت و دیگری خود فرآیند MAP می‌باشد. استفاده از این روش باعث کاهش دما و سرعت واکنش‌های شیمیایی می‌شود. بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده، به معنی جایگزین کردن هوای موجود در بسته با مخلوطی از گازهای متفاوت است به طور معمول مخلوطی از دی‌اکسیدکربن، نیتروژن و اکسیژن در بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده فضای خالی درون بسته‌بندی ابتدا خلا می‌شود و سپس ترکیب گازهای مورد نظر، تحت فشار جایگزین این فضا می‌گردد و بدین ترتیب فعالیت‌های آنزیمی و میکروبی محصول کنترل می‌شود. تعیین نسبت گازها و نگهداشتن این اتمسفر درون بسته‌بندی و اطراف ماده غذایی چندان ساده نیست و در برخی موارد غیر ممکن است [۱۰]. پژوهشی‌هایی بر روی خوراک مرغ در مدت سه هفته [۲۱]، گوشت تازه شتر مرغ در مدت دو هفته [۲۳] و نیز ماهی سفید دودی در زمان دو ماه [۲۴] تحت اتمسفر اصلاح شده و لفاف‌های غیر قابل نفوذ به بخار آب و اکسیژن، در راستای کاهش رشد باکتری هوازی، بی‌هوازی و تغییرات pH و خواص حسی در سال‌های قبل انجام شده است که با توجه به مشابهت تیمارهای گازی و نوع لفاف بسته‌بندی راهنمای انجام این تحقیق بوده است. هدف از این تحقیق نیز بررسی اثر

1. Modified Atmosphere Packaging

۲-۲- خصوصیات لفاف‌های بسته‌بندی مورد

استفاده در این پژوهش

خصوصیات لفاف‌های بسته‌بندی مورد استفاده در این پژوهش مطابق با نتایج تحقیق محققان در جدول ۱ ذکر شده است (۱۱)، ۱۲ و ۱۳).

• C1: لفاف PET (12)/AL(12)/LLD(100) (۳ لایه با

آلومینیم قوی)

• C2: لفاف PET (12)/AL(7)/PET (12)/LLD(100) (۴

لایه)

• C3: لفاف PET (12)/AL(7)/LLD(100) (۳ لایه با

آلومینیم ضعیف)

Table 1 Analytical characteristics of containers used in this research

Packaging coatings	Layers	Thickness (μ)	Tensile of sealing film (N)	Oxygen transmission rate (ml/m ² .day)	Water vapor transmission rate (g/m ² .day)
PET/AL/LLD	12/12/100	124	58.88	0	0.11
PET/AL/LLD	12/7/100	119	48.89	0	0.50
PET/AL/PET/LLD	12/7/12/100	131	61.03	0	0.089

PET: Poly Ethylene Terephthalate; LLD: Low Density Poly Ethylene; AL: Aluminum

میلی لیتر از نمونه به لوله شماره ۱ رقت تهیه شد و به روش پور پلیت در محیط کشت PCA² کشت داده شد و به مدت ۳

روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت شمارش کلی میکروارگانیزم‌ها انکوبه شد سپس توسط دستگاه کلنی‌کانتور تعداد میکروارگانیزم‌ها شمارش شد. شیوه ساخت محیط PCA، ابتدا ۲۳/۵ گرم از پودر محیط کشت را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده سپس در اتوکلاو ۰C¹²¹ به مدت ۱۵ دقیقه استریل نموده بعد از آن که دما به ۰C⁴⁰⁻⁴⁵ رسید محیط را داخل پلیت‌ها ریخته اجازه می‌دهیم تا سفت شود سپس محیط کشت PCA آماده کشت می‌باشد، یک میلی‌لیتر از نمونه توسط سمپلر برداشته شد بر روی محیط کشت ریخته می‌شود و به صورت ۸ انگلیسی همزده می‌شود تا خشک شود تمام مراحل زیر هود انجام می‌شود [۱۴].

۲-۴-۲- شمارش کلی میکروارگانیزم‌های بی‌هوازی (کلی‌فرم)

ابتدا ۱ گرم نمونه در زیر هود لامینار وزن شد و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول رینگر حل شد، سپس یک سری ۶ تایی لوله حاوی آب مقطر استریل با افزودن یک میلی‌لیتر از نمونه به لوله شماره ۱ رقت تهیه شد و به روش پورپلیت دو لایه در محیط کشت VRBA³ کشت داده شد و به مدت ۳ روز در جار بی‌هوازی ۲۵ درجه سانتی‌گراد جهت شمارش کلی‌فرم انکوبه شد سپس شمارش شد شیوه ساخت محیط VRBA، ابتدا ۴۰

۲-۳- نوع گاز مورد استفاده و درصدهای گاز

مصرفی در این پژوهش

هوا توسط دستگاه بسته‌بندی اتمسفر اصلاح شده، از درون بسته‌ها خارج گردیده و با گازهایی که مخلوط آنها به صورت ذیل است، پر شدند:

- A1: ۳۰ درصد دی‌اکسیدکربن + ۷۰ درصد نیتروژن
- A2: ۷۰ درصد دی‌اکسیدکربن + ۳۰ درصد نیتروژن
- A3: ۴۸ درصد دی‌اکسیدکربن + ۴۸ درصد نیتروژن + ۴ درصد اکسیژن
- A4: تحت شرایط خلاء
- A5: شاهد

۲-۴-۲- آزمون میکروبی

۲-۴-۱- شمارش کلی میکروارگانیزم‌های هوازی

ابتدا یک گرم نمونه در زیر هود لامینار وزن شد و در ۱۰ سی‌سی محلول رینگر حل شد سپس به محیط کشت غنی‌کننده CMM¹ ۱۰ میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت سه روز در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد غنی‌سازی انجام شد. سپس یک سری ۶ تایی لوله حاوی آب مقطر استریل با افزودن یک

2 Plate Count Agar
3 Violet Red Bile Agar

1 Cooked Meat Media

دستگاه که از قبل کالیبره شده مقدار pH را اندازه‌گیری نموده است [۱۷].

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آزمایش به صورت ۳ فاکتوریل بود که فاکتور C (اثر نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه) در ۳ سطح C1 تا C3 (لفاف ۳ لایه PET12/AL12/LLD100، لفاف ۴ لایه PET12/AL7/PET12/LLD100، لفاف ۳ لایه PET12/AL7/LLD100) و فاکتور گاز مورد استفاده برای بسته‌بندی (A) در ۵ سطح A1 تا A5 به ترتیب (۷۰ درصد گاز CO₂ + ۳۰ درصد گاز N₂، ۴۸ درصد گاز CO₂ + ۵۲ درصد گاز N₂، ۴۸ درصد گاز CO₂ + ۵۲ درصد گاز N₂، ۴۸ درصد گاز CO₂ + ۵۲ درصد گاز N₂، ۴۸ درصد گاز CO₂ + ۵۲ درصد گاز N₂)، فاکتور Z (زمان نگهداری) در ۴ سطح ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بررسی شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شمارش کلی باکتری‌های هوازی

نتایج شمارش کلی باکتری‌های هوازی نمونه‌های خشک بسته‌بندی شده در فیلم‌های چند لایه انعطاف‌پذیر و اتمسفر اصلاح شده در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق با نتایج تعداد باکتری‌های هوازی خشک بسته‌بندی شده طی مدت زمان نگهداری در تمامی تیمارها روند افزایشی داشت. بطوریکه بالاترین شمارش کلی باکتری‌های هوازی (log cfu) ۳^{-۱} g^{-۱} (۶/۱۷) مربوط به تیمار C3A5 با لفاف ۳ لایه PET12/AL7/LLD100 و بسته‌بندی بدون تزریق گاز پس از ۶۰ روز نگهداری و پایین‌ترین میانگین شمارش کلی باکتری‌های هوازی (۳/۸۴ log cfu g^{-۱}) مربوط به تیمار C2A1 با لفاف ۴ لایه PET12/AL7/PET12/LLD100 و بسته‌بندی تحت شرایط اتمسفر ۷۰ درصد گاز دی‌اکسیدکربن و ۳۰ درصد گاز نیتروژن پس از ۱۵ روز نگهداری بود. مطابق با نتایج آنالیز واریانس (جدول ۶)، اثرات خطی فاکتورهای مستقل (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر، شرایط بسته‌بندی و زمان نگهداری) بر شمارش کلی باکتری‌های هوازی معنی‌دار ($p \leq 0/01$) بود. اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه فاکتورهای مستقل تاثیر معنی‌داری بر شمارش کلی باکتری‌های هوازی خشک بسته‌بندی شده نداشتند ($p > 0/05$).

گرم از پودر محیط کشت را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده سپس در اتوکلاو C⁰ ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل نموده بعد از آن که دما به ۴۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید محیط را داخل پلیت‌ها ریخته اجازه می‌دهیم تا سفت شود سپس محیط کشت VRBA آماده کشت می‌باشد رنگ این محیط قرمز تا ارغوانی می‌باشد، یک میلی‌لیتر از نمونه توسط سمپلر برداشته می‌شود بر روی محیط کشت ریخته می‌شود و به صورت ۸ انگلیسی همزده می‌شود تا خشک شود تمام مراحل زیر هود انجام می‌شود، سپس بعد از آنکه نمونه خشک شد لایه دوم ریخته شد و اجازه داده شد تا سفت شود بعد به جار بی‌هوای انتقال گردید [۱۵].

۲-۴-۳- شمارش کلی کپک و مخمر

ابتدا یک گرم نمونه در زیر هود لامینار وزن شد و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول رینگر حل شد، سپس یک سری ۶ تایی لوله حاوی آب مقطر استریل با افزودن یک میلی‌لیتر از نمونه به لوله شماره ۱ رقت تهیه شد و به روش پورپلیت دو لایه در محیط کشت YGC¹ کشت داده شد و به مدت ۳ روز در جار بی‌هوای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جهت شمارش کپک و مخمر گرمخانه گذاری شد سپس کپک و مخمر شمارش شد. شیوه ساخت محیط YGC، ابتدا ۴۰ گرم از پودر محیط کشت را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده سپس در اتوکلاو C⁰ ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل نموده بعد از آن که دما به ۴۰-۴۵- رسید محیط را داخل پلیت‌ها ریخته اجازه می‌دهیم تا سفت شود سپس محیط کشت YGC آماده کشت می‌باشد، یک میلی‌لیتر از نمونه توسط سمپلر برداشته می‌شود بر روی محیط کشت ریخته می‌شود و به صورت ۸ انگلیسی همزده می‌شود تا خشک شود تمام مراحل زیر هود انجام می‌شود، سپس بعد از آنکه نمونه خشک شد لایه دوم ریخته شد و اجازه داده شد تا سفت شود بعد به جار بی‌هوای انتقال گردید [۱۶].

۲-۵- اندازه‌گیری pH

این دستگاه برای اندازه‌گیری pH در مواد اسیدی و (OH-) در مواد قلیایی بکار می‌رود و دقت آن دو رقم اعشار می‌باشد. این دستگاه تولید شرکت طب آزما (ایران) می‌باشد. در روش اندازه‌گیری pH، دستگاه pH متر ابتدا با محلول‌های تامپون ۴ و ۷ تنظیم شد. مقدار ۱۰ گرم نمونه (خشک خشک) را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و سپس بوسیله الکتروود

ماهی کراکر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و محیط CO₂ نسبت به نمونه‌های شاهد حداقل یک لگاریتم تفاوت در شمارش باکتریایی آنها مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مشابهت داشت [۲۰]. برخی از محققان در پژوهشی در خصوص اثر بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) و لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه در افزایش زمان ماندگاری خوراک مرغ انجام دادند که مدت ۲۱ روز ماندگاری خوراک مرغ افزایش یافت و با توجه به مشابهت تیمارهای گازی و نوع لفاف بسته‌بندی با نتایج این تحقیق از نظر روند شمارش باکتری‌های هوایی مطابقت داشته است [۲۱].

تحقیقات نشان داد نان قندی بعد از زمان ۳ هفته تحت تاثیر لفاف‌های انعطاف‌پذیر ۳ لایه و ۴ لایه و تحت اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) ماندگاری نان افزایش یافت که با نتایج این تحقیق از نظر شمارش کلی باکتری هوایی مطابقت داشته است [۲۲]. برخی محققان پژوهشی بر روی گوشت تازه شتر مرغ بعد از مدت زمان ۱۵ روز و تحت اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) و لفاف‌های انعطاف‌پذیر در راستای رشد باکتری هوایی در لفاف‌های ۳ لایه و ۴ لایه انجام دادند که با نتایج این تحقیق از نظر شمارش کلی باکتری هوایی مطابقت داشته است [۲۳].

پژوهش بر روی ماهی دودی بعد از مدت زمان ۶۰ روز با استفاده از لفاف‌های انعطاف‌پذیر ۳ لایه و ۴ لایه و تحت اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N₂ و ۷۰ درصد CO₂) و در راستای رشد باکتری هوایی با نتایج این تحقیق از نظر شمارش کلی باکتری هوایی مطابقت داشته است [۲۴].

مقایسه میانگین اثر لفاف‌های مختلف روی شمارش کلی باکتری‌های هوایی نشان داد که لفاف سه لایه با آلومینیوم ضعیف‌ترین تعداد باکتری‌های هوایی و لفاف چهار لایه به دلیل ضخامت بالا (۱۲۴ میکرون)، تعداد لایه بیشتر و قدرت نفوذپذیری کم به بخار آب) کمترین شمارش را داشت. مقایسه اثر گازهای مختلف بر روی باکتری‌های هوایی نشان داد که حالت شاهد بیشترین مقدار و حالت ترکیب گاز ۷۰ درصد CO₂ + ۳۰ درصد N₂ کمترین مقدار شمارش باکتری را به خود اختصاص داده است که علت آن خاصیت باکتری‌کشی گاز دی‌اکسیدکربن در درصدهای بالای گاز CO₂ است. اثر زمانهای مختلف (روز) بر روی شمارش کلی باکتری‌های هوایی نشان داد که روز شصتام بیشترین و روز پانزدهم کمترین تعداد باکتری‌های هوایی را دارا بود که علت فرصت داشتن باکتری جهت رشد و تکثیر در روز شصتام است.

برخی از محققین به نتایج مشابهی با این تحقیق دست یافتند آنها خاطر نشان کردند که مخلوط گازی دارای ترکیب مناسب برای افزایش ماندگاری محصول به همراه لفافی که دارای نفوذپذیری ویژه باشد می‌تواند از طریق ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی سودوموناس و دیگر سایکروتروف‌های گرم منفی موجب افزایش قابل توجهی در ماندگاری غذاهای مختلف شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت [۱۸].

محققان نشان داد که عمر نگهداری گوشت بره و خوک در غلظت ۱۰۰ درصد CO₂ دمای ۷-۴ درجه سانتی‌گراد دو برابر گوشت‌هایی بود که در هوای معمولی در همان درجه حرارت نگه داشته شده بود که با نتایج این تحقیق مشابهت داشت [۱۹]. محقق دیگری دریافت در صورت نگهداری قزل آلا و

Table 2 Results of total aerobic bacteria count (log cfu g⁻¹) of dried kashk packed in flexible multilayer films under modified atmospheres

Treatment	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60
C1A1	4.01±0.02 ^{cd}	4.30±0.01 ^l	4.69±0.00 ^l	5.04±0.00 ^l
C2A1	3.84±0.00 ^d	4.11±0.01 ⁿ	4.64±0.00 ^l	4.90±0.00 ^m
C3A1	4.30±0.01 ^{bc}	4.61±0.00 ^g	5.02±0.01 ^e	5.39±0.00 ^f
C1A2	4.30±0.01 ^{bc}	4.69±0.00 ^f	4.95±0.00 ^f	5.47±0.01 ^e
C2A2	4.08±0.02 ^{cd}	4.44±0.01 ^j	4.69±0.00 ⁱ	5.25±0.00 ^h
C3A2	4.60±0.00 ^{ab}	5.01±0.02 ^b	5.27±0.00 ^b	5.84±0.00 ^b
C1A3	4.17±0.00 ^{cd}	4.60±0.00 ^g	4.90±0.00 ^g	5.34±0.00 ^g
C2A3	3.95±0.00 ^{cd}	4.36±0.00 ^k	4.61±0.05 ⁱ	5.14±0.00 ^j
C3A3	4.81±0.58 ^a	4.91±0.01 ^c	5.19±0.07 ^c	5.69±0.00 ^c
C1A4	4.04±0.00 ^{cd}	4.47±0.00 ⁱ	4.77±0.01 ^h	5.20±0.01 ⁱ
C2A4	3.90±0.00 ^{cd}	4.25±0.01 ^m	4.54±0.01 ^k	5.11±0.01 ^k
C3A4	4.69±0.58 ^{ab}	4.79±0.00 ^c	5.09±0.00 ^d	5.54±0.00 ^d
C1A5	4.60±0.00 ^{ab}	4.84±0.00 ^d	5.17±0.00 ^c	5.69±0.00 ^c
C2A5	4.30±0.01 ^{bc}	4.58±0.00 ^h	5.01±0.02 ^e	5.54±0.00 ^d
C3A5	4.90±0.00 ^a	5.16±0.00 ^a	5.54±0.01 ^a	6.17±0.00 ^a

Different letters showed a significant difference in each of the four columns (p≤0.05).

۳-۲- شمارش کلی فرم

نتایج شمارش کلی فرم نمونه‌های خشک خشک بسته‌بندی شده در فیلم‌های چند لایه انعطاف‌پذیر و اتمسفر اصلاح شده در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق با نتایج تعداد کلی فرم‌های خشک خشک شده و بسته‌بندی شده طی مدت زمان نگهداری در تمامی تیمارها روند افزایشی داشت. بطوریکه بالاترین شمارش کلی فرم ($1 \log \text{cfu g}^{-1}$) مربوط به تیمار C3A5 با لفاف ۳ لایه PET12/AL7/LLD100 و بسته‌بندی بدون تزریق گاز پس از ۶۰ روز نگهداری و پایین‌ترین میانگین شمارش کلی فرم ($1/39 \log \text{cfu g}^{-1}$) مربوط به تیمار C2A1 با لفاف ۴ لایه PET12/AL7/PET12/LLD100 و بسته‌بندی تحت شرایط اتمسفر ۷۰ درصد گاز دی‌اکسیدکربن و ۳۰ درصد گاز نیتروژن پس از ۱۵ روز نگهداری بود.

مطابق با نتایج آنالیز واریانس (جدول ۶)، اثرات خطی فاکتورهای مستقل (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر، شرایط بسته‌بندی و زمان نگهداری) و اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه فاکتورهای مستقل بر شمارش کلی فرم‌های خشک خشک بسته‌بندی شده معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بودند.

نمونه‌های خشک خشک در لفاف دوم PET (12)/AL(7)/PET (12)/ LLD(100) دارای بهترین اثر بوده و تفاوت لفاف دوم با سایر لفاف‌ها معنی‌دار بوده است. علت ضخامت

بسته‌بندی و نفوذناپذیری بسته‌بندی چهار لایه است. لفافی که کمترین اثر را بر روی کلی فرم داشت لفاف سوم بود، به خاطر ضخامت کم و نفوذپذیری به بخار بود. بهترین اثر مناسب ممانعت‌کنندگی بر روی شمارش کلی فرم مربوط به نمونه‌های خشک خشک تحت ترکیب گاز ($30 \text{ درصد } \text{N}_2$ و $70 \text{ درصد } \text{CO}_2$) و سپس ترکیب گاز خلا بود. که علت نوع اتمسفر داخل بسته‌بندی است. با توجه به نمودارها بین روزهای (۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰) اختلاف معنی‌داری در خصوص کلی فرم دیده می‌شود. بطوری که در روز پانزدهم شمارش کلی فرم در حداقل میزان خود بوده است و در روز شصت‌ام آزمایش شمارش کلی فرم به بیشترین میزان خود رسیده است. چون با گذشت زمان میکروارگانیسم فرصت جهت رشد و تکثیر را پیدا می‌کند. با گذشت زمان بر تعداد میکروارگانیسم‌ها افزوده می‌شود اما خاصیت میکروبی ترکیب گاز ($30 \text{ درصد } \text{N}_2$ و $70 \text{ درصد } \text{CO}_2$) و نوع بسته چهار لایه و ضخامت آن شرایط را بهتر کنترل کرده است. در ضمن نمونه‌ها در لفاف چهار لایه تحت شرایط ترکیب گاز ($30 \text{ درصد } \text{N}_2$ و $70 \text{ درصد } \text{CO}_2$) در روز پانزدهم حداقل میزان کپک و مخمر دارا بودند و در روز شصت‌ام آزمایش شمارش به بیشترین میزان خود در لفاف سوم تحت شرایط بدون گاز رسیده که علت افزایش، امکان رشد و تکثیر کپک و مخمر با گذشت زمان در بسته‌بندی ضعیف‌تر و شرایط معمولی نمونه‌ها بوده است.

Table 3 Results of Coliform bacteria count ($\log \text{cfu g}^{-1}$) of dried kashk packed in flexible multilayer films under modified atmospheres

Treatment	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60
C1A1	1.69±0.00 ^m	2.17±0.00 ^m	2.30±0.00 ⁿ	2.54±0.00 ⁿ
C2A1	1.39±0.01 ^o	1.87±0.00 ^o	1.99±0.00 ^o	2.39±0.00 ^o
C3A1	1.99±0.00 ⁱ	2.30±0.00 ^l	2.39±0.00 ^l	2.81±0.00 ⁱ
C1A2	2.13±0.00 ^g	2.58±0.00 ^f	2.69±0.00 ^f	2.91±0.00 ^g
C2A2	1.91±0.01 ^j	2.55±0.00 ^h	2.51±0.00 ^j	2.74±0.00 ^j
C3A2	2.43±0.00 ^d	2.85±0.00 ^d	2.91±0.00 ^d	3.21±0.00 ^d
C1A3	2.04±0.00 ^h	2.55±0.00 ^g	2.64±0.00 ^g	2.81±0.00 ^h
C2A3	1.81±0.00 ^l	2.34±0.00 ^j	2.55±0.00 ⁱ	2.69±0.00 ^l
C3A3	2.34±0.00 ^e	2.74±0.00 ^e	2.85±0.00 ^e	3.13±0.00 ^e
C1A4	1.89±0.00 ^k	2.31±0.00 ^k	2.41±0.00 ^k	2.71±0.00 ^k
C2A4	1.55±0.01 ⁿ	2.11±0.00 ⁿ	2.31±0.00 ^m	2.56±0.00 ^m
C3A4	2.19±0.00 ^f	2.41±0.00 ⁱ	2.56±0.00 ^h	3.03±0.00 ^f
C1A5	3.32±0.00 ^b	3.54±0.00 ^b	3.79±0.00 ^b	4.14±0.00 ^b
C2A5	3.14±0.00 ^c	3.24±0.00 ^c	3.54±0.00 ^c	4.02±0.00 ^c
C3A5	3.44±0.00 ^a	3.84±0.00 ^a	4.14±0.00 ^a	4.62±0.00 ^a

Different letters showed a significant difference in each of the four columns ($p \leq 0.05$).

محققان، شیوه‌های نوین در نگهداری و بسته‌بندی پنیر فایوردی لات (نوعی محصول لبنی در جنوب ایتالیا و شبیه پنیر موزارلا) را مورد بررسی قرار دادند. فایوردی لات با روش‌های سنتی و یا با استفاده از شیر پاستوریزه و کشت آغازگر تجاری باکتری‌های اسید لاکتیک ساخته می‌شود. اگرچه پنیر در طی تشکیل دلمه یک تیمار حرارتی دریافت می‌کند، اما آلودگی پس از تولید بواسطه میکروارگانیسم‌ها به علت رطوبت (۵۵ تا ۶۰ درصد) و محتوی چربی بالا (بیش از ۴۵ درصد) ممکن است عمر انباری محصول را تا چند روز محدود کند. اخیراً توجهات زیادی بر روی روش‌های نگهداری غیر حرارتی جدید بر مبنای استفاده از ترکیبات طبیعی با ضد میکروبی متمرکز شده که مانع رشد کلی‌فرم‌ها در طی دوره انبار داری شده است که نتایج این پژوهش با تحقیق مذکور مطابقت داشت [۲۵].

۳-۳- شمارش کپک و مخمر

نتایج شمارش کپک و مخمر نمونه‌های خشک خشک بسته‌بندی شده در فیلم‌های چند لایه انعطاف‌پذیر و اتمسفر اصلاح شده در جدول ۴ نشان داده شده است. مطابق با نتایج تعداد کپک و مخمر خشک شده و بسته‌بندی شده طی مدت زمان نگهداری در تمامی تیمارها روند افزایشی داشت. بطوریکه بالاترین شمارش کپک و مخمر ($1/7 \log \text{cfu g}^{-1}$) مربوط به تیمار C3A5 با لفاف ۳ لایه PET12/AL7/LLD100 و بسته‌بندی بدون تزریق گاز پس از ۶۰ روز نگهداری و پایین‌ترین میانگین شمارش کپک و مخمر ($1/19 \log \text{cfu g}^{-1}$) مربوط به تیمار C2A1 با لفاف ۴ لایه PET12/AL7/PET12/LLD100 و بسته‌بندی تحت شرایط اتمسفر ۷۰ درصد گاز دی‌اکسیدکربن و ۳۰ درصد گاز نیتروژن پس از ۱۵ روز نگهداری بود. مطابق با نتایج آنالیز واریانس (جدول ۶)، اثرات خطی فاکتورهای مستقل (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر، شرایط بسته‌بندی و زمان نگهداری) و اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه فاکتورهای مستقل بر شمارش کپک و مخمر خشک بسته‌بندی شده معنی‌دار ($p \leq 0/01$) بودند. محقق گزارش نمود که کپک بر روی گوشت می‌تواند رشد کند اما با استفاده از ۴ درصد گاز دی‌اکسیدکربن رشد آنها به تأخیر می‌افتد که با افزایش میزان گاز دی‌اکسیدکربن در بسته‌بندی از رشد کپک‌ها جلوگیری می‌کند که با نتایج این

تحقیق در راستای کنترل رشد کپک با افزایش CO_2 به میزان ۷۰ درصد مشابهت دارد [۲۶]. همچنین در تحقیق دیگری که انجام گردید طی نگهداری گوشت مرغ در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۲۰ درصد CO_2 ، ۱۰۰ درصد CO_2 و ۱۰۰ درصد N_2 و نیز شرایط خلاء نشان دادند که رشد بی‌هوازی‌ها بویژه باکتری‌های لاکتیک در اتمسفر حاوی ۱۰۰ درصد CO_2 کمتر از ۲۰ درصد CO_2 و در اتمسفرهای ۲۰ درصد CO_2 کمتر از اتمسفر حاوی ۱۰۰ درصد N_2 می‌باشد و همچنین در شرایط خلاء نیز بیشترین تعداد باکتری‌های بی‌هوازی وجود داشته است که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت [۲۷]. در مطالعه‌ای نوعی گربه ماهی با مخلوطی از چهار نژاد کلاستریدیوم تلقیح شده و در محیط حاوی ۸۰ درصد CO_2 و ۲۰ درصد N_2 در کیسه‌های غیر قابل نفوذ به O_2 و در دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تمام آنهایی که در ۱۰ درجه نگهداری شده بودند بعد از ۶ روز سمی شدند آنهایی که در ۴ درجه در بسته‌های نفوذ پذیر به نگهداری شده بودند در روز نهم سمی شدند اما آنهایی که MAP بسته‌بندی گردیدند تا روز هجدهم سمی تولید نشد طی این تحقیق پی به ممانعت‌کنندگی اتمسفر اصلاح شده در برابر کلاستریدیوم بردند که با نتایج این تحقیق در رشد بی‌هوازی‌ها مطابقت داشت [۲۸].

پژوهش بر روی نان قندی بعد از زمان ۲۱ روز تحت تاثیر لفاف‌های انعطاف‌پذیر ۳ لایه و ۴ لایه و تحت اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) با توجه به مشابهت تیمارهای گازی و نوع لفاف بسته‌بندی با نتایج این تحقیق از نظر روند شمارش کپک و مخمر مطابقت داشته است [۲۹]. در پژوهشی در خصوص اثر بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) و لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه در افزایش زمان ماندگاری خوراک مرغ انجام دادند که با نتایج این تحقیق از نظر رشد باکتری بی‌هوازی مطابقت داشته است [۲۱].

در تحقیقی بسته‌بندی خوراک قارچ و خوراک سبزیجات در ۴ لایه در طول ۶۰ روز بهتر از بسته‌بندی ۳ لایه ارزیابی شد. رشد بی‌هوازی‌ها در نمونه‌های خوراک بسته‌بندی شده در مدت نگهداری در محدوده استاندارد بود که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت [۳۰ و ۳۱].

فساد کافی نیست، اما روند فساد به تأخیر افتاده است، با این حال، بهترین شرایط متعلق به مخلوط گاز (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2)، و تا ۱۵ روز قابل قبول بود. حداکثر باکتری‌های بی‌هوازی‌ها که در این نمونه گوشت رشد کرده‌اند مربوط به ۳۰ درصد CO_2 شرایط در ۳ لایه (AL: 7) و کمترین رشد به درمان تحت ۷۰ درصد CO_2 در ۴ لایه تعلق داشت. همچنین افزایش درصد CO_2 به علت خواص ضد باکتری گاز دی‌اکسیدکربن، باعث کنترل رشد باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه‌های گوشت بسته‌بندی شده در مدت نگهداری در محدوده استاندارد بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۳۴].

در پژوهشی اثر بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده و لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه بر رشد باکتری‌های بی‌هوازی ماهی سفید دودی در دمای محیط انجام گردید. طول دوره این آزمایش ۶۰ روز بوده است. ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که غلظت CO_2 باعث افزایش افزایش عمر مفید ماهی سفید دودی می‌شود. همچنین آنها بیان کردند بهترین شرایط از لحاظ مدت ماندگاری متعلق به ترکیب گازی ۷۰ درصد CO_2 و شمارش کلی باکتری بی‌هوازی مطابقت داشته است [۳۵].

در تحقیقی اثر MAP را در افزایش مدت ماندگاری خوراکی مرغ (با ادویه) بسته‌بندی شده به این نتیجه رسیدند که رشد لاکتوباسیلوس‌ها در اتمسفر معمولی بعد از ۷ روز و تحت شرایط وکیوم بعد از ۲۱ روز و تحت شرایط اتمسفر اصلاح شده بعد از ۲۸ روز بود پس MAP اثر مهارکنندگی روی رشد باکتری‌ها، خصوصاً بی‌هوازی‌ها دارد که با نتایج این تحقیق مشابهت داشت [۳۲].

در پژوهشی دیگر اثر بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده و لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه بر روی تعداد کلوستریدیوم ماهی سفید دودی در دمای در دمای یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. آزمون‌های میکروبی (تعداد کلوستریدیوم)، در زمان‌های مختلف در طول ۶۰ روز انجام شد. ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که غلظت CO_2 باعث افزایش افزایش عمر مفید ماهی سفید دودی شده است. همچنین آنها بیان کردند بهترین شرایط از لحاظ مدت ماندگاری متعلق به ترکیب گازی ۷۰ درصد CO_2 و لفاف ۴ لایه (۱۳۱ میکرون) است که نتایج این پژوهش با تحقیق مذکور از نظر شمارش کلی باکتری بی‌هوازی مطابقت داشت [۳۳]. در پژوهشی دیگر اثر بسته‌های چند لایه انعطاف‌پذیر بر روی رشد باکتری‌های بی‌هوازی در گوشت تازه شتر مرغ در یخچال ۴ درجه بررسی شد، استفاده از MAP برای کنترل

Table 4 Results of mold and yeast count ($\log \text{cfu g}^{-1}$) of dried kashk packed in flexible multilayer films under modified atmospheres

Treatment	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60
C1A1	1.99±0.00 ^m	2.47±0.01 ⁱ	2.60±0.00 ^j	2.84±0.00 ^{gh}
C2A1	1.69±0.00 ^o	2.17±0.01 ^k	2.30±0.01 ^k	2.69±0.00 ^h
C3A1	2.30±0.00 ^h	2.60±0.00 ^h	2.69±0.00 ⁱ	3.11±0.01 ^{efg}
C1A2	2.39±0.00 ^g	2.84±0.00 ^f	2.95±0.00 ^f	3.17±0.01 ^{def}
C2A2	2.17±0.01 ^k	2.70±0.09 ^g	2.77±0.01 ^h	3.01±0.02 ^{fg}
C3A2	2.69±0.00 ^d	3.12±0.02 ^d	3.17±0.01 ^d	3.47±0.01 ^c
C1A3	2.30±0.01 ⁱ	2.81±0.01 ^f	2.86±0.03 ^g	3.08±0.01 ^{efg}
C2A3	2.07±0.01 ^j	2.62±0.04 ^h	2.81±0.01 ^{gh}	2.95±0.00 ^{fgh}
C3A3	2.60±0.00 ^c	3.01±0.02 ^e	3.02±0.14 ^c	3.39±0.00 ^{cd}
C1A4	2.17±0.01 ⁱ	2.60±0.00 ^h	2.69±0.00 ⁱ	3.01±0.02 ^{fg}
C2A4	1.84±0.00 ⁿ	2.40±0.01 ^j	2.60±0.00 ^j	2.84±0.00 ^{gh}
C3A4	2.47±0.01 ^f	2.69±0.00 ^g	2.84±0.00 ^{gh}	3.32±0.01 ^{cde}
C1A5	3.47±0.01 ^b	3.69±0.02 ^b	3.95±0.00 ^b	4.50±0.01 ^b
C2A5	3.30±0.01 ^c	3.39±0.00 ^c	3.69±0.00 ^c	4.30±0.057 ^b
C3A5	3.60±0.00 ^a	4.01±0.00 ^a	4.30±0.01 ^a	4.77±0.00 ^a

Different letters showed a significant difference in each of the four columns ($p \leq 0.05$).

۳-۴- pH

نتایج تغییرات pH نمونه‌های خشک بسته‌بندی شده در فیلم‌های چند لایه انعطاف‌پذیر و اتمسفر اصلاح شده در جدول ۵ نشان داده شده است. مطابق با نتایج میزان pH خشک بسته‌بندی شده طی مدت زمان نگهداری در تمامی تیمارها روند کاهشی و افزایشی داشت. پایین‌ترین میزان pH (۳/۸۴) مربوط به تیمار C2A1 با لفاف ۴ لایه‌ای PET12/AL7/PET12/LLD100 و بسته‌بندی تحت شرایط اتمسفر ۷۰ درصد گاز دی‌اکسیدکربن و ۳۰ درصد گاز نیتروژن پس از ۶۰ روز نگهداری بود. بالاترین میزان pH (۴/۵۱) مربوط به تیمار C3A5 با لفاف ۳ لایه‌ای PET12/AL7/LLD100 و بسته‌بندی بدون تزریق گاز پس از ۶۰ روز نگهداری بود. مطابق با نتایج آنالیز واریانس (جدول ۶)، اثرات خطی فاکتورهای مستقل (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر، شرایط بسته‌بندی و زمان نگهداری) و اثرات متقابل (شرایط بسته‌بندی × زمان نگهداری) و (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر × زمان نگهداری) بر تغییرات pH معنی‌دار بود. اثرات متقابل (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر × شرایط بسته‌بندی) و اثرات سه جانبه (نوع لفاف‌های انعطاف‌پذیر × شرایط بسته‌بندی × زمان نگهداری) تاثیر معنی‌داری بر تغییرات pH خشک بسته‌بندی شده نداشتند ($p > 0.05$).

لفاف اول (AL:12) و لفاف دوم (AL:7) و لفاف سوم (لفاف چهارلایه) با هم تفاوت آماری معنی‌دار ندارند. بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت بهترین اثر متقابل دوگانه را در روند تغییرات pH مربوط به لفاف چهار لایه به همراه ترکیب گاز (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) است و بعد از آن لفاف چهار لایه به همراه خلاء بهترین اثر را داشته است. علت آن افزایش غلظت CO_2 است که موجب افزایش تولید اسیدکربنیک حاصل از ترکیب CO_2 با آب موجود در نمونه شده لذا باعث کاهش pH خشک در ترکیب گاز ۱ می‌گردد به-طوری‌که ملاحظه شد pH در این ترکیب گازی کمتر از سایر روش‌های بسته‌بندی طی زمان نگهداری بود. در لفاف چهار لایه به خاطر ضخامت و خاصیت نفوذپذیری کم بسته‌بندی به بخار آب است که بهترین اثر را روی pH داشته است و در شاهد به خاطر نبود گاز و نفوذپذیری بسته سه لایه ضعیف که باعث رشد میکروارگانیسم‌ها شده و بیشترین مقدار pH را داشتند.

بیشترین تأثیرات بر روی pH در لفاف اول، لفاف دوم و لفاف سوم مربوط به نمونه شاهد در طول شصت روز بود. و کمترین مقدار pH در لفاف اول، دوم و سوم مربوط به ترکیب گاز ۱ (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) طی شصت روز است. به خاطر نوع اتمسفر ترکیب گازی ۱ و نوع بسته‌بندی بهترین اثر را طی روزها روی تغییرات pH داشته است.

در تحقیقی به این نتیجه رسیدند که بسته‌بندی با لفاف چهار لایه نسبت به سه لایه دارای کمترین تغییرات pH است که با نتایج این تحقیق در میزان تغییرات pH مطابقت داشت [۳۶].

برخی از محققان نتایجی مشابه با این تحقیق داشتند. طی تحقیقی از مخلوط دو گاز (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) و خلا به همراه فیلم‌های انعطاف‌پذیر چند لایه جهت افزایش مدت ماندگاری خوراک مرغ استفاده کردند. نتایج نشان داد بهترین شرایط مربوط به مخلوط گاز (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) و لفاف چهار لایه است همچنین نتیجه گرفتند کمترین تغییرات pH مربوط گاز ۷۰ درصد CO_2 و لفاف چهار لایه است و بیشترین تغییرات pH مربوط به شرایط خلاء و تیمار ۷۰ درصد CO_2 است که نتایج این پژوهش با تحقیق مذکور در میزان تغییرات pH مطابقت داشت [۲۱].

در پژوهشی دیگر اثر بسته‌بندی با اتمسفر اصلاح شده و لفاف‌های انعطاف‌پذیر چند لایه بر روی pH ماهی سفید دودی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. آزمون‌های شیمیایی pH در زمان‌های مختلف در طول ۶۰ روز انجام شد. ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که غلظت بالاتر CO_2 باعث کاهش این فاکتور و افزایش عمر مفید ماهی سفید دودی شد که با نتایج این تحقیق مشابهت داشت [۲۳].

در پژوهشی اثر اتمسفر اصلاح شده را بر تغییرات pH و افزایش عمر مفید گوشت تازه شترمرغ در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمایش بر روی تیمارهایی تحت شرایط (اتم‌سفر کنترل شده خلاء، ترکیبات مختلف گازهای (نیتروژن و دی‌اکسیدکربن) و با لفاف‌های سه لایه و چهار لایه در مدت ۱۵ روز انجام گردید. از آنجا که نفوذپذیری بخار در ۴ لایه کمتر از ۳ لایه بوده، و افزایش CO_2 اثر بر pH داشته و دی‌اکسیدکربن بیشتر به منظور حفظ طولانی مدت گوشت تازه شترمرغ به دلیل اثر محافظتی گاز دی‌اکسیدکربن ارزیابی شد که نتایج این پژوهش با تحقیق مذکور مطابقت داشت [۳۷].

Table 5 Results of pH of dried kashk packed in flexible multilayer films under modified atmospheres

Treatment	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60
C1A1	4.02±0.10 ^a	3.96±0.09 ^a	4.17±0.10 ^{bc}	3.90±0.09 ^{fg}
C2A1	4.01±0.10 ^a	3.93±0.09 ^a	4.11±0.10 ^c	3.84±0.11 ^g
C3A1	4.04±0.10 ^a	3.98±0.09 ^a	4.19±0.10 ^{abc}	4.06±0.10 ^{bcdef}
C1A2	4.08±0.10 ^a	3.99±0.09 ^a	4.26±0.10 ^{abc}	3.99±0.09 ^{cdefg}
C2A2	4.06±0.10 ^a	3.96±0.09 ^a	4.22±0.10 ^{abc}	3.98±0.09 ^{cdefg}
C3A2	4.10±0.10 ^a	4.02±0.10 ^a	4.30±0.10 ^{abc}	4.12±0.05 ^{bcd}
C1A3	4.07±0.10 ^a	3.98±0.09 ^a	4.17±0.12 ^{abc}	3.97±0.09 ^{defg}
C2A3	4.05±0.10 ^a	3.95±0.09 ^a	4.16±0.10 ^{bc}	3.94±0.09 ^{defg}
C3A3	4.09±0.10 ^a	4.01±0.10 ^a	4.20±0.13 ^{abc}	4.11±0.10 ^{bcd}
C1A4	4.04±0.10 ^a	3.97±0.09 ^a	4.18±0.10 ^{abc}	3.92±0.09 ^{fg}
C2A4	4.02±0.10 ^a	3.94±0.09 ^a	4.15±0.10 ^{bc}	3.91±0.09 ^{fg}
C3A4	4.06±0.10 ^a	4.00±0.09 ^a	4.19±0.12 ^{abc}	4.05±0.13 ^{cdef}
C1A5	4.10±0.10 ^a	4.01±0.09 ^a	4.36±0.11 ^{ab}	4.24±0.10 ^b
C2A5	4.08±0.10 ^a	4.00±0.09 ^a	4.31±0.10 ^{abc}	4.17±0.10 ^{bc}
C3A5	4.12±0.10 ^a	4.06±0.10 ^a	4.39±0.11 ^a	4.51±0.11 ^a

Different letters showed a significant difference in each of the four columns ($p \leq 0.05$).

Table 6 Analytical variances of the effect of type of flexible containers, packing conditions and storage times on the total count of aerobic bacteria, total Coliform, mold and yeast ($\log \text{cfu g}^{-1}$), and pH of dried Kashk

Variables	Total count		Coliform		Mold and Yeast		pH	
	(F)	(P)	(F)	(P)	(F)	(P)	(F)	(P)
Effect of Flexible Multi-Layer Packs (C)	428.028**	0.000	36826.847**	0.000	360.825**	0.000	12.070**	0.000
Effect of Packing Conditions (A)	138.724**	0.000	166101.917**	0.000	2128.434**	0.000	16.820**	0.000
Effect of Keeping Times (C)	880.885**	0.000	71139.623**	0.000	970.652**	0.000	44.177**	0.000
Interaction (C*A)	0.800 ^{ns}	0.604	151.840**	0.000	11.266**	0.000	0.158 ^{ns}	0.996
Interaction (C*Z)	1.452 ^{ns}	0.201	305.944**	0.000	11.364**	0.000	2.471*	0.027
(A*Z) Interaction	1.424 ^{ns}	0.164	542.927**	0.000	5.305**	0.000	3.051**	0.001
(C*A*Z) Interaction	0.968 ^{ns}	0.513	173.327**	0.000	7.132**	0.000	0.133 ^{ns}	1.000

The sign ** represents a significant difference ($p \leq 0.01$).

The sign * represents a significant difference ($0.05 \leq p \leq 0.01$).

The sign ns represents no significant difference ($p \leq 0.01$).

۴- نتیجه گیری کلی

استفاده از بسته‌بندی (MAP) با اتمسفر اصلاح شده، برای کنترل فساد کافی نیست، اما روند فساد به تأخیر افتاده است، وجود دی‌اکسیدکربن به عنوان یک فاکتور اصلی ضد باکتریایی در اتمسفر اصلاح شده می‌باشد و میزان تأثیر گاز بستگی به غلظت اولیه و نهایی گاز درون بسته و درجه حرارت نگهداری و جمعیت اولیه میکروبی دارد. CO_2 مرحله تاخیر و زمان تولید باکتری‌های هوازی را طولانی می‌کند و همچنین محیط را مقداری اسیدی کرده و این مسئله باعث کاهش رشد می‌شود. البته این تکنولوژی برای مواد غذایی که میکروارگانیسم عامل

فساد آنها هوازی، گرم منفی، سرمدوست است موثر است. طبق نتایج بهترین شرایط نگهداری متعلق به نمونه‌های موجود در لفاف چهار لایه به همراه ترکیب گازی (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) است که تا ۶۰ روز عمر ماندگاری کشک خشک را افزایش داد. بسته‌بندی نمونه‌ها با لفاف چهار لایه نسبت به دو لفاف دیگر ویژگی حفاظت‌کنندگی بهتری دارد. زیرا نفوذپذیری عبور بخار آب در بسته‌هایی با لفاف چهار لایه کمتر از لفاف سه لایه بود، و همین‌طور نوع اتمسفر ترکیب گازی یک، استفاده از بسته‌بندی با لفاف ۴ لایه به همراه ترکیب گازی برای نگهداری ماندگاری کشک خشک در زمان طولانی بهتر است. کمترین تغییر در pH مربوط به نمونه‌های

- Agro science (Article in Russian) Republic of Armenia. 1-2, 73-77 b.
- [13] Zand, N., Mailova, E. 2010. The influence of thermal processing on hermit city of flexible packaging. Journal of Agronomy and Agroecology, (Article in Russian) Republic of Armenia. 2, 96-99 c.
- [14] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 1992. Milk and its products - Total counting of the form - The colony Aerobic microorganisms count method. Iranian National Standard No. 9263. (In Persian).
- [15] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2007. Milk and its products - Total counting of the form - The colony count method. Iranian National Standard No. 9263. (In Persian)
- [16] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2007. Milk and its products - Counting units of mold and yeast colonies in plates at 25. Iranian National Standard No. 10154. (In Persian)
- [17] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. 2006. Milk and its products - measure pH method. Iranian National Standard No. 2852. (In Persian)
- [18] Shabanpour, B., Zolfaghari, M. 2012. Processing and packaging of fish with changed atmosphere. Gorgan Uni. Press, 187-220-222p. (In Persian)
- [19] Killefer, D.H. 1930. Carbon dioxide preservation of meat and fish. Journal of Industrial Engineering Chemistry. 22, 140-143
- [20] Hanks, H. 1981. Shelf life studies on carbon dioxide packaged finfish from the gulf of Mexico. Journal of food science. 45, 157-162.
- [21] Zand, N., Sotoudeh, B. 2013. The influence of MAP on sensory properties of chicken meal. Journal of Annals of Biological Research. 4,7, 175-181 a.
- [22] Zand, N., Allahyari, A.S. 2013. The effect of MAP on sensory evaluation of candy bread. Journal of Annals of Biological Research. 4,7, 243-251 b.
- [23] Zand, N., Hafez pour, A. 2016. Effect of MAP and Multi-layer Flexible Films on the Growth of Aerobic Bacteria of Fresh Ostrich Meat. Journal of International Medical Research & Health Sciences. 5,11, 143-151 a.
- [24] Zand, N., Sakian Mohammadi, A. 2016. Influence of MAP and Multi-layer Flexible بسته‌بندی شده با لفاف ۴ لایه در (۳۰ درصد N_2 و ۷۰ درصد CO_2) و بیشترین تغییر مربوط به نمونه‌های بسته‌بندی شده با لفاف ۳ لایه (آلومینیوم ضعیف) و نمونه شاهد بود.

۵- منابع

- [1] Jung, H. 2007. Packaging for nonthermal processing of food. Departement of food science university of manitoba, 248p.
- [2] Paine, Y., Frank, A. 1992. Modified atmosphere packaging. A Hand Book of Food. Pp: 242-246.
- [3] Adeli, A. 2008. Principles of marketing and packaging of aquatic animals. Tehran Publications .Press, 204p. (In Persian)
- [4] Mirnezami Ziabari, S.H. 2010. Food Packaging Principles, Aijj Publications. Press, 337p (In Persian)
- [5] Zand, N., Allahyari, A.S. 2013. The influence of MAP and different multilayer flexible films on shelf life extension of candy bread. Journal of European Zoological Research. 2,3, 29-38
- [6] Zand, N., Sotoudeh, B. 2013. The effect of MAP and multilayer flexible pouch for shelf life prolongation of chicken meal. Journal of European Zoological Research. 2,2, 26-33 b.
- [7] Karim, G.E. 2013. Health and technology of Tehran milk. Tehran Univ. Press, 2880p. (In Persian)
- [8] Taimoori Yansari, A. 2006. Milk production and processing. 1th Edition. Avaye Msih Publications. Press, 668p. (In Persian)
- [9] Sanhya, M. 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. Journal of LWT - Food Science and Technology. 43, 381-392.
- [10] Caleb, O.J., Opara, U.L., Witthuhn, C.R. 2012. Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils: a review. Journal of Food and Bioprocess Technology. 5, 15-30.
- [11] Zand, N., Mailova, E. 2010. Combined packaging material flexible packs characteristics dependence on changes of components composition and quantity. Processing s of Engineering Academy of Armenia, (Article in Russian) Republic of Armenia. 7,1, 129-132 a.
- [12] Zand, N., Mailova, E. 2010. The strength of the weld seams of flexible packages depending on the sealing mode. Journal of

- European Experimental Biology. 3,3, 246-253 b.
- [32] Sotoudeh, B., Zand, N., Tajabadi, E.M. 2013. The usage of MAP for shelf life extension of packed spicy chicken meal. Journal of European Experimental Biology. 3, 617-623.
- [33] Zand, N., Sakian Mohammadi, A., Eshaghi, M. 2016. Influence of MAP and Multi-layer Flexible Pouches on Clostridium Count of Smoked Kutum Fish (*Rutilus frisii kutum*). Journal of International Medical Research & Health Sciences. 5,11, 191-198 a.
- [34] Zand, N., Hafez pour, A., Asadolahi, S. 2016. Effect of MAP and Multi-layer Flexible Films on the Growth of Anaerobic Bacteria of Fresh Ostrich Meat. Journal of International Medical Research & Health Sciences. 5,11, 182-190 b.
- [35] Zand, N., Sakian Mohammadi, A. 2016. Influence of MAP and Multi-layer Flexible Films on growth of Anaerobic Bacteria of Smoked Kutum Fish (*Rutilus frisii kutum*). Journal of Der Pharma Chemical. 8,19, 624-631 a.
- [36] Zand, N., Mailova, E. 2009. The study of The barrier properties of the combined films. Journal of Annals of Agrarian Science (Article in Russian) Republic of Georgia. 7,3, 94-95.
- [37] Zand, N., Hafez pour, A. 2016. Influence of Modified Atmosphere Packaging and Multi-layer Flexible Pouches on pH of Fresh Ostrich Meat. Journal of Entomology and Applied Science Letters. 3,5, 169-176 b.
- Pouches on Aerobic Bacteria Count of Smoked Kutum Fish (*Rutilus frisii kutum*). Journal of International Medical Research & Health Sciences. 5,11, 174-181 b.
- [25] Ehsani, j., Mohsen zadeh, M., khazadi, S., Jamshidi, A.A. 2012. New ways of storing and packing cheese Strassitello. Twenty-second National Congress of Natural Sciences and Food Industry, Gorgan, J. of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
- [26] Parry, R.T. 1993. Introduction, In principles and application of Modified Atmosphere packaging of food. Blasckie Academic & Professional, Glasgow, Pp: 1-1.
- [27] Kakouri, A., Nychas, G.J.E. 1994. Storage of poultry meat under modified atmosphere or vacuum packs. Journal of Applied Bacteriology. 76,2, 163-172.
- [28] Cai, P., Harrison, M.A., Huang, Y.W. & Silva, L. 1997. Toxin production by clostridium botulinum type E in packaging channel catfish. Journal of food protect. 60, 1358-1363.
- [29] Zand, N., Allahyari, A.S. 2013. The effect of MAP on sensory evaluation of candy bread. Journal of Annals of Biological Research. 4,7, 243-251 b.
- [30] Zand, N. 2013. Sterilization of packed mushroom meal by high frequency electromagnetic field. Journal of European Experimental Biology. 3,2, 598-607 a.
- [31] Zand, N. 2013. Combination of high frequency electromagnetic induction with thermal processing for shelf life prolongation of packed vegetables meal. Journal of

The effect of modified atmosphere packaging and flexible films on growth of bacterias of dried kashk

Zand, N.^{1*}, Shahab Lavasani, A.²

1. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.
2. Innovative Technologies in Functional Food Production Research Center, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

(Received: 2020/01/17 Accepted: 2020/08/31)

In this study the effect of different concentrations of three gas mixture (carbon dioxide, nitrogen, oxygen), vacuum conditions and also ordinary conditions as control and flexible multi-layer films for extending shelf life of dried kashk at 20 °C were evaluated. Ordinary conditions as control packaging were compared with four type of modified atmosphere packaging: ((70% N₂ + 30% CO₂), (48% CO₂ + 48% N₂ + 4% O₂), (30% N₂ + 70% CO₂)), and vacuum conditions, in this project. These samples, (Dried Kashk) were packaged in different flexible multi-layer films under modified atmosphere packaging, 3-layer {PET(12)/ AL(12) (100)}, 4-layer {PET(12)/AL(7) /PET(12)/LLD (100) } and 3-layer {PET(12)/AL(7)/LLD(100)}. Experiments were performed on samples as follows (total aerobics count, total anaerobic count, pH ,organoleptically evaluations, and analyzed by SPSS. The shelf life , dried kashk were reported in 4-layer , under conditions (70% CO₂ + 30% N₂) & (vacuum) & (48% CO₂+ 48% N₂+ 4% O₂) 60, 55, 45 days in (30% CO₂ + 70% N₂) and in ordinary conditions were 40 , 30 days, in 3 layer (AL:12), under conditions (70% CO₂ + 30% N₂) & (vacuum) & (48% CO₂+ 48% N₂+ 4% O₂) 50, 45, 35 days and in (30% CO₂ + 70% N₂) and in ordinary conditions were about 30,25 days, with 3 layer (AL:7), under conditions (70% CO₂ + 30% N₂) & (vacuum) & (48% CO₂+ 48% N₂+ 4% O₂) 40, 35, 30 days, in (30% CO₂ + 70% N₂) conditions 25 days and in ordinary condition were 20 days.

Therefore, the using of gas composition (30% nitrogen and 70% carbon dioxide) and packaging with 4-layers were used to maintain the long-term and antimicrobial properties of dried kashk and have a good effect on the amount of pH was better.

Keywords: Modified atmosphere packaging, Microbial population , Dried kashk, Flexible multi-layer films.

* Corresponding Author E-mail Address: n_zand2008@yahoo.com